

Facultad de Ciencias Médicas

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Tesis de Doctorado

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA
ESTABILIDAD DE PRINCIPIOS ACTIVOS Y SU
INTERACCIÓN CON EXCIPIENTES EN
FORMULACIONES FARMACÉUTICAS LÍQUIDAS
DE USO ORAL PARA EL TRATAMIENTO DE
CARDIOPATÍAS**



FCM Facultad de Ciencias
Médicas · UNR



Presentada por Bioquim. Farm. María Alejandra Operto

Rosario, Santa Fe, Argentina

-2023-

“Desarrollo y evaluación de la estabilidad de principios activos y su interacción con excipientes en formulaciones farmacéuticas líquidas de uso oral para el tratamiento de cardiopatías”

María Alejandra Operto

Bioquímica, Universidad Nacional del Litoral

Farmacéutica, 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 y en el Área Análisis de Medicamentos dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y el Instituto de Química de Rosario, durante el período comprendido entre 2018 y 2023, bajo la dirección de la Dra. Silvana E. Vignaduzzo y la co-dirección del Dr. Darío Leonardi.

"SABEMOS MUY BIEN QUE LO QUE ESTAMOS HACIENDO NO ES MÁS QUE UNA GOTA EN EL OCÉANO. PERO SI ESA GOTA NO ESTUVIERA ALLÍ, AL OCÉANO LE FALTARÍA ALGO" Madre Teresa.

"NUNCA CONSIDERES EL ESTUDIO COMO UNA OBLIGACIÓN, SINO COMO LA OPORTUNIDAD PARA PENETRAR EN EL BELLO Y MARAVILLOSO MUNDO DEL SABER" Albert Einstein.

Agradecimientos: *Quisiera agradecer a mis directores de tesis, Silvana y Darío, que en todo momento me guiaron y trabajaron conmigo para llevar adelante este proyecto, a todos quienes con su experiencia y conocimientos me acompañaron en el camino de la investigación. A mi familia y amigos a los que siempre puedo recurrir en los momentos difíciles.*

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Páginas
Índice de Tablas.....	i
Índice de Figuras.....	iii
Abreviaturas y Símbolos.....	v
Presentaciones en Reuniones Científicas.....	vii
Publicaciones en Revistas Internacionales.....	viii
RESUMEN.....	1
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	
1. Introducción.....	3
1.1 Historia de los medicamentos.....	3
1.2 Los orígenes.....	4
1.3 El camino hacia la farmacia industrial.....	7
1.4 Formulaciones huérfanas: un desafío actual.....	9
1.4.1 Disfagia: un trastorno que puede presentarse en todas las edades.....	10
1.5 Factores por considerar para el diseño de formas farmacéuticas orales pediátricas/geriátricas.....	11
1.6 Selección de los Ingredientes Farmacéuticos Activos.....	13
1.6.1 Carvedilol.....	14
1.6.2 Bisoprolol fumarato.....	14
1.6.3 Amiodarona clorhidrato.....	15
1.6.4 Atenolol.....	15
1.7 Diferencias entre los tratamientos para adultos y pediátricos.....	17
1.8 Formas farmacéuticas.....	17
1.8.1 Tecnología del desarrollo.....	18
1.8.2 Formas farmacéuticas líquidas orales.....	18
1.8.2.1 Jarabes.....	19
1.8.2.2 Bebidas.....	19
1.8.2.3 Soluciones.....	20
1.9 Control de calidad.....	21
1.10 Estudios de estabilidad.....	23
1.10.1 Estudios de estabilidad química.....	23
1.10.2 Estudios de estabilidad microbiológica.....	24
1.11 Diseño de experimentos.....	24
1.11.1. Diseño Plackett-Burman.....	26
1.12 Objetivo.....	26
1.12.1 Objetivo General.....	26
1.12.2 Objetivos Particulares.....	26

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2. Materiales y métodos.....	29
2.1 Equipamiento, Instrumental analítico y de apoyo.....	29
2.1.1 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).....	29
2.1.2 Separaciones cromatográficas.....	29
2.1.2.1 Determinación de Carvedilol.....	29
2.1.2.2 Determinación de Bisoprolol Fumarato.....	29
2.1.2.3 Determinación de Amiodarona Clorhidrato.....	29
2.1.2.4 Determinación de Atenolol.....	30
2.1.3 Propiedades de apariencia física y medición de pH.....	30
2.1.4 Pesadas.....	30
2.1.5 Agitación y sonicación.....	31
2.2 Adquisición y procesamiento computacional de los datos cromatográficos y espectroscópicos.....	31
2.2.1 Cromatogramas.....	31
2.2.2 Gráficos.....	32
2.2.3 Análisis estadístico de los datos.....	32
2.2.3.1. Test “t”.....	32
2.2.3.2. Test de Friedman.....	33
2.2.3.3. Prueba de Wilcoxon.....	33
2.3 Ingredientes farmacéuticos activos y excipientes.....	34
2.3.1 Ingredientes farmacéuticos activos.....	34
2.3.2 Excipientes.....	34
2.4 Reactivos y soluciones buffer para cromatografía.....	35
2.5 Soluciones madre y de trabajo para CLAE.....	35
2.6 Reactivos, soluciones y diluciones de las formulaciones desarrolladas.....	35
2.6.1 Gotas de Carvedilol.....	35
2.6.1.1 Preparación de las muestras del diseño Plackett-Burman.....	35
2.6.1.2 Análisis de enmascaramiento del sabor.....	37
2.6.2. Gotas de Amiodarona Clorhidrato.....	37
2.6.3 Jarabe de Amiodarona Clorhidrato.....	38
2.6.4 Gotas de Bisoprolol Fumarato.....	38
2.6.5 Jarabe de Bisoprolol Fumarato.....	39
2.6.6. Bebida de Atenolol.....	39

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Introducción.....	43
3.1.1 Gotas de Carvedilol.....	44
3.1.2 Etapa de screening.....	44
3.1.3 Mejora de la estabilidad física de las formulaciones.....	49
3.1.4 Estudios de estabilidad microbiológico.....	52

3.1.5 Análisis de enmascaramiento del sabor.....	53
3.1.6 Conclusiones.....	55
3.2 Introducción.....	57
3.2.1 Gotas de Bisoprolol fumarato.....	59
3.2.1.1 Estudios de estabilidad química.....	59
3.2.1.2 Estudios de estabilidad microbiológica.....	63
3.2.1.3 Conclusión gotas de Bisoprolol fumarato.....	63
3.2.2 Jarabes de Bisoprolol fumarato.....	64
3.2.2.1 Estudios de estabilidad química.....	64
3.2.2.2 Estudios de estabilidad microbiológica.....	68
3.2.2.3 Conclusión jarabes de Bisoprolol fumarato.....	68
3.2.3 Conclusiones.....	69
3.3. Introducción.....	71
3.3.1 Etapa de screening.....	74
3.3.1.1 Gotas de Amiodarona clorhidrato.....	75
3.3.1.2 Jarabe Amiodarona.....	75
3.3.1.3 Estudios de estabilidad microbiológico.....	78
3.3.2 Conclusiones.....	79
3.4. Introducción.....	81
3.4.1 Bebida de Atenolol.....	82
3.4.1.1 Etapa de screening.....	82
3.4.2 Estudios de estabilidad química.....	83
3.4.3 Estudios de estabilidad microbiológica.....	84
3.4.4 Conclusiones.....	85
CAPÍTULO 4 CONCLUSIONES	
Gotas de Carvedilol.....	88
Gotas y Jarabes de Bisoprolol Fumarato.....	88
Gotas y Jarabe de Amiodarona Clorhidrato.....	89
Bebida de Atenolol.....	90
Conclusión General.....	91
Referencias Bibliográficas.....	92
Anexo.....	..105

Índice Tablas

Tabla 1.1. Factores por considerar en la selección de una forma de dosificación oral	13
Tabla 1.2. Dosis recomendadas en pediatría y adultos	17
Tabla 1.3. Condiciones de los estudios de larga duración y acelerados	24
Tabla 2.1. Diseño Plackett-Burman para la selección de factores en el desarrollo de gotas de Carvedilol.....	36
Tabla 3.1.1. Diseño Plackett-Burman: screening de factores que afectan la solubilidad de Carvedilol	45
Tabla 3.1.2. Análisis de la variancia de la recuperación de Carvedilol usando un diseño Plackett-Burman	46
Tabla 3.1.3. Apariencia visual y recuperaciones de CAR a 25°C (TA).....	48
Tabla 3.1.4. Composiciones y métodos aplicados para obtener las diferentes formulaciones	50
Tabla 3.1.5. Apariencia visual y recuperaciones de CAR en diferentes condiciones de almacenamiento	51
Tabla 3.1.6. Valores de pH de las formulaciones de Carvedilol durante el período de almacenamiento	52
Tabla 3.1.7. Resultados del análisis microbiológico de las formulaciones a 180 días de su elaboración.....	53
Tabla 3.2.1. Composición final, densidad y pH de gotas de Bisoprolol conteniendo 2,5 y 5 mg mL ⁻¹	59
Tabla 3.2.2. Recuperaciones de Bisoprolol 2,5 y 5 mg mL ⁻¹ inicial y a los 6, 18 y 24 meses de su elaboración, conservadas a 4, 25 y 40°C	60
Tabla 3.2.3. Valores de pH de las gotas de Bisoprolol fumarato durante el período de almacenamiento estudiado.....	60
Tabla 3.2.4. Recuperación de Bisoprolol fumarato contenido en G1 y G2 luego del almacenamiento a 4 y 25 °C y comparación estadística de los resultados.....	61
Tabla 3.2.5. pH final de las gotas de Bisoprolol fumarato G1 y G2 luego del almacenamiento a 4 y 25°C y comparación estadística de los resultados	62
Tabla 3.2.6. Estudios microbiológicos de las formulaciones en las diferentes condiciones de almacenamiento.....	63
Tabla 3.2.7. Composición final, densidad y pH de jarabes de Bisoprolol fumarato conteniendo 2,5 y 5 mg mL ⁻¹	64
Tabla 3.2.8. Recuperaciones de Bisoprolol fumarato 2,5 y 5 mg mL ⁻¹ a los 6, 18 y 24 meses de su elaboración, conservadas a 4, 25 y 40°C	65

Tabla 3.2.9. Valores de pH de los jarabes de Bisoprolol fumarato durante el período de almacenamiento estudiado	66
Tabla 3.2.10. Recuperación de Bisoprolol fumarato contenido en J1 y J2 luego del almacenamiento a 4 y 25 °C y comparación estadística de los resultados	66
Tabla 3.2.11. pH final de los jarabes de Bisoprolol fumarato J1 y J2 luego del almacenamiento a 4 y 25°C y comparación estadística de los resultados	67
Tabla 3.2.12. Estudios microbiológicos de los jarabes de Bisoprolol fumarato en las diferentes condiciones de almacenamiento.....	68
Tabla 3.3.1. Efectos secundarios de Amiodarona clorhidrato	72
Tabla 3.3.2. Composición final de gotas y jarabe de Amiodarona Clorhidrato	76
Tabla 3.3.3. Recuperaciones de Amiodarona clorhidrato	76
Tabla 3.3.4. Valores de pH de las gotas y jarabes de Amiodarona clorhidrato durante el período estudiado.....	78
Tabla 3.3.5. Resultados del análisis microbiológico de las formulaciones orales de Amiodarona clorhidrato.....	78
Tabla 3.4.1. Composición final bebidas Atenolol.....	83
Tabla 3.4.2. Estudios de estabilidad acelerados de la bebida (F3) de Atenolol	83
Tabla 3.4.3. Recuperación de Atenolol y pH final luego del almacenamiento a 4 y 25 °C y comparación estadística de los resultados.....	84
Tabla 3.4.4. Estudios microbiológicos durante el almacenamiento en diferentes las condiciones de la bebida de Atenolol.....	85

Índice Figuras

Figura 1.1. Estructura química de Carvedilol	14
Figura 1.2. Estructura química de Bisoprolol Fumarato.....	14
Figura 1.3. Estructura química de Amiodarona Clorhidrato	15
Figura 1.4. Estructura química Atenolol	16
Figura 3.1.1. Estructura química de Carvedilol. Rojo: NH alifático. Azul: NH carbazol	46
Figura 3.1.2. Control visual gotas de Carvedilol 3mg mL ⁻¹ , 10% v/v PEG 400 (C1); 5mg mL ⁻¹ , 20% v/v PEG 400 (C3).....	48
Figura 3.1.3. Control visual gotas de Carvedilol 3mg mL ⁻¹ , 15% v/v PEG 400 (C2); 5mg mL ⁻¹ , 27% v/v PEG 400 (C4).....	48
Figura 3.1.4. Cromatograma correspondiente a la formulación C4 conteniendo 5 mg mL ⁻¹ de CAR y 27% p/v de PEG a los 30 días de su elaboración	49
Figura 3.1.5. Control visual de las formulaciones en A: F1 M2 (Heladera), en B: F2 M2 (Temperatura ambiente) y C: F2 M2 (Heladera) a los 180 días de su elaboración	51
Figura 3.1.6. Acidez de dosis inicial y media (basada en F1), y dosis máxima (basada en F2), todas ellas diluidas en leche. Formulaciones de Carvedilol (CAR) 3 y 5 mg mL ⁻¹ sin diluir	55
Figura 3.2.1: Esquema de dosificación en el tratamiento con Bisoprolol fumarato	58
Figura 3.2.2. Control visual de las gotas de Bisoprolol a los 24 meses de su elaboración. A: Bisoprolol 2,5 mg mL ⁻¹ conservada a 25°C; B: Bisoprolol 2,5 mg mL ⁻¹ conservada a 4°C; C: Bisoprolol 5 mg mL ⁻¹ conservada a 25°C; D: Bisoprolol 5 mg mL ⁻¹ conservada a 4°C.	62
Figura 3.2.3. Control visual de los jarabes de Bisoprolol a 24 meses de su elaboración. A: Bisoprolol 2,5 mg mL ⁻¹ conservada a 25°C; B: Bisoprolol 2,5 mg mL ⁻¹ conservada a 4°C; C: Bisoprolol 5 mg mL ⁻¹ conservada a 25°C; D: Bisoprolol 5 mg mL ⁻¹ conservada a 4°C	67
Figura 3.3.1. Gotas y jarabe de Amiodarona clorhidrato. A: Gotas, 25 mg mL ⁻¹ conservada a 4°C durante 90 días; B: Gotas, 50 mg mL ⁻¹ conservada a 4°C durante 30 días; C: Jarabe, 25 mg mL ⁻¹ conservado a 4°C durante 30 días	77
Figura 3.4.1. Control visual de la bebida de Atenolol. A: almacenada a 4°C, B: almacenada a 25°C y C: almacenada a 40°C/75%HR durante 6 meses.	85

Abreviaturas y Símbolos

Abreviatura o símbolo	Significado
%p/p	Concentración porcentual peso en peso
%p/v	Concentración porcentual peso en volumen
a. C.	Antes de Cristo
AMIO	Amiodarona clorhidrato
ANMAT	Administración nacional de medicamentos, alimentos y tecnología médica
ANOVA	Análisis de varianza (del inglés análisis of variance)
ATN	Atenolol
BISO	Bisoprolol Fumarato
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación
BSC	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (del inglés Biopharmaceutics Classification System)
CA	Condición de almacenamiento
CAR	Carvedilol
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CMAT	Conteo de microbios aerobios totales
CMC 10000	Carboximetilcelulosa 10000
CMC 4000	Carboximetilcelulosa 4000
CTHyL	Conteo total combinado de hongos filamentosos y levaduras
DOF	Disfagia orofaríngea
ECA	Enzima convertidora de la angiotensina
E coli	Escherichia coli
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
FA	Fibrilación auricular
FV	Fibrilación ventricular
F	Formulación
FI	Fuerza iónica
g	Gramos
Gli	Glicerina
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
HR	Humedad relativa
IC	Insuficiencia cardíaca

ICFEr	Fracción de eyección reducida
ICH	Conferencia Internacional de Armonización (del inglés International Conference on Harmonization)
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
IP	Del inglés “Indian Pharmacopoeia”
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PSVT	Taquicardia supraventricular paroxística (del inglés Paroxysmal supraventricular tachycardia)
PA	Pro-análisis
PAH	Hipertensión arterial pulmonar (del inglés pulmonary arterial hypertension)
PEG 400	Polietilenglicol 400
POE	Procedimiento operativo estándar
PPG	Propilenglicol
rpm	Revoluciones por minuto
SNEDDS	Sistema de administración de fármacosautonanoemulsionante (del inglés Self Nano-Emulsifying Drug Delivery System)
Sor	Sorbitol
TV	Taquicardia ventricular
SGPT	Transaminasa sérica glutamicopirúvica (del inglés Serum glutamic pyruvic transaminase)
SGOT	Transaminasa sérica glutámico oxalacética (del inglés Serum glutamic oxalacetic transaminase)
UE	Unión Europea
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
USP	Del inglés (United State Pharmacopeia)

Presentaciones en Reuniones Científicas

M. A. Operto, P. M. Castellano, S.E. Vignaduzzo, “Desarrollo y optimización de una formulación oral líquida de carvedilol aptas para pacientes pediátricos y adultos” 1° Reunión conjunta, 5ta 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. A. Operto, P. M. Castellano, S.E. Vignaduzzo, “Desarrollo y optimización de gotas de carvedilol aplicando diseño de experimentos”. 6° Jornadas profesionales Farmacéuticas, FEFARA, 7 de junio de 2019, Mar del Plata, Buenos Aires.

M. A. Operto, P. M. Castellano, S.E. Vignaduzzo, “Desarrollo, optimización y estudios de estabilidad de soluciones orales de carvedilol. Evaluación de dos métodos de elaboración”. XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 26 y 27 de noviembre de 2019, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Rosario.

M. A. Operto, S. E. Vignaduzzo, “Desarrollo y estudios de estabilidad de formulaciones orales de bisoprolol para pacientes con trastornos de deglución”. XXII Congreso y XL Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 24 y 25 de noviembre de 2020. Modalidad virtual.

M. A. Operto, S. E. Vignaduzzo, “Development and stability studies of bisoprolol oral formulations for patients with swallowing disorders”, 6ta Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas” (RICiFa) 2020+1, 10,11 y 12 de noviembre de 2021, Córdoba, Argentina.

M. A. Operto, S. E. Vignaduzzo, “Desarrollo y evaluación de la estabilidad de dos formulaciones orales líquidas de amiodarona”. XXIV Congreso y XLII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 1 y 2 de diciembre de 2022.

Publicaciones en Revistas Internacionales

Flexible New Dosage Forms Containing Carvedilol for the Treatment of Patients with Cardiovascular Disorders: Development, Stability, Palatability, and Microbiological Studies.

María Alejandra Operto, Rubén Maggio, Darío Leonardi, Silvana Vignaduzzo. AAPS PharmSciTech (2023) 24:159. <https://doi.org/10.1208/s12249-023-02612-w>

RESUMEN

Introducción

Los niños son frecuentemente tratados con medicamentos que nunca fueron desarrollados ni diseñados para ellos, simplemente para su tratamiento se adaptan y manipulan medicamentos usados en adultos. Por otra parte, los pacientes adultos mayores representan un grupo heterogéneo con un amplio rango de variaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas, que pueden complicar aún más la dosificación. Todas las modificaciones realizadas con el fin de subsanar las dificultades de deglución o dosificación fraccionada pueden afectar la estabilidad física y química del principio activo, y la actividad farmacológica del medicamento a través de un aumento o disminución de la biodisponibilidad, lo que puede conducir a efectos adversos, toxicidad o disminución de la eficacia. En el presente trabajo de Tesis se plantea el desarrollo de formulaciones líquidas orales (gotas, jarabes y suspensiones) para el tratamiento de cardiopatías en pacientes pediátricos, adultos mayores y pacientes con disfagia. Las mencionadas formulaciones presentaron como ingredientes farmacéuticos activos: Carvedilol, Bisoprolol Fumarato, Amiodarona Clorhidrato y Atenolol.

Resultados

1) **Carvedilol.** Se desarrollaron dos formulaciones líquidas, para ser administradas en forma de gotas conteniendo 3 y 5 mg mL⁻¹ de Carvedilol. Estas formulaciones fueron almacenadas en envases de vidrio tipo III color ámbar, resultando ser fisicoquímica y microbiológicamente estables al menos durante 6 meses. Los estudios de palatabilidad realizados empleando leche como diluyente, demostraron mejorar el sabor de estas formulaciones, lo que garantizaría la adherencia al tratamiento por parte del paciente.

2) **Bisoprolol Fumarato.** Se desarrollaron dos formulaciones líquidas para ser administradas en forma de gotas, conteniendo 2,5 y 5 mg mL⁻¹ de Bisoprolol Fumarato. Estas formulaciones fueron almacenadas en envases de vidrio tipo III color ámbar, resultando ser fisicoquímica y microbiológicamente estables durante al menos 18 meses. Por otro lado, se desarrollaron dos jarabes conteniendo 2,5 y 5 mg mL⁻¹ de Bisoprolol

Fumarato. Estas formulaciones fueron almacenadas en envases de vidrio tipo III color ámbar, resultando ser fisicoquímica y microbiológicamente estables durante al menos 18 meses.

3) **Amiodarona Clorhidrato.** Se desarrollaron dos formulaciones líquidas, gotas de Amiodarona Clorhidrato conteniendo 25 (G1) y 50 (G2) mg mL⁻¹ del ingrediente farmacéutico activo respectivamente. La formulación G1 fue estable fisicoquímica y microbiológicamente durante al menos 3 meses, conservada en heladera. En las mismas condiciones, G2 fue estable por 30 días. También se desarrolló un jarabe conteniendo 25 mg mL⁻¹ de Amiodarona Clorhidrato, que resultó ser estable fisicoquímica y microbiológicamente durante 30 días conservado en heladera.

4) **Atenolol.** Se desarrolló una bebida conteniendo 10 mg mL⁻¹ de Atenolol. Esta formulación fue almacenada en envases de vidrio tipo III color ámbar, resultando estable fisicoquímica y microbiológicamente durante al menos 6 meses. Al no contener azúcar, esta bebida es apta para tratar pacientes diabéticos de todas las edades.

Conclusiones

Se han desarrollado gotas, jarabes y suspensiones para el tratamiento de cardiopatías en pacientes que presentan trastornos de la deglución de todas las edades. Las formulaciones fueron elaboradas con excipientes seguros, libres de alcohol y en dosis aprobadas para la población pediátrica y geriátrica, permitiendo, además, flexibilidad en la dosificación. Finalmente, a excepción de Amiodarona Clorhidrato, las formulaciones desarrolladas a partir de los demás ingredientes farmacéuticos activos han demostrado ser estables fisicoquímica y microbiológicamente durante al menos 6 meses.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de los medicamentos

Hablar de la historia de los medicamentos es hablar de la historia del hombre. El pensamiento mágico fortaleció el poder de los conjuros y las pócimas, además de darle autoridad y prestigio a aquel que podía curar. Aún en las sociedades más primitivas y a pesar del desconocimiento de las causas de las enfermedades, el tratamiento de los síntomas observados originó la aparición de “especialistas”. Se haya tratado de brujos, doctores, mujeres sabias, curanderos, sacerdotes, médicos o practicantes con cualquier otro nombre, por prueba y error y fruto de la observación cuidadosa, estos especialistas pronto aprendieron a conocer las cualidades de las diferentes clases de plantas que crecían a su alrededor. Así, las primeras comunidades civilizadas desarrollaron conocimientos básicos sobre las plantas alimenticias, necesarias para el desarrollo corporal, las plantas venenosas, dañinas para la salud y las plantas medicinales, que aliviaban los síntomas de la enfermedad.

El surgimiento de la medicina como oficio, en casos como los de Hipócrates y Galeno, estuvo rodeada de prestigio. Aprendieron a manejar sus propios medicamentos, preparados en algunas trastiendas o “boticas”. Los farmacéuticos se iniciaron como simples dispensadores y tuvieron auge entre los árabes, quienes aportaron mucho a la farmacia, civilización donde aparecieron también los primeros recetarios, listados de medicinas o primitivas farmacopeas, como también las primeras boticas. Se introducen los jarabes, el alcohol, y muchas nuevas drogas. Desde los territorios del islam pasa el arte de curar, “Ars Medica”, a la Escuela de Salerno. La medicina y los medicamentos se mantienen en la Edad Media a cargo de los monjes hasta que en el siglo XII aparecen dos textos fundamentales de farmacología: el Antidotarium de la Escuela de Salerno (redactado por Nicolás Prepósito) y el Macer Floridus, poema de 2.200 versos sobre las virtudes de las hierbas. Llega el Renacimiento: Leonardo, Vesalio, Harvey, Paré, Paracelso, entre muchos

otros anatomistas, así las nuevas escuelas médicas y el resurgir de la cirugía, amplían la visión y surge nueva esperanza en la curación.

Vemos entonces que el medicamento fue en el pasado algo más bien mágico, muy distante de lo científico, cuyo poder curativo dependía de la voluntad de los dioses. Pero a partir de los alcaloides y de las drogas de síntesis, el medicamento se convirtió en una verdadera intervención para cambiar el curso de la enfermedad o para prevenir la aparición de esta. Tuvo entonces que poner el médico en la balanza la ecuación riesgo versus beneficio, conocer la eficacia, las interacciones medicamentosas y los efectos colaterales, e incluso tener en cuenta el costo, asunto que con los medicamentos herbales no existía, pues bastaba con hacer una visita a la huerta o a lo sumo a la botica cercana. El medicamento aumenta su eficacia si se acompaña de otras medidas higiénicas como la supresión de tóxicos, ingeridos o del medio ambiente, la dieta balanceada, la práctica de ejercicios físicos y la psicoterapia, aún si esta fuera un simple apoyo al paciente durante su entrevista con el médico. Pero no hay duda de que a partir del aforismo que dice “curar algunas veces, aliviar otras, consolar siempre”, las dos primeras palabras, curar y aliviar, son ya una maravillosa realidad en nuestros días.

1.2. Los orígenes

De la prehistoria, pasando por las edades de bronce y de hierro, llegamos a las primeras civilizaciones. Probablemente en tiempos similares (unos 3.000 años a.C.) aparecen los pueblos de la Mesopotamia: sumerios y acadios, pero particularmente los babilonios; y adicionalmente los egipcios, en el norte de África, los chinos y los indios, todos con su cultura tribal, algo agrícola y un poco más sedentaria, y también con sus pócimas, hierbas y rudimentarios procesos de farmacia. Todos acudían a los dioses, para que tuviesen compasión, por lo que aquellos sanadores babilonios (2.600 años a.C.), eran a la par sacerdotes, médicos y farmaceutas.

Los sumerios (3.000-2.400 a.C.), que desarrollaron la primera civilización urbana, usaban drogas vegetales y habían aprendido a lavar heridas, colocar vendas y efectuar

formulaciones complejas, como la que prescribe “...pulverizar la semilla de la planta del carpintero, la goma de resina y timo. Disolver en cerveza y dar de beber...”¹.

De las medicaciones que han sido identificadas, hay extractos de plantas, resinas y condimentos; algunos de estos preparados tenían propiedades antibióticas o antisépticas, y enmascaraban el mal olor de las heridas. El aceite era el principal bálsamo para las heridas abiertas, lo que prevenía la adherencia del vendaje.

De los babilonios nos queda el famoso código del rey Hammurabi (1.795-1.750 a.C.) que en su parte de medicina reguló la profesión médica y la cirugía, separando además los aspectos diagnósticos y de tratamiento de la preparación de medicamentos, no siempre asociada a magia o superstición, la cual se asignó como especialidad a los boticarios²⁻⁴. Además, desarrollaron un sistema complejo de pesos y medidas, como así métodos de manufactura de jabón, productos fermentados y para la extracción de aromas vegetales. A pesar de ello, las fórmulas farmacéuticas de la Mesopotamia se caracterizan por no ser cuantitativas.

El imperio asirio (1.900-612 a.C.) dejó como legado el caduceo con las serpientes entrecruzadas, muy relacionado con las profesiones de la salud, que llegó a nuestros días por medio de los griegos. Hacia 1.900 a.C., tiendas de perfumistas (del latín, per fumare, a través del humo) operaban activamente en Sipare, antigua capital de Acadia y comercializaban activamente diversos bienes con numerosos pueblos de Asia y Egipto, primitivo signo de globalización de la industria farmacéutica.

La Medicina y la Farmacia llegaron a desarrollarse en Egipto más que en la Mesopotamia asiática. A la civilización egipcia se le debe una de las versiones acerca del origen de la palabra “farmacia”, que sería a través de “far-maki” (“el que concede seguridad”), título que el dios Thot, patrono de los médicos, confirió a un canoero que lo ayudó a cruzar el río de manera segura.

La medicina egipcia que data de alrededor de 2.900 a.C., es tan antigua como la medicina tradicional china, pero anterior a la de la India, reconocida entre otras por el famoso Ayur-Veda del 700 a.C.; el estudio de las prácticas médicas de la época de los

faraones se ha basado en lo encontrado en unos documentos denominados “papiros”. La principal literatura egipcia está representada por los llamados Libros Herméticos del Dios Thot (quien era identificado por los griegos con su dios Hermes), buena parte de los cuales se han perdido. Los papiros médicos son fragmentos de estos libros y son varios los disponibles en la actualidad en diferentes museos y bibliotecas. Tal vez, el más representativo en cuanto a los medios medicamentosos que se utilizaban es el llamado “Papiro de Ebers” (aproximadamente 1.500 a.C.), documento de 110 páginas que incluye 877 recetas y menciona unas 700 “sustancias medicamentosas”. Este papiro también revela algunos conceptos como el de asegurar la calidad de los medicamentos y otros que se han ido desarrollando gradualmente en el tiempo.

Otro papiro que se debe mencionar es el quirúrgico de Edwin Smith, ligeramente anterior al Ebers (aunque ambos se ubican alrededor del 1.550 a.C.); el texto, que comienza con el diagnóstico y tratamiento de las lesiones de la cabeza, llega sólo hasta las lesiones del hombro, pues dicho texto está mutilado. El Ariana (Sushruta Samhita, ó “Colección de Sushruta”), un tratado quirúrgico ayurvédico del siglo VI a.C., es la más antigua contribución de la Farmacia hindú, siendo contemporánea con el ocaso del imperio egipcio y el apogeo del protagonismo griego en el mundo occidental.

La Farmacia de griegos y romanos guarda numerosas similitudes, especialmente, porque los últimos la tomaron de los primeros y no produjeron innovaciones de relevancia.

El mundo griego se nutrió de conocimientos y medicamentos de las grandes civilizaciones que lo precedieron, la mesopotámica y la egipcia. Las limitaciones de la medicina fueron reemplazadas por una multitud de dioses con poderes curativos, entre ellos Apolo y Prometeo, este último, considerado el primer farmacéutico por sus dones como preparador de medicamentos.

Lentamente fue emergiendo la figura del Dios Asclepio (Esculapio), quien adquirió respeto por conocer las propiedades farmacéuticas de las plantas que crecían en las planicies helénicas y se convirtió en sanador, ayudado por sus hijas Hygea y Panacea. El conjunto de cáliz y serpiente sagrada empleados por Hygea en su tarea de auxilio a los

suplicantes, se convirtió en símbolo de la salud, siendo el internacionalmente reconocido símbolo de la Farmacia. En la Grecia antigua nació el primer sistema secular de práctica médica, encabezado por la escuela de Hipócrates, cuyo conocido juramento es la primera manifestación conocida de ética médica.

Lentamente, los aspectos de prevención de la enfermedad y cuidado de la salud de estar a cargo de los brujos y hechiceros de la antigüedad pasaron a manos de los médicos, botánicos y alquimistas.

La primera farmacia de oficina abrió sus puertas en Bagdad en el año 754, producto de la efectiva separación que el mundo árabe realizó entre las profesiones de Farmacia y Medicina (casi cinco siglos antes que en Europa), y el primer uso farmacéutico del agua destilada se describió en el año 975^{5,6}.

1.3. El camino hacia la farmacia industrial

Las primeras Farmacopeas tal como las conocemos actualmente (libros oficiales sobre normas y especificaciones de calidad farmacéutica) aparecieron en Europa en el siglo XVI. La primera concepción elaborada, acerca de una Farmacopea con la que debían registrarse todos los Farmacéuticos surgió en Florencia, Italia y se materializó con el nombre de // *Nuovo Ricettario*, impreso en 1.498, se convirtió en ley para esa ciudad-estado. Como contrapartida, la primera Farmacopea Española tardó casi un siglo más en aparecer y data de 1.581, tres años después de la aparición de la “Gran Farmacopea” china de Li Shih-Chen.

La Farmacopea Londinense de 1.618 fue la primera Farmacopea de uso nacional, que desde su prefacio ya preanunciaba su marcado interés en la calidad de los productos, al afirmar que “...para que éste cure, el primer requisito es asegurar la máxima integridad del medicamento”. En otro pasaje del mismo documento se observa el interés del legislador en uniformar la fabricación, al indicar que “Por el porvenir hemos quitado todo poder de decisión arbitraria de parte del componedor, adoptando medidas uniformes y hemos determinado las dosis, que el Farmacéutico ni aumentará ni disminuirá...”⁷.

Hacia el siglo XVI, las tendencias medievales y renacentistas, que habían convertido la botica en un laboratorio químico, obligaron a los farmacéuticos a familiarizarse con esta materia. Hacia principios del siglo XVII, los Farmacéuticos ya habían alcanzado una talla considerable como Químicos y comenzado a reemplazar antiguas medicinas de dudosa efectividad por preparaciones con mayor base científica.

Paracelso (1.493-1.541) simplificó la importancia de la asociación entre la Química, Farmacia y Medicina al enunciar “Considero necesaria a la química; sin ella no puede haber conocimiento médico”, profundizando sus ideas al afirmar que “el químico puede ser capaz de tomar de cada cosa lo que resulta ventajoso para la gente. La química tiene un solo propósito: preparar medicinas que permiten recuperar la salud perdida”.

El importante papel que la Farmacia desempeñó en el desarrollo inicial de la Química viene indicado por el hecho que, durante los últimos dos tercios del siglo XVIII y el primer tercio del XIX, muchos de los profesores de Química en las universidades europeas más importantes procedían generalmente de la Farmacia. Por ejemplo, el Farmacéutico alemán Friedrich W. A. Sertürner, aisló morfina del opio en su oficina de farmacia de Einbeck, reconociendo la importancia de los alcaloides.

Hasta poco antes de comienzos del siglo XX, los medicamentos eran esencialmente todos de origen natural, estando a cargo del Farmacéutico la preparación de este. El aislamiento de la quinina por parte de los Farmacéuticos Pelletier y Caventou en 1.820, marcó el inicio de la industria farmacéutica y la empresa Merck comenzó a producir en 1.827 en Darmstadt, Alemania, alcaloides en escala industrial. Con el impulso de la revolución industrial, la aparición de fuertes industrias químicas que se orientaron al sector farmacéutico, la producción de medicamentos pasó de ser una manufactura artesanal a una producción en gran escala, caracterizada por la utilización de procesos tecnológicos cada vez más complejos⁸.

Estas modificaciones en el paradigma de fabricación de los medicamentos significaron grandes desafíos tecnológicos, entre ellos, la necesidad de desarrollar formulaciones y formas farmacéuticas capaces de mantener su estabilidad y propiedades

durante un tiempo prolongado y el requisito de ajustar las características de los productos a especificaciones, cuyos límites evolucionaron para ser cada vez más estrechos, y la necesidad de contar con recursos analíticos para controlar tales características.

Estos cambios en el quehacer tradicional del Farmacéutico adquirieron mayor connotación en la segunda mitad del siglo XX. La aplicación intensiva de los métodos de la investigación científica en todas las áreas de la Farmacia, acaecida particularmente después de la segunda guerra mundial, da cuenta de la gran cantidad de fármacos que hoy conforman el arsenal terapéutico⁹⁻¹¹.

1.4. Formulaciones huérfanas: un desafío actual

La aceptabilidad de los medicamentos en pacientes de todas las edades y patologías es fundamental para garantizar la adherencia al tratamiento y el éxito terapéutico.

El diseño de productos farmacéuticos centrados en el paciente puede describirse como “el proceso de identificar las necesidades integrales de los individuos o de la población objetivo de pacientes, y utilizar las necesidades identificadas para diseñar productos farmacéuticos que brinden el mejor beneficio general al perfil de riesgo para esa población objetivo durante el tiempo previsto del tratamiento”¹². La selección y diseño de formas farmacéuticas orales centradas en el paciente sigue siendo uno de los retos más importantes en el desarrollo de medicamentos para poblaciones pediátricas y geriátricas, debido a las diversas necesidades y características de estos grupos de pacientes¹³.

Las comunidades reguladoras y científicas reconocen cada vez más la falta de formulaciones adecuadas para niños y pacientes mayores, dada la prevalencia de medicamentos sin licencia y uso de medicamentos *off-label* (prescritos de manera diferente a la autorizada), modificaciones no documentadas de las formas de dosificación, dificultades en la administración informadas por los pacientes y altas tasas de incumplimiento en los tratamientos¹⁴⁻¹⁶.

Además de ser una carga para los pacientes y sus cuidadores, estas prácticas pueden ser perjudiciales para la seguridad y la eficacia de los medicamentos^{17,18}. Por

ejemplo, los comprimidos no recubiertos suelen dividirse en partes más pequeñas para facilitar su deglución o adquirir una dosis más adecuada al peso corporal; sin embargo, esto podría ser inapropiado para ciertos productos farmacéuticos. La subdivisión de un comprimido podría dar lugar a segmentos desiguales con dosis de fármaco no uniformes^{19,20}. Adicionalmente, este proceso, puede alterar las características de los fármacos modificando su perfil farmacocinético, su efecto farmacológico y la intensidad de los efectos secundarios (diarrea, náuseas, vómitos, etc.). En estas circunstancias, no puede garantizarse la obtención de concentraciones terapéuticas efectivas del fármaco. Mientras que, cuando un comprimido ha sido formulado con un recubrimiento de liberación modificada o entérico, romper el comprimido podría comprometer la función del mismo y, por lo tanto, alterar su biodisponibilidad.

1.4.1. Disfagia: un trastorno que puede presentarse en todas las edades

La disfagia es una forma de trastorno de alimentación que no constituye una enfermedad en sí misma, sino un síntoma de una enfermedad neurológica, anatómica y/o psicósomática, con una incidencia en aumento. Supone la alteración de alguna de las fases de la deglución y, por tanto, del transporte del alimento de la boca al estómago. Según la fase comprometida, se diferencian dos grupos patológicos: disfagia orofaríngea y disfagia esofágica^{21,22}.

La capacidad de ingerir limita la aceptabilidad de las formas farmacéuticas convencionales, como comprimidos y cápsulas. La deglución es un proceso rápido, aunque complejo, que implica dos acciones esenciales: el transporte del bolo y la protección de las vías respiratorias. El reflejo de deglución generalmente se divide en tres fases principales: la fase preparatoria oral, la fase faríngea y la fase esofágica, pudiendo verse afectadas una o varias de ellas en el paciente con disfagia²³. El desarrollo de la deglución tiene lugar en una serie de fases bien definidas que se inician en la época prenatal y finalizan en torno a los 3 años de vida, lo cual supone un hecho diferencial respecto a la disfagia del adulto^{24,25}.

La etiología de la disfagia orofaríngea en pediatría es heterogénea, puede ser congénita o adquirida, de naturaleza anatómica o neurológica, estática o progresiva, orgánica o funcional y de diversos grados de severidad^{26,27}.

Aunque la incidencia exacta de la disfagia es desconocida, según los informes, se está volviendo más común dado el mejor pronóstico de los bebés prematuros y de los niños con afecciones médicas crónicas^{28,29}. No obstante, se ha informado que entre el 25 y el 45 % de los niños con un desarrollo normal y hasta el 80 % de los niños con discapacidades del desarrollo presentan algún tipo de trastorno de la alimentación²⁶.

A diferencia de los niños, el proceso natural de envejecimiento se asocia con una disminución de la función de deglución que afecta las tres fases de esta³⁰. La mala dentición y la reducción de la fuerza masticatoria en la vejez son las principales causas del aumento de la duración de la fase oral y de la cantidad de residuos orales durante la deglución. El deterioro neuromuscular relacionado con la edad contribuye a un retraso en la activación del reflejo de deglución faríngea y disminuye el movimiento del bolo y la eliminación en la fase esofágica. Se estimó que entre el 70 y el 90 % de la población mayor experimenta algún grado de disfagia³¹. En un estudio, el 87 % de los residentes en un hogar de ancianos (edad promedio de 87 años) informaron dificultades a la hora de comer, relacionadas con la deglución y el 68 % mostró signos de disfagia³². La prevalencia es particularmente alta en pacientes con enfermedades relacionadas con la edad como la enfermedad de Parkinson (80 %), la enfermedad de Alzheimer (40-70 %) y el accidente cerebrovascular agudo (50 %)³³.

1.5. Factores por considerar para el diseño de formas farmacéuticas orales pediátricas/geriátricas

La elección de la formulación puede verse afectada por las propiedades del ingrediente farmacéutico activo (IFA), el grupo etario objetivo y la patología a tratar³⁴, así como la cultura y la ubicación geográfica. En el diseño de un medicamento para uso en

pediatría o adultos mayores, se aplican todas las consideraciones típicas del desarrollo de formas de dosificación para adultos jóvenes o de mediana edad.

En cuanto a cualquier producto farmacéutico, las propiedades del IFA que pueden afectar la selección de la forma de dosificación incluyen, por ejemplo, la clasificación biofarmacéutica (BSC), las propiedades fisicoquímicas, la estabilidad, la dosis y la tasa de

liberación requerida³⁵. Por ejemplo, los IFAs con alta solubilidad (pertenecientes a las clases I y III del BSC) generalmente son más adecuados para soluciones y jarabes orales,

en comparación con los que presentan baja solubilidad. Por otra parte, los mini comprimidos y películas orales pueden no ser apropiadas para vehiculizar aquellos IFAs que requieren dosis altas, debido a las limitaciones en la carga del fármaco por unidad de dosificación. Además, las propiedades del IFA pueden influir en el método de fabricación y la ruta de procesamiento que se puede aplicar a una forma de dosificación en particular³⁶.

El sabor también debe tenerse en cuenta al seleccionar una forma de dosificación oral, y deben utilizarse enfoques para minimizar la interacción de un IFA de sabor aversivo con los receptores del gusto en la boca. Las formulaciones para pacientes pediátricos y adultos mayores agregan complejidad al proceso de desarrollo, debido a la naturaleza diversa de la población de pacientes, y las consideraciones de seguridad y cumplimiento. Por lo tanto, se deben tener en cuenta factores adicionales al desarrollar productos para estos grupos.

Sam y colaboradores (2012) propusieron un marco estructurado para evaluar y equilibrar los beneficios y riesgos de diferentes formas de dosificación farmacéutica para uso pediátrico en relación con 3 criterios clave: eficacia/facilidad de uso, seguridad y acceso del paciente³⁷. Los factores por considerar en relación con estos 3 criterios se describen en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Factores por considerar en la selección de una forma de dosificación oral

Aceptabilidad del paciente	
Consideraciones de dosificación	La capacidad de la formulación para subdividirse sin impacto en la seguridad y eficacia del producto, para permitir una dosificación flexible y óptima para el paciente.
Preparación de dosis	Requisito de cualquier manipulación o medición de una cantidad de la formulación antes de la administración
Facilidad de ingestión	La facilidad con que el paciente puede tomar el producto, incluyendo aspectos como palatabilidad, deglución, tamaño y cantidad de unidades de dosificación sólidas, o volumen de líquido.
Seguridad	
Tolerabilidad y seguridad aceptables	El producto no debe dar lugar a un riesgo inaceptablemente alto de efectos adversos, toxicidad aguda, toxicidad en órganos o efectos secundarios gastrointestinales, que no sean causados directamente por el IFA.
Riesgo de dosificación incorrecta	El riesgo de administración de una dosis incorrecta, por ejemplo, por manipulación incorrecta, medición incorrecta y/o administración incorrecta de la dosis requerida.
Acceso	
Estabilidad	La vida útil del producto, incluido el uso, si corresponde.
Complejidad de fabricación y desarrollo.	Cuán complicados son el proceso de desarrollo requerido y las operaciones de fabricación y empaque, incluida la necesidad de utilizar procesos especializados, no rutinarios.
Cadena de suministro	Cómo se almacena y transporta el producto, incluso en entornos de escasos recursos.
Coste relativo	La magnitud estimada del costo de una forma de dosificación en comparación con otras formas de dosificación, excluyendo el costo del IFA.

1.6. Selección de los Ingredientes Farmacéuticos Activos

Los medicamentos para tratar patologías cardiovasculares son los más requeridos para preparados galénicos en las farmacias de hospitales pediátricos, en vista de su uso para la clínica a veces grave y a menudo crónica de afecciones como insuficiencia cardíaca, hipertensión, shock hipovolémico o edema^{38,39}.

1.6.1. Carvedilol

Conocido químicamente como (2S)-1-(9H-carbazol-4-yloxy)-3-[2-(2-methoxyphenoxy) ethylamino]propan-2-ol (Figura 1.1). Es un derivado carbazólico que presenta una acción bloqueante β -adrenérgica no cardioselectiva, sin actividad simpaticomimética intrínseca⁴⁰, con propiedades vasodilatadoras atribuidas a su acción antagonista α_1 -adrenérgica; es decir, bloquea los receptores α_1 , β_1 y β_2 . Este IFA es prácticamente insoluble en agua, ligeramente soluble en alcohol, y prácticamente insoluble en ácidos diluidos.

Carvedilol (CAR) es también un receptor de radicales libres, posee efectos antioxidantes y antiproliferativos⁴¹. Ha sido prescrito como agente antihipertensivo, agente antianginoso⁴² y para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva⁴³.

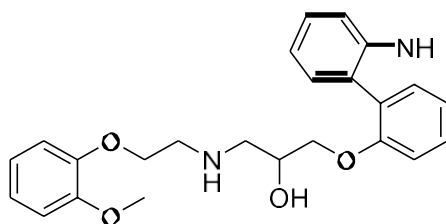


Figura 1.1. Estructura química de Carvedilol

1.6.2. Bisoprolol Fumarato

Conocido químicamente como 1-(propan-2-ylamino)-3-[4-(2-propan-2-yloxyethoxymethyl) phenoxy] propan-2-ol (Figura 1.2), presenta una alta solubilidad acuosa. El Bisoprolol Fumarato (BISO) es un bloqueante de receptores β_1 -adrenérgicos altamente selectivo, se usa para el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares, incluyendo la hipertensión arterial, enfermedades coronarias, trastornos del ritmo cardíaco, cardiopatía isquémica y posterior a un infarto agudo de miocardio⁴⁴.

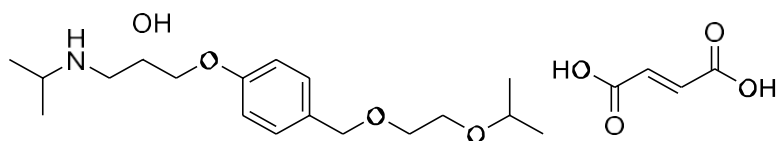


Figura 1.2. Estructura química de Bisoprolol Fumarato

1.6.3. Amiodarona Clorhidrato

Químicamente conocida como (2-butyl-1-benzofuran-3-yl)-[4-[2-(diethylamino)ethoxy]-3,5-diiodophenyl]methanone (Figura 1.3), es muy ligeramente soluble en agua fría, soluble en etanol y muy soluble en cloroformo. La Amiodarona Clorhidrato (AMIO) es un derivado de benzofurano iodado que posee semejanza estructural significativa con las hormonas tiroideas. Es un fármaco antiarrítmico de clase III, según clasificación de Vaughan Williams, es el prototipo de medicamento antiarrítmico que actúa a través de mecanismos múltiples, no solamente bloquea los canales del potasio, sino que también bloquea los canales del sodio, los canales del calcio y los receptores adrenérgicos β y generalmente no es posible determinar con detalle su mecanismo de acción en un paciente concreto o frente a una arritmia específica⁴⁵.

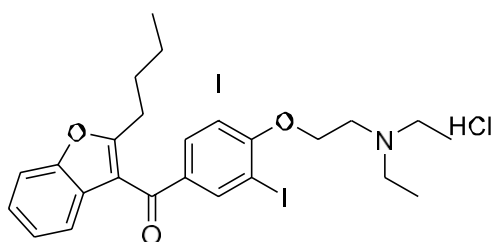


Figura 1.3. Estructura química de Amiodarona Clorhidrato

1.6.4. Atenolol

Químicamente conocido como 2-(p-(2-Hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy) phenyl) acetamide, 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 heces⁴⁶.

Atenolol (ATN), (Figura 1.4), 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 membrana⁴⁷.

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 pediátricos⁴⁸.

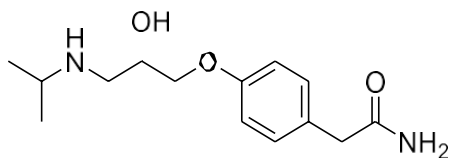


Figura 1.4. Estructura química Atenolol

1.7. Diferencias entre los tratamientos para adultos y pediátricos

Las dosis necesarias para tratar a pacientes pediátricos y neonatos difieren significativamente de las dosis para adultos. En la Tabla 1.2. se presentan las dosis recomendadas en pediatría y para adultos. 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. Por otro lado, como ya fue mencionado, usar estas modificaciones para pacientes adultos con trastornos en la deglución, tampoco garantiza la estabilidad del ingrediente activo.

Tabla 1.2. Dosis recomendadas en pediatría y adultos

Ingrediente Farmacéutico Activo	Dosis terapéutica niños		Dosis terapéutica adultos (mg/día)
	mg/Kg/día	DM/día	
Carvedilol	0,1 a 1,6	50	12,5 a 50
Amiodarona Clorhidrato	20 a 40	400	200 a 400
Bisoprolol Fumarato	1,25	10	10
Bosentan	3 a 4	250	125 a 250
Atenolol	0,5 a 2	100	50 a 100

DM/día: Dosis máxima diaria

1.8. Formas farmacéuticas

Se denomina forma farmacéutica al estado final bajo el cual se presenta el medicamento para ser administrado al paciente⁵¹. Debe contener al/los IFA/s en las cantidades adecuadas, mantenerlos inalterados durante su conservación en las condiciones especificadas, y garantizar 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 siguientes⁵²:

- 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.

1.8.1. 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 otros⁵³.

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 mismo, porque entre mayor sea el número de componentes, mayor es la probabilidad de incompatibilidades o manifestaciones de inestabilidad y mayor es el costo por la adición de posibles etapas innecesarias al proceso de fabricación⁵⁴.

1.8.2. 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 dilución⁵⁴. Dentro de las formas farmacéuticas líquidas en solución destinadas a ser ingeridas, las principales son los jarabes y las soluciones que se administran por medio de goteros (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)^{55,56}. 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 sólidas⁵⁷.

1.8.2.1 Jarabes

Son preparaciones acuosas, límpidas y de elevada viscosidad, que contienen un azúcar (generalmente sacarosa) en concentración similar a la de saturación⁵⁸. 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)⁵³.

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 geriatría⁵².

1.8.2.2 Bebidas

En el caso particular de los jarabes para diabéticos se reemplaza el azúcar por mezclas de cosolventes que permiten solubilizar el fármaco y dar viscosidad a la solución, además del agregado de agentes viscosizantes como por ejemplo derivados de la celulosa. En este caso la formulación no cumple con la definición de “jarabe” establecida en Farmacopea Argentina (FA VII edición)⁵⁹ (ya que la formulación no posee azúcar en su composición) y deberían denominarse “bebidas”.

Una definición más amplia de bebidas sería que son formas líquidas orales que pueden o no contener azúcar y pueden o no contener alcohol. Si contienen azúcar deben hacerlo a una concentración menor a la de un jarabe (85% p/v) y si contienen alcohol deben tener una proporción menor a un elixir. Es decir que no todas las bebidas son para

diabéticos (si tienen azúcar) y no todas las bebidas son para pacientes pediátricos (si tienen alcohol).

1.8.2.3. Soluciones

Las soluciones son una mezcla química y físicamente homogénea de dos o más sustancias, de este modo la partícula de soluto está dispersa a nivel molecular en la del solvente. Las interacciones entre soluto y solvente se dan por fuerzas dipolo-dipolo, dipolo inducido-dipolo inducido y por puente hidrógeno. Por lo tanto, la elección del solvente es fundamental para obtener una solución de uso farmacéutico. 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 otros⁵¹. Por su bajo volumen de dosis y por no contener alcohol, son formas líquidas orales de amplia difusión en pediatría y en geriatría. La principal ventaja que presentan las soluciones es que su efecto terapéutico se da en un tiempo mucho menor que al administrar un sólido, ya que el IFA se administra solubilizado. Como principales desventajas se encuentra la palatabilidad de algunas formulaciones y la inestabilidad de determinados activos al encontrarse en solución⁶⁰.

1.8.2.4. Suspensiones

En el caso que alguno de los IFAs a administrar presente problemas de solubilidad o estabilidad en solución, es posible desarrollar suspensiones, las cuales dependiendo de la presentación y posología pueden ser administradas por medio de frascos goteros o de medidas volumétricas.

Es un sistema disperso heterogéneo constituido por partículas de un sólido insoluble (fase dispersa) de tamaño de partícula mayor de 0,1 micra, dispersadas en un líquido (medio dispersante)⁶¹. Las principales ventajas que presenta la formulación de una suspensión con respecto a una solución son que:

- a) Permite la administración de IFAs poco solubles en agua.
- b) Pueden enmascarse sabores desagradables
- c) La estabilidad de los IFAs frente a la hidrólisis es mayor que en solución.

Por otra parte, las suspensiones presentan problemas de inestabilidad física (sedimentación), lo que es posible de mejorar con una formulación adecuada. Como todos los sistemas dispersos, las suspensiones son termodinámicamente inestables y las partículas sólidas de fase interna tienden a agregarse y sedimentar, por lo que la estabilidad de la suspensión dependerá de las características de las partículas sólidas y de su interacción con el medio dispersante⁶¹. Se debe evaluar o controlar el efecto de las condiciones de suspensión, como el pH, en la estabilización electrostática. Las magnitudes de potencial zeta altas indican una dispersión estable, es un parámetro útil en el desarrollo de formulaciones. Para generar un sistema estable, es crucial introducir un estabilizador o un agente suspensor que reduzca la tasa de sedimentación y permita una fácil dispersión del material particulado sedimentado. Los polisacáridos vegetales se utilizan amplia y extensamente en la industria farmacéutica, especialmente como agentes de suspensión debido a las ventajas que presentan, como ser biodegradables, seguros, económicos, abundantes, renovables y sostenibles, por ejemplo, el xantano o goma xantana, es un polisacárido natural, de alto peso molecular, un biopolímero exocelular producido por la bacteria *Xanthomonas campestris* B-1459 en un proceso de fermentación⁶².

1.9. 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 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, afectan a los pacientes y a 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 Unión Europea (UE)⁶³ y existen normas equivalentes en Estados Unidos⁶⁴, Japón⁶⁵ y en el resto de los países, que alojan a los mayores productores mundiales de medicamentos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) también se ha pronunciado al respecto, emitiendo su propio texto ordenado de Buenas Prácticas de Fabricación y Control⁶⁶. En Argentina, las normas actualmente vigentes están contenidas en la Farmacopea Argentina⁵⁸, 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 que cuando un medicamento sea dispensado, 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 desarrollo, optimización y fabricación de productos farmacéuticos.

Los métodos y actividades propias de la industria farmacéutica que pueden tener impacto sobre la seguridad y la eficacia de los productos elaborados 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”⁶⁷.

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 interferentes⁶⁸.

1.10. Estudios de estabilidad

1.10.1. Estudios de estabilidad química

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 del o los IFAs y la eficacia de los conservantes mediante ensayos y valoraciones apropiadas⁵⁸. En la Tabla 1.3, se indican las condiciones y tiempos mínimos (establecidos por Farmacopea Argentina) de los estudios de estabilidad de larga duración y acelerados.

Tabla 1.3. 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 físicos⁵⁸.

1.10.2. Estudios de estabilidad microbiológica

Los productos farmacéuticos pueden ser vehículos de microorganismos que produzcan 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) Conteo de microorganismos aerobios totales (CMAT), menor a 10³ unidades formadoras de colonias (UFC) por mL, 2) Conteo total combinado de hongos filamentosos y levaduras (CTHyL) menor a 10² UFC mL⁻¹ y 3) Ausencia de *Escherichia coli* (*E coli*)^{58,69}.

Por lo tanto, una formulación farmacéutica de administración oral puede contener microorganismos, pero en un número limitado, siendo una exigencia la ausencia de *E. coli*.

1.11. 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 interacciones⁷⁰. 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 coherente⁷¹. El diseño de experimentos es una técnica estadística introducida por Fisher en 1926 que apunta a resolver tales dificultades⁷². 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.

Para la etapa de screening, se empleó el diseño Plackett-Burman

1.11.1. Diseño Plackett-Burman

Son un grupo de diseños experimentales introducidos en 1946 por Robin L. Plackett y J. P. Burman⁷³, donde el número de experimentos es múltiplo de 4 pero no potencia de 2 (12, 20, 24, etc.)

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.

1.12. Objetivo

1.12.1. Objetivo general

Esta Tesis propone el desarrollo de formulaciones farmacéuticas líquidas de uso oral para el tratamiento de cardiopatías en pacientes pediátricos, adultos mayores y pacientes que presenten dificultad en la deglución (disfagia). Además, se evaluará la interacción de los ingredientes farmacéuticos activos con los excipientes empleados y la estabilidad fisicoquímica y microbiológica de las formulaciones desarrolladas.

1.12.2. 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) 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.
- 3) Determinar qué tipo de excipientes serán los más adecuados para la preparación de las formulaciones líquidas de acuerdo con la dosis requerida, las características organolépticas y compatibilidad con los IFAs.
- 4) Desarrollar y optimizar, haciendo uso de diseño de experimentos, formulaciones líquidas de Carvedilol, Bisoprolol Fumarato, Amiodarona Clorhidrato y Atenolol.
- 5) Validar los métodos analíticos necesarios para la realización de los controles de calidad de las formulaciones.
- 6) Realizar los estudios de estabilidad, tanto químicos como microbiológicos, de las nuevas formulaciones.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y

MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Equipamiento, Instrumental analítico y de apoyo

2.1.1. 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 Fenilhexilo, de 4,6 mm × 25 cm (Phenomenex, Inc., Torrance, 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 ± 0,1 °C, fueron empleadas para realizar las determinaciones correspondientes en cada caso.

2.1.2. Separaciones cromatográficas

2.1.2.1 Determinación de Carvedilol

El contenido de Carvedilol 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 fosfato (50 mM, pH 2.9): metanol (52:48) con un flujo de 1,0 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 µL. La longitud de onda de detección fue 245 nm.

2.1.2.2 Determinación de Bisoprolol Fumarato

Los análisis de cada una de las muestras de Bisoprolol Fumarato se llevaron a cabo empleando una columna Silia Chrom XDB1 C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm tamaño de partícula), termostalizada a 30°C, la fase móvil compuesta por una solución buffer de fosfatos (50 mM, pH 4,5): acetonitrilo (70:30), a una velocidad de flujo de 1,0 mL min⁻¹, con detección UV a 228 nm y un volumen de inyección de 20 µL⁷⁴.

2.1.2.3 Determinación de Amiodarona Clorhidrato

Cada una de las muestras fue analizada a una longitud de onda de 240 nm para determinar el contenido de Amiodarona Clorhidrato. 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 fosfato (50 mM, pH 2,9): acetonitrilo (30:70) con un flujo de 1 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 µL.

2.1.2.4 Determinación de Atenolol

El contenido de Atenolol fue determinado empleando una columna SiliaChrom C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm), termostaticada 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 nm⁷⁵.

2.1.3 Propiedades de apariencia física y medición de pH

Para analizar el aspecto físico de las muestras almacenadas a cada temperatura se utilizó un método de examen sensorial (apreciando modificaciones de color, aroma o tendencia a la formación de precipitados). Las mediciones de pH de todas las formulaciones 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.

2.1.4. 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.

2.1.5. 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 Cromatogramas

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, EE. UU.). Otros gráficos se confeccionaron empleando la aplicación Origin v. 8.0 (OriginLab, Co. Northampton, MA, EE. UU.) y Design-Expert versión 7.

2.2.3 Análisis estadístico de los datos

2.2.3.1. Test “t”

Para determinar si había diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos, tanto en la recuperación del IFA o el pH durante el período de estudio, se llevó a cabo una Prueba t de dos muestras, para determinar si las medias de población de dos grupos distintos son o no iguales (Ecuación 2.1).

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.

$$t = \frac{[\bar{x}_1 - \bar{x}_2]}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

(Ec. 2.1)

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

2.2.3.2. Test de Friedman

Es una prueba no paramétrica desarrollado por el economista Milton Friedman, para varias muestras relacionadas, equivalente a la prueba ANOVA para medidas repetidas en la no paramétrica. El método consiste en ordenar los datos por filas o bloques, reemplazándolos por su respectivo orden (Ecuación 2.2)⁷⁷.

$$\chi^2_r = \frac{12}{Hk(k+1)} \sum Rc^2 - 3H(k+1)$$

(Ec. 2.2)

Donde:

- χ^2_r = estadístico calculado del análisis de varianza por rangos de Friedman.
- H= representa el número de elementos o de bloques (número de hileras)
- K=el número de variables relacionadas

$\sum Rc^2$ = es la suma de rangos por columnas al cuadrado

Se plantean dos hipótesis:

H_0 : las medias son iguales

H_a : al menos dos medias son diferentes.

Si $X^2_{calculado} > X^2_{critico}$ se rechaza la hipótesis nula, es decir, al menos dos de las medias son diferentes.

Para determinar cuál de las medias son diferentes, se realiza la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

2.2.3.3. Prueba de Wilcoxon

La prueba de los rangos con signo de Wilcoxon es un estadístico no paramétrico que se utiliza para comparar la media de dos muestras relacionadas y determinar si existen diferencias entre ellas. Se utiliza como alternativa a la prueba t de Student cuando no se puede suponer la normalidad de dichas muestras⁷⁸.

Cálculo del estadístico W

$$W = \text{mínimo valor } (W+, W-)$$

$W+$ = suma de los rangos con signo positivo

$W-$ = suma de los rangos con signo negativo

Se compara el valor obtenido de W con los valores de una tabla Wilcoxon. Si W cae dentro del intervalo correspondiente en la tabla para ese n, la diferencia NO es significativa.

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.

- *Carvedilol*: Fue provisto por el Laboratorio Bagó, Buenos Aires. Lote 68555, pureza: 99,6%
- *Amiodarona Clorhidrato*: Fue provisto por el Laboratorio Roemmers, Buenos Aires. Lote N° 00132782, pureza: 100,5%.
- *Bisoprolol Fumarato*: Fue provisto por el Laboratorio Roemmers, Buenos Aires. Lote N° 00151691, pureza: 100,6%
- *Atenolol*. Fue provisto por el Laboratorio de Especialidades Medicinales (LEM), Rosario. Lote N° 1409129, pureza: 99,48%.

2.3.2 Excipientes

Los excipientes empleados en este trabajo de Tesis fueron los siguientes: Glicerina (Gli) (Novalquim S.R.L. Lote: N° 130610. Origen: Argentina), sorbitol (Sor) (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), carboximetilcelosa 4000 (CMC 4000), carboximetilcelosa 10000 (CMC 10000), metil parabeno (Prest S.A.), propil parabeno (Unifarma. Lote N° 20130719. Origen: China), benzoato de sodio, citrato de sodio, fosfato monobásico de sodio, hidróxido de sodio, D (+)

Sacarosa pura, grado farmacéutico, y ácido fosfórico (Laboratorio Cicarelli (Santa Fe, Argentina), sacarina (Novalquim S.R.L. Lote N° F019245. Origen: Alemania).

2.4 Reactivos y soluciones buffer para cromatografía

Los solventes metanol (Sintorgan) y acetonitrilo (Panreac) empleados en las separaciones cromatográficas fueron grado CLAE. 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 (USP 38)⁶⁴. 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 IFAs 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 Carvedilol

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 0,2 % p/v de benzoato de sodio. La concentración de este conservante fue seleccionada basada en los valores máximos fijados por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA)⁷⁹.

Se llevaron a cabo un total de 12 experimentos que comprenden siete parámetros independientes, seis factores numéricos y un factor categórico. Los factores numéricos evaluados fueron la concentración de los agentes viscosizantes (Sor, PPG, PEG y Gli, % v/v), el valor de pH y la fuerza iónica de la solución buffer empleada en cada caso, mientras que el factor categórico corresponde al tipo de solución buffer, citrato o fosfato. La Tabla 2.1 resume los factores y niveles correspondientes al diseño Plackett-Burman.

Tabla 2.1. Diseño Plackett-Burman para la selección de factores en el desarrollo de gotas de Carvedilol

Factores	Nivel Numérico		Nivel Categórico	
	-1	+1		
Gli (% v/v)	0	10		
PPG (% v/v)	0	10		
PEG 400 (% v/v)	0	10		
Sor (% v/v)	0	10		
pH	3	7		
FI (mM)	10	30		
Solución buffer			citrato	fosfato

Las diferentes formulaciones se desarrollaron de acuerdo con el siguiente Procedimiento Operativo Estándar (POE):

1) Se prepararon las soluciones buffer a partir de agua conservada (agua estéril conteniendo benzoato de sodio 0,2% p/v).

2) Se pesó la cantidad de CAR para obtener una concentración final de 5 mg mL⁻¹ (concentración basada en la dosis diaria recomendada del fármaco)^{80,81}. Se seleccionó esta concentración debido a que una concentración de 5 mg mL⁻¹ permite cumplir con la recomendación de volúmenes objetivo para formas de dosificación orales para poblaciones pediátricas (≤5 mL para niños de hasta 5 años y ≤10 mL para niños mayores de 5 años)¹³. En pacientes adultos, al iniciar el tratamiento, la dosis recomendada es de 12,5 mg/día durante los primeros dos días y luego aumentar hasta 25 mg/día en una única toma diaria, es decir, que el volumen a dispensar sería 2,5 a 5 mL por dosis.

3) Se incorporaron los cosolventes (Gli, Sor, PEG400 o PPG) con agitación constante durante 20 min hasta formar una solución homogénea.

4) Se agregó la solución buffer hasta el 80% del volumen final (100 mL).

5) Se agitó a 220 rpm durante 5 h.

6) Se completó a volumen (100 mL) con solución buffer.

7) Finalmente, se homogeneizó la mezcla y se filtró con papel de filtro. Cada una de las muestras fue fraccionada en tres envases de vidrio tipo III color ámbar, los cuales fueron conservados en diferentes condiciones: a 4°C Heladera (H), 25°C Temperatura ambiente (TA) y cámara de estabilidad 40°C/ 75% Humedad Relativa (HR), para realizar los estudios de estabilidad.

2.6.1.2 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 CAR (3 y 5 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 3 o 5 mg mL⁻¹ del fármaco (diluido en diferentes volúmenes de leche) en la boca durante 20 segundos y luego la desechó⁸². 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 acidez mediante una escala numérica entre 1 y 5 (1: no ácido, 2: ligeramente ácido, 3: moderadamente ácido, 4: ácido y 5: muy ácido). La media del valor percibido para cada muestra permitió obtener una puntuación final de acidez⁸³.

2.6.2. Gotas de Amiodarona Clorhidrato

Las diferentes formulaciones fueron preparadas usando agua estéril conteniendo benzoato de sodio (0,2% p/v), y se elaboraron de acuerdo con el siguiente POE:

1) Se pesó 2,5 o 5 g de AMIO, según corresponda, en un vaso de precipitados de 150 mL.

2) Se agregó agua conservada (80 mL) y se calentó a 80°C con agitación hasta disolución completa.

3) Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 10 mL de Gli.

4) Se homogeneizó la mezcla.

5) Se trasvasó a un matraz de 100 mL y se completó a volumen con agua conservada.

6) Finalmente, se filtró con papel de filtro y cada una de las muestras fueron fraccionadas en tres envases de vidrio tipo III color ámbar, los cuales fueron conservados en diferentes condiciones: a 4, 25 y 40°C/ 75%HR, para realizar los estudios de estabilidad.

2.6.3 Jarabe de Amiodarona Clorhidrato

Se preparó jarabe simple a partir de agua conservada y sacarosa 85% p/v⁵⁹. Se elaboraron dos jarabes de acuerdo con el siguiente procedimiento operativo:

1) Se pesó 2,5 o 5 g de AMIO, según corresponda, en un vaso de precipitados de 150 mL.

2) Se agregaron 80 mL de jarabe y se calentó a 80°C con agitación hasta disolución completa de AMIO.

3) Se dejó enfriar a temperatura ambiente.

4) Se trasvasó a un matraz de 100 mL y se completó a volumen con jarabe.

5) Finalmente, se filtró con papel de filtro y cada una de las muestras fueron fraccionadas en tres envases de vidrio tipo III color ámbar, los cuales fueron conservados en diferentes condiciones: a 4, 25 y 40°C/ 75%HR, para realizar los estudios de estabilidad.

2.6.4. Gotas de Bisoprolol Fumarato

Considerando las diferentes posologías de acuerdo con la patología a tratar, se plantearon dos concentraciones finales de BISO (2,5 y 5 mg mL⁻¹). El procedimiento operativo fue el siguiente:

1) Se pesó la cantidad correspondiente de BISO en cada caso considerando un volumen final de 100 mL.

2) Se humectó BISO con 10 mL de Gli.

3) Se incorporó, con agitación constante, agua conservada (conteniendo benzoato de sodio 0,2%p/v), hasta aproximadamente un volumen final de 90 mL.

4) Se transfirió a un matraz de 100 mL y se llevó a volumen con agua conservada.

5) Finalmente, estas soluciones se filtraron y cada una de las muestras fueron fraccionadas 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.

2.6.5. Jarabe de Bisoprolol Fumarato

Al igual que en caso de las gotas, se plantearon las mismas concentraciones. Las diferentes formulaciones fueron elaboradas disolviendo BISO en el jarabe simple⁵⁹. Las muestras fueron filtradas con papel de filtro y fraccionadas en tres envases de vidrio tipo III color ámbar, los cuales fueron conservados en diferentes condiciones: a 4, 25 y 40°C/75%HR, para realizar los estudios de estabilidad.

2.6.6. Bebida de Atenolol

Considerando la necesidad de contar con una formulación líquida de ATN apta para pacientes adultos, se desarrolló una bebida conteniendo 10 mg mL⁻¹. Como agente humectante, se empleó Gli (5% v/v), como agente viscosizante, CMC4000 (0,5 % p/v) y como agente edulcorante, sacarina (0,2% p/v). A partir de datos de estabilidad previos⁸⁴, se empleó buffer citrato 10 mM, preparado a partir de agua conservada, conteniendo 0,2 % p/v de benzoato de sodio. El pH final de la formulación fue ajustado dentro del rango 6,9-7,1 utilizando ácido cítrico 10 mM. Se empleó el siguiente procedimiento operativo:

1) Se pesó la cantidad correspondiente de Atenolol considerando un volumen final de 100 mL.

2) Se humectó al ATN con 5 mL de Gli.

3) Se incorporó con agitación constante, buffer citrato que contenía solubilizada la sacarina, el benzoato de sodio y la CMC 4000, hasta aproximadamente un volumen final de 90 mL.

4) Se transfirió a un matraz de 100 mL y se llevó a volumen con la misma matriz.

5) Finalmente, estas soluciones se filtraron y cada una de las muestras fueron fraccionadas en tres envases de vidrio tipo III color ámbar, los cuales fueron conservados en diferentes condiciones: a 4, 25 y 40°C/ 75%HR, para realizar los estudios de estabilidad.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

CARVEDILOL

3.1. Introducción

Como se ha mencionado, CAR es químicamente una base débil ($pK_a = 7,8$) y es un fármaco poco soluble en agua ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ a 25°C) perteneciente a la Clase II del BCS, que presenta una alta permeabilidad gastrointestinal pero su solubilidad disminuye a medida que avanza por el tracto gastrointestinal, siendo esta característica el paso limitante para la absorción del fármaco. CAR se comercializa en varios países únicamente en formulaciones orales sólidas, la mayoría de las cuales son formas de liberación inmediata y solo unas pocas son formas de liberación controlada⁸⁵.

Debido a esto, se han llevado a cabo varios desarrollos para obtener nuevas formulaciones de liberación controlada utilizando diferentes enfoques, como microesferas⁸⁶, nanofibras y films⁸⁷, nanoesferas⁸⁸ y transportadores nanolipídicos⁸⁹, entre otros. También se han desarrollado diferentes formulaciones líquidas, como nanomicelas de copolímero⁹⁰, nanosuspensiones⁹¹ y sistemas de administración de fármacos auto-nano-emulsionantes⁸⁸. Sin embargo, no se han realizado estudios de estabilidad para estas formulaciones, y la complejidad de dichos desarrollos no garantiza la seguridad de los sistemas sin los correspondientes controles. En consecuencia, resulta necesario el desarrollo de formulaciones líquidas orales seguras. En este sentido, en la bibliografía, encontramos el desarrollo de dos soluciones y una suspensión acuosa para pacientes pediátricos (1 mg mL^{-1}) utilizando excipientes seguros; las formulaciones fueron estables por un período relativamente corto (56 días almacenadas a 4 y 25°C , y por 28 días almacenadas a 40°C)⁹².

Cabe señalar que los estudios de estabilidad fisicoquímica y microbiológica son parte fundamental de todo el proceso de investigación y desarrollo. Estos estudios, que determinan el tiempo durante el cual la formulación mantiene sus especificaciones de calidad, deben realizarse antes de que un producto farmacéutico esté disponible para la población.

Debido a todo lo citado anteriormente, el objetivo de este capítulo fue llevar a cabo el desarrollo y optimización de dos formulaciones orales líquidas de CAR, que contengan excipientes seguros, y empleados en rangos adecuados para su administración a pacientes pediátricos, geriátricos y con trastornos en la deglución. Finalmente, para garantizar la adherencia al tratamiento, principalmente en pacientes pediátricos, se estudió la palatabilidad de las formulaciones diluidas en leche.

3.1.1. Gotas de Carvedilol

3.1.1.1 Etapa de screening

La selección de excipientes adecuados que aseguren la estabilidad del IFA y de la formulación final es un paso fundamental en el desarrollo de un producto farmacéutico. Se eligió un diseño de Plackett-Burman para estimar los principales factores que afectan la solubilidad de CAR en las formulaciones líquidas. La concentración de CAR se fijó en 5 mg mL⁻¹ y los factores analizados a dos niveles fueron fuerza iónica (FI, 10-30 mM), valor de pH (3-7), tipo de buffer (citrato, Cit o fosfato, Fos) y presencia de agentes cosolventes: Sor (0-10% v/v), PPG (0-10% v/v), PEG400 (0-10% v/v) y Gli (0-10% v/v). Se eligió benzoato de sodio (0,2 % p/v) como agente conservante, el mismo se utiliza principalmente como conservante antimicrobiano en cosmética, alimentación y productos farmacéuticos, en concentraciones del 0,02 al 0,5% en medicamentos orales. La ingesta diaria admisible de benzoatos totales calculada por la OMS como ácido benzoico, se ha estimado en hasta 5 mg/kg de peso corporal⁵³. La recuperación de CAR (respuesta) se determinó por CLAE. Los rangos de los factores se seleccionaron en base al conocimiento previo sobre el sistema en estudio, como rango de dosis de CAR^{80,81}, limitaciones de los excipientes recomendados por la EMA⁹³ y una formulación previa de CAR en la literatura⁹². La Tabla

3.1.1 resume los resultados de la respuesta analizada en todas las condiciones citadas.

Como se observa en la Tabla 3.1.1, se obtuvo una amplia variación en las recuperaciones de CAR, sugiriendo una influencia significativa de algunas variables independientes sobre la misma; por lo que se aplicó el análisis estadístico correspondiente.

Tabla 3.1.1. Diseño Plackett-Burman: screening de factores que afectan la solubilidad de Carvedilol.

	Factores							Respuesta
	Sor (% v/v)	PPG (% v/v)	PEG (% v/v)	Gli (% v/v)	pH	FI (mM)	Buffer	CAR Rec. (%±RSD) n=3
1	10	10	0	10	7	30	Cit	1,45±0,5
2	0	10	0	0	7	10	Fos	0,01±0,1
3	10	0	10	0	7	10	Cit	14,96±0,4
4	0	0	0	10	3	30	Fos	1,54±0,3
5	0	10	10	10	7	10	Fos	20,80±0,5
6	0	0	0	0	3	10	Cit	18,83±0,2
7	0	10	10	0	3	30	Cit	74,10±0,7
8	10	0	10	10	3	10	Fos	41,40±0,5
9	0	0	10	10	7	30	Cit	11,94±0,3
10	10	0	0	0	7	30	Fos	0,80±0,4
11	10	10	0	10	3	10	Cit	5,85±0,6
12	10	10	10	0	3	30	Fos	53,23±0,9

Se encontró que el coeficiente de determinación del modelo (R^2) fue de 0,996, lo que garantiza un buen ajuste del modelo. La prueba ANOVA mostró que solo los factores "valor de pH" y "concentración de PEG" eran significativos y afectaban la solubilidad del fármaco (valores de $p < 0,05$) (Tabla 3.1.2).

La importancia del factor "valor de pH" podría deberse a que CAR ($pK_a = 7,8$) presenta un perfil de solubilidad típico de bases débiles dependiente del pH, porque la fuerza básica del NH alifático es mayor que la fuerza ácida del NH carbazol (Figura 3.1.1)⁹⁴. Mientras que la importancia del factor "concentración de PEG", podría deberse a que CAR es un fármaco poco soluble en agua y con el agregado de un cosolvente como PEG 400 podría mejorarse la solubilidad de este tipo de IFAs⁹⁵.

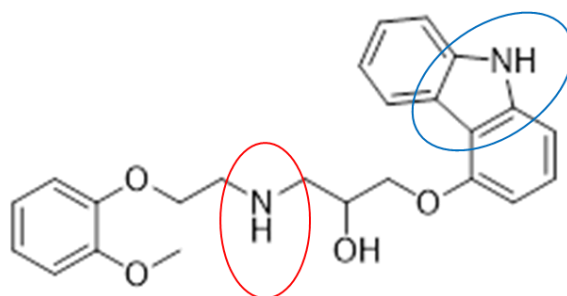


Figura 3.1.1. Estructura química de Carvedilol. Rojo: NH alifático. Azul: NH carbazol

Las Ecuaciones 3.1.1 y 3.1.2 resumen la influencia de cada uno de los factores numéricos en la recuperación de CAR para cada tipo de solución buffer empleada. Los coeficientes representan el efecto cuantitativo de las variables independientes según el tipo de solución amortiguadora utilizada.

Tabla 3.1.2. Análisis de la variancia de la recuperación de Carvedilol usando un diseño Plackett-Burman.

	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F-valor	Probabilidad ($p= 0,05$)	
Modelo	5733,60	7	819,09	6,57	0,0440	Significativo
<i>pH</i>	1751,64	1	1751,64	14,05	0,0200	Significativo
Tipo Buffer	7,33	1	7,33	0,059	0,8203	-
FI	141,48	1	141,48	1,13	0,3468	-
Gli	519,57	1	519,57	4,17	0,1107	-
PEG	2943,49	1	2943,49	23,61	0,0083	Significativo
PPG	362,52	1	362,52	2,91	0,1633	-
Sor	7,57	1	7,57	0,061	0,8175	-
Residuos	498,6	4	124,65			
Cor Total	6232,21	11				

El signo negativo con respecto al factor que influye en el valor del pH implica que un aumento en su valor disminuye la solubilidad del fármaco. Por el contrario, un aumento en la concentración del otro factor de influencia (PEG 400) aumenta la solubilidad de CAR (Ecuación 3.1.1) y (Ecuación 3.1.2).

Buffer citrato

$$\text{CAR rec} = +30.74 - 6.04 \text{ pH} + 0.34 \text{ FI} - 1.31 \text{ Gli} + 3.13 \text{ PEG} + 1.1 \text{ PPG} - 0.15 \text{ Sor}$$

(Ec. 3.1.1)

Buffer fosfato

$$\text{CAR rec} = +29.18 - 6.04 \text{ pH} + 0.34 \text{ FI} - 1.31 \text{ Gli} + 3.13 \text{ PEG} + 1.1 \text{ PPG} - 0.15 \text{ Sor}$$

(Ec. 3.1.2)

Como se observa en la Tabla 3.1.2 FI, Gli, PPG y Sor no fueron factores influyentes, por lo que fueron excluidos para estudios complementarios. Con respecto a “tipo de buffer”, se seleccionó el buffer citrato, debido a que el mismo es ampliamente utilizado en formulaciones farmacéuticas^{84,96} y los valores de pKa (3,17; 4,4 y 6,4) del ácido cítrico son cercanos a los valores del pH de las soluciones finales⁹⁷. Finalmente, el valor de la fuerza iónica se fijó en 10 mM.

Como se observa en la Tabla 3.1.1 se obtuvieron los valores más elevados de solubilidad de CAR empleando 10 %v/v de PEG (nivel máximo evaluado), por lo que se decidió analizar si concentraciones mayores de PEG (15, 20 y 27 % v/v) mejoraban aún más la solubilidad del IFA. Estas concentraciones se estudiaron porque existen varios productos comerciales aprobados que contienen PEG como excipiente en concentraciones cercanas al 30% v/v^{98,99}. Así, se desarrollaron cuatro formulaciones, dos conteniendo 3 mg mL⁻¹ de CAR (C1 y C2) y dos con 5 mg mL⁻¹ de CAR (C3 y C4). Se utilizaron concentraciones más bajas de PEG (10 y 15 % v/v) en las formulaciones que contenían 3 mg mL⁻¹, mientras que se emplearon concentraciones más altas de PEG (20 y 27 % v/v) en las formulaciones que contenían 5 mg mL⁻¹. Se observó que estas concentraciones de PEG permitieron una disolución completa del IFA.

Estas cuatro formulaciones se sometieron a estudios de estabilidad y para ello, fueron almacenadas en envases de vidrio tipo III color ámbar en tres condiciones: heladera, temperatura ambiente y cámara de estabilidad en condiciones aceleradas. Después de 30 días de almacenamiento se realizó una caracterización organoléptica de las formulaciones y también se determinó el contenido del IFA en las mismas. Las formulaciones que contenían 3 mg mL⁻¹ con 10% v/v PEG 400 (C1) y 5 mg mL⁻¹ con 20% v/v PEG 400 (C3)

presentaron precipitados (Tabla 3.1.3 y Figura 3.1.2), mientras que las que contenían 3 mg mL⁻¹ con 15% v/v PEG 400 (C2) y 5 mg mL⁻¹ con 27% v/v PEG 400 (C4) resultaron soluciones ligeramente turbias (Tabla 3.1.3 y Figura 3.1.3)

Tabla 3.1.3. Apariencia visual y recuperaciones de CAR a 25°C (TA)

Formulación	Carvedilol mg mL ⁻¹	PEG 400	Rec./ Apariencia T cero	Rec./Apariencia T 30 días
C1	3	10% v/v	95,8%±0.9 / L	56,7%±0.9 / P
C2	3	15% v/v	100,03%±0.1 / L	87,9%±0.8 / LT
C3	5	20% v/v	95,2%±0.8 / L	73,7%±0.5 / P
C4	5	27% v/v	99,9%±0.3 / L	90,5%±0.6 / LT

L: Límpido, LT: Ligeramente turbio, P: Precipitado cristalino.



Figura 3.1.2. Control visual gotas de Carvedilol 3mg mL⁻¹, 10% v/v PEG 400 (C1); 5mg mL⁻¹, 20% v/v PEG 400 (C3)

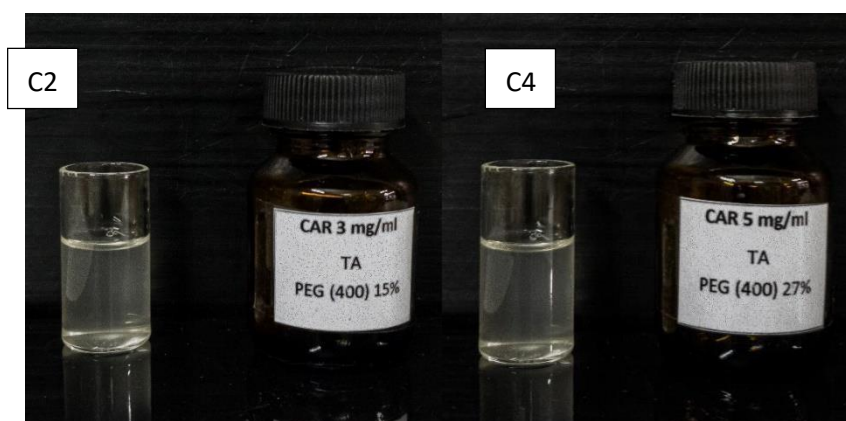


Figura 3.1.3. Control visual gotas de Carvedilol 3mg mL⁻¹, 15% v/v PEG 400 (C2); 5mg mL⁻¹, 27% v/v PEG 400 (C4)

También se observó que el porcentaje de recuperación mejoró con mayores concentraciones de PEG en las formulaciones. Es importante destacar que no se observaron picos extras (posibles productos de degradación) en los cromatogramas. A modo de ejemplo, la Figura 3.1.4 muestra un cromatograma de la formulación C4 conteniendo 5 mg mL^{-1} de CAR y 27% v/v de PEG a los 30 días de su elaboración. Por lo tanto, se concluyó que los precipitados y la ligera turbidez de las soluciones se deberían a problemas en la estabilidad física de las formulaciones. Este resultado puede estar relacionado con el hecho de que, si bien el PEG permite la disolución del fármaco, no es suficiente para mantener CAR en solución en el tiempo. Un incremento en la concentración de PEG podría mejorar este problema en la inestabilidad física, pero excedería los límites permitidos, por lo que se pensó en incorporar otro excipiente para mantener al IFA en solución por más tiempo.

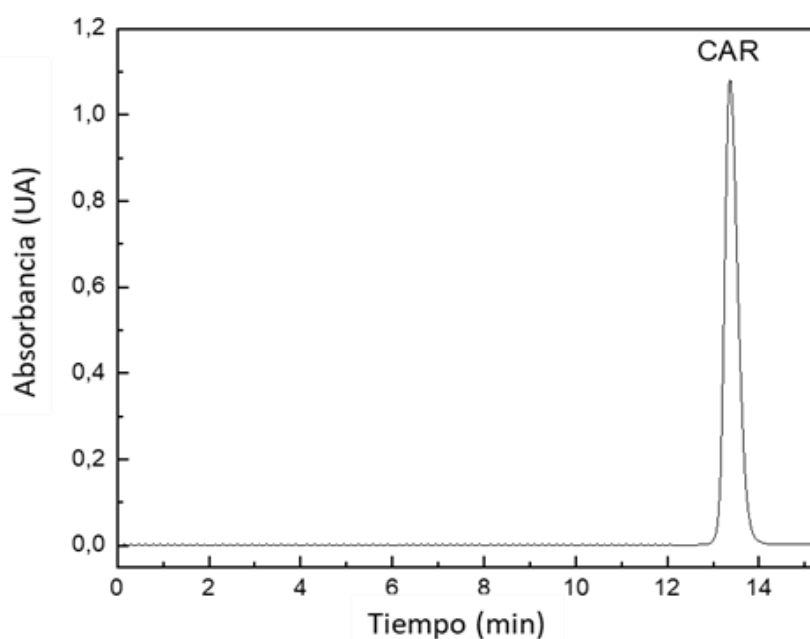


Figura 3.1.4. Cromatograma correspondiente a la formulación C4 conteniendo 5 mg mL^{-1} de CAR y 27% p/v de PEG a los 30 días de su elaboración

3.1.3 Mejora de la estabilidad física de las formulaciones

Para resolver el problema de la estabilidad física, se decidió seleccionar las formulaciones ligeramente turbias pero que no presentaban precipitado. Se añadió HPMC como excipiente a estas formulaciones que contenían 3 mg mL^{-1} con 15 % v/v de PEG 400

y 5 mg mL⁻¹ con 27 % v/v de PEG 400, estas nuevas formulaciones conteniendo HPMC se denominaron F1 y F2, respectivamente. La HPMC es un conocido emulsionante, agente suspensor y estabilizador. Además, se ha informado que la HPMC puede actuar como un inhibidor de la nucleación para IFAs que poseen estos aceptores de enlaces de hidrógeno (como CAR). Esta característica de retraso de la nucleación se atribuye no solo a la energía de activación requerida para el aumento de la nucleación, sino también a la reducción del crecimiento de cristales¹⁰⁰.

La HPMC fue incorporada aplicando dos métodos diferentes (Tabla 3.1.4), y la concentración utilizada fue de 0,25 % p/v para F1 (3 mg mL⁻¹) y 0,5 % p/v para F2 (5 mg mL⁻¹). Los métodos y fórmulas (expresados para un volumen final de 100 mL) se detallan a continuación:

Método 1: se dispersó la HPMC en la solución buffer y se incorporó a la mezcla CAR-PEG 400.

Método 2: CAR se solubilizó en la solución buffer que contenía PEG 400 y luego se añadió la HPMC.

Las cuatro formulaciones: F1-método 1, F1-método 2, F2-método 1 y F2-método 2, se almacenaron en envases de vidrio tipo III color ámbar durante 6 meses en diferentes condiciones (Tabla 3.1.5). Los parámetros estudiados en cada formulación fueron la recuperación de CAR, apariencia física y estabilidad microbiológica.

Tabla 3.1.4. Composiciones y métodos aplicados para obtener las diferentes formulaciones

	Método 1		Método 2	
	F1	F2	F1	F2
Carvedilol	300 mg	500 mg	300 mg	500 mg
HPMC	250 mg	500 mg	250 mg	500 mg
PEG 400	15 mL	27 mL	15 mL	27 mL
Buffer citrato	10 mM, pH 3	10 mM, pH 3	10 mM, pH 3	10 mM, pH 3
Conservante	Benzoato de sodio 0,2%p/v			

De acuerdo con las guías ICH Q1E¹⁰¹ el criterio de aceptación para la determinación del contenido de un IFA en un nuevo producto de dosificación debe estar entre el 95 y el 105% de lo declarado en el rótulo. Después de un almacenamiento de 180 días, se observó que las formulaciones preparadas con el método 2 (F1 cuando se almacena a 4°C y F2 cuando se almacena a 4 y 25°C) cumplieron con los requisitos (Tabla 3.1.5)

Tabla 3.1.5. Apariencia visual y recuperaciones de CAR en diferentes condiciones de almacenamiento

F	MP	CA	Tiempo (Días)/ Rec (%) n=3						
			0	30	60	90	120	150	180
F1	M1	1		88.9±0.7	85.7±0.4	84.4±0.8	83.6±0.5	82.2±0.5	80.0±0.9
		2	98.6±0.5	96.0±0.8	94.5±0.8	93.0±0.3	84.2±0.1	83.5±0.4	82.0±0.8
		3		87.8±0.5	84.6±0.2	80.0±0.7	79.0±0.9	78.6±0.8	78.0±0.3
	M2	1		101.1±1.1	100.7±0.9	95.7±0.5	96.2±0.5	96.0±0.4	95.8±0.5
		2	100.9±0.1	101.1±0.9	97.6±0.4	91.9±0.6	91.6±0.6	90.4±0.5	91.0±0.8
		3		101.1±0.7	97.1±0.5	88.9±0.1	88.1±0.2	86.1±0.8	89.0±0.4
F2	M1	1		98.2±0.8	97.8±0.6	96.0±0.3	95.6±0.8	94.8±0.3	93.0±0.9
		2	96.9±1.1	96.0±1.1	95.5±0.4	95.8±0.5	95.8±0.7	95.5±0.9	94.5±1.1
		3		90.8±0.8	88.6±0.5	85.0±0.9	83.0±0.2	82.7±0.4	81.0±0.8
	M2	1		101.9±0.6	101.3±1.2	100.7±0.8	99.5±0.9	99.3±0.8	99.8±0.9
		2	102.6±0.2	102.1±0.4	100.2±0.5	95.7±0.5	95.8±0.5	95.5±0.6	97.5±0.5
		3		101.2±0.8	95.5±0.8	91.2±0.6	90.8±0.4	86.5±0.4	89.0±0.3

F: Formulación; MP: Método de preparación, M1. Método 1, M2: Método 2 CA: Condición de almacenamiento, 1: 4°C, 2: 25°C, 3: 40°C

Colores: Verde: soluciones claras, amarillo: soluciones turbias, naranja: precipitados

La Figura 3.1.5 muestra las formulaciones elaboradas con el método 2 a los 180 días de su elaboración.

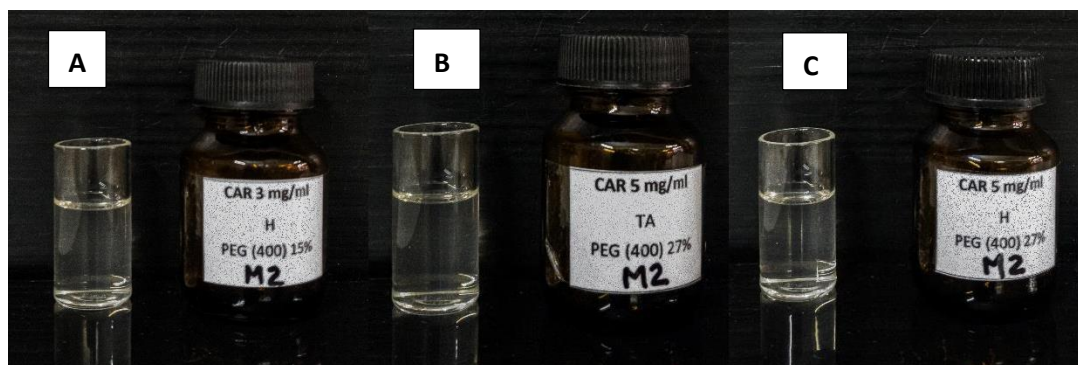


Figura 3.1.5. Control visual de las formulaciones en A: F1 M2 (Heladera), en B: F2 M2 (Temperatura ambiente) y C: F2 M2 (Heladera) a los 180 días de su elaboración.

Además, el pH final de las formulaciones fue controlado durante el mismo período. La Tabla 3.1.6 muestra los resultados obtenidos, como puede apreciarse, los valores de pH se mantuvieron dentro del rango de 3,10-3,17 durante el período en estudio.

Tabla 3.1.6. Valores de pH de las formulaciones de Carvedilol durante el período de almacenamiento

F	MP	CA	Tiempo (Días)/pH						
			0	30	60	90	120	150	180
F1	M1	1		3.13±0.02	3.15±0.03	3.14±0.02	3.17±0.01	3.14±0.02	3.15±0.01
		2	3.12±0.05	3.12±0.05	3.14±0.01	3.13±0.05	3.13±0.04	3.13±0.03	3.13±0.03
		3		3.14±0.04	3.16±0.02	3.11±0.04	3.15±0.05	3.11±0.02	3.12±0.02
	M2	1		3.17±0.01	3.18±0.01	3.16±0.02	3.15±0.04	3.15±0.02	3.14±0.02
		2	3.15±0.02	3.14±0.02	3.14±0.04	3.15±0.01	3.16±0.04	3.17±0.03	3.15±0.03
		3		3.16±0.04	3.15±0.02	3.17±0.03	3.13±0.03	3.14±0.02	3.14±0.04
F2	M1	1		3.15±0.01	3.13±0.02	3.13±0.02	3.14±0.02	3.10±0.01	3.11±0.02
		2	3.09±0.01	3.12±0.01	3.14±0.03	3.15±0.01	3.12±0.01	3.12±0.02	3.10±0.01
		3		3.14±0.03	3.15±0.02	3.14±0.02	3.13±0.03	3.11±0.03	3.13±0.04
	M2	1		3.15±0.04	3.11±0.01	3.15±0.02	3.14±0.04	3.15±0.02	3.15±0.03
		2	3.13±0.02	3.12±0.04	3.13±0.02	3.14±0.03	3.13±0.03	3.13±0.03	3.13±0.01
		3		3.16±0.02	3.17±0.02	3.15±0.04	3.15±0.02	3.16±0.02	3.14±0.02

F: Formulación; MP: Método de preparación, M1. Método 1, M2: Método 2 CA: Condición de almacenamiento, 1: 4°C, 2: 25°C, 3: 40°C

Colores: Verde: soluciones claras, amarillo: soluciones turbias, naranja: precipitados

3.1.4 Estudios de estabilidad microbiológica

Las soluciones orales no son estériles; sin embargo, existen límites en el número y tipo de microorganismos presentes en esta forma farmacéutica, siendo fundamental la ausencia de microorganismos altamente patógenos, como *Escherichia coli* (*E. coli*) fundamentalmente en formulaciones multidosis¹⁰². Todas las formulaciones que resultaron ser químicamente estables por 180 días fueron sometidas al control microbiológico exigido por las farmacopeas para soluciones orales no estériles. La Tabla 3.1.4.1 resume los datos obtenidos a los seis meses de su preparación. Los valores de CTMA y CTHyL cumplieron con los criterios de aceptación y no se detectó *E. coli* en ninguna de las formulaciones. Los resultados mostraron que todas las formulaciones que presentaron estabilidad fisicoquímica también fueron estables microbiológicamente durante 6 meses, independientemente de la temperatura de almacenamiento, y pueden administrarse en dosis seguras.

Tabla 3.1.7. Resultados del análisis microbiológico de las formulaciones a 180 días de su elaboración.

Muestra	Preparación	Condiciones estabilidad	Rec. (%)	Análisis microbiológico		
				CTHyL	CTMA	<i>E. coli</i>
F1	Método 2	4°C	95.8	<100	<1000	ND
F2	Método 2	4°C	99.8	<100	<1000	ND
		25°C	97.5	<100	<1000	ND

ND: no detectable

3.1.5 Análisis de enmascaramiento del sabor

Para mejorar la palatabilidad, la EMA menciona que "las soluciones orales de volúmenes de dosis muy pequeños se pueden diluir en una bebida, a menudo jugo de frutas o leche". En este estudio, las formulaciones se diluyeron en leche, con el objetivo de facilitar la administración del medicamento a bebés, niños¹⁰³ y pacientes con trastornos de la deglución¹⁰⁴.

Las dosis iniciales de CAR en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca en recién nacidos y niños, son del orden de 0,05-0,08 mg/kg/12h. Luego, las dosis se ajustan de acuerdo con la respuesta y la tolerancia con una dosis de rango medio, generalmente alrededor de 0,25 mg/kg/12 h⁸¹. Para un paciente de 10 kg de peso con una dosis inicial de 0,08 mg/kg (0,8 mg) se decidió probar 0,27 mL de la formulación F1 (dosis inicial) y 0,83 mL de la misma formulación (dosis media: 25 mg) diluida en 4,73 y 4,17 mL de leche, respectivamente. En la Figura 3.1.6 se representan las formulaciones y el promedio del nivel de acidez resultante del testeado realizado por los participantes con su correspondiente desvío estándar. Se utilizó el Test de Friedman para probar si existen diferencias significativas entre las mezclas probadas y el nivel de acidez con un nivel de significancia del 5%.

$$\chi^2_{\text{calculado}} = 47.044, \text{ gl} = 5, p\text{-value} = 5.565\text{e-}09, \chi^2_{(0,05;5)} \text{ crítico} = 11,0705.$$

Dado que el valor de Chi cuadrado obtenido es mayor que el Chi crítico, se acepta la Hipótesis alternativa, es decir, que hay diferencias entre las formulaciones testeadas.

Dado que el test utilizado encontró diferencias significativas entre al menos dos grupos, el siguiente paso fue determinar cuáles son los grupos diferentes, llevando adelante una comparación de todos los pares posibles. Para ello se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, la misma indicó que no hay diferencias entre la leche pura y la dosis inicial (puntuación $1,0 \pm 0,1$; $p = 1$) y entre la leche pura y la dosis media (puntuación $1,1 \pm 0,2$; $p = 1$). Además, ambas dosis diluidas en leche mostraron características organolépticas adecuadas, un pH de 6,0, y no se observó precipitado ni turbidez durante 48 h. Dado que no ocurrió desnaturalización de la leche durante el período de prueba, la formulación podría agregarse en el momento de la alimentación del paciente para mejorar su aceptabilidad.

Debido a que la dosis habitual para tratar pacientes adultos es desde 6,25 mg/día hasta 50 mg/día¹⁰⁵ se decidió cubrir la dosis máxima diluyendo 5 mL de la formulación F2 con 5 mL de leche (relación 1:1). La palatabilidad de esta dosis máxima (puntuación $2,7 \pm 0,5$; $p < 0,05$) mostró diferencias significativas con la leche. Aunque esta dilución no es la ideal para enmascarar la acidez del fármaco, es la dosis máxima para pacientes adultos (cuatro veces la dosis media), reduciendo el gusto desagradable de la formulación. Además, en pacientes adultos, dado que el volumen final en la dosificación no es una limitación, se podría aumentar el volumen de leche, o se podría reemplazar la leche por otra bebida para mejorar la aceptabilidad.

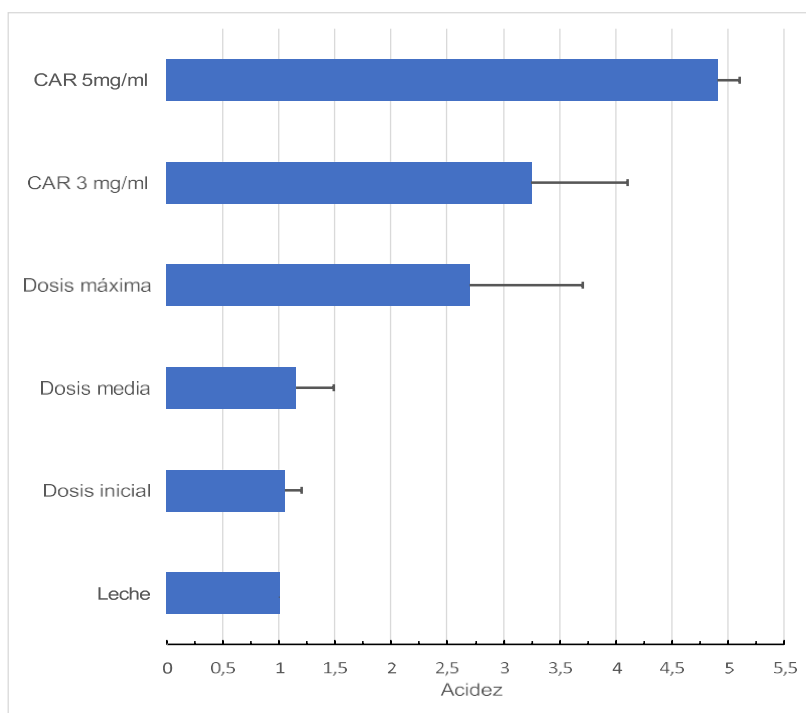


Figura 3.1.6. Acidez de dosis inicial y media (basada en F1), y dosis máxima (basada en F2), todas ellas diluidas en leche. Formulaciones de Carvedilol (CAR) 3 y 5 mg mL⁻¹ sin diluir.

3.1.6 Conclusiones

En este capítulo se detalló una metodología para obtener formulaciones líquidas orales de Carvedilol teniendo en cuenta su solubilidad y estabilidad. La aplicación de un diseño de Plackett-Burman permitió la selección de excipientes que favorecieron su solubilidad, se encontró que la concentración de PEG 400 y el valor de pH de la solución fueron factores influyentes. Para mejorar la estabilidad física de las formulaciones, se agregó HPMC como excipiente y se propusieron dos metodologías para preparar las soluciones. Se encontró que la formulación que contenía 5 mg mL⁻¹ desarrollada mediante la adición de HPMC al final de la preparación (método 2) fue estable durante 180 días a 4 y 25 °C. Con 5 mL de esta formulación se cubren los requerimientos de dosis para el tratamiento en pacientes adultos. Por otro lado, la formulación que contenía 3 mg mL⁻¹ elaborada empleando el método 2 fue estable durante 180 días a 4 °C. Esta formulación permite un mejor ajuste de la dosis en pacientes de menor peso corporal, como es el caso

de los pacientes pediátricos. Los resultados del estudio de estabilidad microbiológica mostraron que las formulaciones optimizadas permanecieron estables durante 6 meses cuando se almacenaron a temperatura ambiente y en heladera. Finalmente, la prueba de palatabilidad mostró que tanto la dosis inicial como la dosis media pediátricas presentaron una palatabilidad similar a la leche sola, y en la dilución en leche no se observó precipitado ni turbidez durante un día. Estas nuevas formas farmacéuticas desarrolladas en este trabajo (de mayor concentración que las reportadas en la literatura) y obtenidas con una mínima cantidad de excipientes de bajo costo, libres de etanol, azúcares y parabenos, y con un proceso de fabricación simple, reducen notablemente los volúmenes a administrar en las dosis ajustadas al peso corporal del paciente y representan una innovación en el mercado farmacéutico.

**BISOPROLOL
FUMARATO**

3.2 Introducción

BISO es un antagonista adrenérgico competitivo, beta 1-selectivo (cardioselectivo). Se usa en adultos para el tratamiento de la hipertensión arterial, de la angina de pecho crónica estable y de la insuficiencia cardíaca crónica estable, en esta última, con función ventricular sistólica izquierda reducida junto con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y diuréticos, y de manera opcional con glucósidos cardíacos. En pediatría se utiliza off – label (en combinación con hidroclorotiazida) en el tratamiento de la hipertensión arterial, e insuficiencia cardíaca¹⁰⁶.

Si no existen contraindicaciones, los beta bloqueantes son el tratamiento de primera línea para la angina crónica estable, particularmente para la angina de esfuerzo, en distintos grupos etarios (incluyendo ancianos) y en ambos sexos¹⁰⁷.

La incidencia de insuficiencia cardíaca (IC) ha aumentado con el envejecimiento de la sociedad¹⁰⁸, y su manejo se ha convertido en un problema epidemiológico. BISO tiene varios efectos beneficiosos en pacientes con insuficiencia cardíaca. Un estudio mostró reducciones significativas en la morbilidad y mortalidad en pacientes con IC con fracción de eyección reducida (ICFEr) al tratarlos con Bisoprolol¹⁰⁹.

Se debe tener precaución en algunos pacientes con insuficiencia cardíaca con respecto a la sobredosis con betabloqueantes, considerando sus efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos. Se necesita especial atención en pacientes de edad avanzada o con insuficiencia renal, porque puede haber un desequilibrio entre la dosis administrada con respecto a la farmacocinética y farmacodinamia de BISO en el organismo.

Por lo tanto, encontrar la dosis óptima de BISO para pacientes individuales con IC sigue siendo un desafío, y las presentaciones que ofrece el mercado no serían adecuadas para ajustar las mismas a las necesidades planteadas¹¹⁰.

El tratamiento con BISO debe iniciarse con dosis mínimas, incrementándolas gradualmente, de acuerdo con el siguiente esquema:

•1,25 mg una vez al día durante 1 semana, en caso de buena tolerancia aumentar la dosis a •2,5 mg una vez al día durante otra semana, en caso de buena tolerancia aumentar la dosis a •3,75 mg una vez al día durante otra semana, en caso de buena tolerancia aumentar la dosis a •5 mg una vez al día durante 4 semanas, en caso de buena tolerancia aumentar la dosis a •7,5 mg una vez al día durante 4 semanas, en caso de buena tolerancia aumentar la dosis a •10 mg una vez al día para el tratamiento de mantenimiento (Figura 3.2.1).



Figura 3.2.1: Esquema de dosificación en el tratamiento con Bisoprolol fumarato

En nuestro país se encuentran autorizadas para su comercialización todas las concentraciones mencionadas anteriormente, pero en el mercado solo se consiguen comprimidos conteniendo 2,5; 5 y 10 mg de BISO. Suele encontrarse también en asociación con hidroclorotiazida en dosis única de 10 mg/25 mg (BISO/Hidroclorotiazida).

Con el fin de brindar una alternativa a pacientes con disfagia, Nozaki y colaboradores desarrollaron un parche transdérmico de BISO, BisoNo[®] tape, que fue lanzado al mercado en Japón en el 2013. Se consigue en dosis de 2, 4 y 8 mg de BISO, pero no permite flexibilidad en la dosificación¹¹¹.

La USP categoriza a BISO como “muy soluble en agua”, lo que le asignaría una solubilidad de al menos 1000 mg mL⁻¹ ⁶⁴, pero otros autores han sido más conservadores y lo categorizan como “soluble” y le asignan una solubilidad en agua de 33 mg mL⁻¹. En contraste, su base libre, presenta una baja solubilidad acuosa reportada en 2,24 mg mL⁻¹, es Clase I según BSC, por su alta solubilidad y permeabilidad de membrana¹¹².

Teniendo en cuenta la falta de formulaciones líquidas orales, el propósito de este capítulo fue desarrollar formulaciones líquidas de BISO, estables tanto fisicoquímica como microbiológicamente. Las mismas deberán ser adecuadas para pacientes pediátricos y

adultos (incluidos diabéticos), desarrolladas con un mínimo de excipientes, garantizando las buenas prácticas de fabricación y control durante la preparación y el almacenamiento.

3.2.1 Gotas de Bisoprolol Fumarato

Considerando la elevada solubilidad acuosa de BISO, se elaboraron soluciones con dos concentraciones: 2,5 (G1) y 5 mg mL⁻¹ (G2). Estas presentaciones permiten una dosificación gradual en pacientes de todas las edades y pesos corporales. Dado que es necesario garantizar una viscosidad adecuada para la correcta dispensación de las gotas, se incorporó a la formulación un 10% v/v de glicerina. Como agente conservante se empleó benzoato de sodio 0,2% p/v.

3.2.1.1 Estudios de estabilidad química

Las muestras fueron almacenadas en tres condiciones, heladera (4°C), temperatura ambiente (25°C) y cámara de estabilidad (40°C/ 75%HR), en envases gotero de 30 mL de vidrio tipo III color ámbar, para luego realizar los estudios de estabilidad acelerados y a largo plazo, establecidos por FA⁵⁸. La concentración de BISO en las formulaciones fue determinada por CLAE⁷⁴ a los 6, 18 y 24 meses de su elaboración para las muestras conservadas en heladera y temperatura ambiente, y a los 6 meses para las muestras conservadas en cámara a 40°C. Además, las características organolépticas como color, olor y apariencia fueron evaluadas durante el mismo período. La Tabla 3.2.1 resume la composición final, densidades y pH finales de ambas formulaciones al momento de su preparación.

Tabla 3.2.1. Composición final, densidad y pH de gotas de Bisoprolol conteniendo 2,5 y 5 mg mL⁻¹.

	Gotas 1 (G1)	Gotas 2 (G2)
Bisoprolol	250 mg	500 mg
Glicerina	10 mL	10 mL
Benzoato de sodio	0,2% p/v	
Agua estéril	csp 100 mL	csp 100 mL
Densidad	1,0041 g/mL	1,0255 g/mL
pH	6,72 ± 0,05	5,92 ± 0,03

La Tabla 3.2.2 resume las recuperaciones de BISO obtenidas en ambas formulaciones luego de preparadas y al ser almacenadas por 6, 18 y 24 meses en diferentes condiciones. En todos los casos, las recuperaciones del IFA superaron el 95%.

Tabla 3.2.2. Recuperaciones de Bisoprolol 2,5 y 5 mg mL⁻¹ inicial y a los 6, 18 y 24 meses de su elaboración, conservadas a 4, 25 y 40°C.

CA	F	Inicial	6 meses	18 meses	24 meses
4±2°C	G1	99,5 ± 0,7	98,1 ± 0,9	97,9 ± 1,1	97,7 ± 0,6
	G2	100,3 ± 1,1	98,5 ± 0,3	98,4 ± 0,8	98,2 ± 0,5
25±2°C	G1	99,5 ± 0,3	98,4 ± 0,9	97,7 ± 0,8	97,5 ± 0,6
	G2	100,3 ± 0,5	99,8 ± 0,6	99,7 ± 0,7	99,5 ± 0,4
40±2°C (75%HR)	G1	99,5 ± 0,5	98,5 ± 0,6	-	-
	G2	100,3 ± 0,7	98,3 ± 1,3	-	-

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación.

Por otro lado, el pH fue controlado durante el mismo período de tiempo. La Tabla 3.2.3 resume los datos obtenidos, como puede observarse, no se encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos para cada formulación durante el período estudiado. Para G1, el pH se mantuvo entre 6,68 y 6,75, mientras que para G2 el rango de valores de pH fue 5,90-5,98.

Tabla 3.2.3. Valores de pH de las gotas de Bisoprolol fumarato durante el período de almacenamiento estudiado.

CA	F	Inicial	6 meses	18 meses	24 meses
4±2°C	G1	6,72 ± 0,05	6,73 ± 0,06	6,68 ± 0,05	6,62 ± 0,05
	G2	5,92 ± 0,03	5,95 ± 0,02	5,98 ± 0,07	5,97 ± 0,02
25±2°C	G1	6,72 ± 0,05	6,69 ± 0,03	6,74 ± 0,04	6,75 ± 0,04
	G2	5,92 ± 0,03	5,90 ± 0,04	5,95 ± 0,07	5,96 ± 0,03
40±2°C (75%HR)	G1	6,72 ± 0,05	6,74 ± 0,03	-	-
	G2	5,92 ± 0,03	5,97 ± 0,05	-	-

CA: Condición de almacenamiento

Para determinar si la condición de almacenamiento luego de 24 meses tenía una influencia significativa sobre la recuperación de BISO, se aplicó un test “t” (Ecuación 2.1) a las muestras de G1 y G2 almacenadas a 4 y 25°C.

La Tabla 3.2.4 resume los resultados de las recuperaciones obtenidas a 4 y 25°C, promedio, varianza y $t_{\text{calculado}}$ para G1 y G2. Dado que el valor de t calculado es menor al valor de t_{tabla} , no se puede rechazar la hipótesis de medias iguales, por lo que las recuperaciones encontradas para ambas condiciones de almacenamiento son iguales. Los resultados obtenidos en ambas condiciones se encuentran dentro de las especificaciones para nuevos productos formulados¹⁰¹ sin observarse una influencia significativa de la condición de almacenamiento utilizada, en la recuperación de BISO.

Tabla 3.2.4. Recuperación de Bisoprolol fumarato contenido en G1 y G2 luego del almacenamiento a 4 y 25 °C y comparación estadística de los resultados.

CA	Inicial	6 meses	18 meses	24 meses	Promedio	Varianzas	$t_{\text{calculado}}$
G1							
4°C	99,5± 0,7	98,1± 0,9	97,9± 1,1	97,5± 0,6	98,25	0,567	0,16
25°C	99,5± 0,3	98,4± 0,9	96,7± 0,8	96,5± 0,6	97,77	1,537	
G2							
4°C	100,3 ± 1,1	98,5 ± 0,3	98,4 ± 0,8	98,2 ± 0,5	98,85	0,974	1,8021
25°C	100,3 ± 0,5	99,8 ± 0,6	99,7 ± 0,7	99,5 ± 0,4	99,82	0,340	

CA: Condición de almacenamiento; $t_{\text{tabla}(0,05;7)} = 1,8946$

El mismo análisis fue llevado a cabo sobre los resultados de pH obtenidos en el mismo período de estudio. La Tabla 3.2.5 resume los valores de $t_{\text{calculado}}$ en ambos casos. Como puede apreciarse en la mencionada tabla, no existieron diferencias estadísticamente significativas en los valores de pH medidos.

Tabla 3.2.5. pH final de las gotas de Bisoprolol fumarato G1 y G2 luego del almacenamiento a 4 y 25°C y comparación estadística de los resultados

CA	Inicial	6 meses	18 meses	24 meses	Promedio	Varianzas	$t_{\text{calculado}}$
G1							
4°C	6,72 ± 0,05	6,73 ± 0,06	6,68 ± 0,05	6,62 ± 0,05	6,687	0,0499	1,2518
25°C	6,72 ± 0,05	6,69 ± 0,03	6,74 ± 0,04	6,75 ± 0,04	6,725	0,0264	
G2							
4°C	5,92 ± 0,03	5,95 ± 0,02	5,98 ± 0,07	5,97 ± 0,02	5,955	0,0264	1,6684
25°C	5,92 ± 0,03	5,90 ± 0,04	5,95 ± 0,07	5,96 ± 0,03	5,9325	0,0275	

CA: Condición de almacenamiento; $t_{\text{tabla}(0,05;7)} = 1,8946$

La Figura 3.2.2 muestra el aspecto visual de las gotas de BISO conteniendo 2,5 y 5 mg mL⁻¹, a los 24 meses de su elaboración y conservadas a 4 y 25°C.

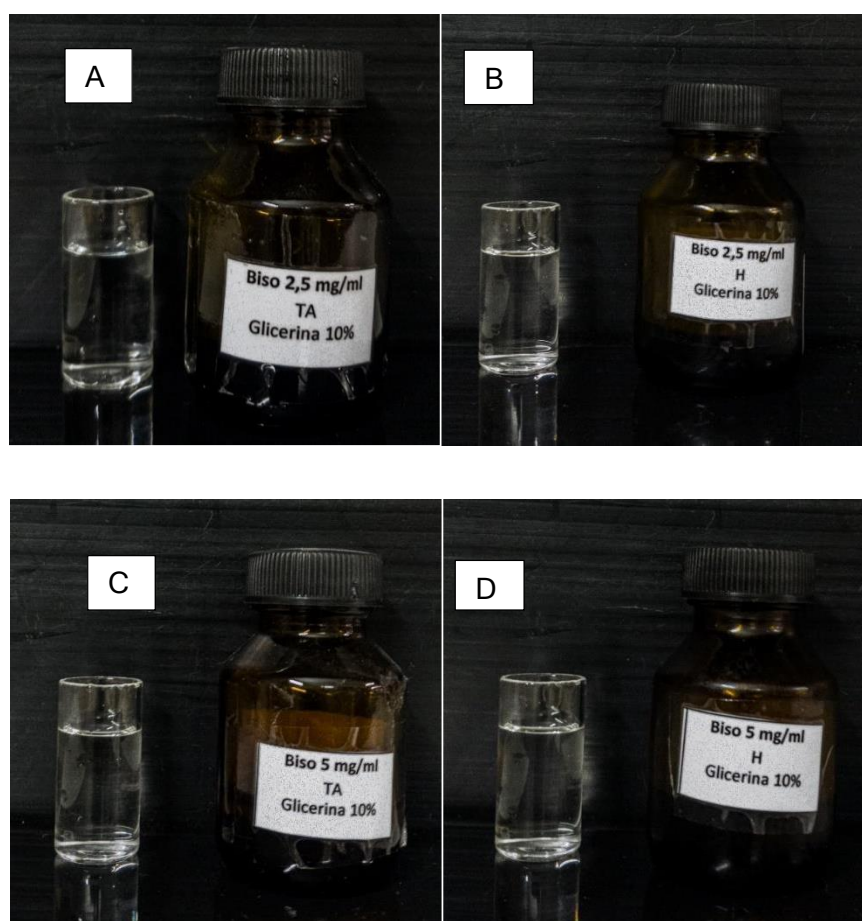


Figura 3.2.2. Control visual de las gotas de Bisoprolol a los 24 meses de su elaboración. A: Bisoprolol 2,5 mg mL⁻¹ conservada a 25°C; B: Bisoprolol 2,5 mg mL⁻¹ conservada a 4°C; C: Bisoprolol 5 mg mL⁻¹ conservada a 25°C; D: Bisoprolol 5 mg mL⁻¹ conservada a 4°C.

3.2.1.2 Estudios de estabilidad microbiológica

El ensayo microbiológico se llevó a cabo analizando ambas formulaciones después de 12 y 24 meses de almacenamiento a 4 y 25 °C, según la monografía de productos no estériles de la Farmacopea Argentina⁵⁸, como se mencionó anteriormente. No se observó crecimiento microbiano ni la presencia de *E coli* en ambas formulaciones durante el período evaluado. (Tabla 3.2.6)

Tabla 3.2.6. Estudios microbiológicos de las formulaciones en las diferentes condiciones de almacenamiento.

	CA	F	CMAT	CTHyL	<i>E.coli</i>	Resultado
12 meses	4±2°C	G1	<1000	<100	ND	Cumple
		G2	<1000	<100	ND	Cumple
	25±2°C	G1	<1000	<100	ND	Cumple
		G2	<1000	<100	ND	Cumple
24 meses	4±2°C	G1	<1000	<100	ND	Cumple
		G2	<1000	<100	ND	Cumple
	25±2°C	G1	<1000	<100	ND	Cumple
		G2	<1000	<100	ND	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, E coli - Cumple si hay ausencia, ND: No detectable

Es importante destacar la estabilidad fisicoquímica y microbiológica lograda en las formulaciones conservadas a temperatura ambiente, este hecho favorecería la logística de almacenamiento y traslado del producto, disminuyendo sus costos productivos respecto a aquellas formulaciones que necesitan ser almacenadas en heladera.

3.2.1.3 Conclusión gotas de Bisoprolol Fumarato

En esta primera etapa, se desarrollaron dos formulaciones líquidas conteniendo 2,5 y 5 mg mL⁻¹ de Bisoprolol fumarato con el agregado de 10 %v/v de glicerina y agua conservada empleando benzoato de sodio 0,2% p/v. El procedimiento de elaboración es simple y seguro, se ha empleado un número acotado de excipientes y las formulaciones son aptas para ser administradas a pacientes diabéticos.

Las formulaciones demostraron ser estables fisicoquímica y microbiológica a 4 y 25 °C, por al menos 24 meses desde el momento de su elaboración. Dada la sencillez del

procedimiento de elaboración, es factible que puedan ser preparadas en una oficina de farmacia que cumpla con las normas de Buenas prácticas de fabricación y control, asegurando la eficacia de estas en el momento de su dispensación. Además, debido a la estabilidad fisicoquímica y microbiológica probada en un período de 24 meses, estas formulaciones podrían ser consideradas para su elaboración a escala industrial.

3.2.2 Jarabes de Bisoprolol Fumarato

En ocasiones es necesario mejorar el sabor de las formulaciones líquidas, cuando se administran a niños o cuando se necesita administrar una dosis mayor del fármaco, en estos casos es más conveniente utilizar un jarabe que dispensar el mismo volumen en gotas, por lo tanto, se propuso el desarrollo de dos jarabes de BISO con la misma concentración que contenían las gotas. Se disolvió la cantidad correspondiente de BISO en jarabe simple (sacarosa 85%) elaborado con agua conservada conteniendo 0,2% p/v de benzoato de sodio. La Tabla 3.2.7 resume la composición de ambos jarabes y los datos de densidad y pH finales luego de su preparación.

Tabla 3.2.7. Composición final, densidad y pH de jarabes de Bisoprolol fumarato conteniendo 2,5 y 5 mg mL⁻¹.

	Jarabe 1 (J1)	Jarabe 2 (J2)
Bisoprolol	250 mg	500 mg
Jarabe (sacarosa 85%)	csp 100 mL	csp 100 mL
Benzoato de sodio		0,2% p/v
Densidad	1,27 g/mL	1,30 g/mL
pH	6,09 ± 0,05	6,14 ± 0,03

3.2.2.1 Estudios de estabilidad química

Al igual que las gotas, los jarabes fueron almacenados en tres condiciones, 4, 25 (estabilidad a largo plazo) y 40°C (estabilidad acelerada), en envases de 30 mL de vidrio tipo III color ámbar, para realizar los estudios establecidos por FA⁵⁸. La concentración del IFA fue determinada por CLAE a los 6, 18 y 24 meses de su elaboración para las muestras

conservadas en heladera y temperatura ambiente, y a los 6 meses para las muestras conservadas cámara 40 °C. La Tabla 3.2.8 resume las recuperaciones encontradas en cada caso.

Tabla 3.2.8. Recuperaciones de Bisoprolol fumarato 2,5 y 5 mg mL⁻¹ a los 6, 18 y 24 meses de su elaboración, conservadas a 4, 25 y 40°C.

CA	F	Inicial	6 meses	18 meses	24 meses
4±2°C	J1	101,9 ± 0,6	99,7 ± 0,8	98,7 ± 1,0	98,5 ± 0,8
	J2	101,3 ± 1,0	99,5 ± 0,5	99,1 ± 0,3	98,9 ± 0,5
25±2°C	J1	101,9 ± 0,4	99,0 ± 0,5	98,5 ± 0,6	98,3 ± 0,4
	J2	101,3 ± 0,3	99,2 ± 0,7	98,9 ± 0,9	98,2 ± 0,8
40±2°C (75%HR)	J1	101,9 ± 0,7	95,5 ± 0,9	-	-
	J2	101,3 ± 0,5	95,2 ± 1,1	-	-

CA: Condición de almacenamiento, F: Formulación

Independientemente de la condición de almacenamiento, tanto en J1 como J2 se obtuvieron recuperaciones superiores al 95 % a los 24 meses de su elaboración.

Por otra parte, el pH de las formulaciones fue controlado durante el mismo período de tiempo (Tabla 3.2.9). Como puede apreciarse, no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos, encontrándose los valores en el rango 6,08-6,18.

Al igual que para las gotas, para determinar si la condición de almacenamiento a los 24 meses influía significativamente en la recuperación de BISO, se aplicó un test “t” (Ecuación 2.1) a las muestras de J1 y J2 almacenadas a 4 y 25°C.

La Tabla 3.2.10 resume los resultados de las recuperaciones obtenidas a 4 y 25°C, promedio, varianza y $t_{\text{calculado}}$ para J1 y J2. Dado que el valor de $t_{\text{calculado}}$ es menor al valor de t_{tabla} , no se puede rechazar la hipótesis de medias iguales, por lo que las recuperaciones encontradas para ambas condiciones de almacenamiento son iguales.

Tabla 3.2.9. Valores de pH de los jarabes de Bisoprolol fumarato durante el período de almacenamiento estudiado.

CA	F	Inicial	6 meses	18 meses	24 meses
4±2°C	J1	6,09 ± 0,05	6,07 ± 0,06	6,08 ± 0,05	6,07 ± 0,05
	J2	6,14 ± 0,03	6,18 ± 0,02	6,12 ± 0,07	6,16 ± 0,02
25±2°C	J1	6,09 ± 0,05	6,10 ± 0,03	6,04 ± 0,04	6,10 ± 0,04
	J2	6,14 ± 0,03	6,12 ± 0,04	6,15 ± 0,07	6,16 ± 0,03
40±2°C (75%HR)	J1	6,09 ± 0,05	6,11 ± 0,03	-	-
	J2	6,14 ± 0,03	6,08 ± 0,05	-	-

CA: Condición de almacenamiento; F: Formulación

Los resultados obtenidos en ambas condiciones se encuentran dentro de las especificaciones para nuevos productos formulados (ICH QE) sin observarse una influencia significativa del almacenamiento seleccionado en la recuperación de BISO.

Tabla 3.2.10. Recuperación de Bisoprolol fumarato contenido en J1 y J2 luego del almacenamiento a 4 y 25 °C y comparación estadística de los resultados.

CA	inicial	6 meses	18 meses	24 meses	Promedio	Varianzas	$t_{\text{calculado}}$
J1							
4°C	101,9 ± 0,6	99,7 ± 0,8	98,7 ± 1,0	97,5 ± 0,8	99,45	2,60	0,02
25°C	101,3 ± 1,0	99,5 ± 0,5	98,7 ± 0,3	98,4 ± 0,5	99,475	1,27	
J2							
4°C	101,3 ± 1,0	99,5 ± 0,5	99,1 ± 0,3	98,9 ± 0,5	99,7	1,095	0,3488
25°C	101,3 ± 0,3	99,2 ± 0,7	98,9 ± 0,9	98,2 ± 0,8	99,4	1,334	

CA: Condición de almacenamiento; $t_{\text{tabla}(0,05;7)} = 1,8946$

El mismo análisis fue llevado a cabo sobre los resultados de pH obtenidos en el mismo período de estudio. La Tabla 3.2.11 resume los valores de $t_{\text{calculado}}$ en ambos casos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de pH medidos.

Tabla 3.2.11. pH final de los jarabes de Bisoprolol fumarato J1 y J2 luego del almacenamiento a 4 y 25°C y comparación estadística de los resultados

CA	Inicial	6 meses	18 meses	24 meses	Promedio	Varianzas	t _{calculado}
J1							
4°C	6,09 ± 0,05	6,07 ± 0,06	6,08 ± 0,05	6,07 ± 0,05	6,0775	0,0095	0,4671
25°C	6,09 ± 0,05	6,10 ± 0,03	6,04 ± 0,04	6,10 ± 0,04	6,0825	0,0287	
J2							
4°C	6,14 ± 0,03	6,18 ± 0,02	6,12 ± 0,07	6,16 ± 0,02	6,15	0,0258	0,6855
25°C	6,14 ± 0,03	6,12 ± 0,04	6,15 ± 0,07	6,16 ± 0,03	6,1525	0,0171	

CA: Condición de almacenamiento; $t_{\text{tabla}(0,05;7)} = 1,8946$

La Figura 3.2.3 muestra el aspecto de los jarabes a los 24 meses de su elaboración, conservados a 4 y 25°C.

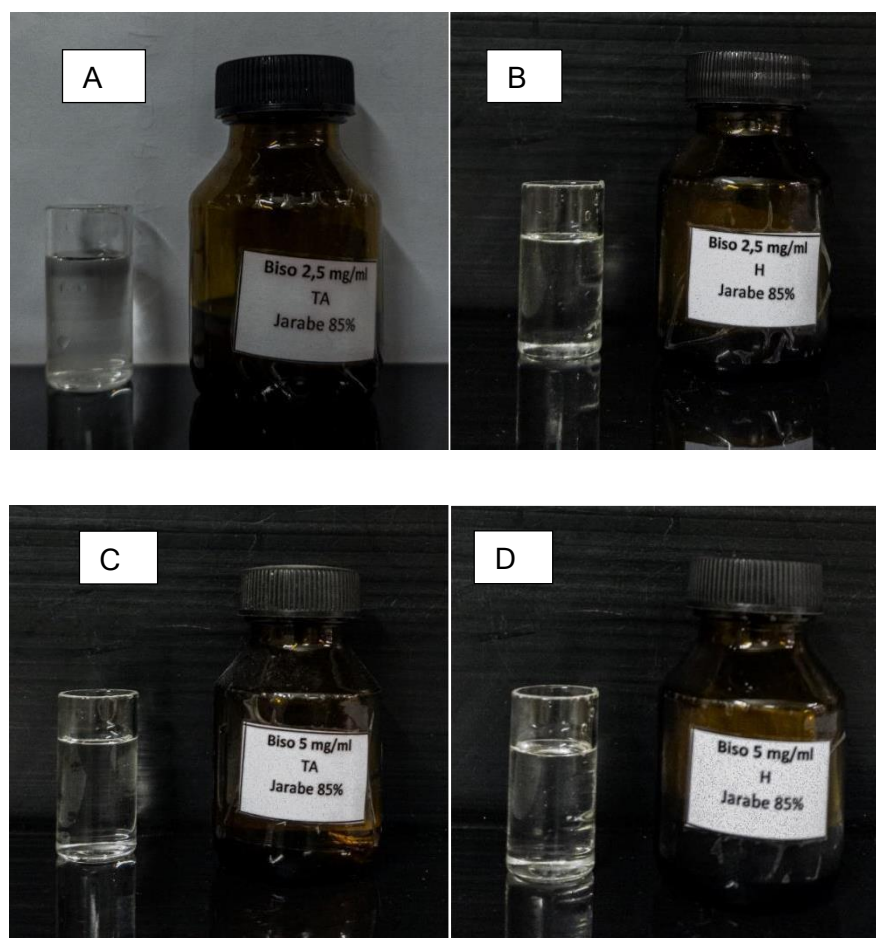


Figura 3.2.3. Control visual de los jarabes de Bisoprolol a 24 meses de su elaboración. A: Bisoprolol 2,5 mg mL⁻¹ conservada a 25°C; B: Bisoprolol 2,5 mg mL⁻¹ conservada a 4°C; C: Bisoprolol 5 mg mL⁻¹ conservada a 25°C; D: Bisoprolol 5 mg mL⁻¹ conservada a 4°C.

3.2.2.2 Estudios de estabilidad microbiológica

Al igual que para las gotas, se realizó el control microbiológico de las formulaciones a los 12 y 24 meses (Tabla 3.2.12).

Tabla 3.2.12. Estudios microbiológicos de los jarabes de Bisoprolol fumarato en las diferentes condiciones de almacenamiento.

	CA	F	CMAT	CTHyL	<i>E. coli</i>	Resultado
12 meses	4±2°C	J1	<1000	<100	ND	Cumple
		J2	<1000	<100	ND	Cumple
	25±2°C	J1	<1000	<100	ND	Cumple
		J2	<1000	<100	ND	Cumple
24 meses	4±2°C	J1	<1000	<100	ND	Cumple
		J2	<1000	<100	ND	Cumple
	25±2°C	J1	<1000	<100	ND	Cumple
		J2	<1000	<100	ND	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, *E. coli* - Cumple si hay ausencia- ND: No detectable

No se observó crecimiento microbiano ni la presencia de *E. coli* en ambas formulaciones durante el período evaluado y almacenadas a 4 y 25°C.

Como se ha mencionado en el caso de las gotas de BISO, cabe destacar que obtener una formulación fisicoquímica y microbiológicamente estable a temperatura ambiente, reduce gastos de almacenamiento y transporte, ya que evita tener que garantizar la cadena de frío.

3.2.2.3 Conclusión jarabes de Bisoprolol fumarato

Se desarrollaron dos jarabes conteniendo 2,5 y 5 mg mL⁻¹ de Bisoprolol fumarato. Estas formulaciones resultaron ser estables a 4 y 25°C tanto fisicoquímica como microbiológicamente durante 24 meses desde su preparación. El procedimiento de elaboración es simple y seguro y puede ser aplicado en la oficina de farmacia para ser

dispensado a pacientes de todas las edades. Por último, el período de estabilidad logrado en estas formulaciones podría favorecer su producción a nivel industrial.

3.2.3 Conclusiones

Se desarrollaron gotas conteniendo 2,5 y 5 mg mL⁻¹ de Bisoprolol fumarato. Las mismas resultaron ser estables fisicoquímica y microbiológicamente durante 24 meses desde el momento de su elaboración. Estas gotas podrían ser empleadas para pacientes diabéticos y facilitarían la flexibilidad de la dosificación al inicio del tratamiento.

Se desarrollaron jarabes conteniendo 2,5 y 5 mg mL⁻¹ de BISO. Los mismos resultaron ser estables fisicoquímica y microbiológicamente durante 24 meses desde el momento de su elaboración. En este caso, la mejora en la palatabilidad de la formulación permitirá una mayor adherencia al tratamiento especialmente en pacientes pediátricos. En todos los casos, la flexibilidad en la dosificación favorece el tratamiento centrado en el paciente.

Tanto para las gotas como para los jarabes desarrollados, se demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a las condiciones de almacenamiento (4 y 25°C) a los 24 meses de su elaboración. La estabilidad a temperatura ambiente presenta la ventaja de disminuir los gastos de traslado y logística del producto final y la correcta conservación de las formulaciones en aquellos lugares que no cuenten con refrigeradores.

AMIODARONA
CLORHIDRATO

3.3. Introducción

AMIO fue desarrollada por la empresa belga Labaz en el año 1962, como una opción de tratamiento para la angina de pecho, ya que produce vasodilatación coronaria y disminuye la demanda cardíaca de oxígeno. Sin embargo, sus efectos antiarrítmicos pronunciados reorientaron su uso. AMIO se ha convertido en un fármaco antiarrítmico de clase III ampliamente utilizado, para tratar y prevenir varios tipos de latidos cardíacos irregulares, incluida la taquicardia ventricular (TV), la fibrilación ventricular (FV), así como fibrilación auricular (FA) y taquicardia supraventricular paroxística (PSVT)¹¹³. En comparación con otros fármacos antiarrítmicos, es más eficaz en el tratamiento de las arritmias supraventriculares y ventriculares¹¹⁴.

Otro uso recientemente publicado, es su actividad antimicótica contra una variedad de hongos, incluido *Cryptococcus neoformans*¹¹⁵, causante de la meningoencefalitis criptocócica, una infección oportunista en humanos, que es una de las principales causas de muerte en pacientes con HIV. La evidencia en *Saccharomyces cerevisiae* ha demostrado que la amiodarona interrumpe la homeostasis del Ca²⁺, desencadenando una entrada inmediata de calcio dependiente de la dosis, seguida de una liberación continua de calcio de la vacuola^{116,117}.

Aunque AMIO es un fármaco eficaz, tiene un alto perfil de toxicidad. Su uso se ha complicado por problemas de seguridad, que se enfatizan en varios informes clínicos asociados con toxicidad pulmonar, tiroidea, ocular y/o hepática. También se sabe que interactúa con una gran variedad de agentes terapéuticos (interacciones fármaco-fármaco, por ejemplo, anticoagulantes, antihipertensivos, antidiabéticos, anticonvulsivantes, y anti retrovirales, entre otros), como resultado de la inhibición del metabolismo mediado por el citocromo P450, lo que aumenta la exposición sistémica del fármaco no metabolizado¹¹⁸⁻¹²⁰.

Estos efectos adversos son particularmente problemáticos para los pacientes geriátricos que son más susceptibles a las toxicidades de los medicamentos y además son

los pacientes que tienen tasas más altas de polifarmacia. Al ser utilizado en una población más grande de diferentes edades, su información de seguridad en geriatría no se conoce claramente¹²¹.

La amiodarona tiene un espectro inusual de efectos secundarios con una prevalencia del 15% en el primer año de tratamiento, aumentando hasta el 50% durante su uso a largo plazo. (Tabla 3.3.1)

Tabla 3.3.1. Efectos secundarios de Amiodarona clorhidrato

Cardiovascular	Hipotensión, bradiarritmia, insuficiencia cardíaca congestiva, QT prolongado
Respiratorio	Neumonía, Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda, Fibrosis Pulmonar
Dermatológico	Coloración azul grisácea de la piel, fotosensibilidad, síndrome de Steven Johnson
Endócrino	Hipertiroidismo, Hipotiroidismo, Tirotoxicosis.
Neurológico	Mareos, Trastornos del movimiento (ataxia, temblores), parestesia, neuropatía periférica.
Hepático	Aumento de enzimas hepáticas como SGOT, SGPT y bilirrubina.
Oftálmico	Depósitos, neuropatía óptica, retinopatía
Músculo esquelético	Dolor lumbar, rabdomiólisis
Gastrointestinal	Constipación, náuseas, vómitos, pérdida de apetito
Inmunológico	Anafilaxia, reacciones de hipersensibilidad
Renal	Insuficiencia renal (niveles elevados de creatinina)

AMIO es un polvo cristalino de color blanco a ligeramente amarillo y es muy poco soluble en agua (0,2-0,5 mg mL⁻¹). Su escasa solubilidad acuosa es una de las propiedades fisicoquímicas más críticas en la absorción y biodisponibilidad del fármaco¹²².

Para superar las limitaciones en la biodisponibilidad de fármacos poco solubles en agua, se han utilizado ampliamente formulaciones basadas en lípidos y tensioactivos¹²³. *Lamprecht y colaboradores* formularon y caracterizaron por completo nano cápsulas lipídicas cargadas con AMIO. Los estudios *in vitro* demostraron que la estructura monodispersa y de tamaño submicrónico de la formulación, así como sus excipientes biocompatibles, la hacían adecuada para su administración intravenosa o intraperitoneal¹²⁴.

Sin embargo, la vía de administración de la formulación desarrollada no la hace apta para continuar con un tratamiento ambulatorio.

Elgart y colaboradores informaron sobre el uso de un sistema de administración de fármacos auto-nano-emulsionante (SNEDDS) para mejorar la biodisponibilidad oral de la amiodarona¹²⁵. También se han diseñado transportadores de fármacos coloidales para administrarlos específicamente en el sitio de acción¹²⁶.

Kronbauer Oliveira y colaboradores, desarrollaron diferentes nanoformulaciones con actividad antifúngica, una de las cuales combinó dos fármacos con diferentes mecanismos de acción. Se produjeron nano cápsulas de núcleo lipídico (LNC) cargadas con amiodarona (LNC_{AMD}), fluconazol (LNC_{FLU}) y ambos (LNC_{AMD+FLU}) para lograr una mejor eficacia *in vivo*. En un modelo de tratamiento intranasal, todas las formulaciones de LNC tuvieron un efecto antifúngico. En un tratamiento intraperitoneal, las nano cápsulas cargadas con AMIO mostraron un mayor efecto contra *Cryptococcus neoformans*, mientras que las nano cápsulas conteniendo fluconazol y la combinación de los dos antifúngicos no mostraron diferencias con los IFAs sin nanoencapsular¹²⁷.

En nuestro país, AMIO se encuentra disponible como comprimidos de 200 mg, y también como solución inyectable (50 mg mL⁻¹). La forma sólida no permite flexibilidad en la dosificación, y por el contenido de excipientes (10% p/v de Polisorbato 80 y 20 mg mL⁻¹ de alcohol bencílico) la formulación parenteral no es apta para su administración oral.

En pacientes adultos, la dosis de carga (600 mg), es 1 comprimido (200 mg) 3 veces por día durante 8 a 10 días. Para el mantenimiento se debe determinar la dosis mínima efectiva, que es individual para cada paciente, y puede variar de 1/2 comprimido por día (1 comprimido cada 2 días) a 2 comprimidos todos los días, según criterio médico. Una vez obtenidos la impregnación tisular y el resultado terapéutico deseado, se recomienda continuar el tratamiento empleando las dosis mínimas efectivas.

De acuerdo con la Asociación Española de Pediatría¹²⁸, las dosis y pautas de administración oral dependen de la edad y peso del paciente.

Neonatal:

En taquicardia supraventricular: 10-20 mg/kg/día, en 2 dosis, 7-10 días. Reducir luego la dosis a la mitad, 5-10 mg/kg/día, por 2-7 meses. Hay estudios donde los pacientes que recibieron una dosis de carga más alta (20 mg/kg/día) tenían más probabilidades de tener una prolongación del intervalo QT, que representa la despolarización y repolarización ventricular en el trazado del electrocardiograma.

Niños:

Calcular la dosis usando la superficie corporal en niños <1 año. Dosis de carga: 10-15 mg/kg/día o 600-800 mg/1,73 m²/día en 1-2 dosis, durante 4-14 días o hasta un adecuado control de la arritmia o la aparición de efectos adversos. Reducir a 5 mg/kg/día o 200-400 mg/1,73 m²/día en una dosis, varias semanas; reducir a la mínima dosis efectiva posible. Dosis mínima: 2,5 mg/kg/día, 5-7 días a la semana.

Amiodarona Clorhidrato se encuentra en el listado de medicamentos esenciales de la OMS. Los medicamentos que se encuentran en este listado cubren las necesidades sanitarias prioritarias de la población y deben estar disponibles en todo momento, en la forma farmacéutica adecuada¹²⁹.

Como puede observarse, hay una amplia variabilidad en la dosificación y la exactitud en el tratamiento puede prevenir muchos efectos adversos. Ante la falta de una formulación oral líquida disponible, nuestro objetivo fue desarrollar formulaciones conteniendo AMIO en una concentración de 25 y 50 mg mL⁻¹, para cubrir la demanda en pacientes con disfagia de cualquier edad, peso corporal y diagnóstico.

3.3.1 Etapa de screening

En una primera etapa, a partir de la búsqueda bibliográfica, se elaboró un diseño Placket-Burman, para evaluar aquellos factores que pudieran afectar significativamente la solubilidad de AMIO. Se estudiaron diferentes excipientes a dos niveles: polietilenglicol 400, propilenglicol, cremophor® RH 40, glicerina y polisorbato 80 (Tween 80). La máxima recuperación obtenida fue de 59% cuando se combinó Tween 80 con cremophor® RH 40 dos agentes tensoactivos.

En la monografía de AMIO de Farmacopea Argentina, la determinación del pH cita lo siguiente: “Disolver 1,0 g de Clorhidrato de Amiodarona en agua libre de dióxido de carbono, calentar a 80 °C, enfriar y diluir a 20 ml con el mismo solvente”. Es decir que la concentración final del analito es de 50 mg mL⁻¹.

3.3.1.1 Gotas de Amiodarona Clorhidrato

A partir de los resultados obtenidos en la etapa de screening, se procedió a solubilizar AMIO en estas condiciones. Es necesario obtener una viscosidad adecuada para dispensar la formulación como gotas, por lo tanto, se incorporó un 10%v/v de glicerina. Se elaboraron dos formulaciones conteniendo 25 y 50 mg mL⁻¹ (AG1 y AG2). En el caso de pacientes adultos, la dosis de un comprimido (200 mg) sería lograda con 4 mL de la formulación de 50 mg mL⁻¹. En el caso de pacientes pediátricos, el volumen podría variar de acuerdo con el peso corporal, pero no se superarían los 5 mL por dosis. Como agente conservante, se empleó benzoato de sodio 0,2 %p/v. De esta forma, esta formulación es apta para tratar pacientes diabéticos de todas las edades.

3.3.1.2 Jarabes de Amiodarona Clorhidrato

En este caso, la matriz consistió en jarabe simple (sacarosa 85% p/v, preparado con agua conservada) y la concentración de AMIO fue la misma que en las gotas: 25 y 50 mg mL⁻¹ (AJ1 y AJ2). La preparación llevada a cabo con jarabe no será apta para pacientes diabéticos, pero será más aceptable en pacientes pediátricos sin esta enfermedad, ya que la presencia de azúcar mejora el sabor de la formulación y favorece la adherencia al tratamiento.

La Tabla 3.3.2 resume la composición de las cuatro formulaciones desarrolladas.

Las recuperaciones de AMIO en las diferentes formulaciones envasadas en envases de vidrio tipo III color ámbar y almacenadas a 4, 25 y 40°C/75%HR se determinaron por CLAE (Tabla 3.3.3).

Tabla 3.3.2. Composición final de gotas y jarabe de Amiodarona Clorhidrato

	Gotas		Jarabes	
	AG1	AG2	AJ1	AJ2
Amiodarona	2,5 g	5 g	2,5 g	5 g
Glicerina	10 % v/v	10% v/v	-	-
Jarabe	-	-	csp 100 mL	csp 100 mL
Agua	csp 100 mL	csp 100 mL	-	-
Conservante	Benzoato de sodio 0,2%p/v			

Tabla 3.3.3. Recuperaciones de Amiodarona clorhidrato

F	CA	Tiempo (Días)/ Rec (%) n=3			
		0	30	60	90
AG1	4°C		98.9±0.7	99.7±0.4	99.1±0.8
	25°C	100.1±0.5	94.0±0.8	72.5±0.8	28.8±0.3
	40°C		97.8±0.5	94.6±0.2	92.1±0.7
AG2	4°C		98.9±1.1	95.7±0.9	93.6±0.5
	25°C	99.7±0.1	92.1±0.9	77.6±0.4	59.5±0.6
	40°C		95.1±0.7	90.1±0.5	82.6±0.1
AJ1	4°C		98.2±0.8	87.8±0.6	71.9±0.3
	25°C	99.1±1.1	86.0±1.1	55.5±0.4	-
	40°C		90.8±0.8	48.6±0.5	-
AJ2	4°C		87.3±0.6	-	-
	25°C	99.4±0.2	80.4±0.4	-	-
	40°C		89.5±0.8	-	-

F: Formulación; CA: Condición de almacenamiento

Con respecto a las gotas, AG1 resultó ser estable fisicoquímicamente por al menos 90 días cuando fue conservada en heladera, mientras que AG2 lo fue durante 30 días en las mismas condiciones (Figura 3.3.1).

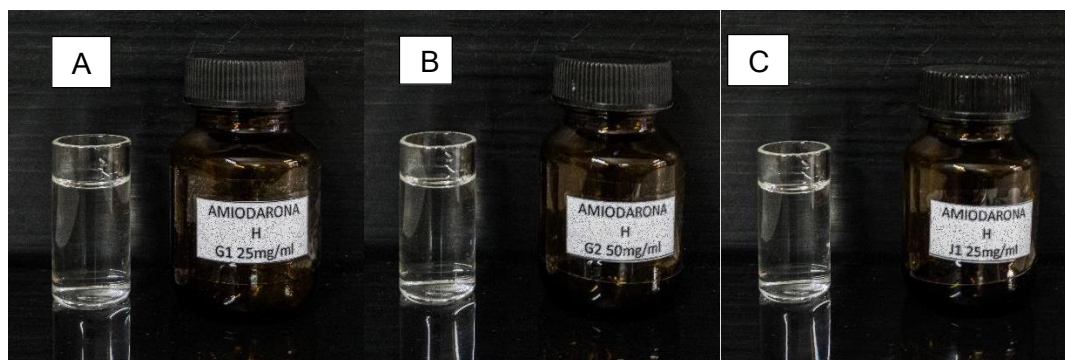


Figura 3.3.1. Gotas y jarabe de Amiodarona clorhidrato. A: Gotas, 25 mg mL⁻¹ conservada a 4°C durante 90 días; B: Gotas, 50 mg mL⁻¹ conservada a 4°C durante 30 días; C: Jarabe, 25 mg mL⁻¹ conservado a 4°C durante 30 días.

Para los jarabes, la estabilidad física se constató por inspección visual. Color, olor y apariencia fueron evaluados antes de cada medición. La formulación AJ2 (50 mg mL⁻¹) presentó una ligera turbidez a los 30 días en todas las condiciones de almacenamiento, además, dadas las bajas recuperaciones obtenidas, esta formulación fue descartada. Por otro lado, AJ1 (25 mg mL⁻¹) resultó ser estable fisicoquímicamente por lo menos 30 días cuando fue almacenada en heladera

Por otro lado, el pH de las formulaciones fue controlado durante el desarrollo. La Tabla 3.3.4 muestra los valores de pH de todas las formulaciones. Como puede observarse, no se encontraron diferencias significativas en los valores de pH determinados en el período de estudio.

Tabla 3.3.4. Valores de pH de las gotas y jarabes de Amiodarona clorhidrato durante el período estudiado.

F	CA	Tiempo (Días)/pH			
		0	30	60	90
	4°C		5.13±0.02	5.15±0.03	5.14±0.02
AG1	25°C	5.12±0.05	5.12±0.05	5.14±0.01	5.13±0.05
	40°C		5.14±0.04	5.16±0.02	5.11±0.04
	4°C		5.17±0.01	5.18±0.01	5.16±0.02
AG2	25°C	5.15±0.02	5.14±0.02	5.14±0.04	5.15±0.01
	40°C		5.16±0.04	5.15±0.02	5.17±0.03
	4°C		5.15±0.01	5.13±0.02	5.13±0.02
AJ1	25°C	5.09±0.01	5.12±0.01	5.14±0.03	-
	40°C		5.14±0.03	5.15±0.02	-
	4°C		5.15±0.04	-	-
AJ2	25°C	5.13±0.02	5.12±0.04	-	-
	40°C		5.16±0.02	-	-

F: Formulación; CA: Condición de almacenamiento

3.3.1.3 Estudios de estabilidad microbiológico

El estudio microbiológico fue llevado a cabo en aquellas formulaciones cuyas recuperaciones fueron superiores al 95%. La Tabla 3.3.5 muestra los resultados obtenidos. Los valores de CMAT y CTHyL cumplen con los criterios de aceptación y no se detectó *E. coli* en ninguna de las formulaciones.

Tabla 3.3.5. Resultados del análisis microbiológico de las formulaciones orales de Amiodarona clorhidrato

Muestra	Tiempo (días)	Condiciones estabilidad	Rec. (%)	Análisis microbiológico		
				CTHyL	CMAT	<i>E. coli</i>
AG1	90	4°C	99.1	<100	<1000	ND
AG2	30	4°C	98.9	<100	<1000	ND
AJ1	30	4°C	98.2	<100	<1000	ND

ND: No detectable

En el mercado argentino no se dispone de una formulación oral líquida de AMIO. Ya se explicó con anterioridad su estrecho margen terapéutico y los efectos adversos que pueden ocurrir por una dosificación incorrecta. Aunque en estos casos no se obtuvieron

soluciones orales estables fisicoquímicamente por un tiempo que pudiera permitir su producción industrial, es importante destacar la posibilidad de una elaboración magistral, para cubrir las necesidades en pacientes con trastornos en la deglución.

3.3.2 Conclusiones

En este capítulo se desarrollaron tres formulaciones orales de Amiodarona clorhidrato, gotas en dos concentraciones y un jarabe. Las recuperaciones fueron determinadas utilizando un método CLAE validado de acuerdo con las guías ICH. Las gotas contienen 25 y 50 mg mL⁻¹ y fueron elaboradas a partir de agua conservada y glicerina. La formulación AG1 (conteniendo 25 mg mL⁻¹) resultó ser estable fisicoquímica y microbiológicamente por al menos 90 días cuando fue conservada en heladera. De la misma manera, la formulación AG2 (conteniendo 50 mg mL⁻¹) fue estable en las mismas condiciones de almacenamiento por al menos 30 días. Por otro lado, el jarabe AJ1 (conteniendo 25 mg mL⁻¹) resultó ser estable el mismo tiempo y en las mismas condiciones que AG2 (de 50 mg mL⁻¹). Cabe destacar que las gotas desarrolladas pueden ser dispensadas a pacientes diabéticos, mientras que el jarabe podría ser destinado a pacientes pediátricos que no presenten la mencionada patología, ya que la presencia del azúcar en la formulación mejora el sabor aumentando la adherencia al tratamiento.

ATENOLOL

3.4. Introducción

ATN, un agente bloqueante de los receptores adrenérgicos $\beta^{130,131}$ es recomendado para el tratamiento de la hipertensión y la arritmia en niños menores de 12 años (incluidos los recién nacidos). Comercialmente se encuentra disponible en forma de comprimidos de 25, 50 y 100 mg. Para el tratamiento de la hipertensión arterial y la angina de pecho, la dosis diaria recomendada en adultos es de 50 mg una vez al día. Debido a que el ATN se elimina fundamentalmente por excreción urinaria, la posología debe ajustarse en casos de insuficiencia renal. Puede ser necesario iniciar el tratamiento con dosis bajas, de 25 mg/día, evaluando el efecto clínico. Los pacientes en hemodiálisis requieren una dosis de 25 a 50 mg después de cada diálisis, debiendo ser supervisados durante su administración.

Aunque varias formulaciones de ATN, como tabletas flotantes, tabletas mucoadhesivas, parches bucales, tabletas de rápida desintegración y matrices poliméricas, entre otras, se han desarrollado y analizado hace varios años¹³²⁻¹³⁷, estas formulaciones no estarían contemplando a pacientes con trastornos en la deglución. En los últimos años se han desarrollado un número reducido de formulaciones pediátricas, entre las que se encuentran una suspensión extemporánea de ATN¹³⁸, cápsulas del IFA obtenidas a partir de comprimidos triturados¹³⁹, un jarabe (que demostró ser estable durante 9 días a 4°C)¹⁴⁰ y gotas conteniendo 2 mg mL⁻¹ de ATN⁸⁴. Debe tenerse en cuenta que existe una preparación líquida con licencia para adultos (jarabe de ATN, 5 mg mL⁻¹) en el Reino Unido, pero su uso no está autorizado en niños.

Aunque estas formulaciones pediátricas podrían mejorar la adherencia al tratamiento en pacientes con disfagia, no podrían adaptarse a las dosificaciones diarias para adultos, ya que se necesitarían entre 12,5 y 25 mL por dosis.

Por último, cabe destacar que no se encontró en la bibliografía el desarrollo de soluciones para ser administradas en forma de bebidas aptas para ser usadas en pacientes adultos.

Como se ha mencionado, las dosis diarias recomendadas de ATN varían desde los 25 a 100 mg, por lo que sería necesario contar con una formulación líquida que permita disponer de estas dosis con el menor volumen posible. Teniendo en cuenta que además, 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 EMA¹⁴¹, en este capítulo se propuso el desarrollo de una bebida de ATN conteniendo 10 mg mL⁻¹. Con esta concentración, el volumen de las dosis diarias estaría entre 2,5 y 10 mL. Además, para aquellos pacientes con insuficiencia renal, sería posible ajustar la dosis a sus necesidades.

3.4.1 Bebida de atenolol

3.4.1.1 Etapa de screening

En una primera etapa, se evaluaron diferentes agentes suspensores, como ser, HPMC, CMC 4000, CMC 10000 y goma xantana, y se fijó el contenido de glicerina en 5% v/v y el de sacarina en 0,2% p/v. La glicerina es ampliamente usada como cosolvente en formulaciones orales líquidas y como agente viscosizante, además de sus propiedades humectantes, y su contenido puede llegar al 30%. En ensayos previos, se observó que esta concentración mejoraba la viscosidad de la matriz. Con respecto a la sacarina, en formulaciones farmacéuticas orales puede emplearse dentro del rango de 0,02 a 0,5% p/v. Las concentraciones de los agentes suspensores, HPMC (0,5 y 1 % p/v), Goma xantana (0,1 % p/v), CMC 4000 (0,5 y 1 % p/v) y CMC 10000 (1 % p/v), son el resultado de datos obtenidos de la bibliografía, los límites permitidos para pediatría y la estabilidad física final de la formulación. Dado que para pacientes pediátricos las restricciones son más rígidas que para pacientes adultos, si la formulación es apta para pediatría, será apta para pacientes de todas las edades.

Con datos previos de estabilidad obtenidos de la bibliografía⁸⁴, se utilizó buffer citrato 10 mM y como agente conservante, benzoato de sodio (0,2% p/v). El pH final de las formulaciones fue ajustado entre 6,0 y 7,0 empleando ácido cítrico 10 mM.

Se elaboraron 6 formulaciones con los diferentes agentes suspensores. La Tabla 3.4.1 resume la composición de las diferentes formulaciones.

Tabla 3.4.1. Composición final bebidas Atenolol

F	ATN (mg)	HPMC (% p/v)	Goma xantana (% p/v)	CMC 4000 (% p/v)	CMC 10000 (% p/v)	Buffer citrato 10 mM
1	1000	0,5	-	-	-	csp 100 mL
2	1000	-	0,1	-	-	csp 100 mL
3	1000	-	-	0,5	-	csp 100mL
4	1000	-	-	1	-	csp 100 mL
5	1000	-	-	-	0,5	csp 100 mL
6	1000	1	-	-	-	csp 100 mL

F: Formulación

3.4.1.2. Estudios de estabilidad química

Estas formulaciones fueron almacenadas en envases de vidrio tipo III color ámbar y conservadas a 4, 25 y 40°C. A los 10 días de su elaboración, se realizó un control visual para evaluar aspecto, color y olor. Las formulaciones 1, 2 y 5 presentaron turbidez, por lo que fueron desestimadas. La formulación 6, además de presentar turbidez, al igual que la formulación 4, mostraron una viscosidad mayor a la esperada para una bebida. La formulación 3 presentó un aspecto límpido, sin presencia de turbidez o precipitados ni aparición de color u olor.

Tabla 3.4.2. Estudios de estabilidad acelerados de la bebida (F3) de Atenolol

CA	Tiempo (días)/Rec (%)							
	0	30	60	90	120	150	180	
4°C		101,3±0,9	99,5±1,1	99,8 ± 0,3	100,2±0,9	100,3±0,8	99,8 ± 0,6	
25°C	100,1±1,1	99,9 ± 0,3	99,8±0,8	100,1±0,5	99,7 ± 0,6	100,9±0,7	99,9 ± 0,5	
40°C		101,1±0,4	99,7 ± 0,5	99,2 ± 0,2	101,2±1,1	100,4±0,5	98,8 ± 0,6	
CA	Tiempo (días)/pH							
	4°C		7,05±0.04	7,01±0.01	6,95±0.02	7,04±0.04	7,02±0.01	6,98±0.02
	25°C	6,95±0,02	7,02±0.04	7,03±0.02	6,94±0.03	7,03±0.03	6,98±0.02	7,02±0.03
	40°C		7,06±0.02	6,97±0.02	7,05±0.04	6,98±0.02	7,01±0.02	6,99±0.04

CA: Condición de almacenamiento

El contenido de ATN de la formulación 3, fue determinado por CLAE. Esta formulación fue controlada mensualmente a lo largo de 6 meses. Los resultados de recuperación y pH se muestran en la Tabla 3.4.2.

Los datos obtenidos, con recuperaciones superiores al 95%, requisito exigido por las guías ICH Q1E¹⁰¹ para nuevas formulaciones, demuestran que la bebida de ATN resultó ser estable fisicoquímicamente por al menos 6 meses conservada a 4, 25 y 40°C/75% (HR). No se observó la presencia de picos extras en los cromatogramas, que podrían relacionarse a la presencia de productos de degradación. La Tabla 3.4.3 resume el análisis estadístico de las recuperaciones y el pH medidos a los 0, 2, 4 y 6 meses. No se observaron diferencias significativas ni en el pH ni en las recuperaciones de la formulación desarrollada medido en el mismo período de tiempo (6 meses).

Tabla 3.4.3. Recuperación de Atenolol y pH final luego del almacenamiento a 4 y 25 °C y comparación estadística de los resultados

Tiempo (días)/Rec (%)							
CA	Inicial	2 meses	4 meses	6 meses	Promedio	Varianzas	t _{calculado}
4°C	100,1±1,1	99,5±1,1	100,2±0,9	99,8 ± 0,6	99,9	0,3162	0,197
25°C	100,1±1,1	99,8±0,8	99,7 ± 0,6	99,9 ± 0,5	99,875	0,1707	
Tiempo (días)/pH							
4°C	6,95±0,02	7,01±0,01	7,04±0,04	6,98±0,02	6,995	0,0387	0,6468
25°C	6,95±0,02	7,03±0,02	7,03±0,03	7,02±0,03	7,007	0,0386	

CA: Condición de almacenamiento; t_{tabla(0,05;7)} = 1,8946

La Figura 3.4.1 muestra el aspecto de la bebida de ATN luego de ser almacenada por 6 meses a 4, 25 y 40°C.

3.4.1.3 Estudios de estabilidad microbiológica

El ensayo microbiológico se llevó a cabo a los 6 meses de su elaboración y almacenamiento a tres temperaturas. La Tabla 3.4.4 resume los resultados del estudio microbiológico.

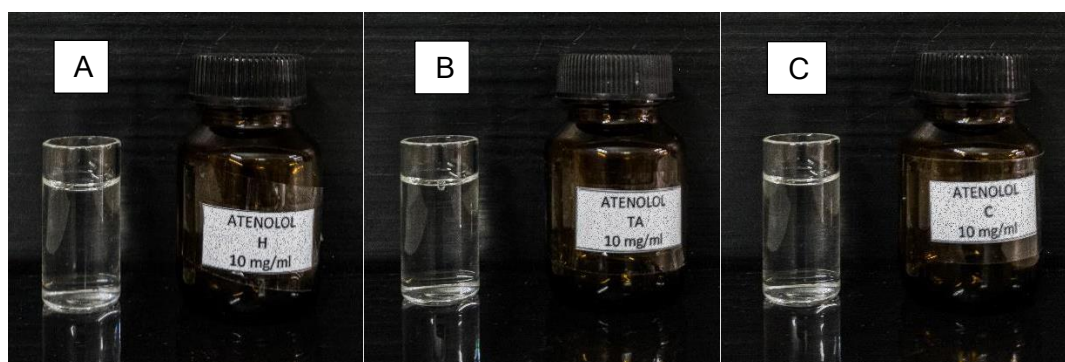


Figura 3.4.1. Control visual de la bebida de Atenolol. A: almacenada a 4°C, B: almacenada a 25°C y C: almacenada a 40°C/75%HR durante 6 meses.

Después de 6 meses de almacenamiento en las diferentes condiciones, no se observó crecimiento de bacterias u hongos, ni la presencia de *E coli*. La bebida conteniendo ATN 10 mg mL⁻¹ desarrollada cumplió con las especificaciones de la Farmacopea Argentina para productos no estériles.

Tabla 3.4.4. Estudios microbiológicos durante el almacenamiento en diferentes las condiciones de la bebida de Atenolol

CA	CMAT	CTHyL	<i>E coli</i>	Resultado
4°C	<1000	<100	ND	Cumple
25°C	<1000	<100	ND	Cumple
40°C	<1000	<100	ND	Cumple

CA: Condición de almacenamiento, 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, *E coli* – Cumple si hay ausencia, ND: No detectable.

3.4.4 Conclusiones

En este capítulo se desarrolló una bebida de Atenolol conteniendo 10 mg mL⁻¹. Se demostró su estabilidad fisicoquímica y microbiológica por al menos 6 meses cuando fue almacenada a 4, 25 y 40°C. Su elaboración es simple, con un mínimo número de excipientes, pudiendo recomendarse su elaboración en oficinas de farmacia. Al no contener azúcar, alcohol y ser libre de parabenos, esta formulación es apta para ser administrada a pacientes de todas las edades, incluidos pacientes diabéticos. Considerando que la dosis diaria para un paciente adulto es de 50-100 mg por día, en una o dos tomas, el volumen a

dispensar estaría entre 2,5 a 10 mL. Por otro lado, a pesar de que hay publicaciones con formulaciones orales líquidas de Atenolol con una potencia menor, las dosis varían de acuerdo con la patología a tratar entre 0,5 -1 mg/kg/día hasta 100 mg. En estos casos, el volumen a administrar por dosis sería un inconveniente en pacientes pediátricos. Es decir, esta formulación, podría ser de elección para este grupo etario cuando las dosis a administrar superen los 10 mg.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

Gotas de Carvedilol

Se obtuvieron dos formulaciones líquidas de Carvedilol (3 y 5 mg mL⁻¹), las cuales cumplieron con los criterios de estabilidad química luego de seis meses en heladera (4°C). La formulación de mayor concentración 5 mg mL⁻¹ permaneció estable a temperatura ambiente (25°C) por el mismo lapso. Los resultados del estudio de estabilidad microbiológica mostraron que las formulaciones optimizadas permanecieron estables durante 6 meses cuando se almacenaron a temperatura ambiente y en heladera. La aplicación de un diseño de Plackett-Burman permitió la selección de excipientes que favorecen la solubilidad de Carvedilol. Se encontró que la concentración de PEG 400 y el valor de pH de la solución fueron factores influyentes en la solubilidad de este. El método 2 en el agregado de HPMC para mejorar la estabilidad de las formulaciones fue considerablemente mejor al método 1, evidenciado en los porcentajes de recuperación del IFA. La prueba de palatabilidad mostró que las dosis pediátricas inicial y media ambas diluidas en leche presentaron un sabor similar a la leche sola, favoreciendo la aceptación de la medicación. Las formas farmacéuticas desarrolladas en este trabajo de Tesis (de mayor concentración que las reportadas en la literatura) y obtenidas con una mínima cantidad de excipientes de bajo costo, libres de etanol, azúcares y parabenos, y con un proceso de fabricación simple, reducen notablemente los volúmenes a administrar en las dosis ajustadas al peso corporal del paciente y representan una opción segura y eficaz en el tratamiento de cardiopatías en poblaciones vulnerables.

Gotas y Jarabes de Bisoprolol Fumarato

Se desarrollaron gotas conteniendo 2,5 y 5 mg mL⁻¹ de Bisoprolol Fumarato, con el agregado de 10 %v/v de glicerina y agua conservada. Las formulaciones demostraron estabilidad fisicoquímica y microbiológica a 4 y 25 °C, por al menos 24 meses desde el momento de su elaboración. Dada la sencillez del procedimiento de elaboración, es factible que puedan ser preparadas en una oficina de farmacia que cumpla con las normas de Buenas prácticas de fabricación y control, asegurando la eficacia de estas en el momento

de su dispensación. Además, por la estabilidad fisicoquímica y microbiológica probada en un período de 24 meses, estas formulaciones podrían ser consideradas para su elaboración a escala industrial.

Se desarrollaron jarabes conteniendo 2,5 y 5 mg mL⁻¹ de Bisoprolol Fumarato. Los mismos resultaron ser estables fisicoquímica y microbiológicamente durante 24 meses desde el momento de su elaboración. En este caso, la presencia de azúcar en el jarabe simple mejora en la palatabilidad de la formulación y permitirá una mayor adherencia al tratamiento especialmente en pacientes pediátricos. En todos los casos, la flexibilidad en la dosificación favorece el tratamiento escalonado y centrado en el paciente.

Tanto para las gotas como para los jarabes desarrollados, se demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a las condiciones de almacenamiento (4 y 25°C) a los 24 meses de su elaboración. Cabe destacar que la estabilidad a temperatura ambiente presenta la ventaja de disminuir los gastos de traslado y logística del producto final y la correcta conservación de las formulaciones en aquellos lugares que no cuenten con refrigeración adecuada.

Gotas y Jarabe de Amiodarona Clorhidrato

Teniendo en cuenta que Amiodarona Clorhidrato se encuentra en el listado de medicamentos esenciales de la OMS¹²⁹ y que estos medicamentos deben estar disponibles para cubrir las necesidades sanitarias esenciales de la población, en la forma farmacéutica adecuada para todas las edades y condiciones de los pacientes, en este capítulo se desarrollaron tres formulaciones orales de Amiodarona Clorhidrato. Las formulaciones fueron gotas en dos concentraciones y un jarabe. Las gotas conteniendo 25 y 50 mg mL⁻¹ fueron elaboradas a partir de agua conservada y glicerina. La formulación (AG1) conteniendo 25 mg mL⁻¹ resultó ser estable fisicoquímica y microbiológicamente por al menos 90 días cuando fue conservada en heladera. La formulación (AG2) conteniendo 50 mg mL⁻¹, fue estable en las mismas condiciones de almacenamiento por al menos 30 días. Por otro lado, el jarabe (AJ1) conteniendo 25 mg mL⁻¹ resultó ser estable el mismo tiempo y en las mismas condiciones que (AG2). Las gotas desarrolladas pueden ser dispensadas

a pacientes diabéticos, mientras que el jarabe, que contiene azúcar, podría ser destinado a pacientes pediátricos (no diabéticos), ya que la mejora en el sabor garantizará la adherencia al tratamiento.

Bebida de atenolol

Se desarrolló una bebida de Atenolol conteniendo 10 mg mL^{-1} , estable fisicoquímica y microbiológicamente por al menos 6 meses cuando fue almacenada a 4, 25 y $40^{\circ}\text{C}/75\%$ (HR). Su elaboración es simple, con un mínimo número de excipientes, pudiendo recomendarse su elaboración en oficinas de farmacia. Al no contener azúcar, alcohol y ser libre de parabenos, esta formulación es apta para ser administrada a pacientes de todas las edades, incluidos pacientes diabéticos y celíacos.

Considerando que la dosis diaria para un paciente adulto es de 50-100 mg por día, en una o dos tomas, el volumen a dispensar estaría entre 2,5 a 10 mL. Por otro lado, a pesar de que hay publicaciones con formulaciones orales líquidas de Atenolol con una potencia menor, las dosis varían de acuerdo con la patología a tratar entre 0,5 -1 mg/kg/día hasta 100 mg. En estos casos, el volumen a administrar por dosis sería un inconveniente en pacientes pediátricos. Es decir, esta formulación, podría ser de elección para este grupo etario cuando las dosis a administrar superen los 10 mg.

Conclusión general

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis permiten asegurar que se ha logrado el desarrollo, optimización, control de calidad y estudios de estabilidad, tanto física, química como microbiológica, de formas farmacéuticas líquidas de uso oral para el tratamiento de cardiopatías en pacientes pediátricos, adultos mayores y pacientes que presenten dificultad para la deglución.

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 herramienta útil a fin de obtener formulaciones con las características buscadas con un mínimo número de experimentos. Las formulaciones seleccionadas, estables tanto química como microbiológicamente, permiten una correcta y segura dosificación en base al peso corporal del paciente.

El medicamento constituyó desde la más remota antigüedad y sigue siendo en nuestros días un bien esencial para prevenir, aliviar y curar diversos síntomas y enfermedades. El desarrollo de formulaciones líquidas orales con aplicaciones concretas en el ámbito hospitalario es una necesidad urgente. Las formulaciones desarrolladas en este trabajo de Tesis tienen impacto directo sobre las poblaciones pediátricas, de adultos mayores y sobre pacientes de cualquier edad con disfagia, adicionalmente, las mismas podrían ser escaladas tanto a escala piloto como a escala industrial.

Referencias bibliográficas

- (1) Borchardt, J. K. 'The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine.' *Drug news & perspectives* **2002**, 15 (3), 187-192.
- (2) Oppenheim, A. L. 'Mesopotamian Medicine.' *Bulletin of the History of Medicine* **1962**, 36 (2), 97-108.
- (3) Trease, G. E. *Pharmacy in History.*; Bailliére, T. & C., Ed.; Londres, 1964.
- (4) McGrew, R. *Encyclopedia of Medical History.*; Macmillan Press, Ed.; Londres, 1985.
- (5) Hadzović, S. 'Pharmacy and the Great Contribution of Arab-Islamic Science to Its Development.' *Medicinski arhiv* **1997**, 51 ((1-2)), 47-50.
- (6) Levey, M. *Early Arabic Pharmacology: An Introduction Based on Ancient and Medieval Sources.*; Brill Archive., Ed.; Leiden, 1973.
- (7) Griffin, J. P., & O'Grady, J. *The Regulation of Medical Products.*; BMJ Books., Ed.; Londres, 2003.
- (8) Baños, J. E., Fernández, S., & Bosch, F. 'El Naixement de La Industria Farmacèutica a Catalunya: El Marc Històric de La Seva Aparició.' *Annals de medicina*, **2007**, 90 (2), 54-59.
- (9) Cowen, D. L., de Sagrera, J. E., & Helfand, W. H. *Historia de La Farmacia.*; Doyma., Ed.; 1992.
- (10) Gracia Guillen, D. *Historia Del Medicamento.*; Doyma, Ed.; Barcelona, 1971.
- (11) De Sagrera, J. E. *Historia de La Farmacia: Los Medicamentos, La Riqueza y El Bienestar.*; Elsevier, Ed.; 2005.
- (12) Stegemann, S., Ternik, R. L., Onder, G., Khan, M. A., & van Riet-Nales, D. A. 'Defining Patient Centric Pharmaceutical Drug Product Design.' *The AAPS journal* **2016**, 18, 1047-1055.
- (13) Walsh, J., Ranmal, S. R., Ernest, T. B., & Liu, F. 'Patient Acceptability, Safety and Access: A Balancing Act for Selecting Age-Appropriate Oral Dosage Forms for Paediatric and Geriatric Populations.' *International journal of pharmaceutics* **2018**, 536 (2), 547-562.
- (14) Fodil, M., Nghiem, D., Colas, M., Bourry, S., Poisson-Salomon, A. S., Rezigue, H., & Trivalle, C. 'Assessment of Clinical Practices for Crushing Medication in Geriatric.' *The journal of nutrition, health & aging, units.* **2017**, 21, 904-908.
- (15) Liu, F., Ghaffur, A., Bains, J., & Hamdy, S. 'Acceptability of Oral Solid Medicines in Older Adults with and without Dysphagia: A Nested Pilot Validation Questionnaire Based Observational Study.' *International journal of pharmaceutics* **2016**, 512 (2), 374-381.
- (16) Mc Gillicuddy, A., Kelly, M., Sweeney, C., Carmichael, A., Crean, A. M., & Sahm, L.

- J. 'Modification of Oral Dosage Forms for the Older Adult: An Irish Prevalence Study.' *International journal of pharmaceutics* 510 (1), 386-393.
- (17) Gore, R., K Chugh, P., D Tripathi, C., Lhamo, Y., & Gautam, S. 'Pediatric Off-Label and Unlicensed Drug Use and Its Implications.' *Current clinical pharmacology* 2017, 12 (1), 18-25.
- (18) Logrippo, S., Ricci, G., Sestili, M., Cespi, M., Ferrara, L., Palmieri, G. F. & Blasi, P. 'Oral Drug Therapy in Elderly with Dysphagia: Between a Rock and a Hard Place!' *Clinical interventions in aging* 2017, 241-251.
- (19) Abu-Geras, D., Hadziomerovic, D., Leau, A., Khan, R. N., Gudka, S., Locher, C. & Lim, L. Y. 'Accuracy of Tablet Splitting and Liquid Measurements: An Examination of Who, What and How.' *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2017, 69 (5), 603-612.
- (20) Ciavarella, A. B., Khan, M. A., Gupta, A., & Faustino, P. J. 'Dose Uniformity of Scored and Unscored Tablets: Application of the FDA Tablet Scoring Guidance for Industry.' *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 2016, 70 (6), 523-532.
- (21) Horton, J., Atwood, C., Gnagi, S., Teufel, R., & Clemmens, C. 'Temporal Trends of Pediatric Dysphagia in Hospitalized Patients.' *Dysphagia* 2018, 33, 655-661.
- (22) Lawlor, C. M., & Choi, S. 'Diagnosis and Management of Pediatric Dysphagia: A Review.' *JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 2020, 146 (2), 183-191.
- (23) Stegemann, S., Gosch, M., & Breitzkreutz, J. 'Swallowing Dysfunction and Dysphagia Is an Unrecognized Challenge for Oral Drug Therapy.' *International journal of pharmaceutics* 2012, 430 ((1-2)), 197-206.
- (24) Kramer, S. S., & Monahan Eicher, P. 'The Evaluation of Pediatric Feeding Abnormalities.' *Dysphagia* 1993, 8, 215-224.
- (25) Foy, T. M., & Czyzewski, D. I. Feeding Difficulties. *Nutrition in Pediatrics: Basic Science and Clinical Applications.*; 2008; pp 471-477.
- (26) Lefton-Greif, M. A., & Arvedson, J. C. 'Pediatric Feeding and Swallowing Disorders: State of Health, Population Trends, and Application of the International Classification of Functioning, Disability, and Health.' *Seminars in speech and language* 2007, 28 (3), 161-165.
- (27) Prasse, J. E., & Kikano, G. E. 'An Overview of Pediatric Dysphagia.' *Clinical pediatrics* 2009, 48 (3), 247-251.
- (28) Kakodkar, K., & Schroeder, J. W. 'Pediatric Dysphagia.' *Pediatric Clinics* 2013, 60 (4), 969-977.
- (29) Arvedson, J. C. 'Assessment of Pediatric Dysphagia and Feeding Disorders: Clinical and Instrumental Approaches.' *Developmental disabilities research reviews* 2008, 14

- (2), 118-127.
- (30) Khan, A., Carmona, R., & Traube, M. 'Dysphagia in the Elderly.' *Clinics in geriatric medicine* **2014**, 30 (1), 43-53.
- (31) Kelly, J., & Wright, D. 'Administering Medication to Adult Patients with Dysphagia.' *Nursing Standard* **2009**, 23 (29), 62.
- (32) Steele, C. M., Greenwood, C., Ens, I., Robertson, C., & Seidman-Carlson, R. 'Mealtime Difficulties in a Home for the Aged: Not Just Dysphagia.' *Dysphagia* **1997**, 12, 43-50.
- (33) Crary, M. A., Humphrey, J. L., Carnaby-Mann, G., Sambandam, R., Miller, L., & Silliman, S. 'Dysphagia, Nutrition, and Hydration in Ischemic Stroke Patients at Admission and Discharge from Acute Care.' *Dysphagia* **2013**, 28, 69-76.
- (34) Wang, S. 'Formulations in Paediatric Investigation Plans (PIPs): Introduction to PIP Quality Section and Regulatory Framework.' *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, 492 ((1-2)), 332-334.
- (35) Kuentz, M., Holm, R., & Elder, D. P. 'Methodology of Oral Formulation Selection in the Pharmaceutical Industry.' *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, 87, 136-163.
- (36) Leane, M., Pitt, K., Reynolds, G., & M. C. S. (MCS) W. G. 'A Proposal for a Drug Product Manufacturing Classification System (MCS) for Oral Solid Dosage Forms.' *Pharmaceutical development and technology* **2015**, 20 (1), 12-21.
- (37) Sam, T., Ernest, T. B., Walsh, J., Williams, J. L., & E. P. F. I. 'A Benefit/Risk Approach towards Selecting Appropriate Pharmaceutical Dosage Forms-an Application for Paediatric Dosage Form Selection.' *International journal of pharmaceutics* **2012**, 435 (2), 115-123.
- (38) Italianos, A. 'La Preparación de Preparaciones Farmacéuticas Personalizadas En Las UUOO de Farmacia de Los Hospitales Pediátricos Italianos.' *Boletín SIFO* **2005**, 51 (5).
- (39) Helin-Tanninen, M., Autio, K., Keski-Rahkonen, P., Naaranlahti, T., & Järvinen, K. 'Comparison of Six Different Suspension Vehicles in Compounding of Oral Extemporaneous Nifedipine Suspension for Paediatric Patients.' *European Journal of Hospital Pharmacy: Science and Practice* **2012**, 19 (5), 432-437.
- (40) Abshagen, U. 'A New Molecule with Vasodilating and Beta-Adrenoceptor Blocking Properties.' *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **1987**, No. 10, S23-32.
- (41) Nakamura, K., Kusano, K., Nakamura, Y., Kakishita, M., Ohta, K., Nagase, S., ... & Ohe, T. 'Carvedilol Decreases Elevated Oxidative Stress in Human Failing Myocardium.' *Circulation* **2002**, 105 (24), 2867-2871.

- (42) Packer, M., Fowler, M. B., Roecker, E. B., Coats, A. J., Katus, H. A., Krum, H. & DeMets, D. L. 'Effect of Carvedilol on the Morbidity of Patients with Severe Chronic Heart Failure: Results of the Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) Study.' *Circulation* **2002**, 106 (17), 2194-2199.
- (43) Poole-Wilson, P. A., Cleland, J. G., Di Lenarda, A., Hanrath, P., Komajda, M., Metra, M. & Torp-Pedersen, C. 'Rationale and Design of the Carvedilol or Metoprolol European Trial in Patients with Chronic Heart Failure: COMET.' *European Journal of Heart Failure* **2002**, 4 (3), 321-329.
- (44) Maheshwari, P., Praveen, D., & Ravichandiran, V. A. 'A Comparative Study to Evaluate the Efficacy of Amlodipine with Bisoprolol in Hypertensive Patients.' *AJPCR* **2014**, 7, 98-101.
- (45) Lazo, J. S., Parker, K. L., & Bruton, L. *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics.*, 11th ed.; McGraw-Hill Publishing., Ed.; 2005.
- (46) Thakur, R., Anwer, M. K., Shams, M. S., Ali, A., Khar, R. K., Shakeel, F., & Taha, E. I. 'Proniosomal Transdermal Therapeutic System of Losartan Potassium: Development and Pharmacokinetic Evaluation.' *Journal of drug targeting* **2009**, 17 (6), 442-449.
- (47) Pandey, S., Praveen, S. H., & Udupa, N. 'Formulation and Evaluation of Nimesulide Transdermal Drug Delivery Systems.' *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, 62 ((3-5)), 376-379.
- (48) EMA/PDCO/246339/2013. 'Inventory of Paediatric Therapeutic Needs. Cardiovascular Therapeutic Area.' *Hum Med Dev Eval.* **2013**, 1-6.
- (49) Kumar, D., Sreenivas, S. A., Samal, H. B., Dey, S., & Priyanka, Y. 'Method Development and Estimation of Bosentan Monohydrate in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms Using UV-Visible Spectrophotometer.' *J. Pharma. Res* **2011**, 4 (6), 1713-1715.
- (50) O'Neil, M. J., Heckelman, P. E., & Koch, C. B. *N-Butyl Alcohol. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals.*; 2006.
- (51) Gennaro, A. R. *Remington Farmacia.*; Ed. Médica Panamericana., Ed.; 2003.
- (52) Swarbrick, J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology: Volume 6.*; CRC press., Ed.; 2013.
- (53) Rowe, R. C., Sheskey, P., & Quinn, M. *Handbook of Pharmaceutical Excipients.*; Libros Digitales-Pharmaceutical Press., Ed.; 2009.
- (54) John Wiley & Sons. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes (Vol. 5).*; Gad, S. C. (Ed. ., Ed.; 2008.
- (55) Mfoafo, K. A., Omidian, M., Bertol, C. D., Omid, Y., & Omidian, H. 'Neonatal and

- Pediatric Oral Drug Delivery: Hopes and Hurdles.' *International Journal of Pharmaceutics* **2021**, 597, 120296.
- (56) Batchelor, H. K., & Marriott, J. F. 'Formulations for Children: Problems and Solutions.' *British journal of clinical pharmacology* **2015**, 79 (3), 405-418.
- (57) Niazi, S. K. *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations: Volume Two, Uncompressed Solid Products.*; CRC press., Ed.; 2019.
- (58) *Argentina, F. Ministerio de Salud. ANMAT, Buenos Aires.*; 2003.
- (59) *Argentina, F. Administración Nacional de Medicamentos, A. y T. M. Vol. I. Argentina: Farmacopea Argentina., 7ª ed.*; 2003.
- (60) Billany Michael. Capítulo 21: Soluciones. In *Aulton M. Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas.*; Elsevier, Ed.; Madrid, 2004.
- (61) Billany Michael. Capítulo 23: Suspensiones y Emulsiones. In *Aulton M. Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas.*; Elsevier, Ed.; Madrid, 2004.
- (62) Nikazar, S., Pezeshkpour, S., & Bahrololoumi, S. Plant Polysaccharides as Suspending Agents in Pharmaceutical Suspensions. In *Plant Polysaccharides as Pharmaceutical Excipients*; Elsevier, Ed.; 2023; pp 103-124.
- (63) Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Prólogo. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. 2016.
- (64) The United States Pharmacopeial Convention. 'Pharmacopeia, U. S. USP 38-NF 33. In The United States Pharmacopeia-The National Formulary'. **2015**.
- (65) The Ministry of Health, L. and W. *Japanese Pharmacopoeia, The Japanese Pharmacopoeia*; 2021.
- (66) World Health Organization. *WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, & World Health Organization. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations.*; 1992.
- (67) Taverniers, I., De Loose, M., & Van Bockstaele, E. 'Trends in Quality in the Analytical Laboratory. II. Analytical Method Validation and Quality Assurance.' *Trends in Analytical Chemistry* **2004**, 23 (8), 535-552.
- (68) Hadjicostas, E. *Quality Assurance in Analytical Chemistry: Training and Teaching*; B. W. Wenclawiak, M. Koch, & E. H., Ed.; Springer: Heidelberg, 2004.
- (69) Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). <http://www.anmat.gov.ar/Medicamentos/basedat.asp>.
- (70) Ardila, J. A., de Alvarenga Junior, B. R., Durango, L. C., Soares, F. L. F., Perlatti, B., de Oliveira Cardoso, J. & Carneiro, R. L. 'Design of Experiments Applied to Stress Testing of Pharmaceutical Products: A Case Study of Albendazole.' *European*

- Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, 165, 105939.
- (71) Armstrong, N. A., & James, K. C. *Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation.*; Press, C., Ed.; 2002.
- (72) Fisher, R. A. *The Design of Experiments.*, 2nd ed.; Boyd, O. & Ed.; Edinburgh & London, 1937.
- (73) Plackett, R. L., & Burman, J. P. 'The Design of Optimum Multifactorial Experiments.' *Biometrika* **1946**, 33 (4), 305-325.
- (74) Joshi, S. J., Karbhari, P. A., Bhoir, S. I., Bindu, K. S., & Das, C. 'RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Bisoprolol Fumarate and Hydrochlorothiazide in Tablet Formulation.' *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2010**, 52 (3), 362-371.
- (75) Bonthu, M. G., Neelima, M. S., Raju, V. B., Sumanth, K. S., Mounika, P., Srinivas, K., & Lakshmi, P. J. N. '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.' *Developmental disabilities research reviews* **2016**, 9 (2), 118-124.
- (76) Indian Pharmacopeia Commission. *Indian Pharmacopeia 2014, Addendum 2015.*, eighth edi.; Ghaziabad, 2015.
- (77) Quispe, A., Calla, K. M., Yangali, J. S., Rodríguez, J. L., & Pumacayo, I. I. *Estadística No Paramétrica Aplicada a La Investigación Científica Con Software SPSS, MINITAB Y EXCEL. Enfoque Práctico.*; EIDEC, 2019.
- (78) Wilcoxon, F. 'Probability Tables for Individual Comparisons by Ranking Methods.' *Biometrics* **1947**, 3 (3), 119-122.
- (79) European Medicines Agency. 'Reflection Paper on the Use of Methyl- and Propylparaben as Excipients in Human Medicinal Products for Oral Use.' *European Union* **2015**, 44 (EMA/CHMP/SWP/272921/2012), 1-3.
- (80) Loftsson, T.; Vogensen, S. B.; Desbos, C.; Jansook, P. 'Carvedilol: Solubilization and Cyclodextrin Complexation: A Technical Note'. *AAPS PharmSciTech* **2008**, 9 (2), 425-430.
- (81) Masarone, D.; Valente, F.; Rubino, M.; Vastarella, R.; Gravino, R.; Rea, A.; Russo, M. G.; Pacileo, G.; Limongelli, G. 'Pediatric Heart Failure: A Practical Guide to Diagnosis and Management'. *Pediatrics & Neonatology* **2017**, 58 (4), 303-312.
- (82) Morri M, Casabonne C, Leonardi D, V. S. 'Orphan Formulations for Pediatric Use: Development and Stability Control of Two Sildenafil Citrate Solutions for the Treatment of Pulmonary Hypertension'. *AAPS Pharmscitech* **2020**, 21.
- (83) Pinto, J. T., Brachkova, M. I., Fernandes, A. I., & Pinto, J. F. 'Evaluation of the Ability

- of Powdered Milk to Produce Minitablets Containing Paracetamol for the Paediatric Population.' *Chemical Engineering Research and Design* **2016**, *110*, 171-182.
- (84) Morri, M.; Castellano, P.; Leonardi, D.; Vignaduzzo, S. 'First Development, Optimization, and Stability Control of a Pediatric Oral Atenolol Formulation'. *AAPS PharmSciTech* **2018**, *19* (4), 1781-1788.
- (85) FDA Listing of Authorized Generics, 2022 <https://www.fda.gov/about-fda/center-drug-evaluation-and-research-cder/fda-listing-authorized-generics>.
- (86) Menon T.V and Sajeeth C.L. 'Formulation and Evaluation of Sustained Release Sodium Alginate Microbeads of Carvedilol'. *Journal of Pharmacy and Technology* **2013**, *6*, 392-397.
- (87) Krstić, M.; Radojević, M.; Stojanović, D.; Radojević, V.; Uskoković, P.; Ibrić, S. 'Formulation and Characterization of Nanofibers and Films with Carvedilol Prepared by Electrospinning and Solution Casting Method'. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2017**, *101*, 160-166.
- (88) Han, H.; Li, Y.; Peng, Z.; Long, K.; Zheng, C.; Wang, W.; Webster, T. J.; Ge, L. 'A Soluplus/Poloxamer 407-Based Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for the Weakly Basic Drug Carvedilol to Improve Its Bioavailability'. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2020**, *27*, 102199.
- (89) Mishra, A.; Imam, S. S.; Aqil, M.; Ahad, A.; Sultana, Y.; Ameenuzzafar; Ali, A. 'Carvedilol Nano Lipid Carriers: Formulation, Characterization and in-Vivo Evaluation'. *Drug Delivery* **2016**, *23* (4), 1486-1494.
- (90) Wegmann, M.; Parola, L.; Bertera, F. M.; Taira, C. A.; Cagel, M.; Buontempo, F.; Bernabeu, E.; Höcht, C.; Chiappetta, D. A.; Moretton, M. A. 'Novel Carvedilol Paediatric Nanomicelle Formulation: In-Vitro Characterization and in-Vivo Evaluation'. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2017**, *69* (5), 544-553.
- (91) Medarević, D.; Djuriš, J.; Ibrić, S.; Mitrić, M.; Kachrimanis, K. 'Optimization of Formulation and Process Parameters for the Production of Carvedilol Nanosuspension by Wet Media Milling'. *International Journal of Pharmaceutics* **2018**, *540* (1-2), 150-161.
- (92) Buontempo F, Bernabeu E, Glisoni RJ, Quiroga E, Bregni C, C. DA. 'Carvedilol Stability in Paediatric Oral Liquid Formulations'. *Farmacia Hospitalaria* **2010**, *34*, 293-7.
- (93) Walsh, J., Cram, A., Woertz, K., Breikreutz, J., Winzenburg, G., Turner, R. . E. F. I. 'Playing Hide and Seek with Poorly Tasting Paediatric Medicines: Do Not Forget the Excipients.' *Advanced drug delivery reviews* **2014**, *73*, 14-33.
- (94) Hamed, R.; Awadallah, A.; Sunoqrot, S.; Tarawneh, O.; Nazzal, S.; AlBaraghtli, T.;

- Al Sayyad, J.; Abbas, A. 'PH-Dependent Solubility and Dissolution Behavior of Carvedilol—Case Example of a Weakly Basic BCS Class II Drug'. *AAPS PharmSciTech* **2016**, *17*, 418-426.
- (95) Santos Souza, H. F.; Real, D.; Leonardi, D.; Rocha, S. C.; Alonso, V.; Serra, E.; Silber, A. M.; Salomon, C. J. 'Development and in Vitro/in Vivo Evaluation of a Novel Benzimidazole Liquid Dosage Form Using a Quality-by-Design Approach'. *TM & IH*. **2017**, *22*, 1514-1522.
- (96) Provenza, N.; Calpena, A. C.; Mallandrich, M.; Halbaut, L.; Clares, B. 'Design and Physicochemical Stability Studies of Paediatric Oral Formulations of Sildenafil'. *Int J Pharm*. **2014**, *460*, 234-239.
- (97) Plummer, D. *Introducción a La Bioquímica Práctica*; Ediciones Universitarias Barcelona, Ed.; 1994.
- (98) van der Vossen, A. C.; van der Velde, I.; Smeets, O. S. N. M.; Postma, D. J.; Eckhardt, M.; Vermes, A.; Koch, B. C. P.; Vulto, A. G.; Hanff, L. M. 'Formulating a Poorly Water Soluble Drug into an Oral Solution Suitable for Paediatric Patients; Lorazepam as a Model Drug'. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2017**, *100*, 205-210.
- (99) Strickley, R. G. 'Solubilizing Excipients Used in Commercially Available Oral and Injectable Formulations'. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 201-230.
- (100) Raghavan, S. .; Trividic, A.; Davis, A. .; Hadgraft, J. 'Crystallization of Hydrocortisone Acetate: Influence of Polymers'. *Int J Pharm*. **2001**, *212*, 213-221.
- (101) European Medicines Agency. ICH Q1E Evaluation of Stability Data - Scientific Guideline. 2003.
- (102) European Pharmacopeia (9.0., S. 2. 6. 12. . Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Total Viable Aerobic Count. 2017, pp 195-199.
- (103) Agency European Medicines. Reflection Paper: Formulation of Choice for the Paediatric Population. 2006.
- (104) Ortega, O.; Martín, A.; Clavé, P. 'Diagnosis and Management of Oropharyngeal Dysphagia among Older Persons, State of the Art'. *J Am Med Dir Assoc* . **2017**, *18*, 576-582.
- (105) Leonetti Luparini, R.; Celli, V.; Piccirillo, G.; Guidi, V.; Cacciafesta, M.; Marigliano, V. 'Carvedilol in Elderly Patients with Chronic Heart Failure, a 12 Weeks Randomized, Placebo Controlled Open Trial'. *Arch Gerontol Geriatr* **2000**, *29*, 275-282.
- (106) Liu, P. H., & Wang, J. D. 'Antihypertensive Medication Prescription Patterns and Time Trends for Newly-Diagnosed Uncomplicated Hypertension Patients in Taiwan.' *BMC Health Services Research* **2008**, *8* (1), 1-11.

- (107) Gibbons, R. J., Chatterjee, K., Daley, J., Douglas, J. S., Fihn, S. D., Gardin, J. M. & Smith, S. C. 'ACC/AHA/ACP-ASIM Guidelines for the Management of Patients with Chronic Stable Angina: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients With Chronic Stable Ang)'. *Journal of the American College of Cardiology* **1999**, 33 (7), 2092-2197.
- (108) Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M. & Turner, M. B. 'Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update: A Report from the American Heart Association.' *circulation* **2015**, 131 (4), e29-e322.
- (109) Investigators, C. I. 'The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): A Randomised Trial.' *The Lancet* **1999**, 353 (9146), 9-13.
- (110) Arita, T., Suzuki, S., Kato, Y., Kano, H., Yajima, J., Matsuno, S. & Yamashita, T. 'Association between Bisoprolol Plasma Concentration and Worsening of Heart Failure:(CVI ARO 6) Metabolism and Pharmacokinetics.' *Drug* **2020**, 35 (2), 228- 237.
- (111) Nozaki, A., Kobayashi, T., Naruhashi, K., Okugawa, H., Horiuchi, N., Nakanishi, H. & Nakamura, S. 'An Attempt at Administering a Transdermal Formulation of Bisoprolol in Patients with Acute Cardiac Symptoms.' *The American Journal of Emergency Medicine* **2021**, 39, 146-150.
- (112) KasimNA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, L.; H, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky SA, Midha KK, S. V.; GL., A. 'Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification.' *Mol Pharm* **2004**, 1 (1), 85-96.
- (113) Swapna, G., Pravallika, B., & Poojitha, J. 'A Review on Drug-Drug Interaction Studies on Amiodarone and Levofloxacin.' *Research journal of Pharmacology and Pharmacodynamics* **2019**, 11 (4), 147-152.
- (114) Connolly, S. J. 'Evidence-Based Analysis of Amiodarone Efficacy and Safety.' *Circulation* **1999**, 100 (19), 2025-2034.
- (115) Courchesne, W. E. 'Characterization of a Novel, Broad-Based Fungicidal Activity for the Antiarrhythmic Drug Amiodarone.' *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2002**, 300 (1), 195-199.
- (116) Gupta, S. S., Ton, V. K., Beaudry, V., Rulli, S., Cunningham, K., & Rao, R. 'Antifungal Activity of Amiodarone Is Mediated by Disruption of Calcium Homeostasis.' *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278 (31), 28831-28839.
- (117) Zhang, Y. Q., & Rao, R. 'Global Disruption of Cell Cycle Progression and Nutrient Response by the Antifungal Agent Amiodarone.' *Journal of Biological Chemistry*

- 2007**, 282 (52), 37844-37853.
- (118) Yamreudeewong, W., DeBisschop, M., Martin, L. G., & Lower, D. L. 'Potentially Significant Drug Interactions of Class III Antiarrhythmic Drugs.' *Drug Safety* **2003**, 26, 421-438.
- (119) Kellett, H. A., Sawers, J. S. A., Boulton, F. E., Cholerton, S., Park, B. K., & Toft, A. D. 'Problems of Anticoagulation with Warfarin in Hyperthyroidism.' *QJM: An International Journal of Medicine* **1986**, 58 (1), 43-51.
- (120) Fatima, N., Mandava, K., Khatoun, F., Badar, J., Begum, S. F., Narasimhan, C. & Mohammed, W. 'Clinical Profile and Side Effects of Chronic Use of Oral Amiodarone in Cardiology Outpatients Department (CLIPSE-A Study)-A Prospective Observational Study.' *Annals of Medicine and Surgery* **2022**, 80, 104167.
- (121) Kilborn, M. J., Rathore, S. S., Gersh, B. J., Oetgen, W. J., & Solomon, A. J. 'Amiodarone and Mortality among Elderly Patients with Acute Myocardial Infarction with Atrial Fibrillation.' *American Heart Journal* **2002**, 144 (6), 1095-1101.
- (122) Rubim, A. M., Rubenick, J. B., Gregolin, E., Laporta, L. V., Leitenberg, R., & Rolim, C. M. B. 'Amiodarone Hydrochloride: Enhancement of Solubility and Dissolution Rate by Solid Dispersion Technique.' *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, 51, 957-966.
- (123) Pouton, C. W. 'Formulation of Poorly Water-Soluble Drugs for Oral Administration: Physicochemical and Physiological Issues and the Lipid Formulation Classification System.' *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, 29 ((3-4)), 278-287.
- (124) Lamprecht, A., Bouligand, Y., & Benoit, J. P. 'New Lipid Nanocapsules Exhibit Sustained Release Properties for Amiodarone.' *Journal of controlled release* **2002**, 84 ((1-2)), 59-68.
- (125) Elgart, A., Cherniakov, I., Aldouby, Y., Domb, A. J., & Hoffman, A. 'Improved Oral Bioavailability of BCS Class 2 Compounds by Self Nano-Emulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS): The Underlying Mechanisms for Amiodarone and Talinlol.' *Pharmaceutical research* **2013**, 30, 3029-3044.
- (126) Nadimi, A. E., Ebrahimipour, S. Y., Afshar, E. G., Falahati-Pour, S. K., Ahmadi, Z., Mohammadinejad, R., & Mohamadi, M. 'Nano-Scale Drug Delivery Systems for Antiarrhythmic Agents.' *European journal of medicinal chemistry* **2018**, 157, 1153-1163.
- (127) Oliveira, N. K., Frank, L. A., Squizani, E. D., Reuwsaat, J. C. V., Marques, B. M., Motta, H. & Kmetzsch, L. 'New Nanotechnological Formulation Based on Amiodarone-Loaded Lipid Core Nanocapsules Displays Anticryptococcal Effect.' *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, 162, 105816.

- (128) Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Pediamécum. Cardiología <https://www.aeped.es/category/pediamecum/cardiologia?page=6>.
- (129) OMS. Medicamentos esenciales. http://www.who.int/topics/essential_medicines/es/.
- (130) Poirier, L., & Lacourcière, Y. 'The Evolving Role of β -Adrenergic Receptor Blockers in Managing Hypertension.' *Canadian Journal of Cardiology* **2012**, 28 (3), 334-340.
- (131) Rousseau, M. F., Pouleur, H., Cocco, G., & Wolff, A. A. 'Comparative Efficacy of Ranolazine versus Atenolol for Chronic Angina Pectoris.' *The American journal of cardiology* **2005**, 95 (3), 311-316.
- (132) Havaladar, V. D., Kulkarni, A. S., Dias, R. J., Aloorkar, N. H., & Mali, K. K. 'Floating Matrix Tablets of Atenolol: Formulation and in Vitro Evaluation.' *Asian Journal of Pharmaceutics* **2009**, 3 (4).
- (133) Singh, B., Chakkal, S. K., & Ahuja, N. 'Formulation and Optimization of Controlled Release Mucoadhesive Tablets of Atenolol Using Response Surface Methodology.' *Aaps Pharmscitech* **2006**, 7, E19-E28.
- (134) Srivastava, A. K., Wadhwa, S., Ridhurkar, D., & Mishra, B. 'Oral Sustained Delivery of Atenolol from Floating Matrix Tablets—Formulation and in Vitro Evaluation.' *Drug development and industrial pharmacy* **2005**, 31 ((4-5)), 367-374.
- (135) Adhikari, S. N. R., Nayak, B. S., Nayak, A. K., & Mohanty, B. 'Formulation and Evaluation of Buccal Patches for Delivery of Atenolol.' *AAPS PharmSciTech* **2010**, 11 (3), 1038-1044.
- (136) Jug, M., Bećirević-Laćan, M., & Bengez, S. 'Novel Cyclodextrin-Based Film Formulation Intended for Buccal Delivery of Atenolol.' *Drug development and industrial pharmacy* **2009**, 35 (7), 796-807.
- (137) Shirwaikar, A. A., & Ramesh, A. 'Fast Disintegrating Tablets of Atenolol by Dry Granulation Method.' *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, 66 (4), 422-426.
- (138) Ramírez, C. C., di Lauro, S. X. G., Garrido, V. R., Carbajosa, G. R., Fernández-Polo, A., & Bautista, S. C. 'Microbiological Quality of Pediatric Oral Liquid Formulations.' *Farmacia Hospitalaria* **2016**, 40 (5), 427-435.
- (139) Zaid, A. N., Malkieh, N., Kharaof, M., Ghoush, A., & Al-Ramahi, R. 'Formulation and Stability Evaluation of Extemporaneously Prepared Atenolol Capsules from Crushed Atenolol Tablets.' *International Journal of Pharmaceutical Compounding* **2012**, 16 (4), 342-346.
- (140) Foppa, T., Murakami, F. S., & Silva, M. A. S. 'Development, Validation and Stability Study of Pediatric Atenolol Syrup.' *International Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, 62 (7), 519-521.

- (141) Santoveña, A., Hernández-Paiz, Z., & Fariña, J. B. 'Design of a Pediatric Oral Formulation with a Low Proportion of Hydrochlorothiazide.' *International journal of pharmaceutics* **2012**, 423 (2), 360-364.

ANEXO

Contenido del Anexo

Índice Tablas del Anexo	1
Índice Figuras del Anexo	3
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
Evaluación estadística	14
a- Cálculo de la recta de regresión.....	14
b- Interpretación estadística de la regresión lineal.....	14
A.3.7 Robustez	18
A.3.8 Rugosidad, aspereza o resistencia.....	19
A.3.9 Aptitud del sistema.....	19
A.3.10 Resultados de la validación de los métodos cromatográficos empleados en la cuantificación de cada uno de los ingredientes activos empleados	19
A.3.10.1 Gotas de Carvedilol	20
A.3.10.2 Gotas de Amiodarona Clorhidrato	28
A.3.10.3 Gotas y jarabe de Bisoprolol Fumarato.....	37
A.3.10.4 Bebida de Atenolol	46
Referencias bibliográficas del anexo.....	55

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 Carvedilol. Resultados de la linealidad del método CLAE.....	22
Tabla A.3 Carvedilol. Resumen de los datos de validación del método cromatográfico.....	26
Tabla A.4 Carvedilol. Resultados de la determinación de la exactitud del método	27
Tabla A.5 Carvedilol. Análisis estadístico de la exactitud del método	27
Tabla A.6 Carvedilol. Resultados de la aptitud del sistema.....	28
Tabla A.7 Amiodarona Clorhidrato. Resultados de la linealidad del método	30
Tabla A.8 Amiodarona Clorhidrato. Resultados de la linealidad del método	33
Tabla A.9 Amiodarona Clorhidrato. Resultados de la determinación de la exactitud del método con matriz 1.....	34
Tabla A.10 Amiodarona Clorhidrato. Resultados de la determinación de la exactitud del método con matriz 2.....	35
Tabla A.11 Amiodarona Clorhidrato. Análisis estadístico de la exactitud del método. Matriz 1	35
Tabla A.12 Amiodarona Clorhidrato. Análisis estadístico de la exactitud del método. Matriz 2.....	36
Tabla A.13 Amiodarona Clorhidrato. Resultados de la exactitud, precisión y especificidad del método	36
Tabla A.14 Clorhidrato de amiodarona. Resultados de la aptitud del sistema.....	37
Tabla A.15 Bisoprolol Fumarato. Resultados de la linealidad del método CLAE.....	39
Tabla A.16 Bisoprolol Fumarato. Resumen de los datos de validación del método cromatográfico.....	43
Tabla A.17 Bisoprolol Fumarato. Resultados de la determinación de la exactitud del método para las gotas.....	44
Tabla A.18 Bisoprolol Fumarato. Análisis estadístico de la exactitud del método para las gotas.....	44
Tabla A.19 Bisoprolol Fumarato. Resultados de la determinación de la exactitud del método para jarabe.....	45
Tabla A.20 Bisoprolol Fumarato. Análisis estadístico de la exactitud del método para jarabe	45
Tabla A.21 Bisoprolol Fumarato. Resultados de la aptitud del sistema.....	46
Tabla A.22 Atenolol. Resultados de la linealidad del método CLAE.....	48
Tabla A.23 Atenolol. Resumen de los datos de validación del método cromatográfico	52
Tabla A.24 Atenolol. Resultados de la determinación de la exactitud del método	53

Tabla A.25 Atenolol. Análisis estadístico de la exactitud del método	53
Tabla A.26 Atenolol. Resultados de la aptitud del sistema	54

Índice Figuras del Anexo

Figura A.1 Curva de calibración de Carvedilol por CLAE	23
Figura A.2 Curva de calibración de Amiodarona Clorhidrato por CLAE	31
Figura A.3 Curva de calibración de Bisoprolol Fumarato por CLAE.....	40
Figura A.4 Curva de calibración de Atenolol por CLAE	49

A.1 Introducción

La separación de un analito, fundamentalmente dentro de una matriz compleja, es de vital importancia en los procedimientos analíticos, actualmente se realiza en la mayoría de los casos por cromatografía siendo lo más adecuado una técnica por Cromatografía de Líquidos de Alta Performance (CLAE) debido a su sensibilidad y su fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas ¹.

A.2 Validación analítica

El propósito de una validación analítica es generar métodos reproducibles y confiables. 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 ². La validación implica la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

Un método analítico debe ser validado para cumplir con los requisitos de las normas internacionales: BPM (Buenas Prácticas de Manufactura, industria farmacéutica), Norma ISO 71025 (acreditación de laboratorios de ensayo y calibración), Norma ISO 15189 (acreditación de laboratorios clínicos), Organismos internacionales como USP y otras farmacopeas, OMS, ICH.

Existen diferentes tipos de métodos analíticos:

- Métodos normalizados: Método analítico desarrollado por un organismo de normalización u otro organismo reconocido cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico correspondiente (por ejemplo, farmacopeas).
- Métodos no normalizados: Método analítico desarrollado por un tercero o que haya sido adaptado por el laboratorio a partir de un método normalizado.
- Métodos desarrollados por el laboratorio: Método analítico que no se encuentra en las normas u otras colecciones de métodos, ni en publicaciones de terceros, habiendo sido desarrollado por el propio laboratorio.

Ahora, la pregunta sería qué métodos deben ser validados:

- Los métodos no normalizados
- Los métodos desarrollados por el laboratorio
- Los métodos normalizados utilizados fuera del alcance previsto
- Los métodos normalizados que han sido modificados por el laboratorio

Es decir, válido un método cuando se incorporan mejoras al mismo o se amplía su alcance para matrices complejas. 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.

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 proyectado ³.

A.3 Atributos analíticos

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 Edición ⁴, 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) ⁵.

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 (DER) 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 Ecuación A-1:

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

(Ec. A-1)

Se selecciona el t_{tabla} 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 homogénea ⁴. Generalmente se expresa como la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) (Ecuación A-3) de una serie de mediciones. Puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

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

(Ec. A-2)

$$DER = \frac{100 \times DE}{\bar{x}}$$

(Ec. A-3)

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 interlaboratorios, siendo particularmente indicada su verificación en el caso de la normalización

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 similar ⁶. 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 (DEa) de una curva de calibración elaborada con soluciones de referencia cuyas concentraciones estén en las vecindades del LOD y la pendiente (b) de dicha curva ⁷, usando la Ecuación A-4.

$$LOD = 3.3(DEa / b)$$

(Ec. A-4)

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 degradación ⁸.

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-5.

$$LOQ = 10(DE / b)$$

(Ec. A-5)

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 (DEc), cuyo cálculo se detalla en la Ecuación A-5, y la desviación estándar relativa $DER = 100 \times DEc/C$ 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-6.

$$DE_c = \frac{DE_b}{b} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n}} + \left(\frac{DE_b}{b}\right) \left(\frac{s}{DE_0}\right) y - \bar{Y}^2$$

(Ec. A6)

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 concentración ⁹.

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 $p < 0,05$) ¹⁰.

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-7)

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

Evaluación estadística

a- Cálculo de la recta de regresión

$$y = a + bx$$

(Ec. A7)

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"

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

(Ec. A8)

Fórmula para hallar "b"

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

(Ec. A-9)

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 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”

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

$$\frac{[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}] [\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}]}$$

(Ec. A-10)

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.

Coeficiente 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 $t_{\text{regresión}}$

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

(Ec. A-11)

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”:

$$s_a = sb^2 \sum \frac{x^2}{n}$$

(Ec. A-12)

Fórmula para hallar la desviación estándar del intercepto “a”

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

(Ec. A-13)

Fórmula para hallar los límites de confianza del intercepto

$$a = a \pm t_{tab} S_a$$

(Ec. A-14)

Determinación del test estadístico del intercepto “a”

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

$$t_{exp} = \frac{|a|}{s_a}$$

(Ec. A-15)

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 (H0): $b=0$

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

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

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

(Ec. A-16)

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

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

(Ec. A-17)

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

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

(Ec. A-18)

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

(Ec. A-19)

Fórmula para hallar los límites de confianza de la pendiente

$$b = b \pm t_{tab} \times S_b$$

(Ec. A-20)

t_{tab} 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 $t_{experimental}$

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

(Ec. A-21)

Criterio de aceptación:

Si t_{exp} 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”

$$f = y/x$$

(Ec. A-22)

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-laboratorios ¹¹.

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 validación ¹². 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 sistema ¹³. 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 Unidos¹⁴.

A.3.8 Rugosidad, aspereza o resistencia

El término rugosidad fue introducido y popularizado por Youden y Steiner¹⁵, 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, etc¹⁶. Esta propiedad puede ser convenientemente evaluada empleando estrategias de diseño experimental¹⁷.

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 Carvedilol

Soluciones para CLAE

Solución madre

La solución madre de CAR fue preparada en un matraz aforado de 50,00 mL disolviendo una cantidad exactamente pesada (65,4 mg) de CAR en metanol, siendo la concentración final de 1,308 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: 0,0654; 0,07848; 0,09156; 0,10464; 0,11772 y 0,1308 mg mL⁻¹.

Condiciones cromatográficas.

Determinación de CAR

El contenido de CAR fue determinado empleando una columna SiliaChrom C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm), termostaticada a 30°C. La fase móvil consistió en una mezcla de

buffer fosfato (50 mM, pH 2,9): metanol (52:48) con un flujo de 1,0 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 µL. La longitud de onda de detección fue 245 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 0,0654-0,1308 mg mL⁻¹.

La Tabla A.2 resume los datos obtenidos de las áreas bajo la curva para cada una 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.2 Carvedilol. Resultados de la linealidad del método CLAE

	CAR (mg mL ⁻¹)	Área (mUA)	x*y	x ²	y ²	f(y/x)
	0,0654	14215631	929702,26	0,00427716	2,02084E+14	217364388,4
	0,0654	14160830	926118,28	0,00427716	2,00529E+14	216526452,6
	0,0654	14172690	926893,92	0,00427716	2,00865E+14	216707798,2
	0,07848	17143968	1345458,60	0,00615911	2,93916E+14	218450152,9
	0,07848	17194562	1349429,22	0,00615911	2,95653E+14	219094826,7
	0,07848	17154561	1346289,94	0,00615911	2,94279E+14	218585130
	0,09156	21169861	1938312,47	0,00838323	4,48163E+14	231212986
	0,09156	21297134	1949965,58	0,00838323	4,53568E+14	232603036,3
	0,09156	21329003	1952883,51	0,00838323	4,54926E+14	232951103,1
	0,10464	23021046	2408922,25	0,01094953	5,29969E+14	220002350,9
	0,10464	23070153	2414060,81	0,01094953	5,32232E+14	220471645,6
	0,10464	22916228	2397954,09	0,01094953	5,25154E+14	219000649,8
	0,11772	26185350	3082539,40	0,01385799	6,85673E+14	222437563,7
	0,11772	26225767	3087297,29	0,01385799	6,87791E+14	222780895,3
	0,11772	26161600	3079743,55	0,01385799	6,84429E+14	222235813,8
	0,1308	29196409	3818890,29	0,01710864	8,5243E+14	223214136,1
	0,1308	29349304	3838888,96	0,01710864	8,61382E+14	224383058,1
	0,1308	29184246	3817299,37	0,01710864	8,5172E+14	223121146,8
Sumatoria	1,7658	393148343	40610649,8	0,18220701	9,05476E+15	4001143134
Promedio						222285729,7
Desviación estándar						5159280,062
Coficiente variación						2,32

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

$$a = -469450,1746$$

$$b = 227431445,3$$

$$\text{Ecuación de la recta: } y = 227431445,3x - 469450,1746$$

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

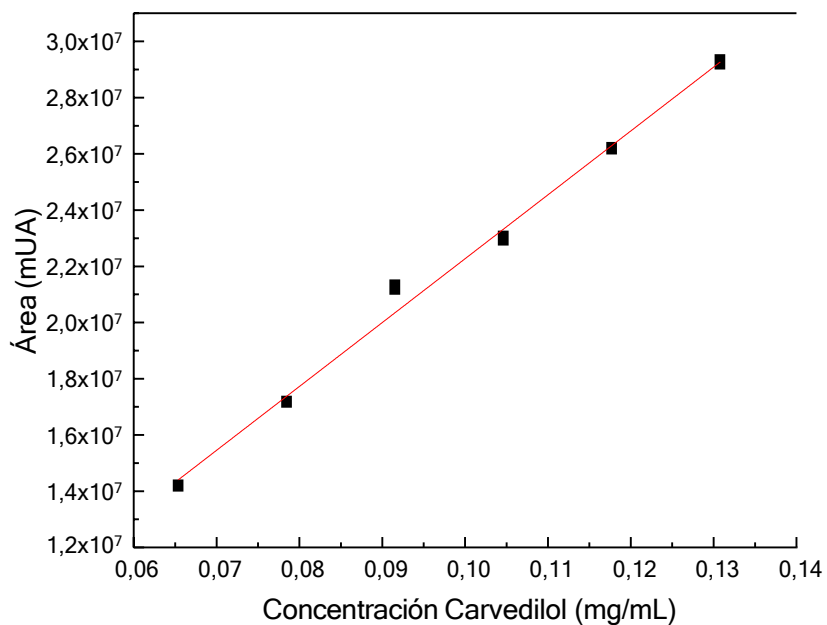


Figura A.1 Curva de calibración de Carvedilol por CLAE

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: 0,9927

Interpretación: El 99,27% 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 $p=0,05$

$t_{\text{regresión}}$: 46,50

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"

$$a = -469450,17 \pm 2,12 \times 473790,34$$

$$a = -943240,51 \text{ hasta } 4340,17$$

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

Determinación del test estadístico del intercepto "a"

Resultado:

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

$$t_{\text{experimental}} = 0,99$$

Límite de confianza de la pendiente "b"

Resultado

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

Intervalo de confianza de la pendiente "b"

$$b = 227431445,3 \pm 2,12 \times 4709121,626$$

$$b = 222722323,67 \text{ hasta } 232140566,926$$

Determinación del test estadístico de la pendiente "b"

Resultado:

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

$$t_{\text{experimental}} = 48,3$$

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

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

Resultados:

$$\text{Promedio de "f": } 222285729,7$$

$$\text{Desviación estándar de "f": } 5159280,062$$

$$\text{Coeficiente de variación (CV): } 2,32 \%$$

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 %, preparadas 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.

Exactitud

La exactitud se evaluó midiendo la recuperación del analito por el método de adición de estándar. Este parámetro fue determinado sobre las gotas de CAR conteniendo 5 mg mL⁻¹ y HPMC (0,5% p/v). Cantidades conocidas del analito fueron agregadas a una muestra de gotas pre-analizada con el método CLAE, conteniendo el equivalente al 80% de la concentración final, a fin de obtener muestras fortificadas con concentraciones correspondientes al 90, 100 y 110%. Cada una de las muestras fueron inyectadas tres veces.

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

Parámetros	Carvedilol	
	Especificaciones	Resultado
Rango lineal (mg L ⁻¹)		65,4-130,8/
Linealidad-Ecuación de regresión		
$b \pm SD_b$ (x 10 ⁸)		2,27 ± 0,05
$a \pm SD_a$ (x 10 ⁵)		-4,7 ± 4,7
Coeficiente de correlación (r)	Mínimo 0,99	0,9965
Coeficiente de determinación (r ²)	Mínimo 0,98	0,9927
Test estadístico para el "r"	$t_{\text{tabla}} = 2,12$	$t_{\text{regresión}} =$
$p = 0,05$ y n-2 grados de libertad	$t_{\text{regresión}} \gg t_{\text{tabla}}$	46,50
Coeficiente de variación (%)	Máximo 5%	2,32%
Prueba de linealidad de la pendiente $p = 0,05$ y n-2 grados de libertad	$t_{\text{tabla}} = 2,12$ $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$	$t_{\text{exp}} = 48,3$
Prueba de proporcionalidad del intercepto $p = 0,05$ y n-2 grados de libertad	$t_{\text{tabla}} = 2,12$ $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$	$t_{\text{exp}} = 0,99$
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- $F_{\text{entre días}}$	$F_{(0,95; 2; 17)} = 3,124$	$F = 1,539$
ANOVA- $F_{\text{entre analistas}}$	$F_{(0,95; 2; 17)} = 3,124$	$F = 3,118$
Especificidad (Pureza de pico)	> 0,95	0,9997

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 Carvedilol. 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 Carvedilol. 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 0,10464 mg mL⁻¹ de CAR.

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.6.

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

Analito	Factor de coleo (t_f)	Platos teóricos (N)	DER (%) ^a
CAR	1,34	5460	0,26

^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 Carvedilol. No se observó la presencia de productos de degradación y los tiempos de retención para CAR en la formulación y la solución estándar fueron coincidentes.

A3.10.2 Gotas de Amiodarona Clorhidrato

Soluciones para CLAE

Soluciones madre

La solución madre de AMIO fue preparada en un matraz aforado de 50,00 mL disolviendo una cantidad exactamente pesada (65,2 mg) de AMIO 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 0,0652-0,1304 mg mL⁻¹.

Condiciones cromatográficas

Determinación de Amiodarona Clorhidrato

Cada una de las muestras fue analizada a 240 nm para determinar el contenido de AMIO. Se empleó una columna SiliaChrom C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), termostaticada a 30°C. La fase móvil consistió en una mezcla de buffer fosfato (50 mM, pH 2,9): acetonitrilo (30:70) con un flujo de 1 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 µL.

Validación del método cromatográfico

Linealidad y rango (intervalo de concentraciones de trabajo)

Teniendo en cuenta el propósito de la cuantificación, el rango lineal fue 0,0652 - 0,1304 mg mL⁻¹. Este rango equivale al intervalo del 65 al 130% de la respuesta objetivo para el contenido promedio del analito en las formulaciones desarrolladas.

La Tabla A.7 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 AMIO en cada una de las formulaciones.

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

$$a = -497218,381$$

$$b = 119371167,8$$

$$\text{Ecuación de la recta: } y = 119371167,8x - 497218,381$$

Tabla A.7 Amiodarona Clorhidrato. Resultados de la linealidad del método

	AMIO (mg mL ⁻¹)	Área (mUA)	x*y	x ²	y ²	f(y/x)
	0,0652	7548924	492189,84	0,00425104	5,69863E+13	115781042,9
	0,0652	7548923	492189,77	0,00425104	5,69862E+13	115781027,6
	0,0652	7548963	492192,38	0,00425104	5,69868E+13	115781641,1
	0,07824	8623996	674741,44	0,00612149	7,43733E+13	110224897,8
	0,07824	8623856	674730,49	0,00612149	7,43709E+13	110223108,4
	0,07824	8623393	674694,26	0,00612149	7,43629E+13	110217190,7
	0,09128	9877589	901626,32	0,00833203	9,75668E+13	108211974,1
	0,09128	9877956	901659,82	0,00833203	9,7574E+13	108215994,7
	0,09128	9877623	901629,42	0,00833203	9,75674E+13	108212346,6
	0,10432	12518896	1305971,23	0,01088266	1,56723E+14	120004754,6
	0,10432	12518658	1305946,40	0,01088266	1,56717E+14	120002473,2
	0,10432	12518689	1305949,63	0,01088266	1,56718E+14	120002770,3
	0,11736	13508756	1585387,60	0,01377337	1,82486E+14	115105282,9
	0,11736	13508756	1585387,60	0,01377337	1,82486E+14	115105282,9
	0,11736	13508689	1585379,74	0,01377337	1,82485E+14	115104712
	0,1304	14986356	1954220,82	0,01700416	2,24591E+14	114926042,9
	0,1304	14985687	1954133,58	0,01700416	2,24571E+14	114920912,6
	0,1304	14985623	1954125,23	0,01700416	2,24569E+14	114920421,8
Sumatoria	1,7604	201191333	20742155,6	0,18109430	2,37812E+15	2052741877
Promedio						114041215,4
Desviación estándar						3963830,6
Coefficiente de variación						3,47

La Figura A.2 Representa la curva de calibración de Amiodarona Clorhidrato.

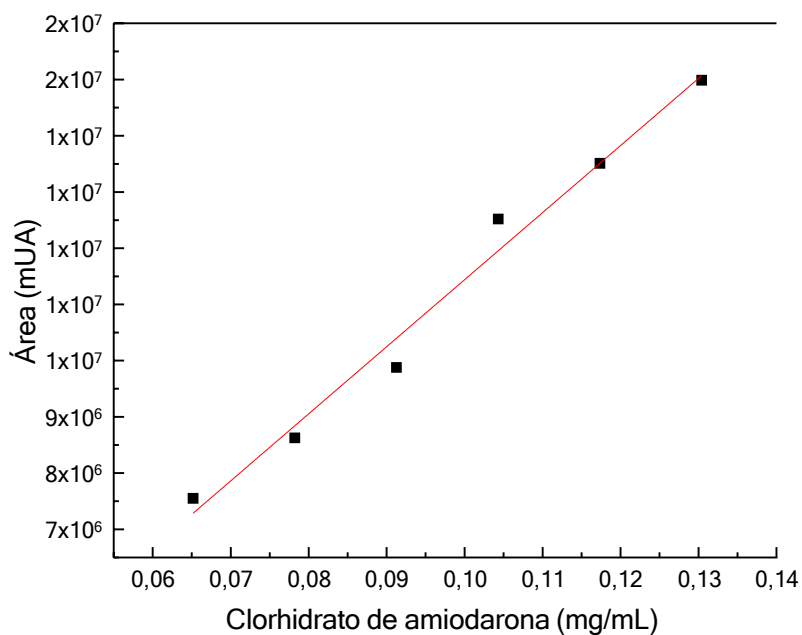


Figura A.2 Curva de calibración de Amiodarona Clorhidrato por CLAE

b- Interpretación estadística de la regresión lineal

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

Resultado: 0,9917

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

Resultado: 0,9834

Test estadístico para el coeficiente de correlación "r"

Resultados:

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

$t_{\text{regresión}}$: 30,79

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"

$$a = -497218,381 \pm 2,12 \times 388110,4464$$

$$a = -1319975,773 \text{ hasta } 325539,0111$$

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:

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

$$t_{\text{experimental}} = 1,28$$

Límite de confianza de la pendiente "b"

Resultado

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

Intervalo de confianza de la pendiente "b"

$$b = 119371167,8 \pm 2,12 \times 3869360,462$$

$$b = 111168490,1 \text{ hasta } 127573845,6$$

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

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

$$t_{\text{experimental}} = 30,85$$

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

Resultados:

$$\text{Promedio de "f": } 114041215,4$$

$$\text{Desviación estándar de "f": } 3963830,597$$

$$\text{Coeficiente de variación (CV): } 3,47 \%$$

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 Amiodarona Clorhidrato. Resultados de la linealidad del método

Parámetros	Clorhidrato de amiodarona	
	Especificaciones	Resultado
Rango lineal (mg L ⁻¹)		65,2-130,4
Linealidad-Ecuación de regresión		
$b \pm SD_b$ (x 10 ⁸)		1,19 ± 0,04
$a \pm SD_a$ (x 10 ⁵)		-4,97 ± 3,88
Coeficiente de correlación (r)	Mínimo 0,99	0,9917
Coeficiente de determinación (r ²)	Mínimo 0,98	0,9834
Test estadístico para el "r"	$t_{\text{tabla}} = 2,12$	$t_{\text{regresión}} = 30,79$
p= 0,05 y n-2 grados de libertad	$t_{\text{regresión}} \gg t_{\text{tabla}}$	
Coeficiente de variación (%)	Máximo 5%	3,47%
Prueba de linealidad de la pendiente p=0,05 y n-2 grados de libertad	$t_{\text{tabla}} = 2,12$	$t_{\text{exp}} = 30,85$
	$t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$	
Prueba de proporcionalidad del intercepto p=0,05 y n-2 grados de libertad	$t_{\text{tabla}} = 2,12$	$t_{\text{exp}} = 1,28$
	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$	

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. En todos los casos, las desviaciones estándares relativas fueron menores al 2%, confirmando la precisión 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, gota, y matriz 2, jarabe, respectivamente) y en la formulación que contiene 25 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 y jarabe 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 Amiodarona Clorhidrato. 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			
0,08	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 Amiodarona Clorhidrato. Resultados de la determinación de la exactitud del método con matriz 2

Inicial	Concentración (mg mL ⁻¹)			RSD (%) n=3	Recuperación de analito (%)	Sesgo (%)
	Agregado	Total	Encontrado			
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 Amiodarona Clorhidrato. 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 Amiodarona Clorhidrato. 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:

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

$t_{\text{exp}} = 1,71$

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

Tabla A.13 Amiodarona Clorhidrato. Resultados de la exactitud, precisión y especificidad del método

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

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.14

Tabla A.14 Clorhidrato de amiodarona. Resultados de la aptitud del sistema

Analito	Factor de coleo (f_r)	Platos teóricos (N)	DER (%) ^a
AMIO	1,26	10980	0,28

^aCinco replicados

Selectividad

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 AMIO. No se observó la presencia de productos de degradación y los tiempos de retención para AMIO en la formulación y la solución estándar fueron coincidentes.

A.3.10.3 Gotas y jarabe de Bisoprolol Fumarato

Soluciones para CLAE

Solución madre

La solución madre de BISO fue preparada en un matraz aforado de 10,00 mL disolviendo una cantidad exactamente pesada (32,7 mg) de BISO en acetonitrilo, siendo la concentración final de 2,78 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: 0,139; 0,167; 0,195; 0,223; 0,250 y 0,278 mg mL⁻¹.

Condiciones cromatográficas.

Determinación de Bisoprolol Fumarato

Los análisis de cada una de las muestras se llevaron a cabo empleando una columna Silia Chrom 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 4,5): acetonitrilo (70:30), a una velocidad de flujo de 1,0 mL min⁻¹, con detección UV a 228 nm y un volumen de inyección de 20 µL.

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 0,139-0,278 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.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^*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

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

$$a = -186517,6811$$

$$b = 57306706,14$$

$$\text{Ecuación de la recta: } y = 57306706,14x - 186517,6811$$

Tabla A.15 Bisoprolol Fumarato. Resultados de la linealidad del método CLAE

BISO (mg mL ⁻¹)	Área (mUA)	x*y	x ²	y ²	f(y/x)
0,139	7827505	1088023,2	0,019321	6,12698E+13	56312985,61
0,139	7825841	1087791,9	0,019321	6,12438E+13	56301014,39
0,139	7821723	1087219,5	0,019321	6,11794E+13	56271388,49
0,167	9295558	1552358,2	0,027889	8,64074E+13	55662023,95
0,167	9246640	1544188,9	0,027889	8,55004E+13	55369101,8
0,167	9268142	1547779,7	0,027889	8,58985E+13	55497856,29
0,195	11050548	2154856,8	0,038025	1,22115E+14	56669476,92
0,195	11019169	2148737,9	0,038025	1,21422E+14	56508558,97
0,195	11050381	2154824,3	0,038025	1,22111E+14	56668620,51
0,223	12605209	2810961,6	0,049729	1,58891E+14	56525600,9
0,223	12607540	2811481,4	0,049729	1,5895E+14	56536053,81
0,223	12565469	2802099,6	0,049729	1,57891E+14	56347394,62
0,250	14185467	3546366,7	0,0625	2,01227E+14	56741868
0,250	14216891	3554222,7	0,0625	2,0212E+14	56867564
0,250	14225982	3556495,5	0,0625	2,02379E+14	56903928
0,278	15660185	4353531,4	0,077284	2,45241E+14	56331600,72
0,278	15706347	4366364,4	0,077284	2,46689E+14	56497651,08
0,278	15708073	4366844,3	0,077284	2,47E+14	56503859,71
Sumatoria	211886670	46534148,3	0,824244	2,63E+15	1014516548
Promedio					56362030,43
Desviación estándar					436377,52
Coficiente de variación					0,77

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

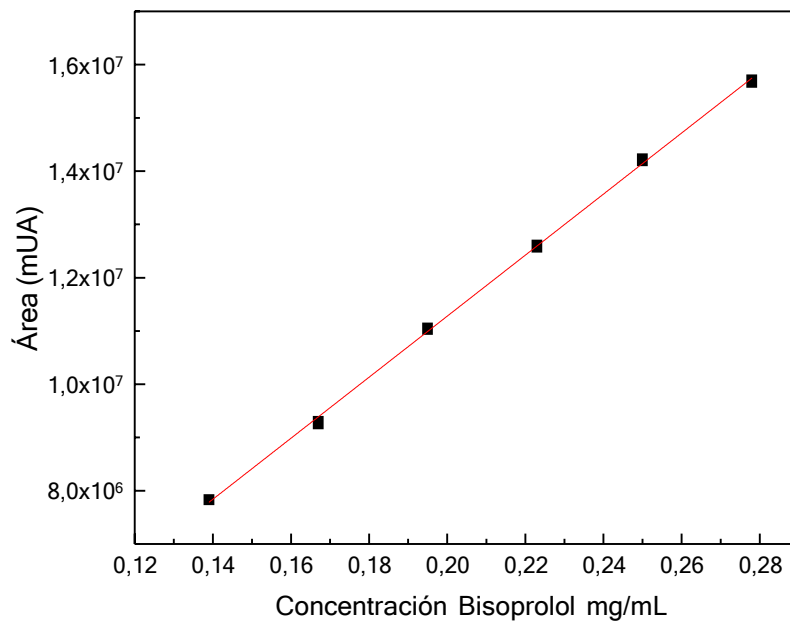


Figura A.3 Curva de calibración de Bisoprolol Fumarato por CLAE

b- Interpretación estadística de la regresión lineal

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

Resultado: 0,9948

Coefficiente de determinación " r^2 " (Mínimo 0,98)

Resultado: 0,9896

Interpretación: El 98,96% 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 $p=0,05$

$t_{\text{regresión}}$: 48,78

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”

 $a = -186517,6811 \pm 2,12 \times 71295,9$ $a = -337664,9$ hasta $24632,301$

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 $p = 0,05$ $t_{\text{experimental}} = 1,98$ **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”

 $b = 57306706,14 \pm 2,12 \times 354307,18$ $b = 56555574,91$ hasta $58057837,36$

Determinación del test estadístico de la pendiente “b”

Resultado:

 $t_{\text{tabla}} = 2,12$ para $18-2 = 16$ grados de libertad y $p = 0,05$ $t_{\text{experimental}} = 161,74$ $t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}} \Rightarrow b \neq 0$

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

Resultados:

Promedio de “f”: 56362030,43

Desviación estándar de “f”: 436377,5283

Coeficiente de variación (CV): 0,77 %

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.16). 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 analítico para rango, linealidad, precisión y especificidad.

Exactitud

La exactitud se evaluó midiendo la recuperación del analito por el método de adición de estándar. Considerando las diferentes matrices elaboradas, gotas y jarabes, la exactitud fue determinada en cada una de ellas y en la mayor concentración, es decir, 5 mg mL⁻¹. En cada caso, cantidades conocidas del analito fueron agregadas a una muestra de gotas o jarabe pre-analizada con el método CLAE, conteniendo el equivalente a 4 mg mL⁻¹, a fin de obtener muestras fortificadas con concentraciones correspondientes a 4,5, 5 y 5,5 mg mL⁻¹.

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

Parámetros	Bisoprolol Fumarato	
	Especificaciones	Resultado
Rango lineal (mg L ⁻¹)		139,0- 278,0
Linealidad-Ecuación de regresión		
$b \pm SD_b$ (x 10 ⁷)		5,73 ± 0,03
$a \pm SD_a$ (x 10 ⁵)		-1,86 ± 0,76
Coefficiente de correlación (r)	Mínimo 0,99	0,9948
Coefficiente de determinación (r ²)	Mínimo 0,98	0,9896
Test estadístico para el "r"	$t_{\text{tabla}} = 2,12$	$t_{\text{regresión}} =$
p= 0,05 y n-2 grados de libertad	$t_{\text{regresión}} \gg t_{\text{tabla}}$	48,78
Coefficiente de variación (%)	Máximo 5%	0,77%
Prueba de linealidad de la pendiente p=0,05 y n-2 grados de libertad	$t_{\text{tabla}} = 2,12$ $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$	$t_{\text{exp}} = 161,74$
Prueba de proporcionalidad del intercepto p=0,05 y n-2 grados de libertad	$t_{\text{tabla}} = 2,12$ $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$	$t_{\text{exp}} = 1,98$
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

Cada una de las muestras fueron inyectadas tres veces. Los resultados de exactitud para las gotas, 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 Bisoprolol Fumarato. Resultados de la determinación de la exactitud del método para las gotas.

Concentración (mg mL ⁻¹)				RSD (%)	Recuperación	Sesgo
Inicial	Agregado	Total	Encontrado	n=3	analito (%)	(%)
4,0	0,00	4,0	4,01	0,26	100,25	+0,25
4,0	0,5	4,5	4,48	0,40	99,55	-0,45
4,0	1,0	5,0	5,02	0,17	100,4	+0,6
4,0	1,5	5,5	5,52	0,44	100,36	+0,36

Evaluación estadística

La Tabla A.18 resume los datos para el análisis estadístico de la exactitud del método.

Tabla A.18 Bisoprolol Fumarato. Análisis estadístico de la exactitud del método para las gotas

Análisis estadístico	
Nº de muestras (n)	9
Recuperación promedio (R) (90-110%)	100,14
Desviación estándar (S)	0,75
Desvío estándar relativo (Máximo 5,0%)	0,74

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 $p=0,05$

$t_{exto} = -1,7$

Los resultados de la exactitud y la evaluación estadística para el jarabe se resumen en las Tablas A.19 y A.20.

Tabla A.19 Bisoprolol Fumarato. Resultados de la determinación de la exactitud del método para jarabe

Concentración (mg mL ⁻¹)				RSD (%)	Recuperación	Sesgo
Inicial	Agregado	Total	Encontrado	n=3	analito (%)	(%)
4,0	0,00	4,0	3,99	0,22	99,75	-0,25
4,0	0,5	4,5	4,49	0,42	99,77	-0,23
4,0	1,0	5,0	5,02	0,27	100,4	+0,6
4,0	1,5	5,5	5,49	0,34	99,81	-0,19

Tabla A.20 Bisoprolol Fumarato. Análisis estadístico de la exactitud del método para jarabe.

Análisis estadístico	
Nº de muestras (n)	9
Recuperación promedio (R) (90-110%)	99,93
Desviación estándar (S)	0,68
Desvío estándar relativo (Máximo 5,0%)	0,69

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 $p=0,05$

$t_{exto} = 0,91$

Aptitud del sistema

La prueba se llevó a cabo inyectando cinco replicados de una solución estándar conteniendo 0,167 mg mL⁻¹ de BISO.

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.21

Tabla A.21 Bisoprolol Fumarato. Resultados de la aptitud del sistema

Analito	Factor de coleo (t_f)	Platos teóricos (N)	DER (%) ^a
BISO	1,15	2460	0,25

^a Cinco replicados

Selectividad

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 las formulaciones y un estándar de Bisoprolol. No se observó la presencia de productos de degradación y los tiempos de retención para BISO en la formulación y la solución estándar fueron coincidentes.

A.3.10.4 Bebida 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 nm¹⁸.

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.22 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

De los datos obtenidos de la Tabla A.22, se obtienen los siguientes valores:

$$a = - 550340,762$$

$$b = 105628262$$

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

Tabla A.22 Atenolol. Resultados de la linealidad del método CLAE

	ATN (mg mL ⁻¹)	Área (mUA)	x*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

La Figura A.4 Representa la curva de calibración de Atenolol.

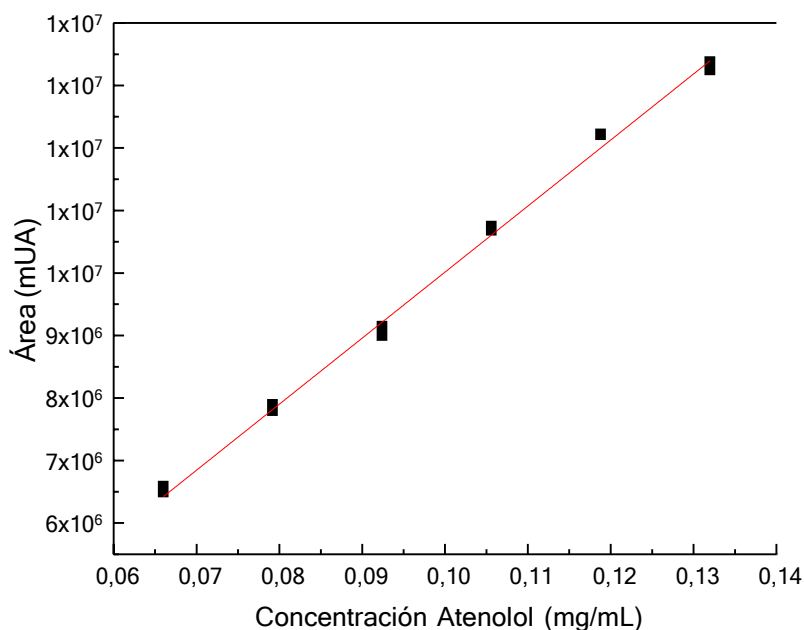


Figura A.4 Curva de calibración de Atenolol por CLAE

b- Interpretación estadística de la regresión lineal

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

Resultado: 0,9932

Coefficiente de determinación " r^2 " (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

Coefficiente 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.2). 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.23 resume los datos de validación del método analítico para rango, linealidad, precisión y especificidad.

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 la bebida pre-analizada con el método CLAE, conteniendo el equivalente a 8 mg mL⁻¹, a fin de obtener muestras fortificadas con concentraciones correspondientes a 9, 10 y 11 mg mL⁻¹.

1.

Tabla A.23 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"	$t_{\text{tabla}} = 2,12$	$t_{\text{regresión}} =$
p= 0,05 y n-2 grados de libertad	$t_{\text{regresión}} \gg t_{\text{tabla}}$	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

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.24, donde el sesgo se calculó como la diferencia entre el porcentaje de analito efectivamente recuperado y el valor teórico (100%).

Tabla A.24 Atenolol. Resultados de la determinación de la exactitud del método

Concentración (mg mL ⁻¹)				RSD (%)	Recuperación	Sesgo
Inicial	Agregado	Total	Encontrado	n=3	analito (%)	(%)
8	0,00	8,0	7,99	0,26	99,99	-0,01
8	1,0	9,0	8,94	0,40	99,37	-0,63
8	2,0	10,0	10,036	0,17	100,36	+0,36
8	3,0	11,0	11,076	0,44	100,69	+0,69

Evaluación estadística

La Tabla A.25 resume los datos para el análisis estadístico de la exactitud del método.

Tabla A.25 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 prueba se llevó a cabo inyectando cinco replicados de una solución estándar conteniendo 0,1056 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 coleo también fueron determinados, y sus correspondientes valores se listan en la Tabla A.26

Tabla A.26 Atenolol. Resultados de la aptitud del sistema

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

^a Cinco replicados

Selectividad

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.

Referencias bibliográficas del anexo

- (1) Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. *Principios de Análisis Instrumental*; McGraw-Hill., Ed.; Madrid, **2001**.
- (2) Cuadros-Rodríguez, L., Valverde-Som, L., Jiménez-Carvelo, A. M., & Delgado-Aguilar, M. 'Validation Requirements of Screening Analytical Methods Based on Scenario-Specified Applicability Indicators.' *Analytical Chemistry* **2020**, *122*, 115705.
- (3) Do, T. K. T., Schmid, M., Phanse, M., Charegaonkar, A., Sprecher, H., Obkircher, M., & Reich, E. 'Development of the First Universal Mixture for Use in System Suitability Tests for High-Performance Thin Layer Chromatography.' *Journal of Chromatography A* **2021**, *1638*, 461830.
- (4) Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina. <1130> Validación de Métodos Analíticos en Farmacopea Argentina, 7º Ed. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/recurso/86181/dto202-2003-95/htm>.
- (5) Clementino, A., & Sonvico, F. '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* **2018**, *155*, 33-41.
- (6) Thompson, M., Ellison, S. L., & Wood, R. 'Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report).' *Pure and applied chemistry* **2002**, *74* (5), 835-855.
- (7) Epshtein, N. A. 'Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis.' *Pharmaceutical Chemistry Journal* **2004**, *38* (4), 212-228.
- (8) Encarnação, T., Aguiar, A., Palito, C., Pais, A. A., Campos, M. G., Sobral, A. J., & Burrows, H. D. 'Development and Validation of a RP-HPLC Method for the Simultaneous Analysis of Paracetamol, Ibuprofen, Olanzapine, and Simvastatin during Microalgae Bioremediation.' *MethodsX* **2020**, *7*, 101083.
- (9) 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. 'Statistical Evaluation of Analytical Curves for Quantification of Pesticides in Bananas.' *Food chemistry* **2021**, *345*, 128768.
- (10) Quiñones-García, Y. A., Calvo-Alonso, A. M., Carabaloso-Noa, I. M., & Alonso-Rodríguez, H. L. 'Validación de Un Método Analítico Para La Determinación Del Contenido de Monobromado En El Dermofural Por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE), Fase Inversa.' *Revista Cubana de Química* **2015**, *27* (2), 163-181.

- (11) Crabbe, J. 'Robustness of Analytical Methods and Pharmaceutical Technological Products.' *Computers and Chemistry* **1998**, 6 (21), 453.
- (12) Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BG, M. D. 'Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation.' *J Pharm Biomed Anal* **2001**, 24 (5-6), 723-753.
- (13) Sharma, T., Khurana, R. K., Borges, B., Kaur, R., Katare, O. P., & Singh, B. 'An HPTLC Densitometric Method for Simultaneous Quantification of Sorafenib Tosylate and Chrysin: Analytical Method Development, Validation and Applications.' *Microchemical Journal* **2021**, 162, 105821.
- (14) FDA, R. G. Validation of chromatographic methods. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/reviewer-guidance-validation-chromatographic-methods>.
- (15) Youden, W. J., & Steiner, E. H. 'Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists.' **1975**.
- (16) Palakurthi, A. K., Dongala, T., & Katakam, L. N. R. 'QbD Based Development of HPLC Method for Simultaneous Quantification of Telmisartan and Hydrochlorothiazide Impurities in Tablets Dosage Form.' *Practical Laboratory Medicine* **2020**, 21, e00169.
- (17) Vander Heyden, Y., Questier, F., & Massart, L. 'Ruggedness Testing of Chromatographic Methods: Selection of Factors and Levels.' *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1998**, 18 (1-2), 43-56.
- (18) Kaur, I., Wakode, S., Pal Singh, H., & Manachanda, S. 'Development and Validation of a Stability-Indicating Reverse Phase HPLC-PDA Method for Determination of Canagliflozin in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form.' *Pharmaceutical methods* **2016**, 7 (1).
- (19) The United States Pharmacopeial Convention. 'Pharmacopeia, U. S. USP 38-NF 33. In The United States Pharmacopeia-The National Formulary'. **2015**.