



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**Desarrollo y comparación de la  
prueba de verificación de desempeño  
de disolución en un simulador  
gástrico y en el aparato 2 USP**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**Ingeniera en Sistemas Biomédicos**

**P R E S E N T A**

Itzel Guadalupe Martínez Camacho

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Luis Fernando Donis Rabanales



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2024



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Titulación con trabajo escrito)**



De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado DESARROLLO Y COMPARACION DE LA PRUEBA DE VERIFICACION DE DESEMPEÑO DE DISOLUCION EN UN SIMULADOR GASTRICO Y EN EL APARATO 2 USP que presenté para obtener el título de INGENIERO EN SISTEMAS BIOMÉDICOS es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación.

---

**ITZEL GUADALUPE MARTINEZ CAMACHO**  
Número de cuenta: 313311556

## Agradecimientos

Este proyecto se realizó en el Laboratorio Nacional de Manufactura Aditiva y Digital (MADiT), con sede en el Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), ubicado en Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y gracias al apoyo brindado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con clave IN-119423.

## Agradecimientos

*A mis padres, Olivia Camacho Vega y Ricardo Martínez Ruíz, a mi hermano, José Martínez agradezco su amor incondicional, apoyo constante y palabras de aliento que han sido fundamentales a lo largo de este proceso, gracias por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia. Su confianza en mí, me ha inspirado a seguir adelante, incluso en los momentos más desafiantes. Esta tesis es un tributo a su dedicación y sacrificio, refleja todo lo que he aprendido de ustedes.*

*A mi alma mater Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Ingeniería por brindarme la oportunidad de formar parte de una institución de excelencia académica y proporcionar los conocimientos necesarios para mi formación académica.*

*A los laboratorios e integrantes: Laboratorio Nacional de Manufactura Aditiva y Digital (MADiT), Laboratorio Universitario de Nanotecnología Ambiental (LUNA), Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica (LUCE), Ingeniería de Procesos e Ingeniería de Precisión y Metrología del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), por el uso de sus instalaciones, equipos y materiales necesarios para desarrollar este proyecto.*

*A mi tutor Dr. Luis Fernando Donis, por su confianza y apoyo para desarrollar este proyecto.*

*A los doctores: Dr. Gabriel Ascanio, Dr. Alberto Caballero, Dra. María Soledad Córdova, Dr. Carlos Palacios, Dra. Selene Islas, M. en I. Sergio Padilla, Dr. Juan Durán, Dr. Erasmo Correa y Dr. Leopoldo Ruíz, por su apoyo, paciencia, conocimientos, enseñanzas y confianza durante el tiempo que trabajé en sus laboratorios y clases. Así como el apoyo brindado por Marcos Velázquez en la manufactura de los elementos necesarios para este trabajo.*

*A la M. en C. Ruth Silvana Cortés Lagunes, por los conocimientos brindados en el área de la química analítica, así como, su valiosa contribución por sus asesorías en el desarrollo y validación del método analítico.*

*A la familia Roldán, en especial a mi amigo M. en I. Daniel Roldán, por su acompañamiento emocional, sus revisiones y comentarios en el presente trabajo, sus porras a lo largo de toda mi carrera universitaria y por las valiosas enseñanzas de vida que me ha compartido.*

*A mis amigas de la carrera, especialmente a Ing. Abigail Abundio, Montse Arteaga y Ing. Fernanda Fonseca. A los amigos que he tenido la suerte de conocer durante mi estancia en el MADiT: Vlad, Luis, Homero, Tona, Gloria y Anuar, por todas las risas y el apoyo brindado. A todos aquellos que pude haber olvidado, mis más sinceras disculpas.*

*En especial a mi abuelito "Chapo", Gerardo Camacho, cuya memoria siempre vivirá en mi corazón.*

*"Nada en la vida es para ser temido, solo para ser comprendido"*

*Marie Curie.*

# ÍNDICE

Abstract.....	12
Resumen .....	13
Introducción.....	14
1. Antecedentes .....	15
1.1 Panorama de la disolución de formas farmacéuticas sólidas .....	15
1.2 Estado actual de la prueba de verificación de desempeño (PVT).....	18
1.3 Modelos <i>in vitro</i> para el estudio de disolución.....	19
1.3.1 Modelos <i>in vitro</i> estáticos.....	23
1.3.2 Modelos <i>in vitro</i> dinámicos.....	26
1.4 Antecedentes del modelo IV-DGS en el MADiT del ICAT.....	27
2. Marco teórico.....	29
2.1 Administración de fármacos por vía oral: su paso por el sistema digestivo.....	29
2.1.1 Estómago .....	30
2.1.2 Intestino delgado .....	31
2.2 Proceso LADME en los fármacos de administración vía oral.....	32
2.3 Disolución de fármacos .....	33
2.3.1 Formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata (IR).....	34
2.3.1.1 Sistema de Clasificación de productos Biofarmacéuticos (BCS).....	35
2.3.1.2 Condición de sumidero (sink) .....	36
2.3.1.3 Factores que influyen en la disolución .....	37
2.4 Prueba de verificación de desempeño (PVT).....	37
2.5 La prednisona como estándar de referencia de la USP .....	38
2.6 Selección de la categoría para la validación de métodos analíticos.....	39
2.7 Selección de los equipos analíticos .....	42
2.7.1 Espectrofotometría visible (UV-Vis).....	42
2.7.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC MS/MS).....	44
3. Planteamiento del problema .....	45
3.1 Hipótesis.....	46
3.2 Objetivo general.....	46
3.2.1 Objetivos particulares .....	46

3.3 Metas y alcances .....	46
3.4 Metodología .....	47
4. Materiales y métodos .....	49
4.1 Materiales.....	49
4.2 Equipos e instrumentos de laboratorio .....	49
4.3 Reactivos y sustancias activas .....	50
4.4 Equipos de disolución (Modelos <i>in vitro</i> ).....	50
4.4.1 Modelo estático: Aparato de disolución 2 USP (paleta).....	50
4.4.1.1 Protocolo de calibración mecánica del aparato 2 USP (calificación operativa).....	51
4.4.1.2 Montaje experimental del aparato 2 USP .....	57
4.4.2 Modelo dinámico: IV-DGS.....	58
4.4.2.1 Requerimientos del modelo IV-DGS para desarrollar la PVT .....	60
4.4.2.1.1 Fabricación de membranas flexibles .....	60
4.4.2.1.2 Medición de presión .....	61
4.4.2.1.3 Determinación del volumen del medio de disolución.....	62
4.4.2.2 Montaje experimental del IV-DGS.....	63
4.5 Validación instrumental de los métodos analíticos .....	65
4.5.1 Preparación de las soluciones de referencia del estándar de prednisona.	66
4.5.2 Características de desempeño para la validación de los métodos analíticos .....	68
4.5.3. Validación del sistema de disolución .....	71
4.6 Pruebas preliminares y protocolo experimental de la PVT.....	71
4.6.1 Filtración del medio de disolución.....	72
4.6.2 Deaireación del medio de disolución.....	72
4.6.3 Desarrollo de la PVT en el modelo estático, aparato 2 USP.....	73
4.6.4 Desarrollo de la PVT en el modelo dinámico, IV-DGS.....	76
4.7 Análisis de las muestras .....	78
4.7.1 Análisis de las muestras en HPLC MS/MS.....	79
4.7.2 Análisis de las muestras en espectrofotometría UV-Vis.....	80
5. Resultados y discusión .....	82
5.1 Calibración mecánica en el aparato 2 USP.....	82

5.2 Validación de los métodos analíticos .....	83
5.2.1 Validación instrumental de los métodos analíticos.....	83
5.2.2 Validación de los modelos <i>in vitro</i> .....	92
5.3 Pruebas preliminares para desarrollar la PVT .....	93
5.4 PVT de disolución en el modelo estático y dinámico.....	96
Conclusiones .....	103
Referencias.....	106
Apéndice A. Medios de disolución biorrelevantes .....	112
Apéndice B. Implementación del catéter de manometría esofágica para medir la presión.	113
Apéndice C. Cálculos de la validación de los métodos analíticos (HPLC MS/MS y UV-Vis)...	118



## Índice de figuras

FIGURA 1. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DEL PROCESO DE DESINTEGRACIÓN Y DISOLUCIÓN DE UN FÁRMACO (ADAPTADA DE ABDOU ET AL., 2003). .....	16
FIGURA 2. ESQUEMA DEL APARATO 2 USP (GRAY Y ROSANSKE, 2014). .....	24
FIGURA 3. HIDRODINÁMICA DEL APARATO 2 DE LA USP, CON 900 ML DE MEDIO DE DISOLUCIÓN A 50 RPM. LOS VECTORES DE MAGNITUD DE VELOCIDAD ESTÁN CODIFICADOS POR COLORES EN ORDEN DE MAGNITUD DE VELOCIDAD CRECIENTE. LOS VECTORES CON VELOCIDADES MÁS BAJAS SE TRAZAN EN AZUL OSCURO HASTA LLEGAR AL COLOR ROJO QUE CORRESPONDE A LOS VECTORES CON LAS VELOCIDADES MÁS ALTAS (BROWN ET AL., 2019). .....	25
FIGURA 4. ESQUEMA DE LA POSICIÓN CORRECTA DE LA FORMA FARMACÉUTICA EN EL APARATO 2 USP, ANTES DE INICIAR LA PRUEBA. ADAPTADO DE (GRAY Y ROSANSKE., 2014). .....	26
FIGURA 5. GRÁFICA DE LAS CONTRACCIONES PERISTÁLTICAS EJERCIDAS POR EL IV-DGS. A) PERFIL DE PRESIÓN EN LA CÁMARA B Y SECUENCIA DE PRESURIZACIÓN DE LAS CÁMARAS; B) ESQUEMAS DE FLUJOS A TRAVÉS DEL MODELO (DONIS ET AL., 2022). ....	28
FIGURA 6. ESQUEMA DEL A) SISTEMA DIGESTIVO FORMADO POR EL B) TRACTO DIGESTIVO (MOORE ET AL., 2013; GUERRA ET AL., 2012). .....	29
FIGURA 7. FASES DEL PROCESO DE DIGESTIÓN (MARTÍN Y RICO, 2023). .....	30
FIGURA 8. A) REGIONES DEL ESTÓMAGO Y MOVIMIENTO PERISTÁLTICO B) PROPULSIÓN, C) PROCESO DE MEZCLA, Y D) RETROPULSIÓN; E) PERFIL DE PRESIÓN EN EL MODELO TIM-AGC (BELLMAN ET AL., 2016; MOORE ET AL., 2013; KELLY, 1980). .....	31
FIGURA 9. 1) ADMINISTRACIÓN ORAL; 2) LIBERACIÓN DE LA SUSTANCIA ACTIVA (DESINTEGRACIÓN Y DISOLUCIÓN) Y ABSORCIÓN; 3) ELIMINACIÓN DEL FÁRMACO (ELABORACIÓN PROPIA). .....	33
FIGURA 10. ESQUEMA DE LA FRACCIÓN BIOACCESIBLE Y BIODISPONIBLE DE COMPONENTES INGERIDOS (GUERRA ET AL., 2012). ....	34
FIGURA 11. PORCENTAJE DE USO DE DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS EN EL ANÁLISIS DE MATERIALES FARMACÉUTICOS (SIDDIQUI ET AL., 2017). .....	42
FIGURA 12. ESQUEMA DEL FUNCIONAMIENTO DEL ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS DE DOBLE HAZ. LA LÁMPARA DE TUNGSTENO EMITE LUZ VISIBLE MIENTRAS QUE LA LÁMPARA D2 GENERA LUZ ULTRAVIOLETA. LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA SE DIRIGE A UN MONOCROMADOR QUE SELECCIONA LAS LONGITUDES DE ONDA QUE PASA A TRAVÉS DE LA MUESTRA (ROCHA ET AL., 2018). .....	43
FIGURA 13. ESQUEMA DE DIAGRAMA DE FLUJO DEL PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO HPLC (BHARDWAJ ET AL., 2015). .....	44
FIGURA 14. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA PARA LA PVT EN DOS MODELOS IN VITRO: UNO ESTÁTICO Y OTRO DINÁMICO (ELABORACIÓN PROPIA). .....	48
FIGURA 15. A) ESQUEMA DIMENSIONAL Y B) FOTOGRAFÍA DEL APARATO 2 USP FABRICADO EN EL ICAT (ELABORACIÓN PROPIA). ....	51
FIGURA 16. NIVELACIÓN DEL ENTORNO (A) BASE DEL APARATO (1) SIN APARATO; (2) CON APARATO Y MEDIO DE DISOLUCIÓN; (B) SOPORTE DEL VASO; (C) TAPA DEL APARATO (ELABORACIÓN PROPIA). .....	53
FIGURA 17. ESQUEMA DEL ELEMENTO DE AGITACIÓN DE PALETA CON TOLERANCIAS (USP <711>, 2010). .....	54
FIGURA 18. ALINEACIONES DEL (A) ELEMENTO DE AGITACIÓN Y (B) VASO DE DISOLUCIÓN (ELABORACIÓN PROPIA). .....	55
FIGURA 19. (A) ESCANTILLÓN Y (B) MEDICIÓN DE ALTURA CON ESCANTILLÓN (ELABORACIÓN PROPIA). .....	56
FIGURA 20. OSCILACIÓN DEL ELEMENTO DE AGITACIÓN (ELABORACIÓN PROPIA). .....	57
FIGURA 21. (A) ESQUEMA DEL MONTAJE EXPERIMENTAL PARA EL APARATO 2 USP: (1) MOTOR; (2) TACÓMETRO; (3) REGULADOR DE FRECUENCIA; (4) MESA ÓPTICA; (B) SISTEMA DE RECIRCULACIÓN: (1) BOMBA DE AGUA; (2) SENSOR DE TEMPERATURA; (3) TERMOSTATO; (4) RESISTENCIA ELÉCTRICA (ELABORACIÓN PROPIA). .....	58
FIGURA 22. VISTA RENDERIZADA DEL MODELO IV-DGS: (1) CÁMARA A; (2) CÁMARA B; (3) MEMBRANAS A Y B; (4) TAPA SUPERIOR; (5) PUERTO PARA COMPRIMIDOS DE FÁRMACO; (6) PUERTO PARA SENSOR DE TEMPERATURA; (7) PUERTO PARA CATÉTER DE PRESIÓN; (8) PUERTO PARA MEDIO DE DISOLUCIÓN; (9) TAPA INFERIOR; (10) PUERTO PARA MEDIDOR DE pH; (11) PUERTO PARA TOMA DE MUESTRAS; (12) ABRAZADERA SANITARIA DE ACERO INOXIDABLES (ELABORACIÓN PROPIA ADAPTADO DEL DISEÑO DONIS ET AL., 2022). .....	59
FIGURA 23. VISTA RENDERIZADA DE LA TAPA SUPERIOR: (1) PUERTO PARA CATÉTER DE PRESIÓN; (2) ENTRADA DEL MEDIO DE DISOLUCIÓN; (3) ENTRADA DE LA TABLETA DEL FÁRMACO; (4) PUERTO PARA EL SENSOR DE TEMPERATURA (ELABORACIÓN PROPIA). .....	60
FIGURA 24. PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN DE MEMBRANAS FLEXIBLES (1A) MEMBRANA PEQUEÑA PARA LA CÁMARA B; (1B) MEMBRANA GRANDE PARA LA CÁMARA A DEL MODELO IV-DGS; (2) MEZCLA 1:1 DEL ECOFLEX 00-30; (3) CURACIÓN DE LAS	

MEMBRANAS EN EL HORNO DE CONVECCIÓN; (4) DESMOLDE DE LAS MEMBRANAS; (5) VERIFICACIÓN DE FUNCIONAMIENTO (ELABORACIÓN PROPIA).	61
FIGURA 25. (A) ESQUEMA DEL CATÉTER DE MANOMETRÍA ESOFÁGICA, (B) CARACTERIZACIÓN DE PRESIÓN Y C) POSICIÓN DEL SENSOR CIRCUNFERENCIAL AMARILLO EN EL IV-DGS (ELABORACIÓN PROPIA).	62
FIGURA 26. NIVELES DE AGUA EN LA A) CÁMARA DE COMPLIANZA A Y B) CÁMARA DE COMPLIANZA B (ELABORACIÓN PROPIA).	64
FIGURA 27. MONTAJE EXPERIMENTAL DEL MODELO IV-DGS (ELABORACIÓN PROPIA).	65
FIGURA 28. ESQUEMA DE LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE ESTÁNDAR DE PREDNISONA Y SOLUCIONES DE REFERENCIA (1) Y (2) PARA EL MÉTODO HPLC MS/MS (ELABORACIÓN PROPIA).	67
FIGURA 29. ESQUEMA DE LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE REFERENCIA PARA EL MÉTODO ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS (ELABORACIÓN PROPIA).	68
FIGURA 30. IMAGEN DEL SISTEMA DE FILTRACIÓN (A) EQUIPO DE MICROFILTRACIÓN; (B) BOMBA DE VACÍO (ELABORACIÓN PROPIA).	72
FIGURA 31. IMAGEN DE LA PRUEBA DE DEAIRACIÓN (ELABORACIÓN PROPIA).	73
FIGURA 32. EQUIVALENCIA EN MASA DE LAS TABLETAS DE PREDNISONA (ELABORACIÓN PROPIA).	74
FIGURA 33. (A) IMAGEN DE DOSIFICACIÓN Y (B) EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA DE LA PVT (ELABORACIÓN PROPIA).	75
FIGURA 34. DOSIFICACIÓN DE LA TABLETA ESTÁNDAR DE PREDNISONA USP (ELABORACIÓN PROPIA).	77
FIGURA 35. ANÁLISIS DE MUESTRAS EN LOS MÉTODOS ANALÍTICOS (ELABORACIÓN PROPIA).	78
FIGURA 36. DILUCIONES DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS EN HPLC MS/MS (ELABORACIÓN PROPIA).	80
FIGURA 37. DILUCIONES DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS EN EL ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS CARY 5000 (ELABORACIÓN PROPIA).	81
FIGURA 38. GRÁFICA DEL INTERVALO DE TRABAJO PARA EL ANÁLISIS DE PREDNISONA ENTRE CONCENTRACIONES DE 1.00 A 20.00 MG/L PARA EL MÉTODO ANALÍTICO HPLC MS/MS (ELABORACIÓN PROPIA).	83
FIGURA 39. GRÁFICO DE RESIDUALES DEL INTERVALO DE TRABAJO PARA EL MÉTODO ANALÍTICO HPLC MS/MS (ELABORACIÓN PROPIA).	84
FIGURA 40. GRÁFICA DEL INTERVALO DE TRABAJO PARA EL ANÁLISIS DE PREDNISONA ENTRE CONCENTRACIONES DE 0.50 A 35.00 MG/L PARA EL MÉTODO ANALÍTICO UV-VIS (ELABORACIÓN PROPIA).	85
FIGURA 41. GRÁFICO DE RESIDUALES DEL INTERVALO DE TRABAJO PARA EL MÉTODO ANALÍTICO UV-VIS (ELABORACIÓN PROPIA).	85
FIGURA 42. CROMATOGRAMAS DE HPLC MS/MS A) MEDIO DE DISOLUCIÓN Y B) UN ESTÁNDAR DE PREDNISONA A 1.0 MG/L (ELABORACIÓN PROPIA).	87
FIGURA 43. ESPECTRO DE ABSORBANCIA A UNA LONGITUD DE ONDA DE APROXIMADAMENTE 242 NM A) MEDIO DE DISOLUCIÓN Y B) ESTÁNDAR DE PREDNISONA A 20 MG/L (ELABORACIÓN PROPIA).	87
FIGURA 44. GRÁFICA DE EXACTITUD DE LA CONCENTRACIÓN ESTIMADA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN REAL PARA EVALUAR LA EXACTITUD DEL MÉTODO HPLC MS/MS (ELABORACIÓN PROPIA).	88
FIGURA 45. GRÁFICA DE EXACTITUD DE LA CONCENTRACIÓN ESTIMADA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN REAL PARA EVALUAR LA EXACTITUD DEL MÉTODO UV-VIS (ELABORACIÓN PROPIA).	89
FIGURA 46. CURVA PROMEDIO DE CARACTERIZACIÓN DEL SENSOR (ELABORACIÓN PROPIA).	94
FIGURA 47. PERFIL DE PRESIÓN PARA LA DISOLUCIÓN DE PREDNISONA (1) INICIO DE LA FASE DE PROPULSIÓN; (2) FIN DE LA FASE DE PROPULSIÓN; (3) INICIO DE LA FASE DE RETROPULSIÓN; (4) FIN DE LA FASE DE RETROPULSIÓN (ELABORACIÓN PROPIA).	94
FIGURA 48. GRÁFICA DE CAJAS Y BIGOTES DEL PORCENTAJE DE DISOLUCIÓN DE LAS TABLETAS DE LA PREDNISONA DPVS PARA EL MODELO ESTÁTICO Y DINÁMICO ANALIZADAS EN EL MÉTODO HPLC MS/MS Y ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS (ELABORACIÓN PROPIA).	100
FIGURA 49. ESPECTROS DE ABSORBANCIA DE LA PREDNISONA DPVS EN EL A) APARATO 2 USP Y B) IV-DGS. LA LONGITUD DE ONDA MÁXIMA ABSORBIDA POR LA PREDNISONA ES DE APROXIMADAMENTE 242 NM (ELABORACIÓN PROPIA).	101
FIGURA 50. SEDIMENTACIÓN DE PREDNISONA ESTÁNDAR DE REFERENCIA USP EN A) APARATO 2 USP Y B) MODELO IV-DGS (ELABORACIÓN PROPIA).	102

## Índice de tablas

TABLA 1. MODELOS DINÁMICOS IN VITRO (ADAPTADO DE GUERRA ET AL., 2012). .....	21
TABLA 2. DIMENSIONES Y CAPACIDADES DEL VASO DE VIDRIO DE LA USP (711 USP, 2010).....	24
TABLA 3. CLASIFICACIÓN DEL PRODUCTO FARMACÉUTICO DE ACUERDO CON EL BCS. ....	35
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO REQUERIDAS PARA LA VALIDACIÓN. ADAPTADA DEL CAPÍTULO 1225 USP, 2024. .....	40
TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS (ELABORACIÓN PROPIA ADAPTADO DE: FEUM, 2023; USP 1092, 2024; USP 1225, 2024). ....	41
TABLA 6. RESULTADOS DEL PROTOCOLO DE CALIBRACIÓN DEL APARATO 2 USP.....	82
TABLA 7. PARÁMETROS DE LA REGRESIÓN LINEAL PARA EL INTERVALO DE TRABAJO EN EL MÉTODO HPLC MS/MS. ....	84
TABLA 8. PARÁMETROS DE LA REGRESIÓN LINEAL PARA EL INTERVALO DE TRABAJO EN EL MÉTODO UV-VIS.....	86
TABLA 9. VALORES DE PRECISIÓN OBTENIDOS PARA EL ANÁLISIS DE PREDNISONA PARA HPLC–MS/MS. ....	90
TABLA 10. VALORES DE PRECISIÓN OBTENIDOS PARA EL ANÁLISIS DE PREDNISONA EN UV-VIS. ....	91
TABLA 11. COMPATIBILIDAD DEL FILTRO EN MUESTRAS FILTRADAS Y SIN FILTRAR DE PREDNISONA POR HPLC MS/MS Y UV-VIS. ...	92
TABLA 12. PRUEBA DEL MÉTODO DE DEAIRACIÓN PARA EL MEDIO DE DISOLUCIÓN. ....	93
TABLA 13. PVTs CON TABLETAS DE PREDNISONA GENÉRICA PARA EL APARATO 2 USP. ....	95
TABLA 14. PVTs CON TABLETAS DE PREDNISONA GENÉRICA PARA EL MODELO IV-DGS. ....	96
TABLA 15. PVTs CON TABLETAS DE PREDNISONA ESTÁNDAR DE REFERENCIA USP PARA EL APARATO 2 USP Y MODELO IV-DGS. ....	97
TABLA 16. RESULTADOS DE LA PRUEBA ANOVA DEL MÉTODO HPLC MS/MS DE LOS RENDIMIENTOS DE DISOLUCIÓN OBTENIDOS PARA LOS MODELOS PROBADOS. ....	98
TABLA 17. RESULTADOS DE LA PRUEBA ANOVA DEL MÉTODO ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS DE LOS RENDIMIENTOS DE DISOLUCIÓN OBTENIDOS PARA LOS MODELOS PROBADOS. ....	99

Abreviaturas	Simbología
<b>Abs:</b> Absorbancia	<b>nm:</b> Nanómetros
<b>ANOVA:</b> Análisis de varianza	<b>mm:</b> Milímetros
<b>API:</b> Ingrediente farmacéutico activo	<b>mg:</b> Miligramos
<b>BCS:</b> Sistema de clasificación biofarmacéutica	<b>mbar:</b> Milibares
<b>CV:</b> Coeficiente de variación	<b>psi:</b> Libra por pulgada cuadrada
<b>DER:</b> Desviación estándar relativa	<b>mmHg:</b> Milímetros de mercurio
<b>DGM:</b> Modelo gástrico dinámico	<b>v:</b> volts
<b>DPVS:</b> Estándar de verificación del desempeño de disolución	<b>ppm:</b> Partes por millón
<b>FDA:</b> Administración de Alimentos y Medicamentos	<b>cpm:</b> Contracciones por minuto
<b>FEUM:</b> Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos	<b>pH:</b> Potencial de hidrógeno
<b>GM:</b> Media geométrica	<b>μL:</b> Microlitros
<b>HGS:</b> Simulador gástrico humano	<b>μ:</b> Media de referencia
<b>HPLC MS/MS:</b> Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas	$\bar{x}$ : Media
<b>ICAT:</b> Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología	<b>s:</b> Desviación estándar
<b>IR:</b> Liberación inmediata	°C: Grados Celsius
<b>IV-DGS:</b> Simulador gástrico distal <i>in vitro</i>	$\lambda$ : Longitud de onda
<b>LUCE:</b> Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica	
<b>LUNA:</b> Laboratorio Universitario de Nanotecnología Ambiental	
<b>MADiT:</b> Laboratorio Nacional de Manufactura Aditiva y Digital	
<b>NIR:</b> Infrarrojo cercano	
<b>OMS:</b> Organización mundial de la salud	
<b>PVT:</b> Prueba de verificación de desempeño	
<b>RS:</b> Estándar de referencia	
<b>USP:</b> Farmacopea de los Estados Unidos	
<b>UV/Vis:</b> Ultravioleta visible	

# Development and comparison of dissolution performance verification testing in a gastric simulator and USP Apparatus 2

By

Martínez Camacho Itzel Guadalupe

## Abstract

The dissolution test is essential in the pharmaceutical industry as it allows the study of the dissolution kinetics of drugs, ensuring their quality, effectiveness, and bioavailability in the body. Currently, to guarantee the accuracy and reproducibility of these tests, the Performance Verification Testing (PVT) is first employed as a standardized method. The PVT evaluates the dissolution behavior of a standard reference material and verifies that the apparatus complies with the mechanical parameters established by the United States Pharmacopeia (USP). Furthermore, this test is utilized by various international pharmacopeias to ensure the proper execution of dissolution procedures for solid oral dosage forms.

There are various *in vitro* models available to study drug dissolution, ranging from conventional systems, such as USP apparatus 1 and 2, considered static models due to their design and limited simulation of digestive parameters to more innovative dynamic models. Static models are design for specific tests, such as drug disintegration and dissolution, but are sensitive to factors like vibrations, deaeration of the dissolution medium, and sampling zone location, among others. Consequently, dynamic models have emerged, offering a more realistic simulation by emulate human gastrointestinal conditions, such as peristaltic movements, transit times, and simulated gastric fluids. The importance of dynamic models lies in their ability to replicate conditions closer to the human digestive process, providing a more representative analysis of drug dissolution.

This work focused on the development and comparative evaluation of the PVT in a dynamic model, the *in vitro* distal gastric simulator (IV-DGS), compared with the USP apparatus 2. Standardized prednisone tablets were used for this comparison. During the experiment, two analytical methods were validated: High performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC MS/MS) and ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), with the aim of determining the percentage of prednisone dissolution. The methodology considered the requirements in accordance with the USP compendiums. Based on its implementation in the apparatus 2 USP, an experimental protocol for the PVT in the gastric simulator was designed, considering yours specifications.

The results indicated that the IV-DGS model met the PVT criteria, as both models yielded statistically similar dissolution percentages. However, the IV-DGS model demonstrated behavior more closely aligned with physiological conditions by more accurately simulating mechanical factors, such as the peristaltic movement of gastric digestion. This reinforces its potential as an alternative to USP Apparatus 2 in future dissolution testing. Additionally, HPLC MS/MS exhibited lower variability and higher precision compared to the UV-Vis spectrophotometer, although both analytical methods are considered valid for the test.

**Keywords:** PVT dissolution, drug dissolution, gastric simulator, USP Apparatus 2, analytical methods.

# Desarrollo y comparación de la prueba de verificación de desempeño de disolución en un simulador gástrico y en el aparato 2 USP

Por

Martínez Camacho Itzel Guadalupe

## Resumen

La prueba de disolución es esencial en la industria farmacéutica, ya que permite estudiar la cinética de disolución de los fármacos, asegurando su calidad, efectividad y biodisponibilidad en el organismo. Actualmente, para garantizar la precisión y reproducibilidad de estas pruebas, primero se emplea la prueba de verificación de desempeño de disolución (Performance Verification Testing, PVT) como un método estandarizado. La PVT evalúa el comportamiento de disolución de un material estándar de referencia y verifica que los aparatos cumplan con los parámetros mecánicos establecidos por la farmacopea de los Estados Unidos (United States Pharmacopeia, USP). Además, esta prueba es utilizada por diversas farmacopeas internacionales para asegurar la correcta ejecución de los procedimientos de disolución en formas farmacéuticas orales sólidas.

Existen diversos modelos *in vitro* para estudiar la disolución de fármacos, desde los convencionales, como los aparatos 1 y 2 de la USP, considerados modelos estáticos por su diseño y una limitada simulación de parámetros digestivos, hasta modelos dinámicos más innovadores. Los modelos estáticos, están diseñados para pruebas específicas de desintegración y disolución, pero son sensibles a factores como vibraciones, deaeración del medio y ubicación de la zona de muestreo, entre otros. En consecuencia, surgen los modelos dinámicos que ofrecen una simulación más realista al emular condiciones del tracto digestivo humano, como movimientos peristálticos, tiempos de tránsito y fluidos gástricos simulados, entre otros. La importancia de utilizar modelos dinámicos radica en su capacidad para recrear condiciones cercanas al proceso digestivo humano y analizar de forma más representativa la disolución de fármacos.

El presente trabajo se centró en el desarrollo y la evaluación comparativa de la PVT en un modelo dinámico, el simulador gástrico distal *in vitro* (IV-DGS), frente al aparato 2 USP. Para esta comparación se utilizaron tabletas estandarizadas de prednisona, y se validaron dos métodos analíticos para su cuantificación del porcentaje de disolución: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC MS/MS) y espectrofotometría (Ultraviolet-Visible, UV-Vis). La metodología contempló los requerimientos en conformidad con los compendios de la USP. A partir de su implementación en el aparato 2 USP, se desarrolló un protocolo experimental para la PVT en el simulador gástrico considerando sus especificaciones.

Los resultados indicaron que el modelo IV-DGS cumplió con los criterios de la PVT, ya que ambos modelos obtuvieron porcentajes de disolución estadísticamente similares; sin embargo, el modelo IV-DGS mostró un comportamiento más cercano al fisiológico al simular de manera más precisa los movimientos peristálticos de la digestión gástrica, lo que refuerza su utilidad como alternativa al aparato 2 USP en futuras pruebas de cinética de disolución. Además, el HPLC MS/MS demostró menor variabilidad y mayor precisión en comparación con el espectrofotómetro UV-Vis, aunque ambos métodos analíticos son válidos para la prueba.

**Palabras clave:** PVT disolución, disolución de fármacos, simulador gástrico, aparato 2 de la USP, métodos analíticos.

## Introducción

Los modelos dinámicos actualmente no están estandarizados para realizar pruebas de disolución como los aparatos de la USP, que emplean la PVT y sus criterios de aceptación para asegurar la correcta ejecución de los procesos de disolución y estudiar la cinética de disolución de los fármacos. Esto resalta la necesidad de validar los modelos dinámicos mediante la PVT, un área aún poco investigada. Este enfoque busca avanzar en el uso de modelos más representativos del tracto gastrointestinal, mejorando la precisión de las pruebas de liberación de fármacos y facilitando la evaluación de la biodisponibilidad en condiciones más cercanas a la fisiología gástrica humana.

El objetivo de este proyecto fue el desarrollo, análisis y comparación de la PVT en el modelo dinámico IV-DGS con respecto a la prueba tradicional del aparato 2 de la USP con el fin de validar la operatividad y uso confiable del modelo dinámico en futuras pruebas de perfiles de disolución de fármacos. Se utilizaron tabletas estandarizadas de prednisona en diferentes volúmenes del medio de disolución. Para determinar el porcentaje de disolución de masa prednisona se utilizaron dos métodos analíticos, HPLC MS/MS y espectrofotometría UV-Vis. De esta forma se buscó establecer la viabilidad del IV-DGS como un complemento o alternativa a los métodos tradicionales para estudiar la disolución de fármacos.

El presente trabajo se desarrolló en cinco capítulos. En el primer capítulo se presentan los antecedentes relativos a la disolución de formas farmacéuticas sólidas, en específico para la PVT, así como la descripción de los modelos *in vitro* utilizados para desarrollar la prueba. En este sentido, se planteó evaluar el desempeño de rendimiento en el simulador IV-DGS.

El segundo capítulo se enfoca en el marco teórico y conceptual del comportamiento de la disolución de fármacos y la PVT. Asimismo, se aborda la descripción y validación de los métodos analíticos utilizados en este trabajo para la cuantificación de la prednisona estándar de referencia. En consecuencia, se detallan los equipos analíticos seleccionados: HPLC MS/MS y espectrofotometría UV-Vis para la medición de las muestras.

En el tercer capítulo se centra en el planteamiento de la problemática, objetivos y los alcances a cumplir. En el cuarto capítulo se detallan las especificaciones de los montajes experimentales de los modelos utilizados y se describen los protocolos experimentales para el desarrollo de la PVT. Así mismo, los parámetros de desempeño y sus respectivos criterios de aceptación para la validación de los métodos analíticos.

En el quinto capítulo se muestran los resultados obtenidos de la calibración mecánica en el aparato 2 de la USP, la validación instrumental de los métodos analíticos por medio de pruebas estadísticas y las pruebas preliminares de disolución. La parte medular del trabajo experimental fue el análisis estadístico comparativo de la PVT entre el modelo estático (aparato 2 USP) y el modelo dinámico (IV-DGS).

Finalmente, se presentan las conclusiones obtenidas del trabajo, así como, los trabajos a futuro con respecto a pruebas de disolución de fármacos para ambos modelos *in vitro*.

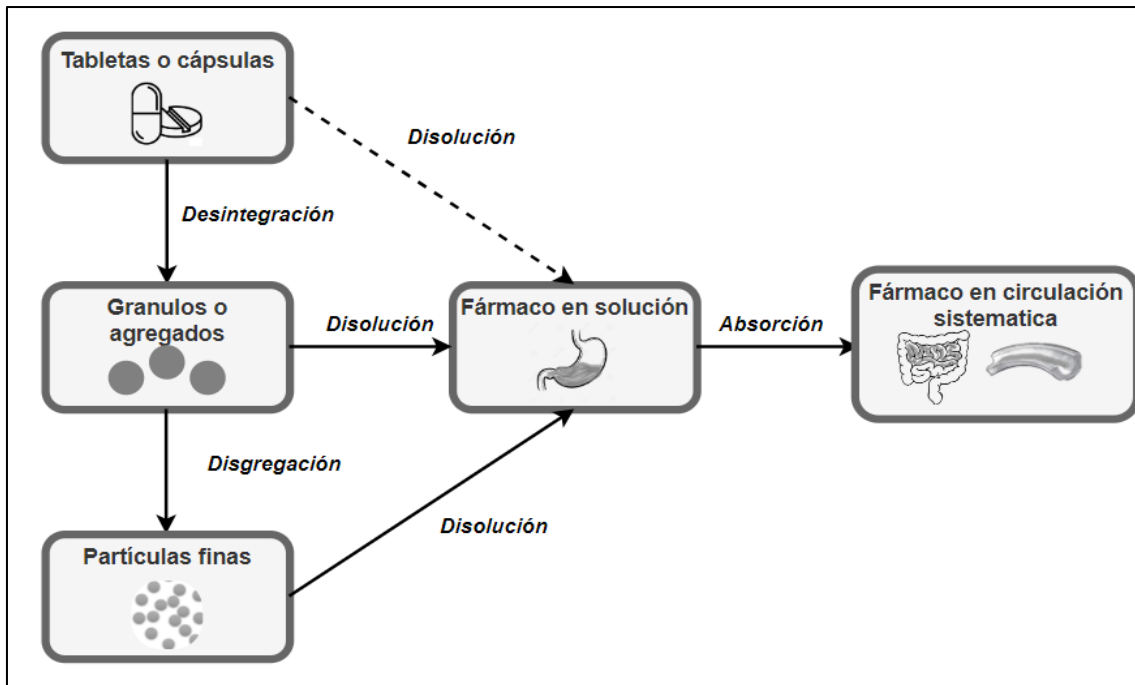
## 1. Antecedentes

### 1.1 Panorama de la disolución de formas farmacéuticas sólidas

La administración por vía oral de formas farmacéuticas sólidas, como tabletas (comprimidos) o cápsulas, constituye una gran fracción de los productos farmacéuticos actuales y ha sido el principal método de administración de medicamentos en humanos durante más de un siglo debido a su seguridad, bajo costo y alto grado de cumplimiento por parte del paciente (Guerra et al, 2012). De acuerdo con Kaur y Mehara (2016), las tabletas que se administran de forma entera, son las más comunes en la industria farmacéutica. Esta forma de administración no requiere conocimientos previos ni insumos especiales, como jeringas, agujas y goteros, lo que la distingue de otras vías de administración de productos farmacéuticos.

La investigación sobre la disolución de fármacos comenzó a desarrollarse hace más de 100 años en el campo de la química y la física. Sin embargo, fue en la década de 1950 cuando creció el interés explícito de los investigadores, quienes se dieron cuenta de la importancia de los procesos de disolución en la disponibilidad fisiológica del fármaco para su uso terapéutico (Dokoumetzidis y Macheras, 2006). Anteriormente, se pensaba que la disponibilidad del ingrediente farmacéutico activo (Active Pharmaceutical Ingredient, API) o sustancia activa se determinaba únicamente por la desintegración de la tableta, ignorando el proceso de disolución. No obstante, antes de que el API pueda ser absorbido, primero se desintegra y después se disuelve en el medio acuoso del tracto digestivo como se muestra en el diagrama esquemático de la Figura 1, (Uddin y Sutradhar, 2011). Es decir, la desintegración indica la rapidez con la que el fármaco se descompone en gránulos y partículas finas sin considerar la dirección de su movimiento, mientras que la disolución refleja la velocidad con la que la sustancia activa se disuelve en una solución gástrica para ser absorbida en el intestino delgado (Kong y Singh, 2008).





**Figura 1. Diagrama esquemático del proceso de desintegración y disolución de un fármaco (Adaptada de Abdou et al., 2003).**

Durante las primeras etapas de la investigación sobre la disolución de fármacos (1950-1960), tras confirmar que la disolución era clave para la biodisponibilidad<sup>1</sup> de los medicamentos, se profundizó en el estudio de los factores que afectan su velocidad de disolución mediante pruebas de disolución (Dokoumetzidis y Macheras, 2006).

En el período de 1960 a 1970, se produjo una proliferación en el diseño de aparatos con diversas condiciones para estudiar las pruebas de disolución, sin embargo, los resultados obtenidos de los perfiles de disolución a menudo no eran comparables entre laboratorios y gradualmente se comprendió que era necesaria una estandarización de los métodos, que permitió la correlación de los datos obtenidos con los diversos aparatos de prueba. En respuesta a esto, la USP estandarizó el primer aparato oficial, conocido como canastilla manufacturada en 1970, junto con las condiciones de operación. Esta estandarización permitió obtener resultados comparables entre laboratorios internacionales que utilizaban el mismo diseño de aparato, incluso si este era manufacturado por diferentes fabricantes (Dressman y Krämer, 2005).

Posteriormente, de acuerdo con Uddin y Sutradhar (2011), en 1978 se introdujo en la industria farmacéutica el segundo aparato de disolución, que adoptó la paleta como elemento de agitación junto con las dos tabletas de calibración química (prednisona y ácido salicílico), años posteriores se observó que este nombre es incorrecto, ya que no corrigen ni

<sup>1</sup> La biodisponibilidad es la velocidad y cantidad en la cual el API de un producto farmacéutico se encuentra disponible (o accesible) en el sitio de acción o en un medio biológico (Palma-Aguirre, 1998).

ajustan ningún parámetro, por lo que actualmente se llaman material estándar de referencia, las cuales garantizan la precisión y repetibilidad de los resultados a nivel mundial. Finalmente, en 1990 se armonizaron los aparatos 3 (cilindro oscilante, de acuerdo con el capítulo general 711 de la USP 2010, actualmente no lo acepta la Farmacopea Japonesa), 4 (celda de flujo continuo), 5 (paleta sobre disco), 6 (cilindro) y 7 (soporte alternativo), con la finalidad de desarrollar pruebas de disolución en diferentes formas farmacéuticas.

Entre los aparatos más comunes para realizar las pruebas de disolución de formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata (Immediate Release, IR) de administración oral, destacan los aparatos 1 (canastilla) y 2 (paleta) de la USP, ampliamente utilizados en la industria farmacéutica (Zaborenko et al., 2019). En cambio, los aparatos del 3 al 7 se utilizan con menos frecuencia, pero son especialmente útiles para productos de liberación prolongada con baja solubilidad, sistemas de administración transdérmica y otras formas de dosificación, como suspensiones, parches liberadores de fármacos, entre los cuales el aparato 4 ha ganado importancia para realizar los estudios de diferentes formas de dosificación (Almukainzi et al., 2014; Uddin y Sutradhar, 2011).

La prueba de disolución es un método basado en compendios oficiales utilizado por diferentes farmacopeas, como la USP, para medir y evaluar en un laboratorio la eficacia con la que un fármaco se libera a partir de su forma de dosificación (sólidas y semisólidas) mediante modelos *in vitro*. Aunque originalmente fue diseñada para cuantificar la liberación de fármacos en tabletas y cápsulas de IR, esta prueba actualmente se utiliza para diversas formas de dosificación, como polvos, tabletas masticables, bucales y sublinguales, cápsulas de gelatina blanda, supositorios, parches transdérmicos y aerosoles (Azarmi et al., 2007; Zaborenko et al., 2019).

Por otro lado, la prueba de disolución es común en el estudio de control de calidad farmacéutico, para asegurar la uniformidad del fármaco entre lotes y detectar posibles desviaciones en la fabricación. También se utiliza en la investigación de desarrollo de nuevos fármacos para estimar la liberación del fármaco y su rendimiento *in vivo* (Azarmi et al., 2007). Además, las pruebas de disolución son cada vez más utilizadas en pautas regulatorias y por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para documentar la biodisponibilidad y bioequivalencia<sup>2</sup> de formas farmacéuticas (Deng et al., 2008).

Finalmente, otra aplicación es el estudio de bioexención, que sirve como alternativa al estudio de bioequivalencia *in vivo* mediante la demostración de equivalencia terapéutica *in vitro* para

---

<sup>2</sup> La bioequivalencia es cuando dos productos farmacéuticos alcanzan la circulación sistémica de modo similar, logrando las mismas concentraciones en el torrente sanguíneo, es decir, que son igualmente biodisponibles y en consecuencia su eficacia y seguridad son las mismas (Huayanay-Falconí, 2012).

un grupo de fármacos que cumplen con los requisitos del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica<sup>3</sup> y obtener una la correlación *in vitro/in vivo*. Esta prueba consiste en el estudio comparativo de los perfiles de disolución *in vitro* entre el producto farmacéutico similar o genérico<sup>4</sup> y el innovador o de patente. En la práctica, la bioexención presenta ventajas sobre los estudios *in vivo*, como menor variabilidad, facilidad de control y mayores probabilidades de detectar diferencias entre dos productos farmacéuticos, si es que existen. Además, es rápida, económica y no involucra humanos en el estudio, lo que elimina la posibilidad de efectos tóxicos en los voluntarios por reacciones adversas a medicamentos (Saavedra et al., 2011).

## 1.2 Estado actual de la prueba de verificación de desempeño (PVT)

Es importante diferenciar la prueba de disolución de cualquier fármaco de dosificación oral, con la PVT, la cual utiliza un material estándar de referencia (Standard Reference, RS). El material RS es una sustancia con alta pureza y se utilizan en pruebas específicas en los laboratorios, como la PVT, otra característica es que no tiene aplicación de uso terapéutico. La prueba de disolución evalúa la liberación de un fármaco en desarrollo o genérico, midiendo el cambio en su concentración a diferentes tiempos, lo que genera un perfil de disolución con un propósito terapéutico. En cambio, la PVT utilizan procedimientos y materiales estandarizados para verificar el rendimiento de los aparatos de disolución 1 y 2 de la USP, que junto con la calibración mecánica de los mismos aparatos aseguran que en los equipos se ejecuten correctamente las pruebas de disolución, garantizando la precisión de los resultados, identificar fuentes de variabilidad e implementar medidas para mitigar dichas variabilidades (Brown et al., 2019). Esta prueba se realiza en un tiempo único, generalmente de 30 minutos, por lo que solamente se obtiene el porcentaje de masa de disolución y el coeficiente de variación del material estándar, utilizando tabletas estandarizadas de prednisona o ácido salicílico, los parámetros evaluados deben encontrarse dentro del intervalo de aceptación indicado en el certificado de cada tableta RS. En el caso de las tabletas de prednisona, actualmente se les denomina estándar de verificación del desempeño de disolución (Dissolution Performance Verification Standard, DPVS).

Desde 1978, la USP estableció utilizar tabletas RS de ácido salicílico y prednisona para los aparatos de disolución 1 y 2, respectivamente. Estas tabletas RS fueron introducidas en colaboración con fabricantes farmacéuticos para abordar problemas de variabilidad en los resultados de disolución, especialmente entre laboratorios internacionales. El uso de tabletas RS es fundamental para el éxito de la PVT, ya que contienen criterios de aceptación basados

---

<sup>3</sup> Esta clasificación se aborda en el subtema 2.3.1.1

<sup>4</sup> Es aquel fármaco disponible en el mercado que no es producido por el laboratorio innovador que desarrolló el principio activo, es decir, el laboratorio que lo generó por primera vez y lo patentó. Sin embargo, se espera que tenga el mismo efecto terapéutico que el fármaco original. (Aranda & Rosasco, 2019).

en estudios colaborativos internacionales que reflejan la variabilidad inherente observada en pruebas realizadas en diferentes laboratorios a nivel mundial (Uddin y Sutradhar, 2011).

Según Brown et al. (2019), mencionan que, si bien la PVT juega un papel crucial en la identificación y mitigación de las fuentes de variabilidad en los resultados de disolución, son las tabletas RS las que permiten que los laboratorios independientes comparen sus resultados con los obtenidos en estudios colaborativos de la USP. Esto ayuda a garantizar que las pruebas de disolución se realicen bajo condiciones controladas y comparables a nivel mundial, reduciendo las diferencias entre laboratorios y mejorando la reproducibilidad de los resultados.

### 1.3 Modelos *in vitro* para el estudio de disolución

Actualmente, existen diferentes modelos que estudian la prueba de disolución de fármacos, los cuales buscan explicar lo que ocurre con un fármaco dentro del organismo después de ser ingerido. Dentro de estos modelos, encontramos los términos "*in vivo*" e "*in vitro*", ambos derivados del latín. El primero, "*in vivo*", significa "dentro de lo vivo", lo que indica que el proceso tiene lugar dentro de un organismo biológico (humano o animal). Por lo general, los estudios *in vivo* son invasivos, costosos y requieren de mucho tiempo y de personal capacitado para trabajar con seres vivos. En sí se utilizan para estudiar la biodisponibilidad y bioaccesibilidad<sup>5</sup> del fármaco (Kong y Singh, 2008).

Por otro lado, el término "*in vitro*" significa "dentro del vidrio" y se refiere a la realización de un experimento en un entorno controlado fuera del organismo, es decir, en un laboratorio. Los modelos *in vitro* reducen costos, son reproducibles y permiten emular fielmente los procesos fisiológicos (Guerra et al., 2012). Estos estudios no requieren aprobación de un comité de ética como lo implica la experimentación en humanos o animales (Kong y Singh, 2008).

En los últimos años, los modelos gastrointestinales *in vitro* han adquirido gran relevancia en la industria farmacéutica, así como en los sectores de alimentos y salud. En farmacología, se utilizan para estudiar el destino de los fármacos administrados por vía oral a lo largo del tracto digestivo, permitiendo desarrollar y caracterizar productos farmacéuticos y realizar pruebas de disolución con fines de control de calidad (Shah et al., 2001). Regularmente, los ensayos de digestión *in vitro* reproducen las fases oral, gástrica e intestinal, y en menor medida, la fermentación bacteriana. Sin embargo, si el fármaco es líquido, se omite la fase oral, como señala Lucas-Gonzalez-González (2016). Estos modelos se diferencian principalmente en el número y tipo de fases incluidas, en la composición de los fluidos simulados (como enzimas y soluciones salinas), así como en los esfuerzos mecánicos, las presiones, los movimientos peristálticos simulados, los flujos gástricos y el vaciado, procesos que ocurren durante la

---

<sup>5</sup> En el subtema 2.3 se aborda este término.

digestión humana (Hur et al., 2011). Estos modelos se caracterizan por ser flexibles, precisos y reproducibles (Guerra et al., 2012).

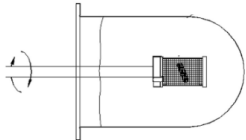
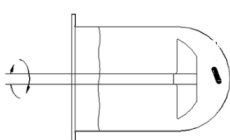
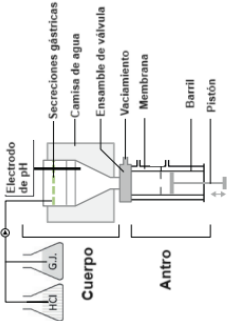
Los modelos *in vitro* se pueden clasificar en modelos estáticos y modelos dinámicos (Kong y Singh, 2008). Los modelos estáticos tienen un número limitado de parámetros simulados y están diseñados para una aplicación específica, como la prueba de desintegración y disolución. Sin embargo, para emular los complejos procesos físicos y químicos que ocurren en el tracto digestivo, es crucial exponer el fármaco a cada etapa de la digestión con tiempos de tránsito, cambios de pH<sup>6</sup> y condiciones enzimáticas realistas. En consecuencia, se han desarrollado modelos dinámicos monocompartimentales, bicompartimentales y multicompartimentales (Guerra et al., 2012). Como lo son: el modelo gástrico dinámico (Dynamic gastric model, DGM), el simulador gástrico humano (Human gastric simulator, HGS), el simulador gástrico distal *In Vitro* (IV-DGS) y el Modelo Gastrointestinal TNO (TIM-1).

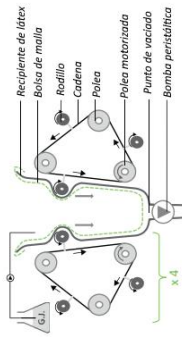
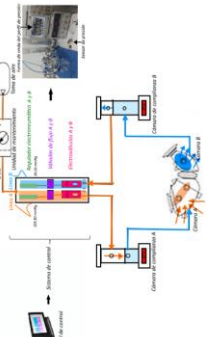
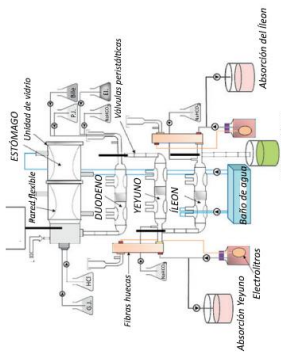
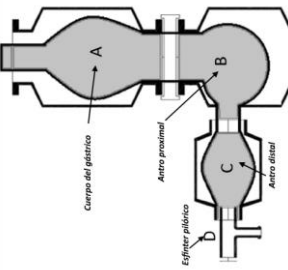
En la Tabla 1, se presenta una evolución de los modelos *in vitro* y a su vez una comparación entre modelos, esquemas, características generales y su respectiva clasificación.

---

<sup>6</sup> Potencial de hidrógeno.

**Tabla 1. Modelos dinámicos in vitro (Adaptado de Guerra et al., 2012).**

Modelo gástrico in vitro	Representación esquemática	Forma anatómica y órgano simulado	Mecanismo de mezclado	Parámetros fisiológicos emulados				
				Movimientos peristálticos	Vaciamiento	pH	Temperatura	Secreciones
<b>Monocompartimental estático</b>								
Aparato 1 USP (USA, Pernarowski et al., 1970)		No, estómago	Elemento de agitación con velocidad constante de 50 a 100 rpm (eje con canasta)	No aplica	No aplica	1.2-6.8	37 °C	Es fija (tampones a diferentes pH, fluido gástrico simulado o fluido intestinal simulado)
Aparato 2 USP (USA, Levy & Hayes, 1978)		No, estómago	Elemento de agitación con velocidad constante de 50 a 100 rpm (eje con paleta)	No aplica	No aplica	1.2-6.8	37 °C	Es fija (utiliza tampones a diferentes pH, fluido gástrico simulado o fluido intestinal simulado)
<b>Monocompartimental dinámico</b>								
DGM (Reino Unido, Wickham & Faulks, 2008)		No, estómago	Cilindro y pistón dentro de una camisa de agua	No aplica	Si aplica	1.2-6.8	37 °C	Variable (tampones a diferentes pH, fluido gástrico simulado)

<p>HGS (USA, Kong &amp; Singh, 2010)</p>  <p>Reservorio de látex Bolsa de malla Rodillo Cadena Polea Polea motorizada Punto de vaciado Bomba peristáltica</p>	<p>No, estómago</p> <p>Cámara látex y un conjunto de rodillos y correas controlado por un motor y poleas</p> <p>Si aplica</p> <p>Si aplica</p> <p>1.2-6.8</p> <p>37 °C</p> <p>Variable (tampones a diferentes pH, fluido gástrico simulado)</p>
<p>IV- DGS (México, Donis et al., 2022)</p>  <p>Sensores de presión Sensores de temperatura Controlador de temperatura Controlador de presión Controlador de flujo Controlador de pH Controlador de conductividad Controlador de oxígeno Controlador de nitrógeno Controlador de dióxido de carbono Controlador de hidrógeno Controlador de metano Controlador de amoníaco Controlador de ácido sulfhídrico Controlador de ácido fólico Controlador de vitamina B12 Controlador de vitamina C Controlador de vitamina E Controlador de vitamina K Controlador de vitamina A Controlador de vitamina D Controlador de vitamina B6 Controlador de vitamina B9 Controlador de vitamina B1 Controlador de vitamina B2 Controlador de vitamina B3 Controlador de vitamina B5 Controlador de vitamina B7 Controlador de vitamina B8 Controlador de vitamina B10 Controlador de vitamina B11 Controlador de vitamina B12</p>	<p>Sí, estómago</p> <p>Capacidad para generar movimientos peristálticos y presiones internas de 15 a 30 mmHg mediante cámaras hidroneumáticas</p> <p>Si aplica</p> <p>Si aplica</p> <p>1.2-6.8</p> <p>37 °C</p> <p>Es fija (tampones a diferentes pH, fluido gástrico simulado)</p>
<p><b>Multicompartimental dinámico</b></p>	
<p>TIM-1 (Países Bajos, Minekus et al., 1995)</p>  <p>ESTÓMAGO Intest. fijable / Unidad de vidrio DUODENO YERBUJO ILEON Filtro huecos Absorción de agua Electrolitos Absorción de yema Balcón de agua Absorción del ileon Entrada del ileon</p>	<p>No, estómago e intestino delgado</p> <p>Por medio de un mecanismo tubular y bombas peristálticas.</p> <p>Si aplica</p> <p>Si aplica</p> <p>1.2-6.8</p> <p>37 °C</p> <p>Variable (tampones a diferentes pH, fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado)</p>
<p>TIM-agc (Países Bajos, Bellman et al., 2016)</p>  <p>Corpo del gástrico Antro proximal Esfínter pilórico Antro distal</p>	<p>No, estómago</p> <p>Por medio de un mecanismo tubular y bombas peristálticas.</p> <p>Si aplica</p> <p>Si aplica</p> <p>1.2-6.8</p> <p>37 °C</p> <p>Variable (tampones a diferentes pH, fluido gástrico simulado)</p>

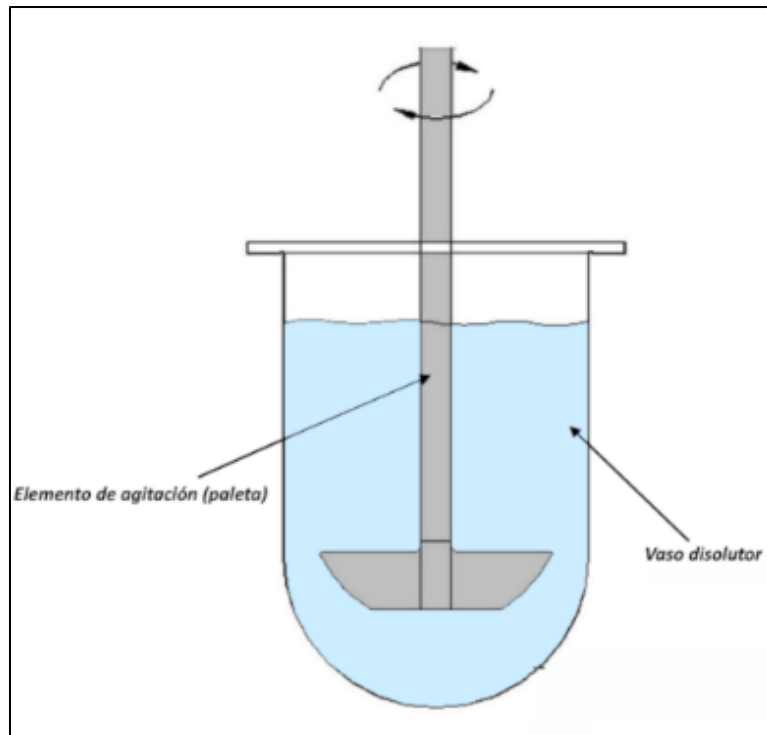
### 1.3.1 Modelos *in vitro* estáticos

Los modelos estáticos suelen ser los más comunes y tradicionales para pruebas de disolución por las farmacopeas, ya que son menos complejos que los modelos dinámicos. Esto se debe a que solo simulan un número limitado de parámetros fisiológicos, además, por su configuración son incapaces de reproducir los movimientos peristálticos gastrointestinales (Lucas-González, 2016; Kong y Singh, 2008).

Estos modelos pueden contar con múltiples compartimientos al que se añaden soluciones simuladas de cada fase de la digestión (Lucas-González, 2016). Este proceso puede generar errores en la fase ensayada si no se dosifican correctamente. Sin embargo, han sido estandarizados por diferentes farmacopeas internacionales para estudiar y evaluar la liberación cuantitativa de fármacos en un solo medio de disolución que reproduce las condiciones digestivas tanto gástricas (fluido gástrico simulado) como intestinales (fluido intestinal simulado). No obstante, en este enfoque, a menudo se utilizan grandes volúmenes de medio de disolución (500 mL y 900 mL) y agitación continua para realizar el mezclado, lo cual no representa la naturaleza de los movimientos peristálticos (Guerra et al., 2012) y el volumen del contenido gástrico *in vivo*.

Uno de los modelos *in vitro* estáticos más utilizados en la industria farmacológica es el segundo aparato de disolución de la USP, también denominado aparato de paleta desarrollado por Levy y Hayes en 1978 (Uddin y Sutradhar, 2011). Este dispositivo está conformado por un vaso y un elemento de agitación (ver Figura 2). Se considera un método estandarizado y simple de compartimiento cerrado, ya que utiliza un volumen fijo de medio de disolución contenido en un vaso cilíndrico de vidrio u otro material inerte y transparente con fondo semiesférico, lo que permite visualizar el proceso de disolución, y está embebido en una camisa de agua con una temperatura controlada ( $37 \pm 0.4$  °C). Además, cuenta con una tapa en la parte superior para minimizar la evaporación. Las dimensiones y capacidades del vaso se detallan en la Tabla 2 (Capítulo 711 USP, 2010). El aparato dispone de un mecanismo de mezcla por convección forzada, utilizando un elemento de agitación a una velocidad de rotación específica y constante (Uddin y Sutradhar, 2011).





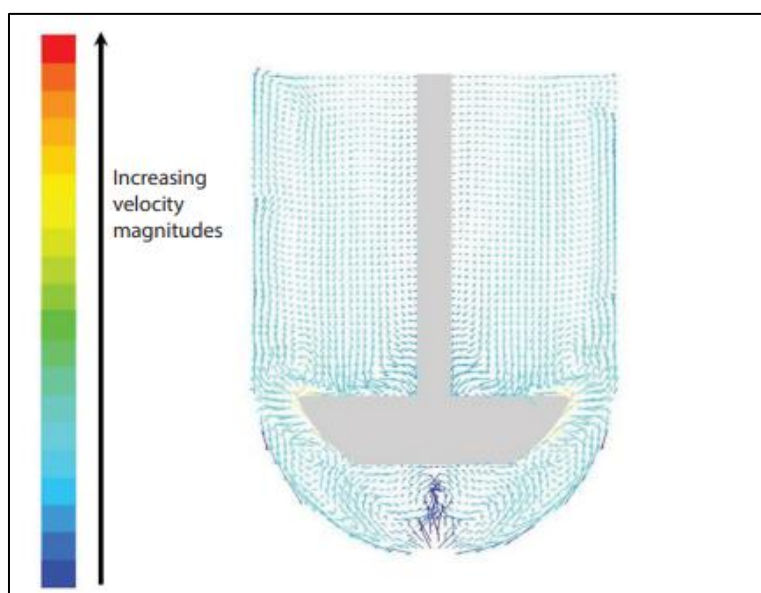
**Figura 2. Esquema del aparato 2 USP (Gray y Rosanske, 2014).**

**Tabla 2. Dimensiones y capacidades del vaso de vidrio de la USP (711 USP, 2010).**

Capacidad nominal (L)	Altura (mm)	Diámetro interno (mm)
1	160-210	98-106
2	280-300	98-106
4	280-300	145-155

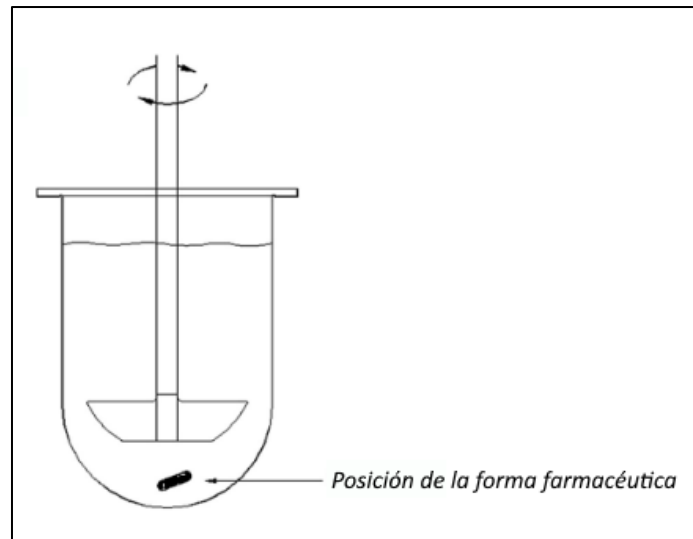
Para el mecanismo de agitación se utiliza un motor acoplado a un eje propulsor metálico y un elemento de agitación de material de acero inoxidable tipo 316 L, que está compuesta por una paleta plana y un eje de pieza única. Esta paleta presenta una alineación precisa entre su eje longitudinal central, la paleta y el eje propulsor, de modo que el punto inferior de la paleta está ubicado exactamente sobre el punto inferior del eje propulsor (USP 711, 2010). Es crucial que ninguna parte del equipo, ni el entorno en el que está colocado, aumente significativamente el movimiento de agitación. Por lo tanto, se deben evitar las vibraciones internas y externas para garantizar que el elemento de agitación gire con suavidad y no se comprometa la prueba de disolución. Por esta razón, es necesario calibrar mecánicamente el aparato de disolución antes de realizar las pruebas (Gray y Rosanske, 2014).

La forma farmacéutica se dosifica de manera estandarizada directamente en el recipiente que contiene el medio de disolución, llegando al fondo del vaso. Posteriormente, la paleta gira a una velocidad específica. El elemento de agitación se puede sumergir en el vaso antes de dejar caer la forma de dosificación, pero la rotación de la paleta no debe comenzar hasta que la dosis alcance el fondo del vaso (Gray y Rosanske, 2014). Los aparatos de disolución ofrecen ventajas como un alto grado de estandarización y facilidad de uso. Sin embargo, la forma farmacéutica puede verse afectada por interacciones durante los procesos de disolución, incluyendo la presencia de una "zona muerta" hidrodinámica bajo la paleta, es decir, se forma una sedimentación del fármaco en forma cónica que puede no garantizar un sumidero perfecto, especialmente para fármacos poco solubles. De acuerdo con Brown et al. (2019), la hidrodinámica en el aparato 2 se muestra en la Figura 3, que se caracteriza por dos bucles de recirculación a cada lado del eje vertical del impulsor, uno por encima y otro por debajo de la paleta y por una "zona muerta" de baja velocidad ubicada alrededor de la ubicación de la forma de dosificación, directamente debajo del centro de la paleta, lo que puede influir en la disolución del fármaco.



**Figura 3. Hidrodinámica del aparato 2 de la USP, con 900 mL de medio de disolución a 50 rpm. Los vectores de magnitud de velocidad están codificados por colores en orden de magnitud de velocidad creciente. Los vectores con velocidades más bajas se trazan en azul oscuro hasta llegar al color rojo que corresponde a los vectores con las velocidades más altas (Brown et al., 2019).**

La reproducibilidad de las pruebas en diferentes laboratorios no siempre está asegurada, ya que la hidrodinámica se ve influenciada por las características operativas de los recipientes de disolución, como su forma, contorno, patrón de dispersión del fármaco, lugar de sedimentación y la posición de la tableta en la parte inferior del vaso al caer (Cascone et al., 2016). Por lo tanto, la tableta debe estar centrada (ver Figura 4) antes de iniciar la prueba.



**Figura 4. Esquema de la posición correcta de la forma farmacéutica en el aparato 2 USP, antes de iniciar la prueba. Adaptado de (Gray y Rosanske., 2014).**

El aparato tiende a ser extremadamente sensible a los factores ambientales, por ejemplo: vibraciones externas, así como a factores internos: como variaciones en la velocidad de rotación de la paleta, las vibraciones del propio aparato, la deaireación<sup>7</sup> del medio de disolución y la inserción de la cánula en la toma de muestreo. Estos factores pueden generar diferentes perfiles de disolución de un mismo fármaco (Cascone et al., 2016).

### 1.3.2 Modelos *in vitro* dinámicos

Debido a las limitaciones de los modelos estáticos mencionadas anteriormente, se han desarrollado diversos modelos dinámicos *in vitro* para emular el proceso gastrointestinal. Estos modelos han demostrado ser útiles en la industria farmacéutica para comprender la digestión de alimentos y la disolución de fármacos IR. Estos modelos permiten, estudiar la interacción entre medicamentos y nutrientes tanto en condiciones de ayuno como de alimentación, e incluso se ha investigado la interacción de los fármacos con drogas como el alcohol (Cascone et al., 2016).

Dentro de los modelos monocompartimentales, destacan el modelo gástrico dinámico, DGM, el simulador gástrico distal *In Vitro* (IV-DGS) y el simulador gástrico humano, HGS. El DGM consta de dos compartimentos sucesivos diseñados para emular el cuerpo y el antro del estómago. Simula el vaciado gástrico mediante una válvula que permite que las partículas más pequeñas salgan del estómago, mientras que las más grandes regresan a la cámara superior para ser digeridas aún más, aunque carece de la capacidad para reproducir las contracciones peristálticas gástricas (Guerra et al., 2007; Vardakou et al., 2011; Wickham y Mandalari, 2012). Por otro lado, el HGS, compuesto por una cámara de látex rodeada por un sistema de conducción mecánica (Guerra et al., 2007; Kong y Singh, 2010) y el IV-DGS pueden

<sup>7</sup> Este término se entiende como el proceso de eliminar gases disueltos como el oxígeno disuelto en un líquido; en la literatura, se puede encontrar bajo los términos "desaireación" o "desgasificación".

emular los movimientos peristálticos de manera muy similar al estómago en términos de amplitud, intensidad y frecuencia (Donis et al., 2022).

El IV-DGS, en comparación con los modelos DGM y HGS, destaca por su forma anatómica en "J", que replica con precisión la curva característica del estómago humano. Esta forma no solo es representada en su estructura externa, compuesta de resina, sino también en su interior, con membranas blandas de silicona diseñadas para emular la fisiología y anatomía. El IV-DGS puede reproducir las presiones y movimientos peristálticos similares a los *in vivo*, facilitando una simulación más realista del vaciamiento gástrico y de la digestión en condiciones *in vitro* (Donis et al., 2022).

Por otro lado, el modelo multicompartimental más conocido el Modelo Gastrointestinal TNO (TIM-1) que ofrece una opción integral para replicar diversos procesos digestivos continuos, aunque presentan limitaciones en cuanto a mecanismos de retroalimentación, no emulan la microbiota, ni el sistema inmunológico y tampoco vías hormonales (Guerra et al., 2012). El TIM-1, combina la multicompartimentalización y dinamismo (Minekus et al., 1995). Este modelo, se controla por computadora, reproduce de manera fisiológica las funciones digestivas principales del estómago y del intestino delgado, según lo indicado por Lucas-Gonzalez (2016). Posteriormente, Bellman et al. (2016) desarrollaron una variante del TIM-1, llamado TIM-agc, tiene una configuración en forma de L con tres cámaras que emulan la motilidad y estructura del estómago: el cuerpo, antro proximal y distal. Aunque estos sistemas han sido en su mayoría estandarizados y validados para aplicaciones específicas, como el estudio de la actividad antiácida o la supervivencia de probióticos (Guerra et al., 2012), carecen de la forma anatómica del estómago e intestino delgado.

#### **1.4 Antecedentes del modelo IV-DGS en el MADiT del ICAT**

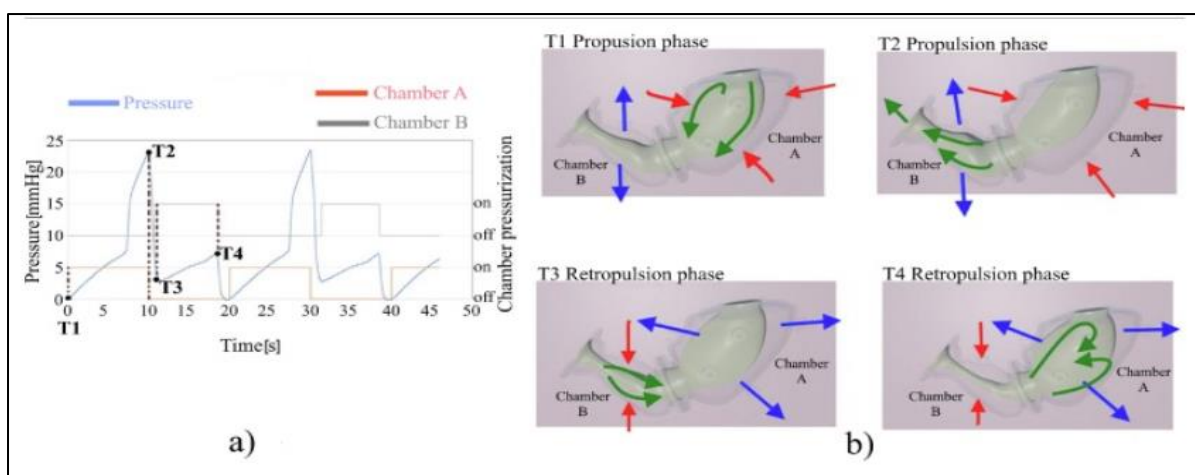
El modelo IV-DGS es fundamental en este trabajo, ya que fue el modelo dinámico utilizado para desarrollar la PVT. Cabe destacar que el simulador gástrico ha tenido evoluciones en su desarrollo experimental a través de los siguientes proyectos desarrollados en el Laboratorio Nacional de Manufactura Aditiva y Digital (MADiT) del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) de la UNAM, los cuales se detallan a continuación:

El primer diseño anatómico e instrumentación del IV-DGS fue desarrollado en el 2018, en los trabajos de tesis "Estudio hidrodinámico *in vitro* del flujo gástrico" del M.I. Rabanales Donis Luis Fernando y "Automatización e instrumentación de un simulador gástrico" de la Ing. Escalona Ortiz Monserrat, donde se realizaron los primeros estudios de desintegración de alimentos bajo condiciones fisiológicas reales. Estos trabajos incluyeron la generación de ondas peristálticas dentro del modelo y la medición de variables de interés, como la presión, el pH y la temperatura, permitiendo obtener perfiles de presiones gástricas y pH. Posteriormente, en el 2021, en la tesis "Instrumentación y protocolos de digestibilidad para modelos gástricos *in vitro*" de la M.I. Montalvo González Jackeline implementó protocolos de

digestibilidad, tomando en cuenta los fluidos gástricos simulados en cada fase de la digestión, para validar la capacidad mecánica y química del simulador en el estudio de alimentos, y en el 2023, en la tesis "Diseño de modelos dinámicos *in vitro* del sistema gastrointestinal" del Dr. Donis Rabanales Luis Fernando desarrollo nuevas mejoras en el simulador, como la implementación del vaciamiento gástrico y la creación de un modelo translúcido que permite la visualización de la mezcla, así como estudios de mezcla homogénea en el simulador, lo que ayuda a validar la dispersión uniforme de las partículas. Actualmente, se ha desarrollado una interfaz de usuario para controlar los parámetros mecánicos y químicos, como el flujo de aire, la presión, el pH, la temperatura y el vaciamiento gástrico, desde un panel de control implementado por el Ing. Tonatiuh López Ruíz.

Los trabajos mencionados anteriormente permitieron comprender tanto el funcionamiento del equipo IV-DGS como establecer las perspectivas de las pruebas que se pueden desarrollar en el equipo. Así, se estableció las condiciones de operación, protocolos y pruebas para desarrollar la PVT en este simulador. Por lo tanto, en este trabajo, se propuso una aplicación del simulador con un enfoque farmacológico.

Se asumió que la viabilidad de la aplicación de la PVT en el modelo IV-DGS fue que presenta características relevantes para el desarrollo de la PVT, tales como la representación anatómica de la sección distal del estómago en forma de "J", la capacidad de reproducir perfiles de presión entre 15 y 30 mmHg, que son similares a los registrados *in vivo* y la emulación del movimiento peristáltico de la zona antral del estómago humano. Estas características permiten generar flujos de propulsión y retropulsión mostrado en la Figura 5, que favorecen la desintegración física y química de los alimentos (Donis et al., 2022). En esta aplicación, no es necesario la desintegración de un alimento, pero si permite visualizar la disolución de un fármaco.

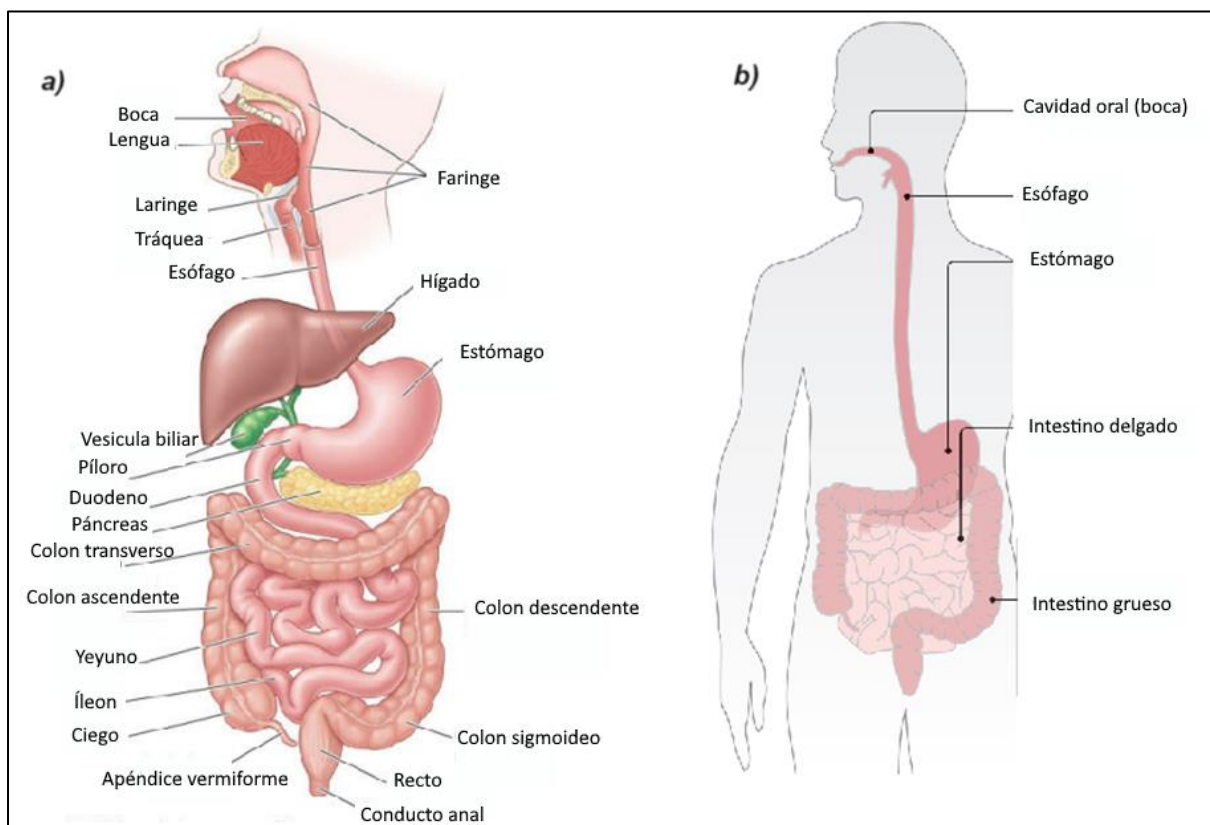


**Figura 5. Gráfica de las contracciones peristálticas ejercidas por el IV-DGS. a) Perfil de presión en la cámara B y secuencia de presurización de las cámaras; b) Esquemas de flujos a través del modelo (Donis et al., 2022).**

## 2. Marco teórico

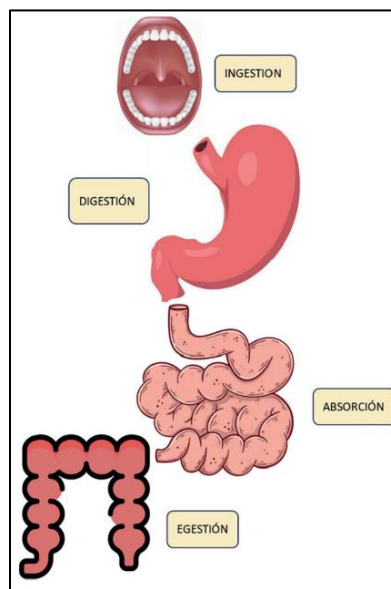
### 2.1 Administración de fármacos por vía oral: su paso por el sistema digestivo

La administración de fármacos por vía oral de formas farmacéuticas sólidas, como tabletas al ser ingeridas pasa a través del tracto digestivo para ser liberadas y absorbidas las sustancias activas, en su paso por el sistema digestivo es muy similar al proceso de digestión de los alimentos, por lo que se puede explicar similarmente. La Figura 6a, ilustra el sistema digestivo, que contiene el tracto digestivo: cavidad oral, el esófago, el estómago y los intestinos (ver Figura 6b), así como sus glándulas y órganos accesorios (Moore et al., 2013). En conjunto, estos elementos tienen la función principal de transformar y absorber los nutrientes presentes en los alimentos, mientras que, en el caso de los fármacos, su función es la desintegración, disolución y absorción. A pesar de la complejidad de su funcionamiento, destacan dos procesos principales que ocurren de manera simultánea: (1) la reducción del tamaño de los alimentos, junto con la desintegración y disolución de las tabletas, por medio de la actividad muscular del sistema, (2) las transformaciones químicas catalizadas por enzimas, que permiten la conversión final de los alimentos en moléculas asimilables y la liberación de los fármacos para su absorción en el torrente sanguíneo con fines terapéuticos (Guerra et al., 2012; Martín y Rico, 2023).



**Figura 6. Esquema del a) sistema digestivo formado por el b) tracto digestivo (Moore et al., 2013; Guerra et al., 2012).**

La digestión se lleva a cabo en cuatro fases, como se muestra en la Figura 7. La primera ocurre con la ingesta del fármaco o alimento en la cavidad oral. La segunda se desarrolla en el estómago, donde se produce la disolución del fármaco o la mezcla y digestión del alimento. La tercera tiene lugar en el intestino delgado, donde se absorben la sustancia activa y los nutrientes. Finalmente, la cuarta fase consiste en la egestión de lo que no se asimiló en el intestino delgado (Martín y Rico, 2023). El tiempo total de tránsito de los fármacos en el tubo digestivo varía de 0.4 a 5 días. Al igual que los alimentos, el sitio más importante para la absorción de fármacos es el intestino delgado específicamente en el duodeno, puede existir absorción en el colón o incluso en el estómago, pero en menor medida (Talevi y Ruíz, 2016).



**Figura 7. Fases del proceso de digestión (Martín y Rico, 2023).**

### 2.1.1 Estómago

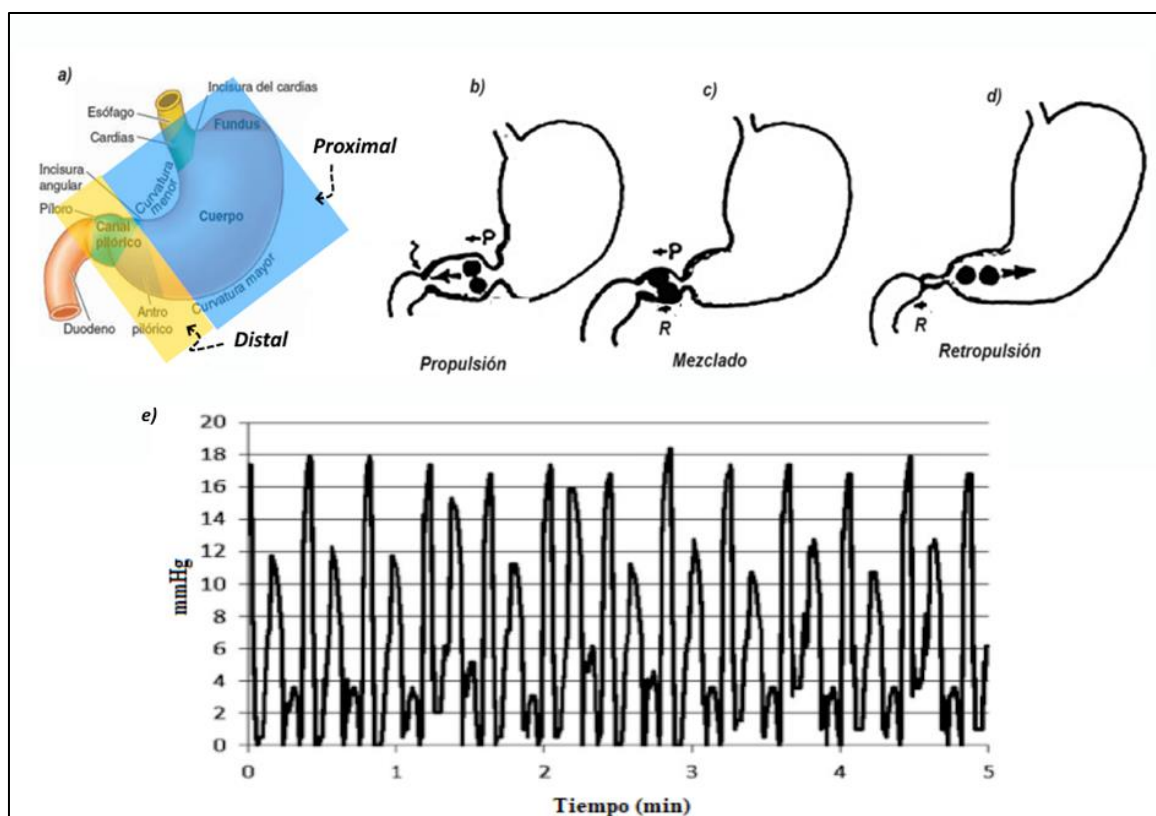
La digestión y disolución de fármacos ocurre principalmente en el estómago, que es la porción expandida del tracto digestivo, ubicada entre el esófago y el intestino delgado. Tiene forma anatómica en "J" y se divide en cuatro regiones: el cardias, el *fundus* gástrico, el cuerpo y la porción pilórica (Figura 8a). El cardias rodea la abertura superior del estómago, mientras que el *fundus* es la parte superior dilatada que puede contener gas, líquido gástrico o alimentos. El cuerpo del estómago, junto con el cardias y el *fundus*, constituye la parte proximal del estómago y actúa como un depósito temporal de alimentos y fármacos (Moore et al., 2013; Kong y Singh, 2008).

Mientras que la porción pilórica es la parte distal del estómago, con forma de embudo, e incluye el antro pilórico y el píloro, un esfínter que controla la evacuación del contenido gástrico hacia el intestino delgado. Este vaciado se produce de manera intermitente, cuando la presión intragástrica supera la resistencia del píloro, que normalmente está en contracción tónica. La peristalsis, una serie de ondas de contracción anulares y movimientos involuntarios, inicia alrededor de la porción media del estómago y avanza lentamente hacia el píloro,



mezclando con mayor fuerza y reduciendo el tamaño de los alimentos masticados y de los fármacos (Moore et al., 2013; Kong y Singh, 2008).

A intervalos regulares, el movimiento peristáltico empuja el quimo<sup>8</sup> y los fármacos hacia el intestino delgado en un proceso llamado propulsión (Figura 8b), mientras que el flujo de retroimpulsión (Figura 8d) permite que parte del quimo regrese al cuerpo del estómago, estimulando la desintegración de partículas grandes y disolución de fármacos mediante el proceso de mezclado (Figura 8c). La frecuencia de contracción durante la ingestión es de aproximadamente tres ciclos por minuto, con una amplitud máxima de 25 mmHg en la fase de propulsión y de 14 mmHg en la fase de retroimpulsión como se muestra en la Figura 8e (Bellmann et al., 2016; Kong y Singh, 2008; Kelly et al., 1980; Maqbool et al., 2009; Urbain et al., 1990).



**Figura 8.** a) Regiones del estómago y movimiento peristáltico b) propulsión, c) proceso de mezcla, y d) retroimpulsión; e) perfil de presión en el modelo TIM-agc (Bellman et al., 2016; Moore et al., 2013; Kelly, 1980).

### 2.1.2 Intestino delgado

El intestino delgado se divide en tres zonas anatómicas y continuas: duodeno, yeyuno e íleon. En el duodeno, el quimo entra en contacto con las secreciones pancreáticas y biliares, que se encarga de emulsionar las grasas. El pH en esta región es de aproximadamente 6 a 6.5 debido a la presencia de bicarbonato, que neutraliza el quimo ácido procedente del estómago. El

<sup>8</sup> El quimo se entiende como la mezcla de alimentos con jugos gástricos (Moore et al., 2013).



duodeno y el yeyuno son responsables de la absorción de la mayor parte de los compuestos liberados de los alimentos y los fármacos. El quimo avanza a lo largo del intestino delgado mediante movimientos peristálticos, rodeado de mucosidad intestinal que protege las microvellosidades encargadas de maximizar la superficie de absorción. La porción restante, el íleon, presenta un pH creciente, alrededor de 8 en la zona más distal, donde absorbe sales biliares y la vitamina B12 (Talevi y Ruíz, 2016).

## **2.2 Proceso LADME en los fármacos de administración vía oral**

Un fármaco administrado por vía oral debe atravesar varios procesos para ejercer su potencial terapéutico (Cascone et al., 2016). La farmacocinética estudia el tránsito de los fármacos a través del organismo en función del tiempo y la dosis, es decir, qué le hace el organismo al fármaco desde su administración hasta su eliminación. El fármaco debe disolverse y liberar la sustancia activa en el lugar deseado a lo largo del tubo digestivo, atravesar la pared intestinal, superar el metabolismo hepático y finalmente llegar al plasma, donde debe permanecer estable durante su viaje hacia el órgano o tejido diana. Este proceso incluye las etapas: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción. Ocasionalmente, los dos últimos se agrupan bajo el término general de eliminación, conocidas en conjunto como la ruta LADME (Juárez et al., 2019; Cascone et al., 2016). Estos fenómenos determinan la evolución de la concentración del fármaco en el organismo.

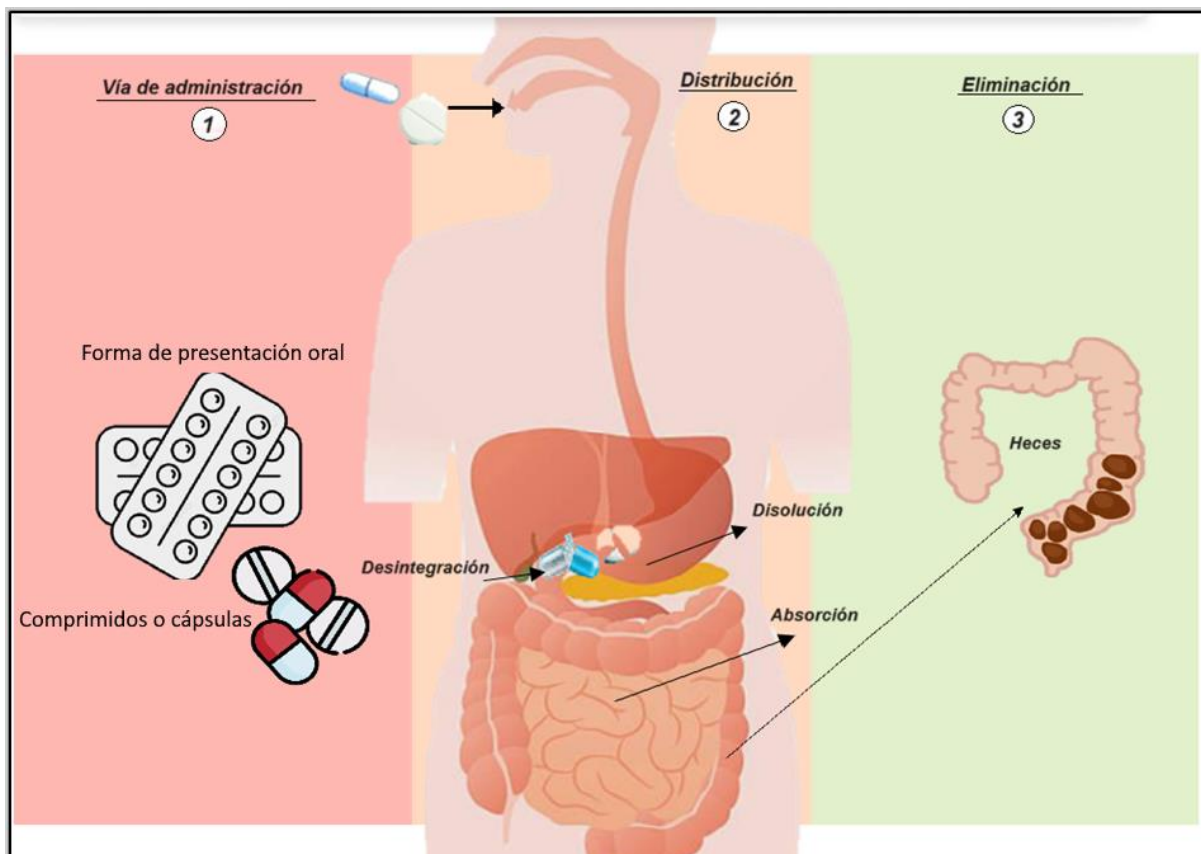
Tras la administración de un fármaco, su acción puede dividirse en tres fases: la fase farmacéutica, durante la cual el fármaco se libera de la forma farmacéutica y se disuelve en el medio biológico, abarcando todos los procesos físicos y químicos que determinan la fracción de la dosis disponible para su absorción, la fase farmacocinética, que comprende los procesos que determinan la fracción de dosis disponible para ejercer su acción terapéutica y la fase farmacodinámica, que incluye todos los procesos biológicos involucrados en los efectos del fármaco (Cascone et al., 2016).

La absorción implica el acceso de la sustancia activa inalterada a la circulación sistémica. Una vez en el torrente sanguíneo, el fármaco se distribuye a distintos lugares del organismo. Posteriormente, ocurre el metabolismo, que es la biotransformación de la molécula original en uno o varios metabolitos, los cuales suelen ser menos tóxicos y eficaces que la forma inalterada. Finalmente, la eliminación se refiere a la excreción del fármaco o de sus metabolitos del organismo por vía fecal (Juárez et al., 2019).

Pocos investigadores consideran la liberación como parte del proceso LADME que siguen los fármacos, ya que este proceso involucra conocimientos técnicos y de ingeniería relacionados con la elaboración y estabilidad de las formas farmacéuticas (Juárez et al., 2019). Sin embargo, este proceso es crucial para liberar la sustancia activa de sus excipientes, lo que puede influir significativamente en la absorción.

### 2.3 Disolución de fármacos

La disolución es el estado de transformación de un sólido en solución (Almukainzi et al., 2014). En farmacología es el proceso mediante el cual se libera el API, es decir, cuando se forma una solución en los jugos gastrointestinales. Por ejemplo: cuando una tableta o cápsula, se introduce en un recipiente con un medio acuoso o llega al estómago, el API del medicamento se libera y forma una solución con el disolvente. Durante este proceso, se llevan a cabo diversos fenómenos fisicoquímicos, como la humidificación de la superficie de la forma farmacéutica, lo que regula el acceso del disolvente. Posteriormente, en el estómago la cápsula debe abrirse o la tableta fragmentarse en partículas finas (desintegración), que se dispersan en el medio y al disolverse, son absorbidas a través de la mucosa del intestino delgado para ingresar al torrente sanguíneo y ser eliminadas del sistema biológico (Figura 9) (DiPiro, 2003; Lullmann et al., 2010).



**Figura 9. 1) Administración oral; 2) Liberación de la sustancia activa (desintegración y disolución) y absorción; 3) Eliminación del fármaco (Elaboración propia).**

Es importante destacar dos términos que se muestran en la Figura 10, bioaccesibilidad y biodisponibilidad de un fármaco. La bioaccesibilidad es la fracción del fármaco ingerido que se libera y está disponible para la absorción intestinal, evaluada normalmente a través de procedimientos *in vitro*. Mientras que la biodisponibilidad se refiere a la fracción que está disponible para ser utilizada en la circulación sistémica a una velocidad y cantidad deseada

para lograr su efecto terapéutico, lo cual se determina mediante ensayos *in vivo* (Guerra et al., 2012).

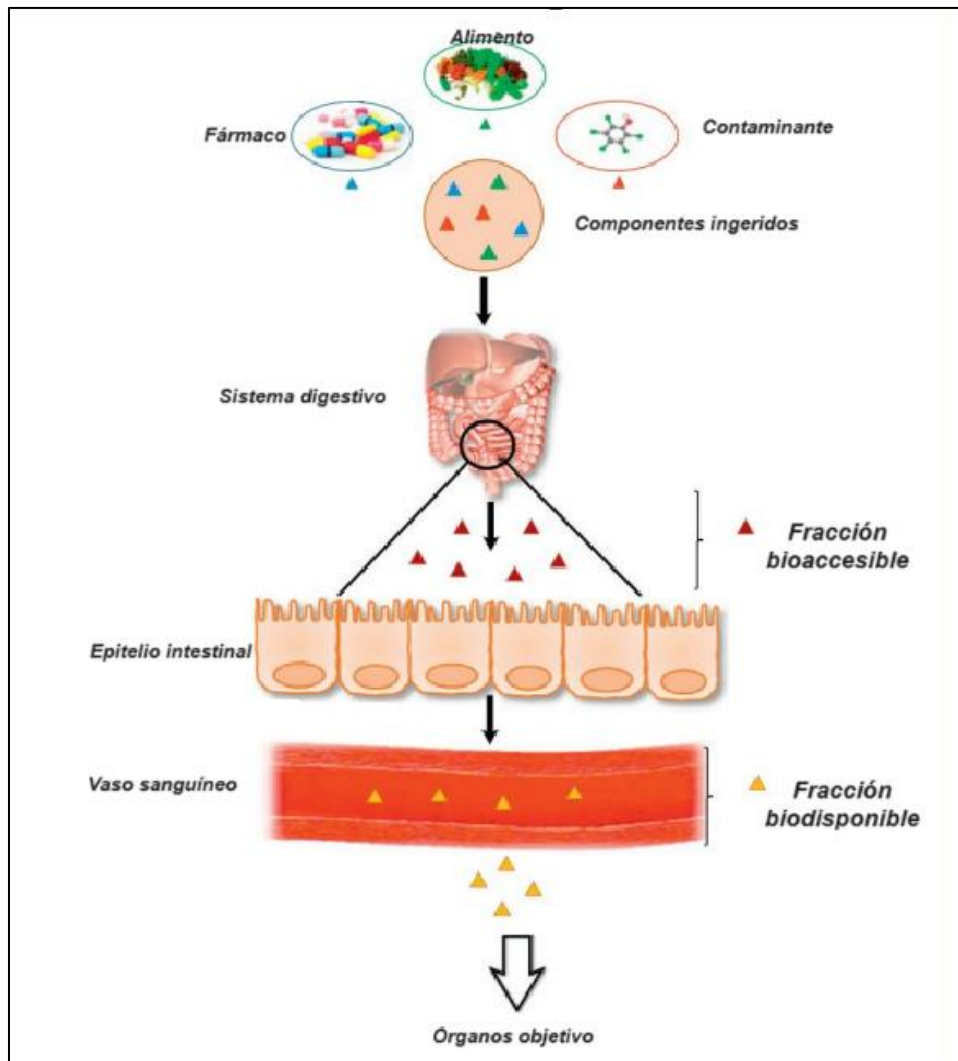


Figura 10. Esquema de la fracción bioaccesible y biodisponible de componentes ingeridos (Guerra et al., 2012).

### 2.3.1 Formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata (IR)

Las formas farmacéuticas IR son formulaciones en las que la velocidad de liberación y absorción del fármaco no se retrasa de manera significativa mediante manipulaciones farmacéuticas, es decir, se descomponen y disuelven rápidamente para liberar el API (Pande et al., 2016). Determinadas patologías necesitan un inicio de acción rápido para una condición terapéutica específica, lo que hace necesaria la liberación inmediata del fármaco (Kaur y Mehara, 2016).

Las formas farmacéuticas orales sólidas de IR se clasifican en función de la velocidad de disolución, que puede ser rápida o lenta. Se considera que una forma farmacéutica tiene IR rápida si al menos el 85% de la cantidad etiquetada o declarada del fármaco se disuelve en 30 minutos. En el caso de las tabletas IR, la única barrera para la liberación del fármaco es la

etapa de desintegración, que generalmente se completa en menos de una hora (Kaur y Mehara, 2016).

Es crucial que el excipiente o vehículo farmacéutico no retrase la velocidad de liberación o absorción del fármaco IR (Kaur y Mehara, 2016). Los excipientes son ingredientes inactivos de calidad alimentaria, típicamente basados en azúcar, como manitol, polidextrosa, lactitol y almidón, que mejoran la percepción sensorial. Se incorporan en tabletas y algunas formulaciones encapsuladas para facilitar la ruptura de la tableta y la cápsula en fragmentos más pequeños en un ambiente acuoso. Esto aumenta el área de superficie disponible y promueve una liberación más rápida de la sustancia farmacológica (Pande et al., 2016). Generalmente, se utilizan en niveles bajos, entre el 1 y el 10 % en peso respecto al peso total de la unidad de dosificación, favoreciendo la penetración de la humedad y la dispersión de la matriz de la tableta o cápsula (Kaur y Mehara, 2016).

### 2.3.1.1 Sistema de Clasificación de productos Biofarmacéuticos (BCS)

Un criterio para optar por una forma farmacéutica de IR de la clase II del Sistema de Clasificación de productos Biofarmacéutica (Biopharmaceutics Classification System, BCS) es la baja solubilidad del fármaco y alta permeabilidad en el sistema digestivo (Kaur y Mehara, 2016; Shah y Amidon, 2014). El BCS es un marco científico estandarizado utilizado para clasificar los fármacos según su solubilidad acuosa (relacionada con la disolución) y permeabilidad intestinal (relacionada con la absorción). El BCS considera tres factores clave que determinan la velocidad y el grado de absorción de las formas farmacéuticas orales sólidas de IR: disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal (Shah y Amidon, 2014). Basándose en estos principios, los fármacos se clasifican en cuatro clases, los cuales se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Clasificación del producto farmacéutico de acuerdo con el BCS.**

<b>Clase</b>	<b>Solubilidad</b>	<b>Permeabilidad</b>
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

Para su uso reglamentario, un fármaco se considera altamente soluble si la dosis más alta comercializada es soluble en 250 mL de medio acuoso en todo el rango de pH del tracto gastrointestinal, desde el estómago hasta el intestino delgado superior (pH= 1.2-7.4) y altamente permeable cuando un fármaco cuya absorción es mayor al 90% de la dosis administrada (Shah y Amidon, 2014).

De acuerdo con la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA), esta clasificación puede usarse para establecer las especificaciones de disolución *in vitro* y para predecir la probabilidad de lograr una correlación *in vivo-in vitro* (IVIVC) exitosa. Los fármacos de clase II, en cuanto a su velocidad de disolución es el factor que más limita su absorción en el organismo, por lo tanto, se puede esperar una buena correlación IVIVC, es decir, como se disuelve el fármaco en las pruebas *in vitro* puede predecir su absorción en el organismo (FDA, 2018). La prednisona pertenece a la clase II del BCS la cual se utilizó en su forma específica de material de referencia para desarrollar la PVT de este proyecto.

### 2.3.1.2 Condición de sumidero (sink)

La condición de sumidero es crucial en las pruebas de disolución, ya que determina el volumen del medio utilizado. Esta condición se da naturalmente cuando la concentración del fármaco en ambos lados del epitelio intestinal se aproxima al equilibrio rápidamente, lo que significa que el fármaco es absorbido casi de inmediato al disolverse (alta permeabilidad). Así, el intestino actúa como un sumidero natural<sup>9</sup>, es decir, a medida que el fármaco se disuelve en el estómago, las células epiteliales del intestino lo absorben continuamente, manteniendo una baja concentración en el lumen. Esto evita que la solución se sature y permite que el proceso de disolución continúe. Por lo tanto, en condiciones *in vivo*, no se desarrolla una concentración significativa del fármaco en el lumen, lo que permite mantener una concentración baja y constante (Abdou et al, 2013).

Para simular la condición de sumidero *in vivo*, las pruebas de disolución *in vitro* se realizan utilizando un gran volumen de medio de disolución, de manera que la concentración del soluto nunca supere el 10 al 15% de su solubilidad máxima. Si se mantiene este parámetro, se dice que la prueba de disolución se está llevando a cabo en condiciones de sumidero, es decir, sin la influencia del gradiente de concentración. Los fármacos con baja solubilidad y alta permeabilidad (como los de clase II) pueden cumplir esta condición fácilmente, ya que su alta permeabilidad permite una rápida absorción y evita la acumulación significativa en el medio (Abdou et al, 2013).

---

<sup>9</sup> La condición de sumidero natural se refiere a cualquier sistema o proceso en el que una sustancia es absorbida o removida del entorno de forma continua, manteniendo una baja concentración en el medio y evitando su acumulación.

### **2.3.1.3 Factores que influyen en la disolución**

El medio de disolución afecta la prueba de disolución por su composición y volumen, en los medios convencionales de la USP, generalmente se caracteriza en términos de pH. En contraste, los medios biorrelevantes están diseñados para imitar el entorno gastrointestinal tanto en condiciones de ayuno como de alimentación, teniendo en cuenta factores como el pH, la presencia de bilis, enzimas y la tensión superficial de los fluidos (Apéndice A). La composición de estos medios de disolución se selecciona de acuerdo con la formulación del fármaco que se estudia. Esto es importante para compuestos poco solubles, donde la disolución, al ser un paso limitante de la velocidad, puede verse afectada por el pH y la presencia de alimentos (Cascone et al., 2016).

Como se ha descrito anteriormente, el diseño del aparato influye en los resultados de la disolución mediante varios factores: como la geometría, la estructura del recipiente, así como la velocidad de agitación. Estos factores, a su vez, afectan la tasa de abrasión de la forma de dosificación sólida intacta sobre las partículas, la dispersión de las partículas desintegradas, la homogeneidad del fluido de disolución y la reproducibilidad del sistema de un ensayo a otro (Abdou et al., 2003).

### **2.4 Prueba de verificación de desempeño (PVT)**

La USP establece los parámetros para promover de manera reproducible la desintegración, disolución y transferencia de masa de un fármaco desde su forma de dosificación empleando sus aparatos de disolución estandarizados. Para calificar un aparato de disolución, la USP determina necesario demostrar su rendimiento a través del estudio del comportamiento de disolución de un material estándar, controlar los atributos mecánicos del aparato y cumplir con los requerimientos establecidos en la hoja de certificación de la tableta RS. Esto incluye dos evaluaciones una operativa y una de rendimiento. La evaluación operativa es la calibración mecánica del aparato de disolución en un intervalo de cada seis meses, mientras que la evaluación de rendimiento se lleva a cabo mediante la PVT, como se describe en el capítulo general de disolución 711 de la USP (Brown et al., 2019).

La USP 2023, establece un método y especificaciones en el documento titulado “Guía de la USP sobre procedimientos para la prueba de calibración mecánica y verificación del rendimiento (aparato 1 y aparato 2)”, en el documento se detalla el desarrollo de la calibración mecánica para verificar que se cumpla con los parámetros fijos del aparato y sus complementos: la nivelación de la mesa de trabajo y la base del aparato, las dimensiones de la paleta y el vaso, la alineación, el centrado y la oscilación del eje, así como, la parte operativa del instrumento: la velocidad de rotación y control de la temperatura. Aspectos que se abordan con más detalle en el capítulo 4 subtema 4.4.1.1 del presente trabajo.

Para la evaluación de la PVT requiere cumplir dos criterios de aceptación: la media geométrica (GM) y el coeficiente de variación (%CV) del material de referencia, la USP permite elegir entre un método de prueba de una o dos etapas. La prueba de una etapa aplica para más de doce pruebas consecutivas en conjuntos de seis, mientras que la de dos etapas se usa con un único conjunto inicial de seis pruebas, bajo criterios más estrictos; si no se cumple, se realiza un segundo conjunto. La PVT concluye si ambos criterios se cumplen, lo que significa que el aparato puede reproducir resultados precisos y confiables de disolución con un material estándar, indicando que funciona correctamente; de lo contrario, el conjunto no es adecuado.

Una especificación de la prueba es el medio de disolución, que es agua destilada y deaireada, su uso facilita el trabajo de ensayo analítico para la PVT. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el pH del agua puede variar según su fuente de obtención (Almukainzi et al., 2014).

Por otra parte, de acuerdo al capítulo 1092 de la USP, *"El Procedimiento de Disolución: Desarrollo y Validación"*, la filtración de las muestras de disolución es un paso crucial para obtener resultados precisos y exactos. Su objetivo es eliminar fármacos y excipientes no disueltos de la solución extraída que pueden interferir en el análisis. En caso de no retener las partículas del fármaco podrían seguir disolviéndose y alterar los resultados. Por lo tanto, es necesario filtrar las muestras de disolución y hacerse de inmediato.

Al seleccionar un filtro, es importante considerar el material, tipo y tamaño de poro (los más comunes oscilan entre 0.20 y 70  $\mu\text{m}$ ). Algunos ejemplos de filtros utilizados en el análisis de disolución son las de cánula, discos filtrantes, material sinterizado, puntas filtrantes o filtros de jeringa. El material del filtro debe ser compatible tanto con el medio de disolución como con el fármaco. Por último, la velocidad de rotación del elemento de agitación se debe encontrar entre 50 a 100  $\pm 1$  rpm y la temperatura del medio de disolución a 37  $\pm 1^\circ\text{C}$ .

## **2.5 La prednisona como estándar de referencia de la USP**

La prednisona es un glucocorticoide utilizado en la práctica clínica y se prescribe en enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias (Casanova et al., 2018). En el contexto de la disolución de fármacos, la prednisona pertenece a la Clase II del BCS, lo que indica que tiene una baja solubilidad en medios acuosos y una alta permeabilidad a través de las membranas biológicas. Debido a su baja solubilidad, se utiliza como material de referencia en estudios de disolución, ya que esta característica puede afectar directamente su absorción y, en consecuencia, su eficacia terapéutica.

En este proyecto se decidió utilizar la prednisona en conformidad con la "Guía de la USP sobre procedimientos para la prueba de calibración mecánica y verificación del rendimiento (aparato 1 y aparato 2)". Las especificaciones del certificado de la prednisona confirman su uso para la PVT en estos aparatos. Desde mayo de 2023, la tableta de prednisona DPVS se ha

utilizado para realizar la PVT y de acuerdo con la USP, este nuevo producto es más sensible a las variables operativas y menos sensible a la deaireación del medio.

## 2.6 Selección de la categoría para la validación de métodos analíticos

De acuerdo con el capítulo 1225 de la USP, titulado “Validación de procedimientos farmacéuticos” la validación de un método analítico es el proceso mediante el cual, a través de estudios de laboratorio, se demuestra que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos necesarios para las aplicaciones analíticas previstas.

La USP clasifica los métodos analíticos en cuatro categorías, dependiendo del tipo de estudio que se desee realizar. En cada categoría, se definen de manera específica las características de desempeño analítico que deben ser evaluadas.

- *Categoría I:* Método analítico para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos en productos farmacéuticos terminados.
- *Categoría II:* Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite de detección.
- *Categoría III:* Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (pruebas de disolución, liberación de fármacos entre otros).
- *Categoría IV:* Pruebas de identificación.

Cada categoría requiere información analítica diferente. En la Tabla 4 se detallan las características de desempeño analítico que normalmente se solicitan para cada una de estas categorías.



**Tabla 4. Características de desempeño analítico requeridas para la validación. Adaptada del capítulo 1225 USP, 2024.**

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de límite		
<b>Exactitud</b>	Sí	Sí	*	*	No
<b>Precisión</b>	Sí	Sí	No	Sí	No
<b>Especificidad/ Selectividad</b>	Sí	Sí	Sí	*	Sí
<b>Límite de detección</b>	No	No	Sí	*	No
<b>Límite de cuantificación</b>	No	Sí	No	*	No
<b>Linealidad</b>	Sí	Sí	No	*	No
<b>Intervalo de trabajo</b>	Sí	Sí	*	*	No

\* Depende de la naturaleza de la prueba específica.

La prueba a realizar en este trabajo se encuentra en la categoría III. Por otra parte, de acuerdo con el capítulo 1092 de la USP y la FEUM, recomiendan verificar no solo el parámetro de precisión, sino también los parámetros de linealidad, intervalo de trabajo, exactitud y especificidad, como se indica en la Tabla 5.

**Tabla 5. Características de desempeño y criterios de aceptación para la validación de los métodos analíticos (Elaboración propia adaptado de: FEUM, 2023; USP 1092, 2024; USP 1225, 2024).**

Características de Desempeño	Definición	Prueba de disolución	Determinación	Prueba	Criterios de Aceptación
Linealidad	Capacidad del método para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en relación con la señal analítica dentro de un intervalo dado.	Las soluciones individuales pueden prepararse en el medio de disolución.	Aplicar el método analítico a muestras con diferentes concentraciones del analito, preparadas de manera independiente mediante la adición del analito o la dilución de una solución madre estándar.	Gráfico de linealidad	Confirmación visual del comportamiento lineal en el gráfico de respuesta analítica vs concentración.
				Gráfico de residuales	Distribución aleatoria de los puntos alrededor de la recta. No se debe presentar ninguna tendencia.
Intervalo del trabajo	Es el intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior del analito (incluyendo dichas concentraciones) y se ha demostrado que el analito es cuantificado con precisión, exactitud y linealidad para el método analítico.	Debe cubrir al menos el 80-120% de la concentración objetivo.	Calcular la concentración del analito en cada muestra, utilizando los datos obtenidos de la respuesta analítica durante la evaluación de la linealidad.	Coeficiente de determinación.	Coeficiente de determinación: $r^2 \geq 0.98$
				Intervalo de confianza de la pendiente.	Debe incluir el valor de la unidad.
Precisión	La precisión de un método analítico es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, bajo las mismas condiciones analíticas (repetibilidad) o bajo diferentes condiciones analíticas (reproducibilidad), utilizando una muestra homogénea en condiciones normales de operación.	La precisión del método se mide en términos de: a) Repetibilidad, la cual se refiere al uso del método analítico en un laboratorio durante un periodo corto por el mismo analista con el mismo equipo. b) Precisión intermedia (reproducibilidad intralaboratorio), la cual expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método analítico se aplica en diferentes días, analistas o equipos.	La precisión de un método analítico generalmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación).	Coeficiente de variación *En este proyecto se entiende como CV, la desviación estándar relativa.	Repetibilidad: CV $\leq 2\%$ en estudios intradía.
				Coeficiente de variación.	Reproducibilidad: CV $\leq 5\%$ en estudios interdía.
Exactitud	Es la proximidad absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra, a una cantidad fija.	Se le relaciona con el concepto de veracidad. Se puede lograr conjuntamente con la determinación de linealidad.	Mediante la evaluación de la recuperación del analito (porcentaje de recuperación) en todo el intervalo de la valoración, o evaluando la linealidad de la relación entre las concentraciones estimadas y las reales.	Recuperación del analito.	Recuperación entre 95-105% del valor teórico.
				Intervalo de confianza de la pendiente.	Debe incluir el valor de la unidad
Especificidad/Selectividad	Capacidad del método para para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, que pueden estar presentes (especificidad) o que se pudieran presentar por efectos ambientales o de interacción con los mismos componentes (selectividad) tales como: impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra.	Demostrar que los resultados no están indebidamente afectados por el medio de disolución usado como blanco, los ingredientes del placebo, otros fármacos activos o potenciales productos de degradación a partir del fármaco disuelto en el medio de disolución.	Analizar el blanco del medio de disolución (sin la muestra disuelta) en comparación con una muestra con una concentración conocida del analito.	Espectroscopia UV-Visible (UV-Vis)	Ausencia de interferencias en la señal del analito: Los espectros de absorción UV de la solución de prueba y de la solución estándar deben exhibir máximos y mínimos de absorbancia en la misma longitud de onda.
			Evaluar el efecto de la absorbancia del blanco a la longitud de onda analítica o el área bajo la curva para el HPLC.	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)	Evaluar visualmente la pureza del pico.
Robustez	Capacidad del método analítico para no ser afectado ante pequeñas variaciones durante condiciones normales de uso.	Evaluación de la consistencia del método ante cambios controlados.	Se modifican ligeramente factores como temperatura, pH, velocidad de agitación, tiempo de muestreo y desgasificación.	La robustez sigue los conceptos generales de precisión intermedia y usa criterios de aceptación similares.	El método debe ser insensible a pequeñas variaciones en condiciones operativas.

## 2.7 Selección de los equipos analíticos

Las técnicas analíticas son fundamentales en el análisis farmacéutico, porque permiten identificar y cuantificar el fármaco desde su desarrollo hasta la comercialización, así como, su estabilidad física y química del fármaco (Siddiqui et al., 2017). Las mediciones a través de los métodos analíticos buscan ser precisas y garantizar resultados válidos de las muestras analizadas (Deng et al., 2008). En este trabajo se determinaron dos métodos: la espectrofotometría UV-Vis y la cromatografía, HPLC MS/MS.

En la Figura 11, se muestra el porcentaje de uso de los métodos analíticos basados en las ediciones de la Farmacopea Europea (Ph. Eur) y la USP. En la tabla se observa que, entre las técnicas cromatográficas, el HPLC se ha convertido en el método principal de uso para la USP con un 44 % y en menor medida con un 15.5 % en la Ph. Eur, superando al método espectrofotométrico UV-Vis con un 9.5 % en la Ph. Eur y 8.5 % en la USP (Siddiqui et al., 2017). El HPLC que integra detectores UV-Vis o espectrometría de masas, permite no solo cuantificar la concentración de compuestos en solución, sino también identificar con precisión todos los compuestos presentes (Rocha et al., 2018).

Method	Ph. Eur. 4 (%)	USP 27 (%)
HPLC	15.5	44
GC	2	2.5
Titration	69.5	40.5
Acid-base	57.5	29.5
Aqueous mixtures	21	5.5
Indicator	6.5	4.5
Potentiometric	14.5	1
Non-aqueous	36.5	24
Indicator	9.5	14
Potentiometric	27	10
Redox (Iodometry, Nitritometry, etc.)	6.5	5.5
Other (complexometry, argentometry, etc.)	5.5	5.5
UV-vis spectrophotometry	9.5	8.5
Microbiological assay (antibiotics)	3	2.5
Other (IR, NMR, polarimetry, fluorimetry, atomic absorption spectroscopy, polarography, gravimetry etc.)	0.5	2

**Figura 11. Porcentaje de uso de diferentes métodos analíticos en el análisis de materiales farmacéuticos (Siddiqui et al., 2017).**

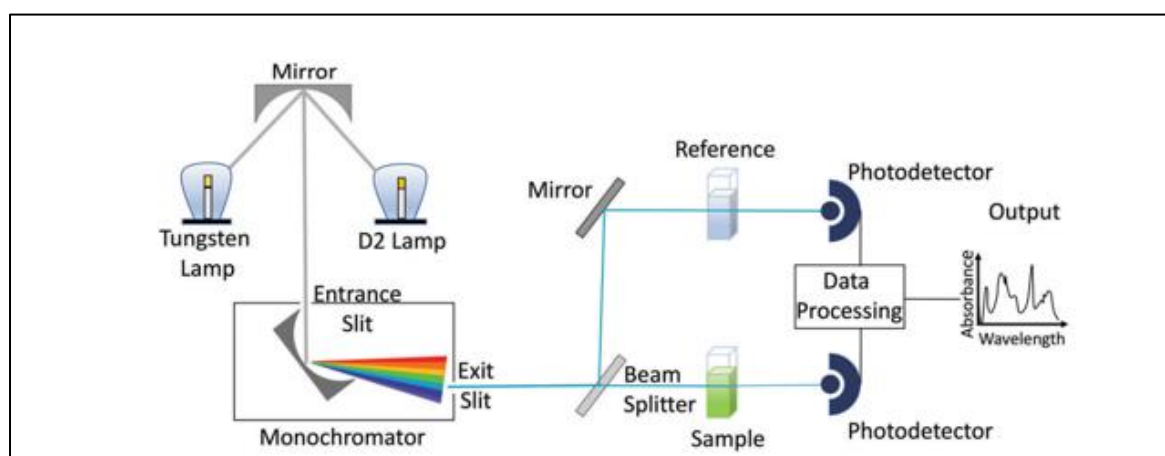
### 2.7.1 Espectrofotometría visible (UV-Vis)

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica analítica que permite la determinación de concentración del compuesto en solución, su principio de medición es la absorción y transmisión de la energía radiante al atravesar una sustancia en función de la longitud de onda ( $\lambda$ ). La región del espectro electromagnético en la espectroscopia es la ultravioleta visible (UV-Vis) que se sitúa entre 200 y 800 nm (Rocha et al., 2018).

El principio básico de la espectroscopia se basa en la absorción de la luz en el rango UV-Vis, lo cual está relacionado con la excitación de electrones en las moléculas, que pasan de niveles

de energía bajos a altos. Debido a que los niveles de energía están cuantificados, solo la luz con la energía exacta puede causar estas transiciones y ser absorbida (Atole et al., 2018).

Los espectrofotómetros UV-Vis utilizan una fuente de luz que atraviesa la muestra, mientras que un detector en el lado opuesto mide la luz transmitida (Figura 12). Normalmente, los datos se representan en gráficos donde la línea base está en la parte inferior y los picos en la parte superior, el eje "x" indica la longitud de onda en nanómetros (nm) y el eje "y" representa la absorbancia (Abs). La absorbancia de la luz es proporcional a la longitud del camino óptico a través de la muestra y a la concentración del analito<sup>10</sup>. Los disolventes más comunes que se utilizan son el agua y los alcoholes ya que al ser transparentes no absorben en el rango UV-Vis, son medios excelentes para esta técnica porque no generan interferencia con el analito de interés (Rocha et al., 2018).



**Figura 12. Esquema del funcionamiento del espectrofotómetro UV-VIS de doble haz. La lámpara de tungsteno emite luz visible mientras que la lámpara D2 genera luz ultravioleta. La radiación electromagnética se dirige a un monocromador que selecciona las longitudes de onda que pasa a través de la muestra (Rocha et al., 2018).**

Este método es rápido, económico, fácil de usar, flexible, de bajo mantenimiento, no destructivo y que proporciona buena precisión en los resultados (Atole et al., 2018; Rocha et al., 2018; Siddiqui et al., 2017). Sin embargo, presenta desventajas la mayoría de los analitos de interés se encuentran en sus formas farmacéuticas acompañados de otros compuestos que también absorben en la misma región espectral, lo que puede dificultar la determinación utilizando mediciones espectrales UV-Vis clásicas (Atole et al., 2018). Además, la técnica es sensible a cambios en el pH y la temperatura, los cuales pueden afectar los niveles de energía, por ende, la longitud de onda y la intensidad de la absorbancia (Rocha et al., 2018).

<sup>10</sup> El analito es el fármaco que se mide en una muestra.

## 2.7.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC MS/MS)

El método HPLC acoplada a espectrometría de masas (MS) se ha consolidado como una de las técnicas analíticas más relevantes en la industria farmacéutica desde la última década del siglo XX, gracias a su alta eficiencia en la separación y su notable capacidad de detección del compuesto en solución. Este método es especialmente útil para analizar medicamentos con múltiples analitos en su formulación, destacándose por su rapidez, especificidad, precisión, exactitud y la facilidad con la que puede ser automatizado (Bhardwaj et al., 2015; Siddiqui et al., 2017). La técnica permite separar, identificar y cuantificar compuestos presentes en muestras solubles en líquido y se utiliza extensivamente en el análisis cuantitativo y cualitativo, así como en la determinación de la estabilidad de las pruebas de disolución (Bhardwaj et al., 2015). Sin embargo, la HPLC presenta limitaciones, como el elevado costo de las columnas y disolventes, además de la necesidad de personal capacitado (Siddiqui et al., 2017).

El principio de funcionamiento de la HPLC se muestra en la Figura 13, se basa en la inyección de la solución de la muestra en una columna que contiene material poroso (fase estacionaria), posteriormente en la fase líquida (fase móvil) se bombea a alta presión a través de la columna para ser analizada. La separación de los compuestos ocurre en la columna de HPLC por la adsorción diferencial del soluto en la fase estacionaria, dependiendo de la afinidad de cada componente de la muestra tenga hacia dicha fase (Bhardwaj et al., 2015).

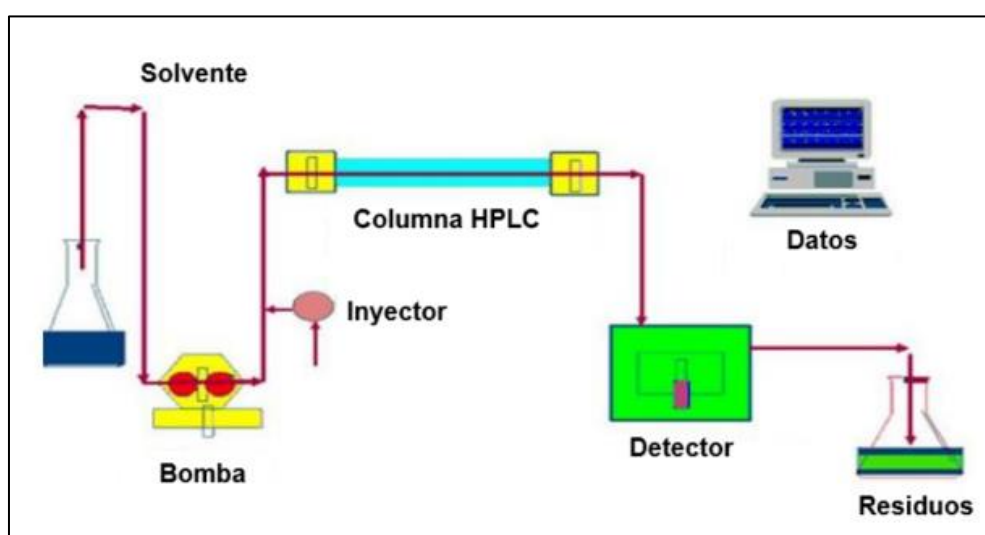


Figura 13. Esquema de diagrama de flujo del principio de funcionamiento HPLC (Bhardwaj et al., 2015).

### 3. Planteamiento del problema

A través de la literatura revisada, se identificaron problemáticas relacionadas con las pruebas de disolución de formas farmacéuticas sólidas, en particular con la PVT y los modelos estáticos tradicionales utilizados para su evaluación. La USP ha desarrollado siete aparatos estandarizados, entre los cuales se encuentra el aparato 2 de la USP (paleta), el cual es utilizado ampliamente en la industria farmacéutica debido a su aceptación regulatoria por diversas farmacopeas internacionales.

Sin embargo, el aparato 2 USP, como modelo estático de referencia *in vitro*, presenta limitaciones importantes al no reflejar adecuadamente las condiciones fisiológicas *in vivo*, lo cual compromete la predictibilidad del comportamiento de los fármacos en el organismo. Factores como las restricciones hidrodinámicas, el “efecto cono” y los volúmenes de disolución confinados entre 500 y 1000 mL son útiles para el control de calidad del fármaco, pero no representan las condiciones reales del estómago humano, lo que puede llevar a una sobreestimación o subestimación del rendimiento de disolución. Además, la reproducibilidad de los resultados entre laboratorios es sensible a variables operacionales mínimas como vibraciones, ubicación de la zona de muestreo, velocidad de rotación, posición del fármaco en el recipiente y la deaireación del medio de disolución (Cascone et al., 2016).

En cuanto al modelo dinámico IV-DGS con forma anatómica del estómago distal permite emular los movimientos peristálticos y el volumen gástrico (máximo de 256 mL) de manera más precisa, replicando el comportamiento de mezcla del estómago humano. Esto resalta la necesidad de utilizar modelos dinámicos para pruebas de disolución que se asemejen mejor a las condiciones fisiológicas naturales, las cuales no están presentes en los aparatos de disolución USP convencionales. Sin embargo, el IV-DGS no está estandarizado ni ha sido validado mediante la implementación de la PVT como lo exige la USP para sus aparatos oficiales. La PVT es fundamental para garantizar que un sistema experimental opere consistentemente dentro de parámetros aceptables, asegurando la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados, lo cual es un desafío clave para la estandarización de las pruebas de disolución en modelos no convencionales.

Ante esta problemática, surge la necesidad de desarrollar y evaluar el rendimiento del modelo dinámico IV-DGS mediante la PVT, y compararlo con el desempeño del modelo estático del aparato 2 de la USP, utilizando tabletas de prednisona DPVS como material de referencia, para evaluar la funcionalidad de sistemas de disolución y en conformidad con los capítulos generales de disolución de la USP. Para cuantificar la concentración del fármaco disuelto, se emplean dos métodos analíticos: HPLC MS/MS y espectrofotometría UV-Vis con el fin de determinar la precisión y confiabilidad de ambos modelos.

En este estudio se pretende establecer la viabilidad del modelo dinámico como una alternativa o complemento a los métodos tradicionales en la evaluación de la disolución de fármacos en un entorno que emule el comportamiento fisiológico del estómago humano.

### 3.1 Hipótesis

La implementación de la prueba de verificación de desempeño de disolución en el modelo dinámico IV-DGS puede garantizar resultados reproducibles y confiables, comparables con el aparato 2 USP convencional.

### 3.2 Objetivo general

Desarrollar, evaluar y comparar la prueba de verificación de desempeño de disolución (PVT), entre el modelo dinámico IV-DGS y el modelo estático convencional del aparato 2 de la USP, mediante la cuantificación de los porcentajes de disolución de tabletas estandarizadas de prednisona, utilizando dos métodos analíticos: HPLC MS/MS y espectrofotometría UV-Vis.

#### 3.2.1 Objetivos particulares

1. Investigar el estado actual de las pruebas de disolución en modelos *in vitro*, tanto estáticos como dinámicos, con énfasis en la PVT para el aparato 2 de la USP.
2. Validar, analizar y comparar los métodos analíticos HPLC MS/MS y espectrofotometría UV-Vis mediante técnicas estadísticas, para determinar el porcentaje de disolución de las tabletas estandarizadas de prednisona y garantizar la confiabilidad de los resultados.
3. Realizar pruebas preliminares de la PVT con tabletas genéricas de prednisona, con el fin de garantizar la correcta ejecución de la prueba. Para las pruebas de validación se utilizan las tabletas estandarizadas de referencia de prednisona.
4. Utilizar los protocolos y procedimientos de la PVT para el aparato 2 de la USP establecidos en los compendios de la USP.
5. Desarrollar el protocolo experimental de la PVT para el modelo dinámico IV-DGS que garantice las mediciones consistentes y reproducibles.
6. Analizar y comparar los resultados obtenidos de la PVT en ambos modelos *in vitro*, mediante la prueba estadística ANOVA.

### 3.3 Metas y alcances

1. Proponer el protocolo del montaje experimental para cada modelo: el aparato 2 USP y el modelo IV-DGS.
2. Utilizar los métodos analíticos el HPLC MS/MS y espectrofotometría UV-Vis para la cuantificación de la prednisona.
3. Validar los métodos analíticos HPLC MS/MS y espectrofotometría UV-Vis para garantizar resultados confiables en las pruebas PVT.
4. Implementar el protocolo de calibración mecánica de la USP para el aparato 2.
5. Implementar un método para la eliminación de oxígeno disuelto en el medio de disolución.

6. Determinar un volumen del medio de disolución que cumpla con la condición de sumidero.
7. Evaluar la compatibilidad del filtro con el medio de disolución.
8. Realizar las pruebas PVT en los dos modelos *in vitro* desarrollados en el MADit del ICAT.
9. Obtener los porcentajes de disolución de la prueba PVT en los modelos IV-DGS y el apartado 2 para validar su operatividad.
10. Obtener los perfiles de presión en el modelo IV-DGS.
11. Los resultados de esta investigación se limitan a las condiciones experimentales definidas en este proceso, con el equipo descrito, la analista y los métodos analíticos empleados (HPLC MS/MS y UV-Vis).

### 3.4 Metodología

El presente trabajo se desarrolló siguiendo el procedimiento metodológico descrito en el diagrama de flujo de la Figura 14. El esquema presenta la metodología de investigación utilizada para la recolección de información y el análisis bibliográfico para entender el contexto del proceso de disolución. Consecutivamente, se describe la metodología experimental, que involucró la determinación de los modelos *in vitro*, los métodos analíticos y los parámetros de validación para llevar a cabo la prueba de verificación de desempeño de disolución. Finalmente, se presenta el análisis estadístico de los resultados para obtener las conclusiones del estudio.



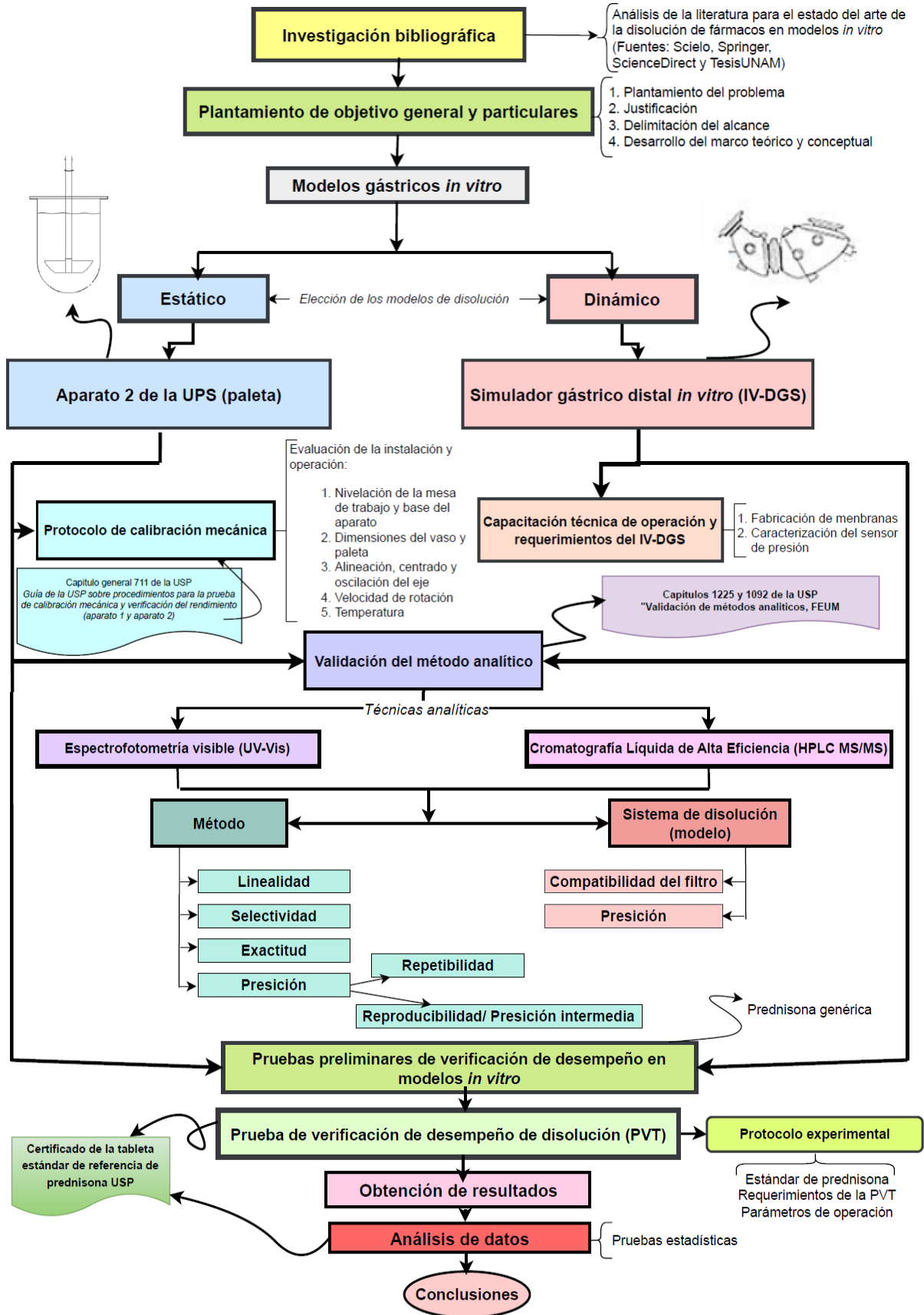


Figura 14. Diagrama de flujo de la metodología para la PVT en dos modelos *in vitro*: uno estático y otro dinámico (Elaboración propia).

## 4. Materiales y métodos

En este capítulo se describen los materiales y métodos utilizados para llevar a cabo las pruebas de disolución.

### 4.1 Materiales

- Matraces volumétricos: 5 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL
- Vasos de precipitados: 100 mL, 1000 mL
- Pipetas desechables: 5 mL
- Jeringas de plásticos graduadas: 5 mL, 30 mL, 50 mL
- Filtro de membrana de nylon StoryLab® de 0.45  $\mu\text{m}$  con diámetro de 47 mm
- Filtro de pirinola de 0.45  $\mu\text{m}$
- Espátula
- Vidrio de reloj
- Tubos de ensayo: 10 mL
- Frasco ámbar: 25 mL
- Pisseta: 50 mL
- Puntas de micropipetas
- Gradilla
- Cánulas para la toma de muestra
- Celdas de cuarzo
- Mangueras flexibles: 5 mm y 6 mm

### 4.2 Equipos e instrumentos de laboratorio

- Balanza analítica
- Espectrofotómetro UV-Vis Cary 500 (Agilent Technologies)
- HPLC MS/MS (Agilent Technologies 6400, modelo 6420)
- Aparato 2 USP del ICAT
- IV-DGS diseñado en el MADiT
- Horno de convección BINDER
- Mesa neumática THORLABS
- Cámara de vacío
- Termostato
- Termómetro de mercurio
- Resistencia eléctrica
- Bomba de agua
- Vernier
- Nivel digital Mitutoyo
- Base y comparador horizontal de palpador oscilante
- Micropipetas: 10-200  $\mu\text{L}$ , 200-1000  $\mu\text{L}$ , 1000-5000  $\mu\text{L}$

- Divisor interno
- Tacómetro
- Regulador de frecuencia
- Cronómetro
- Equipo de microfiltración de vidrio al vacío de la marca MFS
- Medidor METTLER TOLEDO  $O_2$  4100e
- Medidor de oxígeno disuelto

### 4.3 Reactivos y sustancias activas

#### a) Reactivos

- Agua destilada
- Metanol grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Ácido fórmico grado HPLC

#### b) Sustancias activas

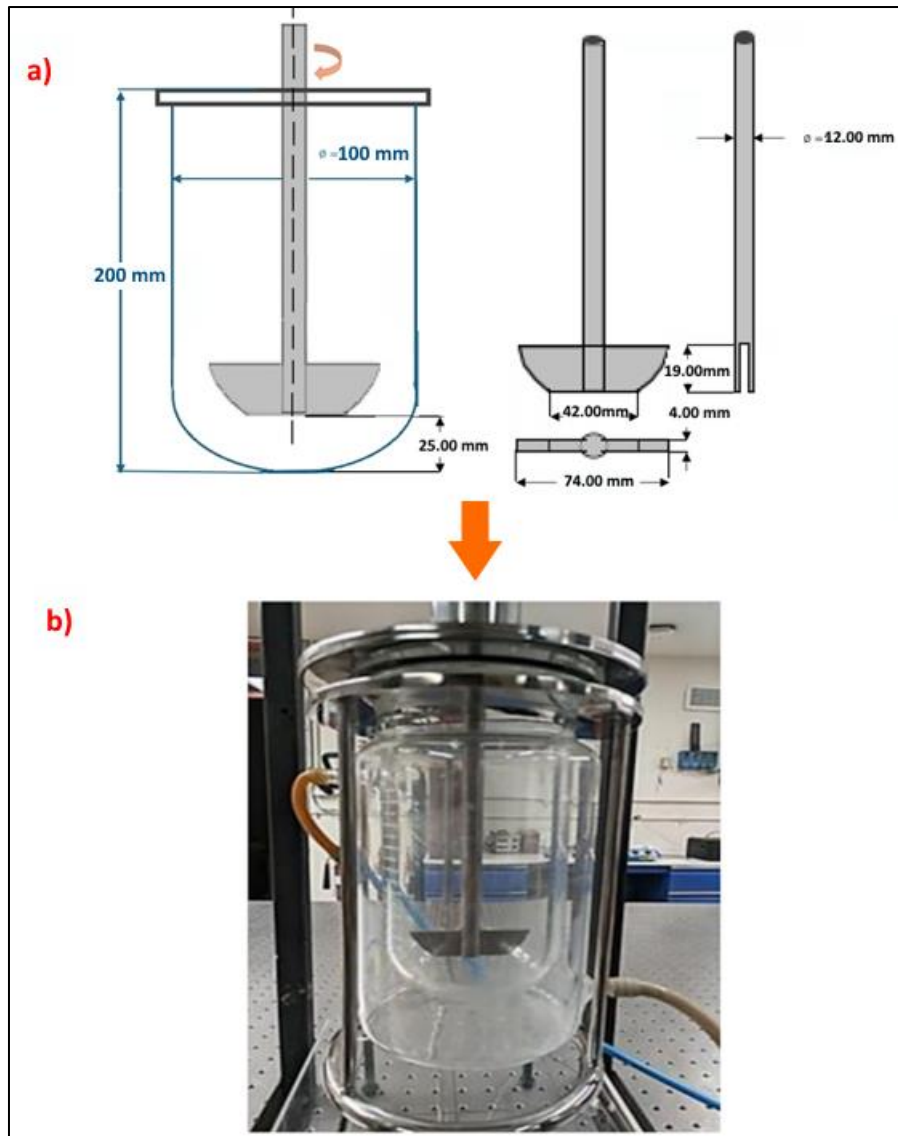
- Prednisona estándar Sigma-Aldrich (pureza > 98 %) en polvo
- Tabletas de prednisona DPVS, 10 mg (USP RS: 1222818, lote F161Y0)
- Medicamento de prednisona de 5 mg de la marca farmacias del ahorro®

### 4.4 Equipos de disolución (Modelos *in vitro*)

Se emplearon dos modelos *in vitro* para llevar a cabo la PVT: el aparato de disolución 2 de la USP (paleta) como modelo estático y el simulador gástrico IV-DGS como modelo dinámico. A continuación, se describe la construcción experimental de ambos modelos.

#### 4.4.1 Modelo estático: Aparato de disolución 2 USP (paleta)

En el ICAT, se manufacturó el aparato 2 de la USP siguiendo las especificaciones descritas en el capítulo general 711 de la USP, titulado "Disolución" (ver Figura 15). El equipo estuvo compuesto por un recipiente cilíndrico de vidrio con fondo semiesférico y una capacidad nominal de 1 L, con una altura de 200 mm y un diámetro interno de 100 mm. El elemento de agitación consistió en una paleta y un eje de acero inoxidable 316 L. La paleta presentó una altura de 19 mm, un ancho de 74 mm en la parte superior y 42 mm en la inferior, con un grosor de 4 mm. El diámetro del eje fue de 12 mm.



**Figura 15. a) Esquema dimensional y b) fotografía del aparato 2 USP fabricado en el ICAT (Elaboración propia).**

#### **4.4.1.1 Protocolo de calibración mecánica del aparato 2 USP (calificación operativa)**

Este protocolo tuvo como objetivo establecer el procedimiento estándar para la calibración mecánica del aparato 2 de la USP y definir el montaje experimental para la PVT, con el fin de asegurar el funcionamiento y desempeño correctos del aparato, mediante la calificación operativa y de rendimiento, respectivamente, en conformidad con el capítulo 711 de la USP y la guía de disolución descrita previamente en el subtema 2.4. A continuación, se detallan los parámetros evaluados durante la calibración mecánica junto con una descripción y las tolerancias aceptadas por la USP.

El entorno utilizado para la prueba de disolución requería estar nivelado, conforme a lo descrito en los siguientes incisos:

**a) Nivelación de la mesa de trabajo:**

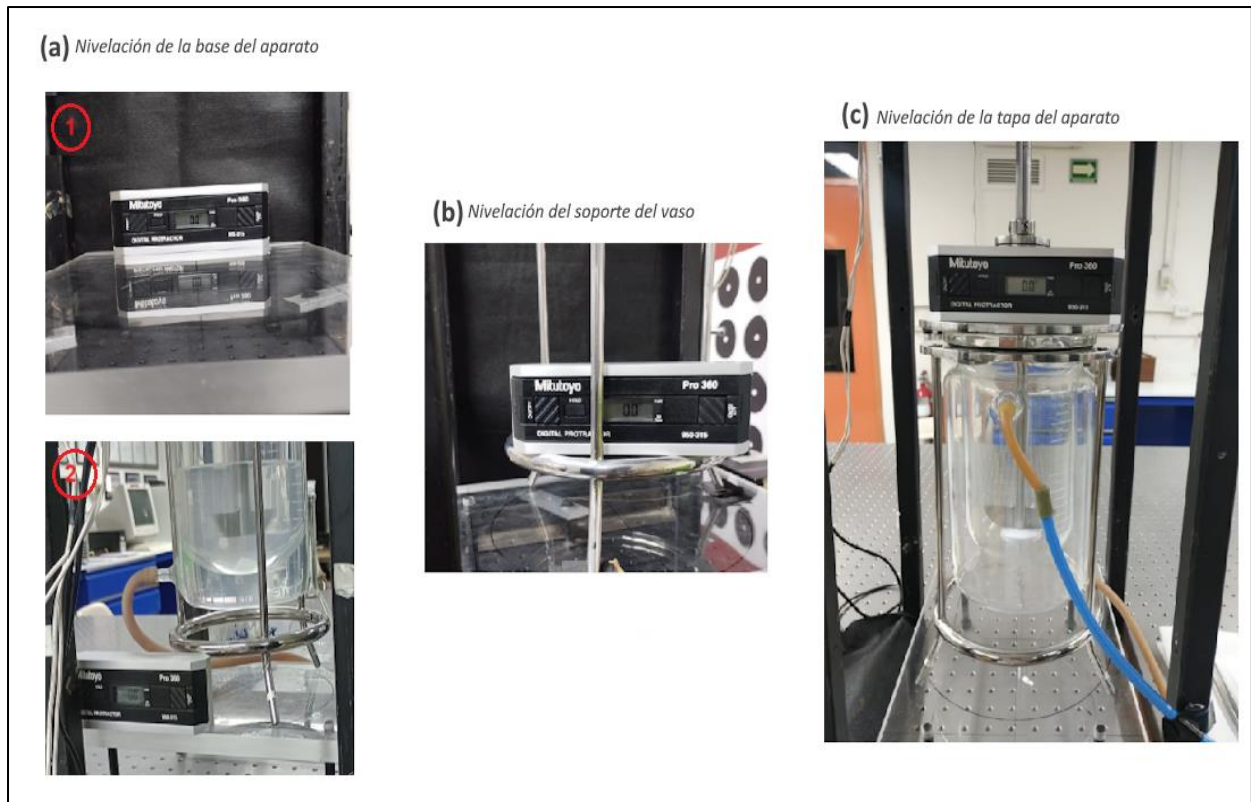
1. Girar la palanca de la toma de aire de la mesa óptica THORLABS para activarla.
2. Sin el aparato de disolución colocado, verificar la inclinación de la superficie de la mesa óptica en dos direcciones ortogonales respecto a la horizontal, es decir, en dos direcciones perpendiculares entre sí (norte-sur y este-oeste), utilizando un nivel digital. La inclinación no deberá exceder  $1^\circ$ .
3. Colocar el aparato de disolución y repetir la verificación en ambas direcciones ortogonales. Registrar los valores obtenidos.

**b) Nivelación de la base del aparato y soporte del vaso:**

1. Ajustar la base del aparato utilizando los cuatro tornillos de nivelación, asegurándose de que esté en la misma posición.
2. Verificar la nivelación de la base del aparato y soporte del vaso con un nivel digital en dos direcciones ortogonales respecto a la horizontal, sin el aparato de disolución colocado. La inclinación no debe exceder los  $0.5^\circ$  (Figura 16 a1; b).
3. La base del aparato debe resistir el vaso lleno con el medio de disolución. Por esta razón, se debe medir nuevamente la nivelación de la base con el aparato y medio de disolución y registrar los valores obtenidos (Figura 16 a2).

**c) Nivelación de la tapa del aparato:**

Colocar el elemento de agitación en la tapa del aparato y verificar la inclinación de la tapa con un nivel digital en dos direcciones ortogonales respecto a la horizontal. Registrar los valores, asegurándose de que la inclinación no exceda los  $0.5^\circ$  (Figura 16c).



**Figura 16. Nivelación del entorno (a) Base del aparato (1) Sin aparato; (2) Con aparato y medio de disolución; (b) Soporte del vaso; (c) Tapa del aparato (Elaboración propia).**

El procedimiento para verificar las dimensiones del elemento de agitación se detalla en los siguientes incisos:

**a) Elemento de agitación:**

1. Observar que la paleta y eje se encuentren en buenas condiciones, sin raspaduras e intactas.
2. Utilizar un vernier y medir las dimensiones de la paleta las cuales deben de corresponder con la Figura 17 y registrar los valores.

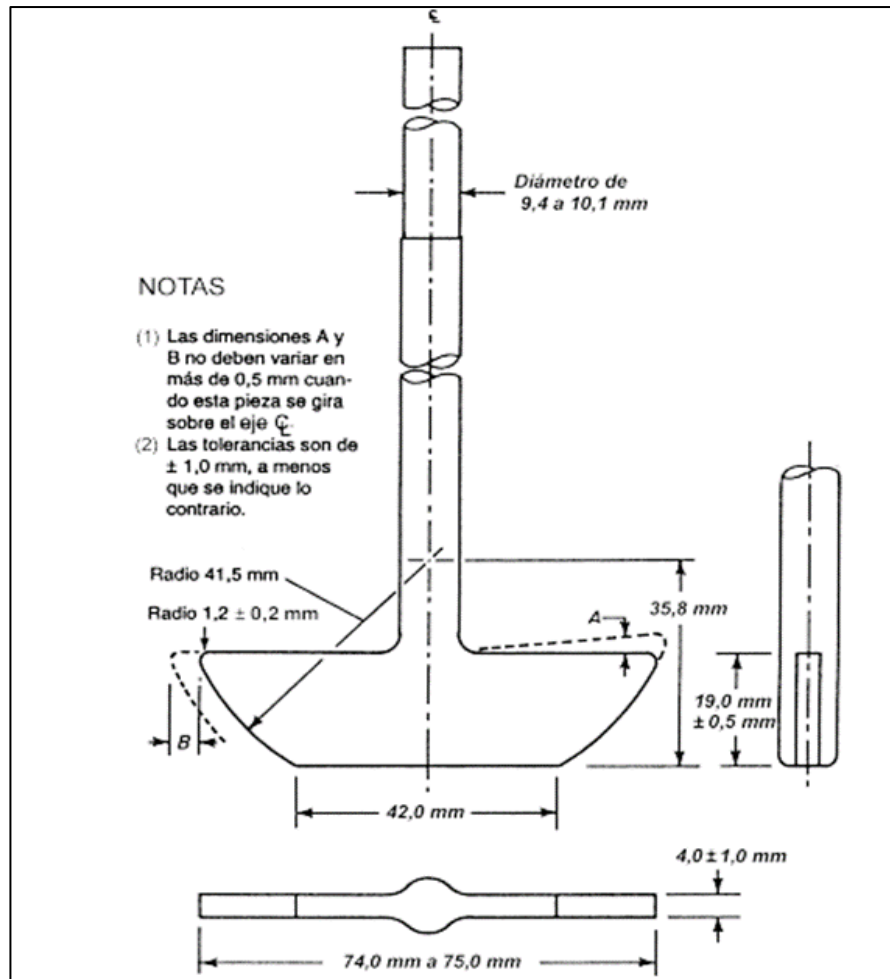


Figura 17. Esquema del elemento de agitación de paleta con tolerancias (USP <711>, 2010).

**b) Vaso de disolución:**

1. Inspeccionar que las superficies internas del vaso estén limpias, sin corrosión ni raspaduras.
2. Utilizar un vernier, medir la altura y el diámetro interno del vaso. Registrar los valores obtenidos.

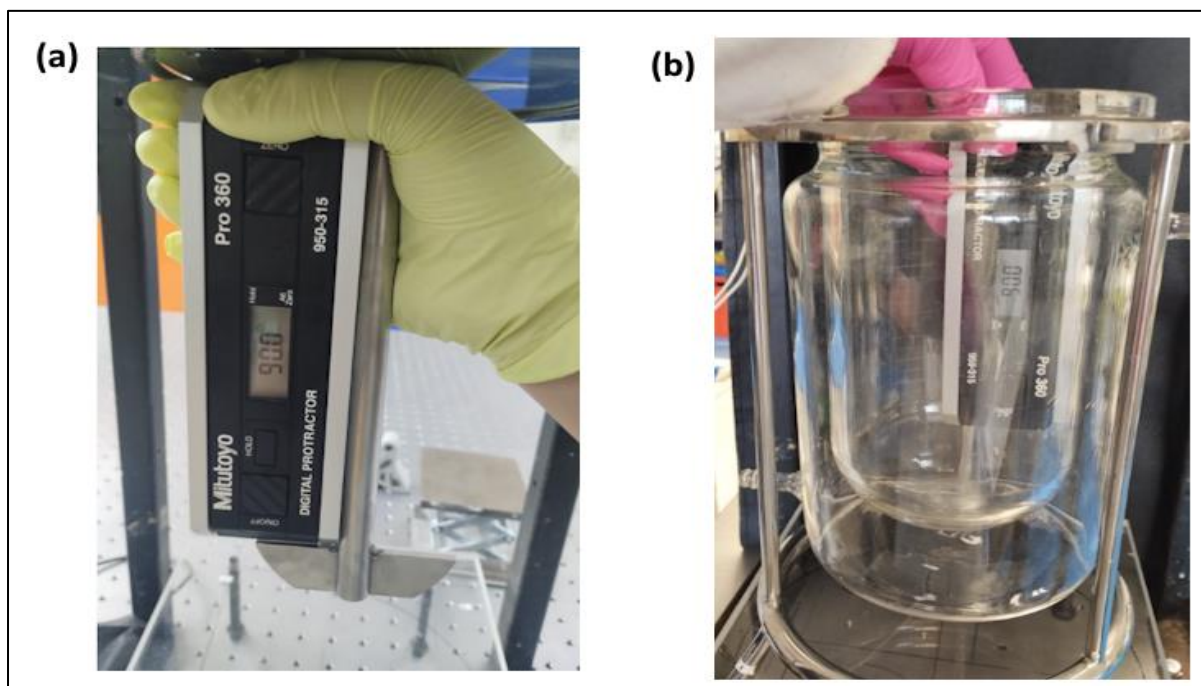
El procedimiento para verificar las alineaciones de los componentes del aparato se detalla en los siguientes incisos:

**a) Verticalidad del elemento de agitación:**

Medir y registrar la verticalidad del elemento de agitación utilizando un nivel digital. La medida debe ser de  $90^\circ \pm 0.5^\circ$  (Figura 18a).

**b) Verticalidad del vaso:**

Medir y registrar con el nivel digital la verticalidad del vaso en dos posiciones internas orientadas a 90°. No se permite una desviación  $\geq 0.5^\circ$  (Figura 18b)



**Figura 18. Alineaciones del (a) elemento de agitación y (b) vaso de disolución (Elaboración propia).**

**c) Centrado:**

Determinar el centrado del eje del elemento de agitación dentro del vaso, simulando las condiciones de la prueba de disolución. Utilizar un divisor interno y medir en cuatro posiciones cardinales las distancias entre el eje de agitación y la pared interna del vaso, a no más de 2 cm por debajo del borde. La diferencia entre la lectura más grande y la más pequeña observadas durante una rotación completa de 360° no debe exceder los 2 mm. Registrar los valores obtenidos.

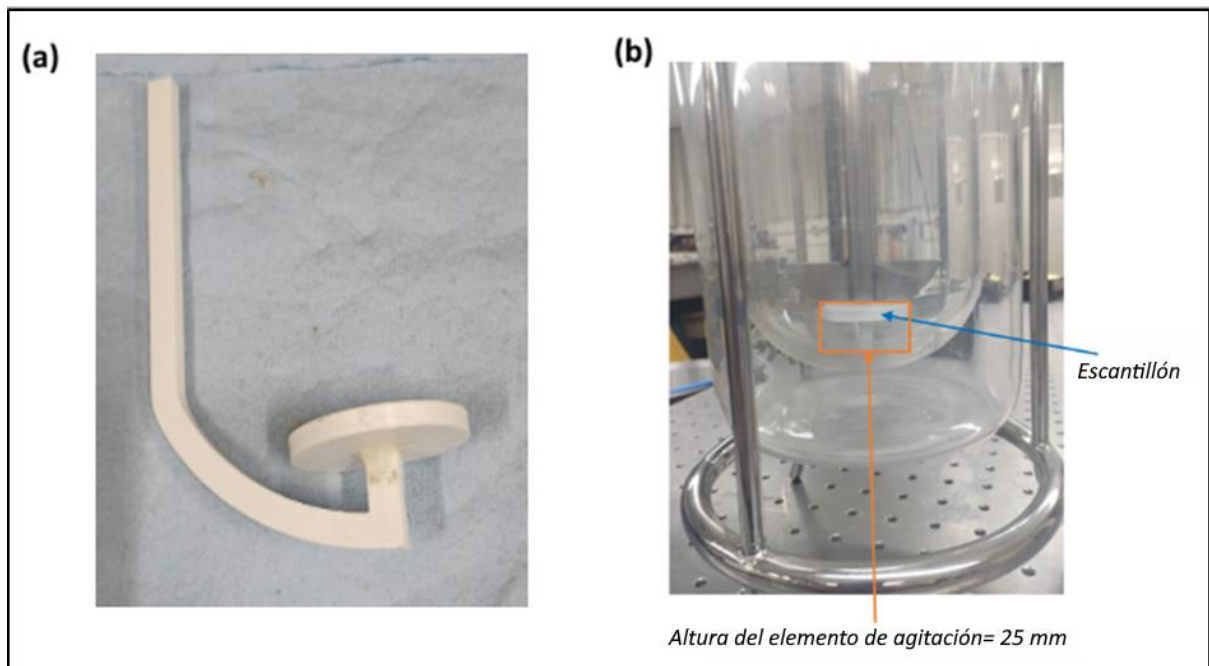
**d) Altura del elemento de agitación:**

Para la prueba de PVT y de disolución, es crucial ajustar la altura del elemento de agitación, que corresponde a la distancia entre la superficie interna del vaso y la parte inferior de la paleta ( $25 \pm 2$  mm). Para ello, se implementó un escantillón de material de PLA (ácido poliláctico) fabricado mediante manufactura aditiva, que se utiliza como regla o patrón con una altura de 25 mm (Figura 19a).

1. Colocar el escantillón de forma vertical hasta el fondo del vaso de disolución.
2. Introducir el elemento de agitación con la tapa del aparato.



3. Ajustar la altura del eje de la paleta, asegurando que se posicione sobre la superficie del escantillón para garantizar la altura correcta y precisa (Figura 19b).



**Figura 19. (a) Escantillón y (b) Medición de altura con escantillón (Elaboración propia).**

Para los siguientes dos puntos, es necesario simular las condiciones de la prueba de disolución, lo que implica realizar el montaje experimental del aparato de disolución, tal como se describe en el subtema 4.6.3.

El procedimiento para verificar el motor y la transmisión del aparato 2 de la USP se describe en los siguientes incisos:

**a) Velocidad de rotación:**

1. Ajustar la velocidad de rotación utilizando un regulador de frecuencia.
2. Verificar con un tacómetro la velocidad de rotación, la cual debe ser de  $50 \pm 1$  rpm.

**b) Oscilación del elemento de agitación:**

1. Instalar el elemento de agitación sin la tapa en el cople superior que conecta al motor.
2. Colocar la punta del comparador analógico en un punto sobre el eje de la paleta, aproximadamente a 1 cm por encima del aspa (Figura 20).
3. Encender el motor a  $50 \pm 1$  rpm y obtener 5 lecturas. La deflexión total de la punta debe ser  $\leq 1.0$  mm.



**Figura 20. Oscilación del elemento de agitación (Elaboración propia).**

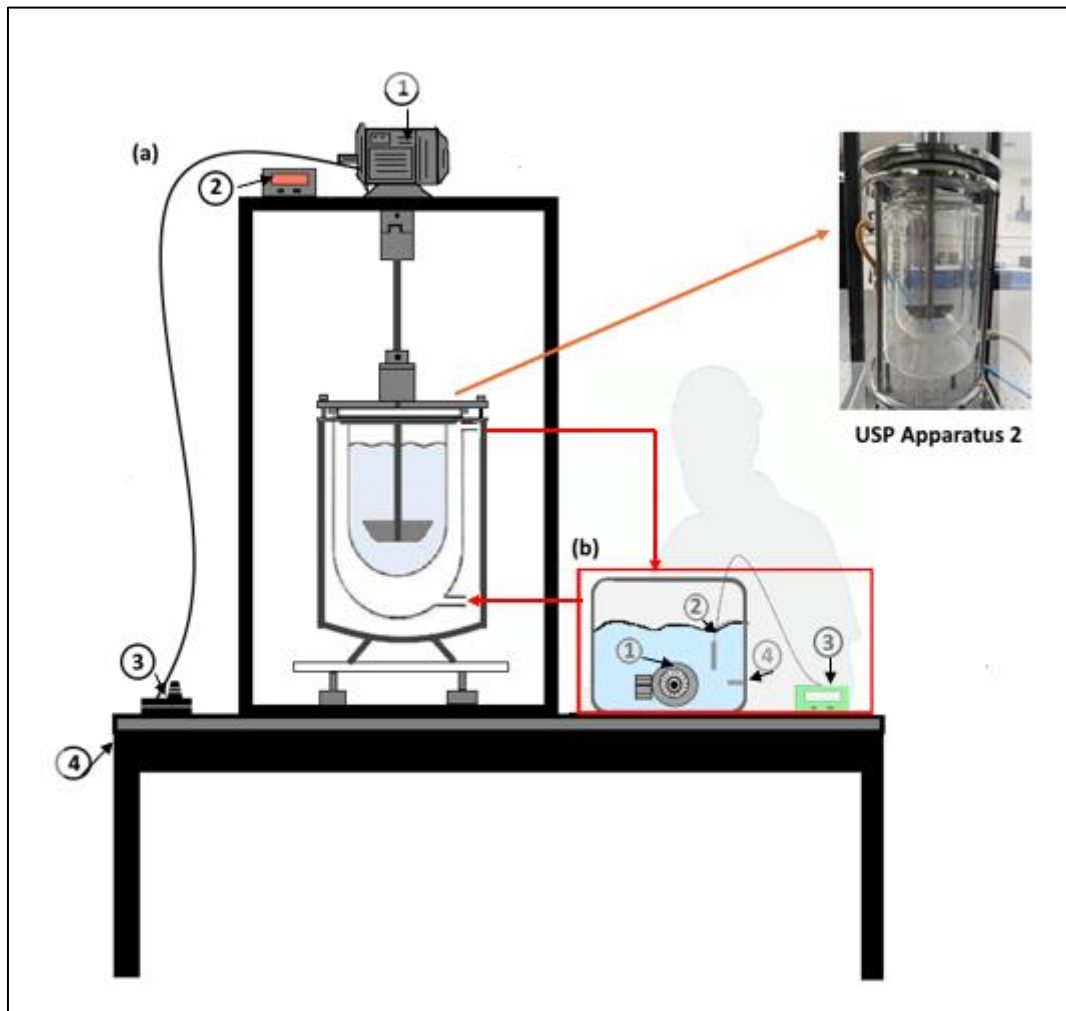
El procedimiento para el control de temperatura en el aparato 2 de la USP se describe a continuación:

1. Calentar el medio de disolución a 38 °C, transferirlo a un matraz volumétrico de 500 mL y verterlo en el vaso de disolución.
2. Colocar el termómetro de mercurio en el aparato de disolución, sumergiéndolo en el medio sin que toque el fondo del vaso ni la paleta.
3. Esperar a que la temperatura del medio y el sistema de recirculación alcancen los 37° ± 0.4 °C y registrar el valor final obtenido.

#### **4.4.1.2 Montaje experimental del aparato 2 USP**

Como primer paso, el aparato de disolución se instaló en una mesa óptica THORLABS (Figura 21a; 4) junto con la base del aparato, utilizada como mesa de trabajo, la cual cuenta con un sistema de aislamiento neumático para evitar vibraciones y proporcionar estabilidad, ya que estos parámetros pueden afectar las pruebas de disolución (Seeger et al., 2015). Posteriormente, el elemento de agitación se introdujo en la parte central de la tapa del aparato y se acopló con prisioneros a la flecha del motor y se colocó en la parte superior (Figura 21a; 1). A continuación, se implementó un sistema de recirculación con agua destilada (Figura 21b) para mantener la temperatura del medio de disolución en el interior del vaso a 37 ± 0.4 °C. Esto se logró mediante un recipiente con un termostato W1209, un sensor de temperatura, una resistencia eléctrica y una bomba de recirculación (Figura 21b; 3, 2, 4, 1). Las mangueras de la bomba de circulación se conectaron al vaso de disolución, se calentó el agua destilada hasta los 37 °C y una vez alcanzada la temperatura, se bombeó hacia la camisa que envolvía el vaso. Finalmente, se utilizó un regulador de frecuencia y un tacómetro (Figura

21a; 2, 3) para establecer y monitorear la velocidad de rotación del eje y la paleta durante los experimentos.

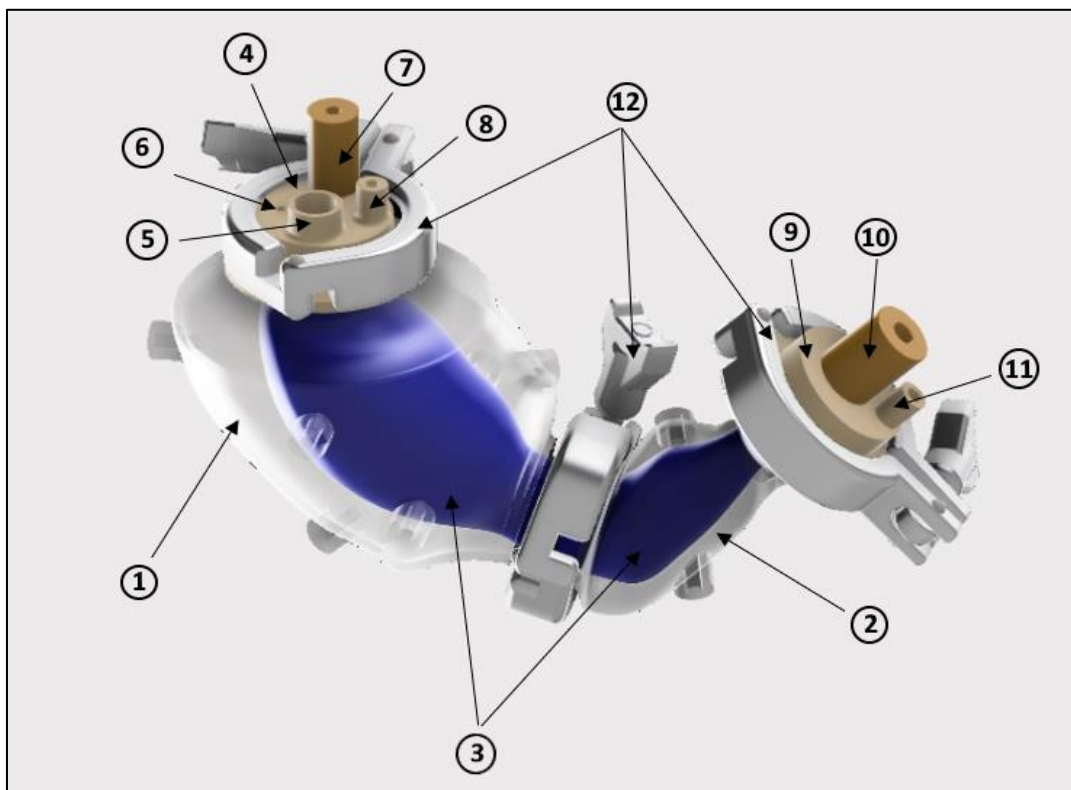


**Figura 21. (a) Esquema del montaje experimental para el aparato 2 USP: (1) Motor; (2) Tacómetro; (3) Regulador de frecuencia; (4) Mesa óptica; (b) Sistema de recirculación: (1) Bomba de agua; (2) Sensor de temperatura; (3) Termostato; (4) Resistencia eléctrica (Elaboración propia).**

#### 4.4.2 Modelo dinámico: IV-DGS

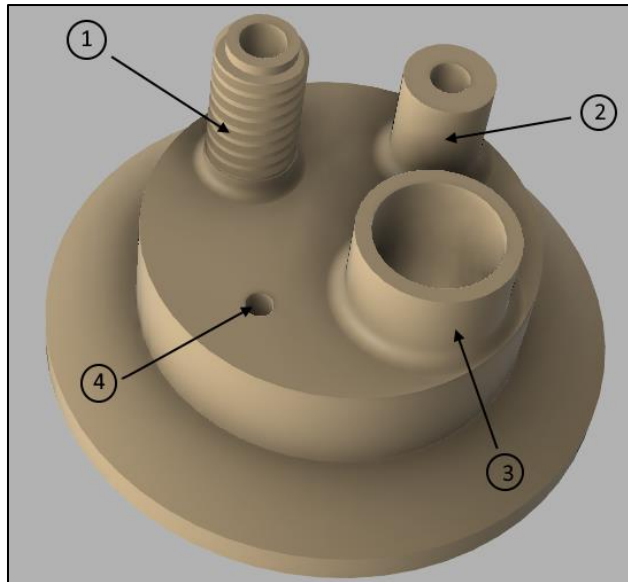
El modelo IV-DGS (Donis et al., 2022) consistió en dos cámaras traslúcidas y huecas (Figura 22; 1, 2), fabricadas mediante el proceso de colada al vacío de resina de poliuretano. En su interior se ubicaron membranas transparentes y blandas de silicona, que emularon las paredes gástricas. Estas membranas, al contraerse y expandirse, adaptaron la forma geométrica del IV-DGS, limitada por las paredes de las cámaras, como se muestra en la Figura 22; 3. Las contracciones peristálticas se lograron alternando la presión en las cámaras A y B, utilizando agua como fluido de trabajo. Para controlar la presión en las cámaras, se tenían diez puertos de entrada/salida en el IV-DGS (siete puertos para la cámara A y tres para la cámara B). En la parte superior del modelo se ubicó la tapa superior (Figura 22; 4), que contó con cuatro puertos de entrada: uno para la dosificación del comprimido de prednisona (Figura

22; 5), otro para suministrar el medio de disolución hacia las membranas (Figura 22; 8), y los otros dos para registrar parámetros como la temperatura mediante un termistor (Figura 22; 6) y medir la presión interna de las membranas a través de un catéter de manometría esofágica modelo GIM-6000E, introducido por el conector roscado (Figura 22; 7). En la parte inferior del modelo se ubicó la tapa inferior, que presentó un puerto de salida para la toma de muestras de disolución (Figura 22; 11). Las cámaras y las tapas se unieron mediante abrazaderas sanitarias de acero inoxidable tipo Tri-Clamp, junto con un empaque para garantizar la hermeticidad (Figura 22; 12).



**Figura 22. Vista renderizada del modelo IV-DGS: (1) Cámara A; (2) Cámara B; (3) Membranas A y B; (4) Tapa superior; (5) Puerto para comprimidos de fármaco; (6) Puerto para sensor de temperatura; (7) Puerto para catéter de presión; (8) Puerto para medio de disolución; (9) Tapa inferior; (10) Puerto para medidor de pH; (11) Puerto para toma de muestras; (12) Abrazadera sanitaria de acero inoxidable (Elaboración propia adaptado del diseño Donis et al, 2022).**

Se realizó una adaptación de la tapa superior del modelo para realizar la prueba, con el fin de tener un puerto de entrada de dosificación de la tableta de prednisona y otro puerto para alimentar el medio de disolución, se manufacturo mediante el proceso de manufactura aditiva (Figura 23).



**Figura 23. Vista renderizada de la tapa superior: (1) Puerto para catéter de presión; (2) entrada del medio de disolución; (3) entrada de la tableta del fármaco; (4) puerto para el sensor de temperatura (Elaboración propia).**

#### **4.4.2.1 Requerimientos del modelo IV-DGS para desarrollar la PVT**

Para realizar la PVT en el IV-DGS, fueron necesarios los siguientes requerimientos: la fabricación de membranas flexibles para el modelo, la medición de presión interna en el modelo del simulador gástrico y la determinación del volumen del medio de disolución.

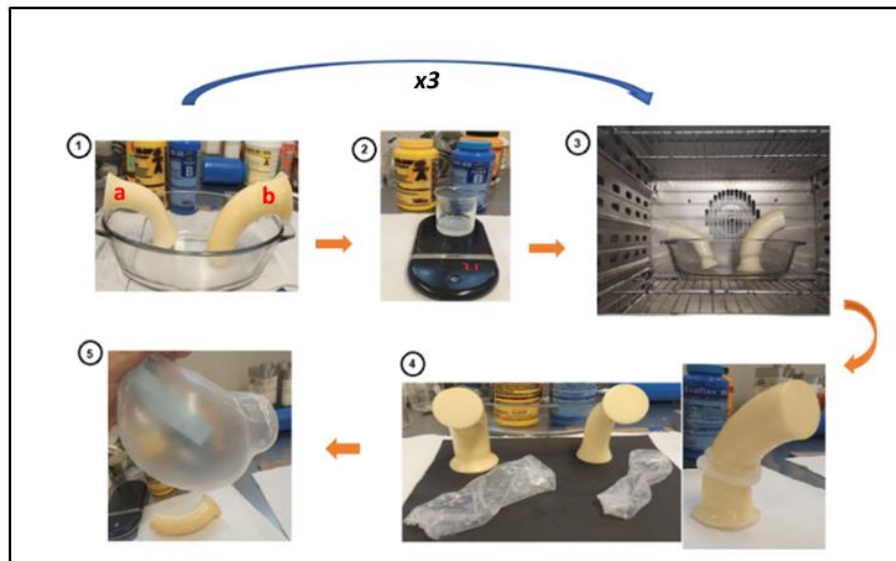
##### **4.4.2.1.1 Fabricación de membranas flexibles**

Se fabricaron nuevas membranas para cada prueba con el fin de evitar la contaminación cruzada de prednisona entre los experimentos, evitando así la transferencia involuntaria de residuos de prednisona de una prueba a otra. Esto previno posibles alteraciones en los resultados, concentraciones erróneas y la eventual afectación de la validez de los experimentos.

Para fabricar las membranas flexibles se utilizaron dos moldes con geometría en forma de “J”, Se utilizó un molde para la cámara A (Figura 24; 1b) y otro para la cámara B (Figura 24; 1a). Las membranas se elaboraron con caucho de silicona Ecoflex® 00-30 (Smooth On, Inc.), compuesto por dos partes, A y B, mezcladas en una proporción 1:1, es decir, se pesaron 3.5 mg de cada parte en una balanza analítica y se mezclaron durante 30 segundos (Figura 24; 2). Para la primera capa, se limpiaron los moldes con alcohol isopropílico antes de cubrirlos con la mezcla de Ecoflex® de manera uniforme utilizando una espátula. Para el proceso de curado se colocaron en el horno de convección<sup>11</sup> BINDER a 66 °C durante 10 minutos (Figura 24; 3).

<sup>11</sup> El horno de convección BINDER utiliza un ventilador o un sistema de circulación de aire para distribuir de manera uniforme el calor dentro la cámara del horno.

Este proceso de recubrimiento y curado se repitió por triplicado para asegurar un grosor adecuado. Al finalizar, las membranas se retiraron del molde cuidadosamente para evitar daños físicos como rasgaduras (Figura 24; 4, 5) y se almacenaron en pares para su posterior uso en las PVTs.



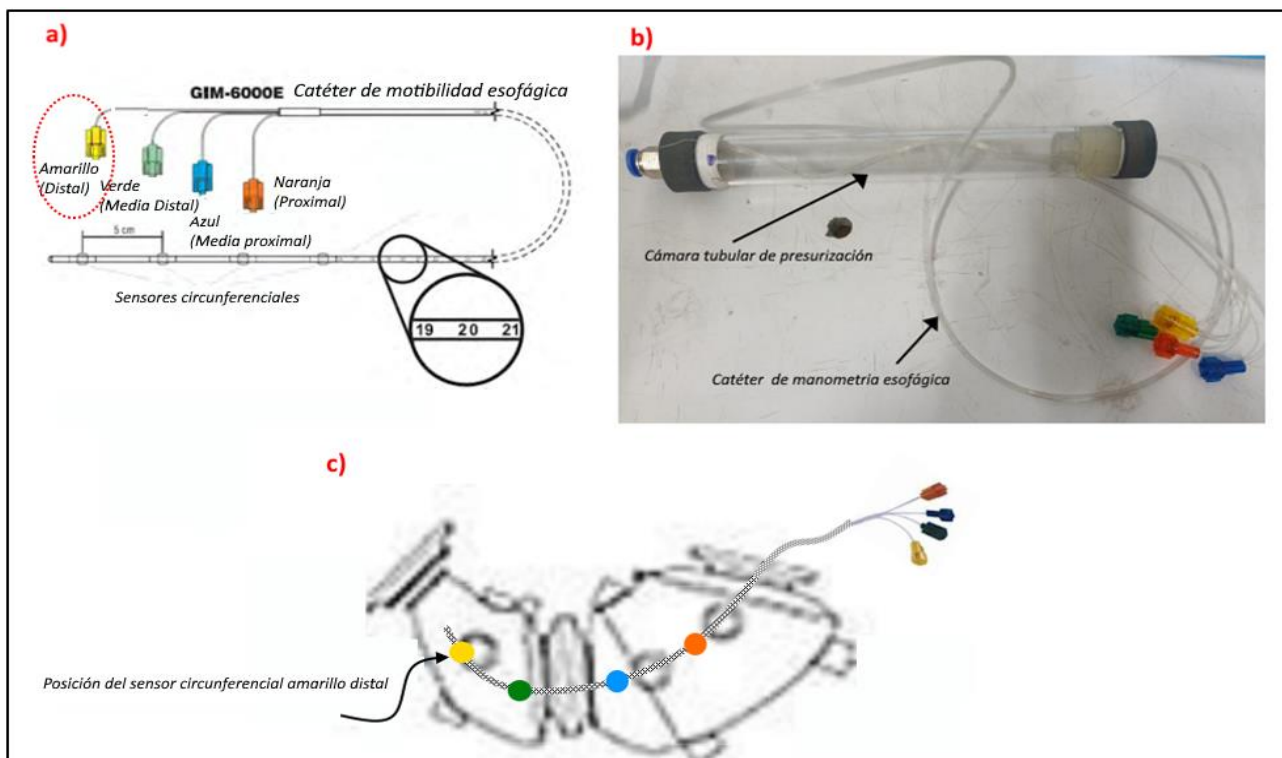
**Figura 24. Procedimiento de fabricación de membranas flexibles (1a) Membrana pequeña para la cámara B; (1b) Membrana grande para la cámara A del modelo IV-DGS; (2) Mezcla 1:1 del Ecoflex 00-30; (3) Curación de las membranas en el horno de convección; (4) Desmolde de las membranas; (5) Verificación de funcionamiento (Elaboración propia).**

#### 4.4.2.1.2 Medición de presión

Un aspecto clave del modelo IV-DGS fue la medición de la presión interna dentro de las membranas para asegurar que el sensor responda de manera adecuada a las variaciones de presión durante el proceso de disolución, evitando errores en la evaluación de las condiciones dinámicas del modelo, por lo que se realizó la medición con el catéter de manometría esofágica (GIM-6000E) mostrado en la Figura 25a para visualizar los perfiles de presión (propulsión y retropulsión) de la parte distal del IV-DGS en tiempo real mediante un osciloscopio.

Se realizaron seis experimentos para confirmar la repetibilidad de los resultados, en cada prueba se mantuvieron diferentes presiones, las cuales fueron medidas con un manómetro digital. Estas presiones se aplicaron a una cámara tubular de presurización, se colocó en la parte interna el catéter de manometría y sellada en los extremos con un tapón de silicón para no tener fuga de aire (Figura 25b). Esta cámara estaba conectada a un sensor de presión y un voltímetro para registrar los datos obtenidos, lo que permitió establecer una correlación entre las lecturas de presión y de voltaje registradas (Apéndice B).





**Figura 25. (a) Esquema del catéter de manometría esofágica, (b) Caracterización de presión y c) Posición del sensor circunferencial amarillo en el IV-DGS (Elaboración propia).**

#### 4.4.2.1.3 Determinación del volumen del medio de disolución

Se determinó el volumen gástrico del medio de disolución en el IV-DGS bajo condiciones fisiológicas, donde se verificó que el volumen del medio fuera suficiente para cumplir con la condición de "sumidero". Esta condición establece que la concentración del soluto en el medio debe ser lo suficientemente baja para evitar la saturación del medio de disolución. En conformidad con el capítulo 1092 de la USP, el volumen del medio ( $V$ ) debe ser al menos tres veces mayor que el requerido para formar una solución saturada ( $V_{sat}$ ) del fármaco, es decir, debe cumplir que  $\frac{V}{V_{sat}} \geq 3$ .

Primero se necesitó conocer la solubilidad de la prednisona en el medio de disolución (agua destilada) para calcular  $V_{sat}$ , la solubilidad de la prednisona en agua es ligeramente soluble ( $< 1$  mg/mL), y específicamente a  $37$  °C su solubilidad es aún menor de aproximadamente  $0.2$  mg/mL, información obtenida de fuentes como: (DrugBank, 2023; PubChem, 2023; Merck Index, 2017). El volumen de saturación  $V_{sat}$  se calculó usando la siguiente ecuación (1):

$$V_{sat} = \frac{\text{Cantidad de prednisona}}{\text{Solubilidad}} = \frac{10 \text{ mg}}{0.2 \text{ mg/mL}} = 50 \text{ mL} \quad (1)$$

Por lo tanto, el volumen de saturación es de  $50$  mL.

Para cumplir con la condición de sumidero, se multiplicó por tres el  $V_{sat}$  :

$$V = 3 \times 150 \text{ mL} = 450 \text{ mL}.$$

Así, el volumen de disolución necesario para disolver 10 mg de prednisona bajo condiciones de sumidero fue de 450 mL de medio de disolución.

Finalmente, se verificó que esta afirmación fuera correcta, por lo que se demostró que:

$$\frac{V}{V_{sat}} = \frac{450 \text{ mL}}{150 \text{ mL}} \geq 3$$

Con base en lo mencionado anteriormente, se determinó que el volumen de disolución para el modelo IV-DGS podría ser de 450 mL. Este volumen cumplió con la condición de sumidero necesaria para evitar la saturación del medio de disolución, garantizando que 10 mg de prednisona se disolvieran en el medio seleccionado (agua destilada) bajo condiciones fisiológicas. Cabe mencionar que una de las limitantes del rango en cuanto al volumen máximo del medio de disolución de esta prueba fue el diseño establecido del simulador IV-DGS por Donis-Rabanales (2022), ya que el rango máximo permitido por el diseño fue de 256 mL.

#### 4.4.2.2 Montaje experimental del IV-DGS

Al cumplir con los requerimientos del modelo IV-DGS mencionados anteriormente, se realizó el montaje experimental de la siguiente forma: (1) se introdujeron las membranas flexibles en las cámaras correspondientes del modelo IV-DGS, es decir, la membrana A en la cámara A y la membrana B respectivamente. (2) Se acomodó el sensor circunferencial del catéter de manometría esofágica en la parte distal del modelo y se unieron las cámaras con abrazaderas sanitarias, así como la tapa superior e inferior.

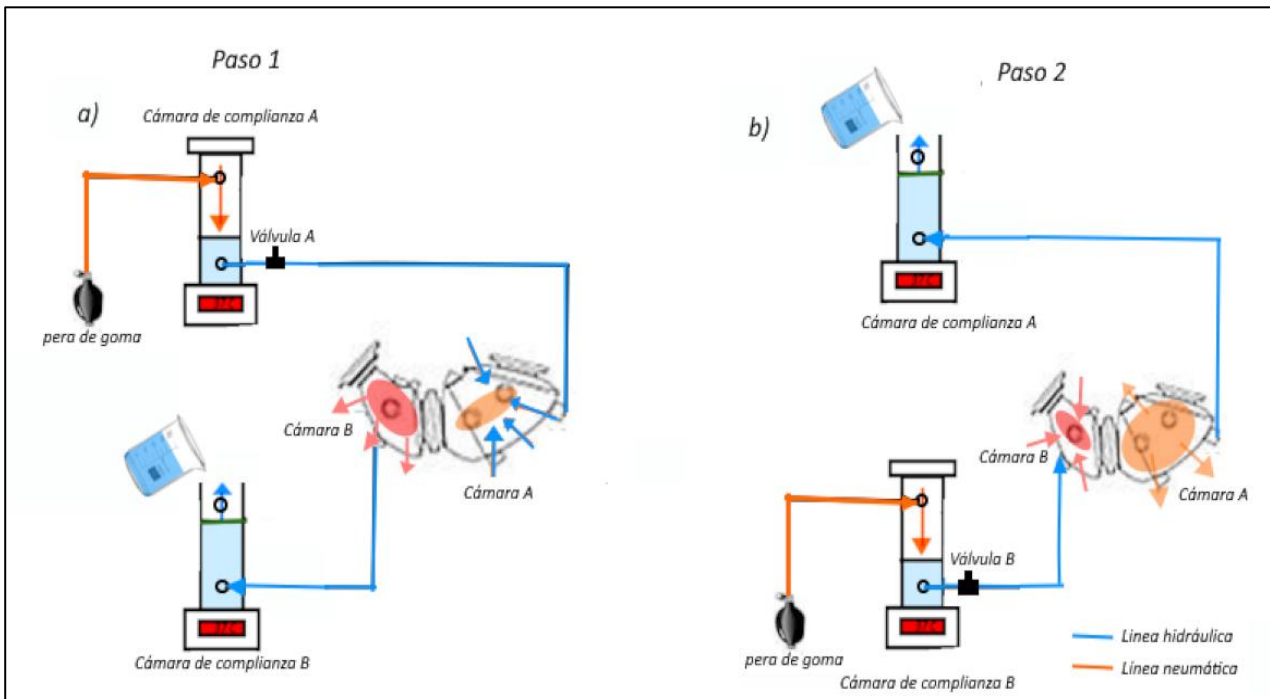
(3) El simulador utilizó cámaras de complianza<sup>12</sup> para convertir la presión neumática en presión hidráulica, lo que le permitió comprimir y expandir alternadamente las membranas al interior del modelo para replicar las ondas peristálticas, así como replicar los flujos de propulsión y retropulsión gástrica, por lo cual, se llenaron las cámaras de complianza con agua y encendieron las resistencias eléctricas para alcanzar una temperatura de  $37 \pm 0.4$  °C. (4) Se incorporó el medio de disolución previamente calentado a  $37 \pm 0.4$  °C por la parte superior del modelo. (5) Se nivelaron manualmente los niveles de agua (que circula al exterior de las membranas) en las cámaras de complianza A y B, para evitar el retorno de agua hacia el sistema de control durante la operación del simulador. Para ello, se desconectaron las mangueras de las electroválvulas A y B, las mangueras se conectaron a una pera de goma para ajustar los niveles de agua. Primero, se conectó la manguera de la cámara de complianza A y se presurizó aire para desplazar el volumen de agua hacia dicha cámara, lo que provocó la

---

<sup>12</sup> Al referirse a cámaras de complianza en este proyecto se entiende como una cámara hidroneumática que emula la expansión de las paredes gástricas, es decir, las membranas flexibles.



contracción de la membrana A y la expansión de la membrana B. Luego, se cerró la válvula A para ajustar el nivel de agua hasta la marca de la cámara de complianza B y con el nivel ajustado, se abrió nuevamente la válvula A (Figura 26a). Para nivelar la cámara de complianza A, se conectó la manguera con la pera de goma en la cámara de complianza B para desplazar el agua hacia esta, comprimiendo con cuidado la membrana B, ya que podría romperse. Finalmente, se cerró la válvula B y se ajustó el nivel de agua hasta la marca de la cámara de complianza A (Figura 26b) en este paso, se reconectaron las mangueras a las electroválvulas A y B, alineándolas con su respectiva cámara de complianza para completar el cierre del sistema.



**Figura 26. Niveles de agua en la a) cámara de complianza A y b) cámara de complianza B (Elaboración propia).**

(6) Los parámetros utilizados para la realización de las pruebas en este trabajo fueron: La presión de trabajo de la unidad de mantenimiento (Modelo 1B-AC201A-M, Guss-Roch), la cual se reguló a 2 bar. Para controlar la presión en las cámaras de complianza de forma independiente, el aire proveniente de la unidad de mantenimiento se dividió en dos líneas; cada línea se conectó a un regulador electroneumático (Modelo ITV0030, SMC Pneumatics), que permitió ajustar la amplitud de los perfiles de presión dentro de rangos fisiológicos entre 1 y 30 mmHg, en donde se fijó la presión del regulador electroneumático A en 205.80 mmHg y la del regulador electroneumático B en 95.55 mmHg, mediante un panel de control digital; para el control del flujo del caudal y ajustar la forma de la onda de presión se utilizaron válvulas de aguja (Modelo 1E-NSF-08), situadas después de los reguladores electroneumáticos. Estas válvulas se ajustaron manual e individualmente, basándose en los datos obtenidos de los sensores de presión, hasta alcanzar la amplitud y forma de onda

deseada, esa posición se mantuvo durante todos los experimentos. Por último, para generar la presurización alternada en las cámaras de complianza, se configuró una secuencia de contracciones con un tiempo de activación de la electroválvula A de 10 s, seguido de un tiempo de espera de 2 s y un tiempo de activación de la electroválvula B de 7 s, con un tiempo de espera final de 1 s de acuerdo con el trabajo de Donis-Rabanales (2022) menciona que estos tiempos de espera se establecieron para evitar la succión de la membrana B hacia la cámara A, con el objetivo de generar 3 contracciones por minuto, emulando el ritmo natural de las contracciones gástricas. Al ser presurizadas alternadamente, las cámaras de complianza desplazaron el volumen de agua destilada hacia las cámaras del simulador. Con esta configuración, se repitió la secuencia para generar la actividad contráctil.

Se propuso utilizar agua destilada como medio de llenado de las cámaras de complianza para evitar la sedimentación de minerales en las paredes de las cámaras de complianza y del modelo, ya que esto podría dificultar la visibilidad del proceso del nivel de agua y disolución con el paso del tiempo, en comparación con el uso de agua corriente. El montaje experimental obtenido se muestra en la Figura 27.

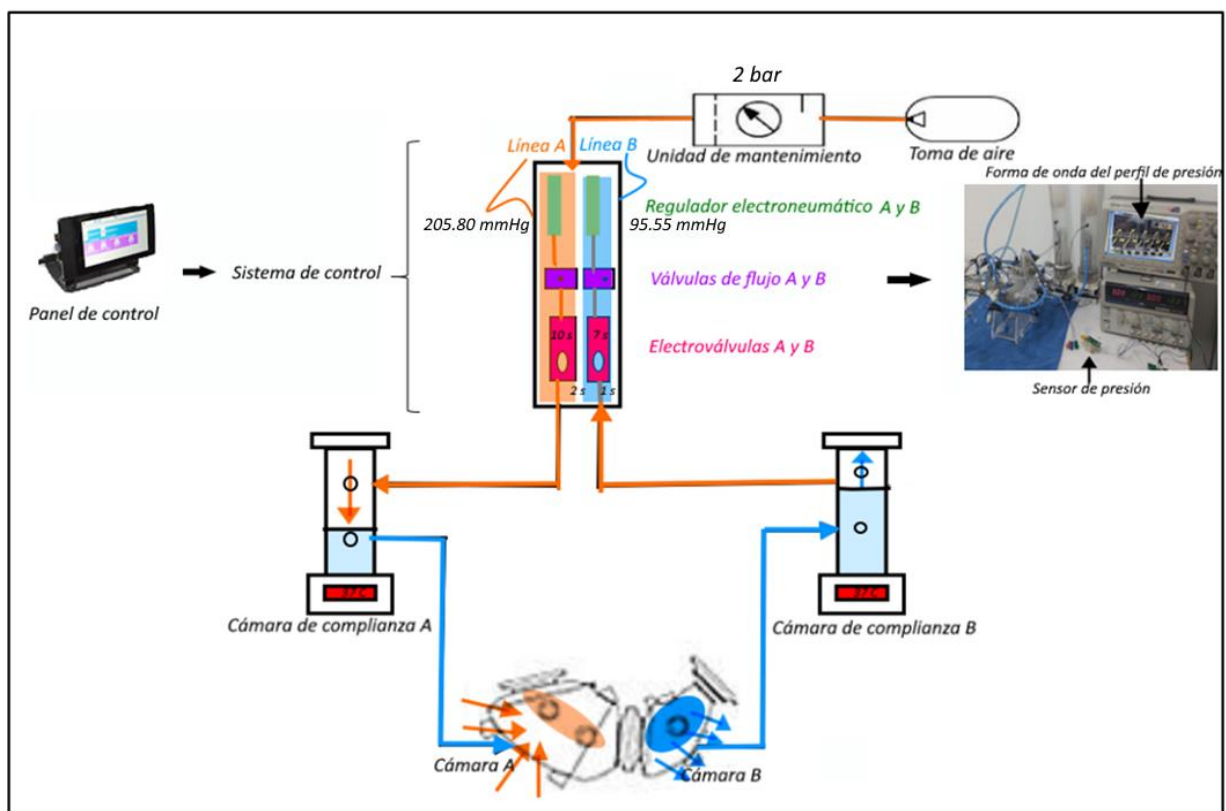


Figura 27. Montaje experimental del modelo IV-DGS (Elaboración propia).

#### 4.5 Validación instrumental de los métodos analíticos

Antes de realizar la PVT, se validaron ambos métodos analíticos para garantizar la obtención de datos confiables y comparables entre laboratorios, minimizando errores y cumpliendo con

los criterios estandarizados. La validación se realizó conforme a los parámetros de desempeño y los criterios de aceptación recomendados en los capítulos 1225 y 1092 de la USP, titulados “Validación de Procedimientos Farmacopeicos” y “Procedimiento de Disolución: Desarrollo y Validación”, respectivamente. Además, se complementó con el Apéndice III de la FEUM, “Validación de Métodos Analíticos”.

#### **4.5.1 Preparación de las soluciones de referencia del estándar de prednisona**

Primero, se preparó la solución madre o solución stock del estándar de prednisona con 98% de pureza (Sigma Merck) con el objetivo de realizar diluciones a diferentes concentraciones y generar las soluciones de referencia (Figura 28) necesarias para obtener la curva de calibración en cada prueba de los parámetros de desempeño de los métodos analíticos.

##### **a) Solución madre de prednisona**

1. En una balanza analítica se pesaron 14.6 mg del material estándar de prednisona Sigma-Aldrich en un reloj de vidrio.
2. Se agregaron los 14.6 mg de prednisona previamente pesados a un matraz volumétrico de 10 mL con metanol y se llevó al aforo. Posteriormente, se agitó manualmente para asegurar una disolución completa, obteniendo una solución con una concentración de 1460 mg/L.
3. La pureza del estándar de prednisona al 98%, fue tomada en cuenta para ajustar la concentración teórica. Por ello, se multiplicó el valor de 1460 mg/L por 0.98, obteniendo una concentración real de 1430.8 mg/L.
4. La solución se transvasó a un frasco de vidrio color ámbar, etiquetado con la fecha, nombre y la concentración de la solución.
5. Finalmente, se almacenó en el refrigerador del laboratorio (se debe tomar en cuenta que, para su uso, la solución debe estar a temperatura ambiente).

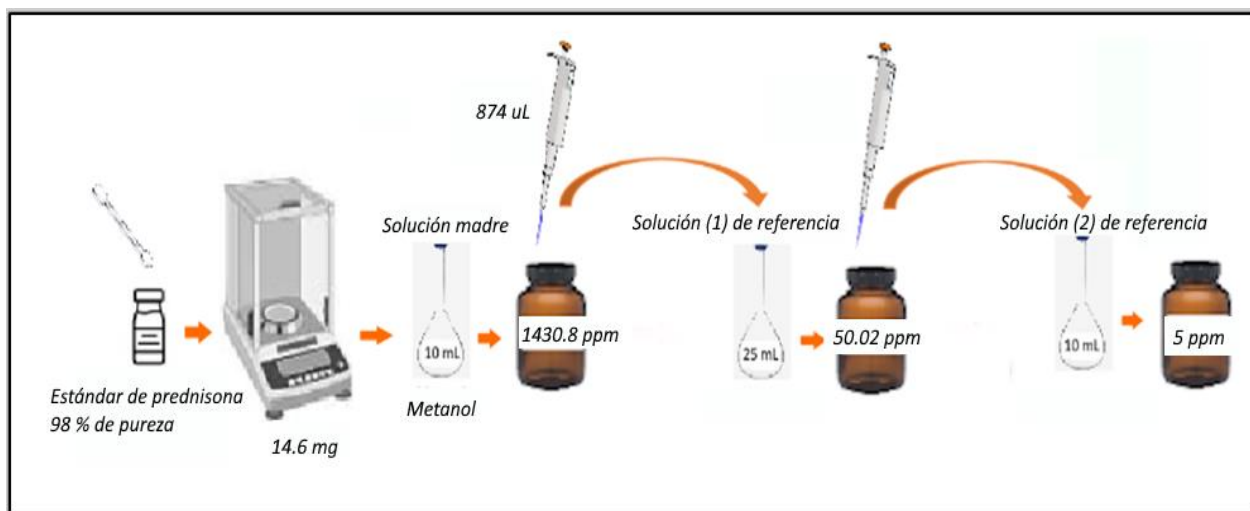
##### **b) Solución de referencia para la curva de calibración en el método HPLC MS/MS**

###### **b-1) Solución (1) de referencia de 50 mg/L**

1. De la solución madre de prednisona de 1430.8 mg/L, se tomó una alícuota de 874  $\mu\text{L}$  con una micropipeta y se colocó en un matraz volumétrico de 25 mL.
2. Se llevó a volumen de aforo con medio de disolución, es decir, con agua destilada filtrada y deairada para obtener una concentración real de 50.02 mg/L por el ajuste de la pureza.
3. Se transvasó la dilución en un frasco de vidrio color ámbar, etiquetado con la fecha, nombre y la concentración de la dilución.

### **b-2) Solución (2) de referencia de 5 mg/L**

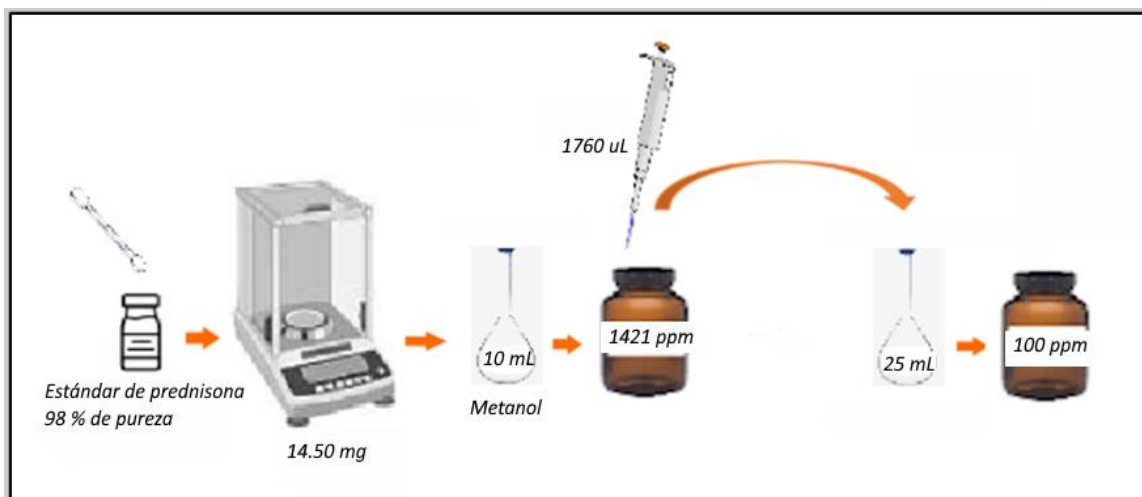
1. De la solución (1) de referencia de 50.02 mg/L, se tomó una alícuota de 1000  $\mu\text{L}$  con una micropipeta y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL.
2. Se llevó a volumen de aforo con medio de disolución, es decir, con agua destilada filtrada y deairada para obtener una concentración final de 5 mg/L.
3. Se transvasó la dilución en un frasco de vidrio color ámbar, etiquetado con la fecha, nombre y la concentración de la dilución.



**Figura 28. Esquema de la preparación de la solución madre de estándar de prednisona y soluciones de referencia (1) y (2) para el método HPLC MS/MS (Elaboración propia).**

### **c) Solución de referencia de 100 mg/L para la curva de calibración en el método UV-Vis**

1. En una balanza analítica se pesaron 14.5 mg del material estándar de prednisona Sigma-Aldrich en un reloj de vidrio.
2. Se preparó una solución madre de prednisona de 1450 mg/L. La pureza del estándar de prednisona al 98%, fue tomada en cuenta para ajustar la concentración teórica. Por ello, se multiplicó el valor de 1450 mg/L por 0.98, obteniendo una concentración real de 1421 mg/L.
3. Se tomó una alícuota de la solución madre de 1760  $\mu\text{L}$  con una micropipeta y se colocó en un matraz volumétrico de 25 mL.
4. Se llevó a volumen de aforo con medio de disolución, es decir, con agua destilada filtrada y deairada para obtener una concentración real de 100.04 mg/L.
5. Se transvasó la dilución en un frasco de vidrio color ámbar, etiquetado con la fecha, nombre y la concentración de la dilución (Figura 29).



**Figura 29. Esquema de la preparación de la solución de referencia para el método espectrofotómetro UV-Vis (Elaboración propia).**

#### 4.5.2 Características de desempeño para la validación de los métodos analíticos

Descripción del procedimiento realizado para evaluar los parámetros de desempeño durante la validación instrumental para ambos métodos analíticos. En el subtema 2.6, Tabla 5, se describieron los seis parámetros de desempeño que validan el rendimiento de los métodos analíticos. A continuación, se detalla en los incisos el procedimiento que se siguió para desarrollar cada parámetro.

##### a) Linealidad e intervalo de trabajo

**Método analítico HPLC MS/MS:** Para determinar el intervalo lineal y de trabajo se midieron por triplicado e individualmente 13 niveles de concentración, a partir de las soluciones de referencia de estándar de prednisona (1) y (2), de 50 mg/L y 5 mg/L respectivamente preparadas previamente, los niveles de concentración se prepararon de acuerdo con la curva de calibración que se muestran en el Apéndice C-1. La medición se realizó en un rango de concentración de 0.10 a 20.0 mg/L para el intervalo lineal. Se graficó el área bajo la curva en función de la concentración y mediante la inspección visual del gráfico, se determinó que el intervalo de trabajo sería entre 1.0 y 20 mg/L, ya que en este rango se observó un comportamiento lineal. Además, se graficaron los valores residuales dentro de este intervalo.

**Método analítico espectrofotometría UV-Vis:** Para determinar el intervalo de trabajo, se realizaron mediciones por triplicado e individualmente de 9 niveles de concentración, utilizando la solución estándar de prednisona de 100 mg/L de concentración preparada previamente, se prepararon de acuerdo con la curva de calibración mostrada en el Apéndice C-4. Las mediciones cubrieron un rango de concentración de 0.5 a 35 mg/L. Se graficó la absorbancia en función de la concentración, donde se observó un comportamiento lineal.

Además, se elaboró el gráfico de residuales dentro del intervalo de trabajo para confirmar la linealidad del modelo.

Para cada método analítico, se determinó la ecuación lineal mediante regresión lineal y se obtuvo el intervalo de confianza (IC, ecuación 2) tanto para la pendiente como para la ordenada al origen. Asimismo, se calculó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), con un criterio de aceptación entre  $0.98 < r^2 < 1.0$ .

$$I.C. = \bar{x} \pm t_{(\alpha, n-2)} * \frac{s}{\sqrt{n}}, \text{ es decir,} \quad (2)$$

*I.C. = valor de la pendiente o la ordenada al origen  $\pm$  error asociado.*

*Donde:*

$\bar{x}$  = Valor puntual del parámetro (la pendiente, la ordenada al origen o media)

$t$  = Valor de  $t$  – Student con  $n - 2$ , grados de libertad (Tablas  $t$  – Student, 2.06)

$\alpha$  = 0.05, es decir, al 95 % de confianza

$s$  = Desviación estándar

$n$  = Número de puntos de la curva de calibración

Asimismo, se verificó que la pendiente fuera estadísticamente diferente de cero, mediante una prueba  $t$ -Student (ecuación 3) con un intervalo de confianza de 95% a una cola.

$$H_0: \bar{x} = \mu$$

$$H_1: \bar{x} > \mu$$

$$t_0 = \frac{(\bar{x} - \mu)\sqrt{n}}{s} \quad (3)$$

*Donde:*

$\bar{x}$  = valor de la pendiente

$t_0$  = Valor de  $t$  – Student para comparar con la  $t_c$  (crítica)

$\mu$  = Media de referencia

$s$  = Desviación estándar

$n$  = Número de puntos de la curva de calibración

Se determinó que el intervalo de trabajo fuera la curva de calibración utilizada tanto en el análisis de las muestras PVT como en la validación del método. Es importante destacar que, cada vez que se realizó un análisis de las muestras en cada método, se preparó una nueva curva de calibración (ver Apéndice C; 1 y 4).

### **b) Selectividad**

**Método analítico HPLC MS/MS:** La selectividad del método analítico se determinó mediante una comparación visual entre los cromatogramas obtenidos del medio de disolución y una muestra tomada del aparato 2 de la USP, con una concentración aproximada de 1.0 mg/L de prednisona. Se verificó que no hubiera interferencia en la señal, lo que confirma la capacidad del método para distinguir el analito del medio de disolución.

**Método analítico espectrofotometría UV-Vis:** Se determinó mediante comparación visual de los espectros de absorción UV del medio de disolución con respecto al espectro de absorción UV obtenido de una muestra tomada del aparato 2 USP, con una concentración aproximada de 10 mg/L de prednisona. Los espectros de onda deben exhibir máximos de absorbancia en la misma longitud de onda.

### **c) Exactitud**

Para cada método se graficó la concentración real de prednisona en función de la concentración esperada a lo largo de todo el intervalo de trabajo. Mediante regresión lineal se obtuvo el valor de la pendiente y su intervalo de confianza (ecuación 2), el cual debe incluir el valor de la unidad para establecer que el método es exacto.

### **d) Precisión**

Se evaluó la precisión de ambos métodos analíticos mediante *repetibilidad* y *reproducibilidad* mediante mediciones realizadas por la misma analista en diferentes días para cada método analítico. Se analizaron por triplicado y de manera independiente tres niveles del intervalo de trabajo (inferior, medio y superior), determinando el porcentaje de recuperación ecuación (4) para cada medición y su desviación estándar relativa (DER)<sup>13</sup>, ecuación (5). Se considera repetibilidad cuando en un mismo día se obtienen valores similares y reproducibilidad cuando en ambos días las 18 mediciones en conjunto son similares. De acuerdo con el capítulo 1092 de la USP, el criterio de aceptación establece un % DER ≤ 2 y un porcentaje de recuperación entre el 95 al 105 %.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{c_r}{c_a} * 100 ; \quad (4)$$

Donde:

$C_r$  = Concentración recuperada o estimada de la muestra

$C_a$  = Concentración adicionada o real de la muestra

---

<sup>13</sup> En este proyecto se entiende al coeficiente de variación (CV) como la desviación estándar relativa (DER) según la FEUM.

$$\% DER \text{ o } CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad (5)$$

Donde:

$s$  = Desviación estándar

$\bar{x}$  = Media de cada nivel de concentración

### 4.5.3. Validación del sistema de disolución

La validación del sistema se refiere a la evaluación de los modelos, es decir, el modelo estático y el modelo dinámico. Este proceso incluye la verificación de la compatibilidad del filtro con el medio de disolución y la evaluación de los parámetros de precisión. Estas pruebas se llevaron a cabo en las etapas preliminares de cada modelo utilizando prednisona estándar Sigma-Aldrich para la compatibilidad del filtro y prednisona genérica de la marca Farmacia del Ahorro para las pruebas de precisión (ver subtemas 4.6.3 y 4.6.4).

#### **Compatibilidad del filtro**

La filtración de la muestra, tuvo como objetivo detener el proceso de disolución de la prednisona, además de eliminar el fármaco y los excipientes no disueltos de la disolución retirada, con la finalidad de evitar resultados sesgados. Para la filtración de las muestras, de acuerdo con el capítulo 1092 de la USP, se utilizó un filtro de jeringa de nylon tipo PVDF con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Se prepararon tres concentraciones por triplicado y de manera independiente dentro del intervalo de trabajo, tanto para el HPLC MS/MS como para el UV-Vis. Primero se midieron las muestras sin filtrar y posteriormente las muestras filtradas, comparando las muestras del medio de disolución filtrado con el medio sin filtrar. La diferencia absoluta de la adherencia del filtro se calculó con la ecuación (6), la cual debe ser menor al 1%.

$$\% \text{ Adherencia del filtro} = \left| \frac{C_{SF} - C_{CF}}{C_{SF}} \right| * 100 \quad (6)$$

Donde:

$C_{SF}$  = Concentración de la muestra sin filtro

$C_{CF}$  = Concentración de la muestra con filtro

### 4.6 Pruebas preliminares y protocolo experimental de la PVT

Como se ha descrito anteriormente para la realización de la prueba experimental PVT, se requirieron de dos pasos: (1) La filtración del medio de disolución y (2) la deaireación del medio de disolución.



#### 4.6.1 Filtración del medio de disolución

Para el desarrollo de la PVT en ambos modelos de disolución, fue necesario filtrar el medio de disolución con el fin de obtener resultados exclusivos de la prednisona, eliminando cualquier interferencia. Se filtró el medio de disolución con un equipo de microfiltración de vidrio al vacío MFS (Micro Filtration Systems), con una membrana de nylon de tamaño de poro de  $0.45 \mu\text{m}$  y un diámetro de filtrado de 47 mm marca StoryLab®, conectado a una bomba de vacío (Figura 30).



*Figura 30. Imagen del sistema de filtración (a) equipo de microfiltración; (b) Bomba de vacío (Elaboración propia).*

#### 4.6.2 Deaireación del medio de disolución

Para la deaireación del medio de disolución se utilizó agua destilada, tal como lo indicaba el certificado de la tableta estándar de referencia de prednisona USP. La presencia de gases disueltos en el medio de disolución podía causar la formación de burbujas, lo que podría haber alterado los resultados de la prueba, ya que durante la disolución se habrían generado tres fases (líquida, gaseosa y sólida), aumentando el riesgo de que el fármaco no se disolviera correctamente o quedara atrapado en las burbujas.

**Método de deaireación:** Se calentó un volumen adecuado del medio de disolución filtrado (600 mL para el aparato 2 USP y 200 mL para el IV-DGS) a una temperatura entre  $41^{\circ}\text{C}$  a  $45^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se incorporó en una cámara de vacío durante 2 minutos. Dependiendo del modelo utilizado, el medio de disolución se transfirió a un matraz volumétrico y se aforó a 500 mL para el aparato 2 USP y para el IV-DGS a 100 mL y 50 mL. Inmediatamente, se

añadió el medio deairado en los modelos y se esperó hasta alcanzar los 37 °C en los sistemas correspondientes para iniciar la PVT.

Se realizó una prueba de deaireación, ya que se ha demostrado que los niveles de oxígeno disuelto no deben superar las 6 ppm. Se prepararon, por triplicado e individualmente, tres muestras de medio de disolución utilizando el método de deaireación mencionado anteriormente y tres muestras sin aplicar dicho método. Posteriormente, se midieron los niveles de oxígeno disuelto en las muestras con un medidor METTLER TOLEDO  $O_2$  4100e y un analizador de oxígeno disuelto portátil D09100 (Figura 31), y se compararon los resultados obtenidos entre ambos grupos.

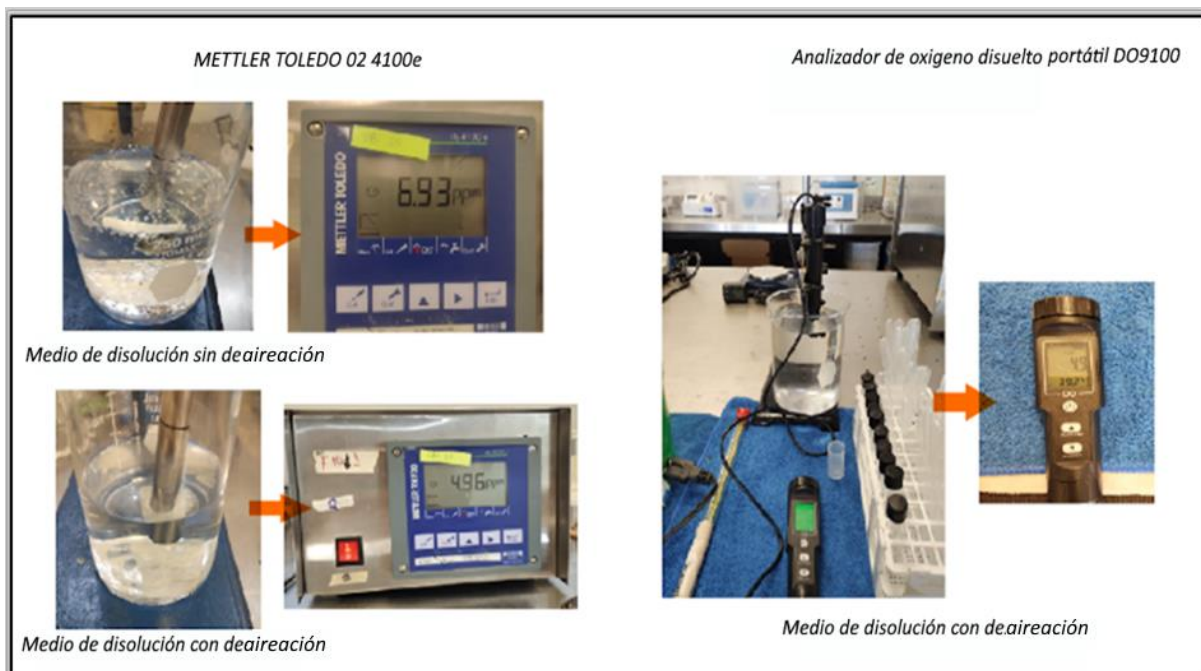


Figura 31. Imagen de la prueba de deaireación (Elaboración propia).

#### 4.6.3 Desarrollo de la PVT en el modelo estático, aparato 2 USP

##### a) Especificaciones

Las especificaciones para el aparato 2 de la USP, se establecieron de acuerdo con el certificado de la tableta de prednisona DPVS de 10 mg, con base en la prueba denominada de dos etapas para la PVT. Las especificaciones se mencionan a continuación:

- *Velocidad de rotación:*  $50 \pm 1$  rpm.
- *Temperatura:*  $37 \pm 0.4$  °C.
- *Tiempo de muestreo:*  $30 \text{ min} \pm 36$  s.
- *Medio de disolución:*  $500 \text{ mL} \pm 1\%$  de agua destilada, filtrada y deaireada.
- *Primera etapa de dos para la PVT:* 6 pruebas.
- *Condición instrumental para el espectrofotómetro UV-Vis:* Longitud de onda analítica aproximadamente 242 nm.

### ***b) Pruebas preliminares de la PVT con medicamento genérico***

Antes de llevar a cabo la PVT con tabletas de prednisona DPPVS, se realizaron pruebas preliminares para familiarizarse con el procedimiento y optimizar los parámetros experimentales. Este enfoque resultó fundamental, ya que las tabletas de prednisona RS son costosas en comparación con las tabletas de prednisona genéricas, por lo cual se buscó minimizar su uso innecesario de las tabletas de prednisona DPVS. Las pruebas preliminares permitieron adquirir la experiencia necesaria para asegurar la validez de los resultados y el correcto funcionamiento del método analítico, contribuyendo a la eficiencia de la PVT en las tabletas estándar y garantizando la precisión del aparato de disolución.

Se realizó el mismo procedimiento y especificaciones que se requieren para la PVT, con la única diferencia de que se dosificaron dos tabletas de prednisona genéricas de 5 mg de la marca Farmacia del Ahorro para alcanzar la equivalencia de 10 mg de una tableta de prednisona DPVS (Figura 32).

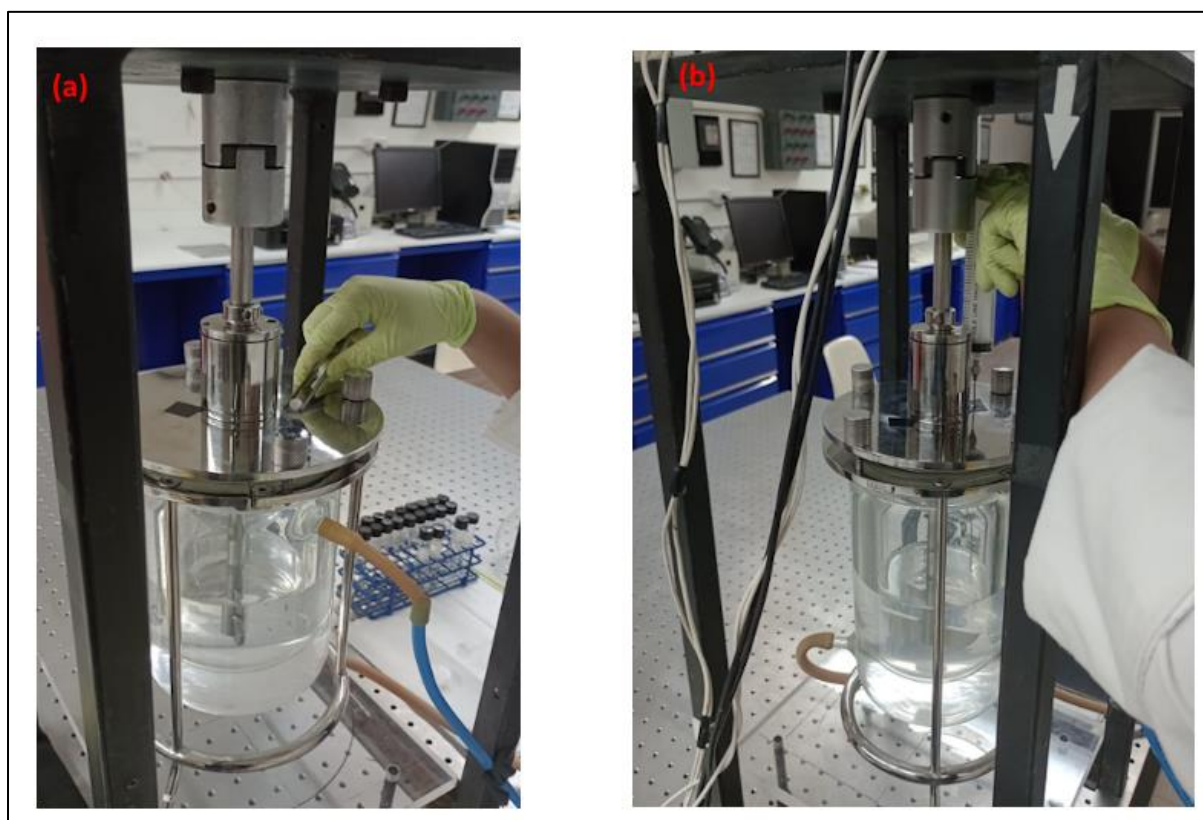


***Figura 32. Equivalencia en masa de las tabletas de prednisona (Elaboración propia).***

### ***c) Desarrollo de la PVT con el estándar de referencia de prednisona DPVS***

Se llevó a cabo la primera de dos etapas para la PVT, es decir, por sextuplicado y de manera independiente. Primero se conectaron las mangueras flexibles del sistema de recirculación al vaso de disolución y se encendió el sistema de recirculación del aparato de disolución. Se deairó el medio de disolución utilizando el método de deaireación (subtema 4.6.2) y se midió

el volumen con un matraz volumétrico de 500 mL, que se aforó. Luego, se inclinó el vaso de disolución aproximadamente a 45° y se vertió cuidadosamente el medio de disolución, evitando la formación de burbujas. Se colocó la tapa con el elemento de agitación y se verificó que la temperatura del medio de disolución fuera de 37 °C con un termómetro de mercurio. Se confirmó la temperatura deseada tomando dos lecturas continuas que no cambiaron dentro de 3 minutos y se dosificó la tableta de prednisona en una posición estandarizada (Figura 33a). Cuando la tableta llegó al fondo del vaso, se activó inmediatamente el motor y el cronómetro, iniciando así la prueba PVT. Posteriormente, se observó que la muestra estuviera directamente debajo del eje de la paleta y la caída de la tableta no formará burbujas de aire en su recorrido. Alcanzados los 30 minutos de análisis y continuando con la rotación del elemento de agitación, se tomó una muestra de 30 mL de la disolución con una jeringa y cánula entre la superficie del medio de disolución y la parte superior de la paleta, a no menos de 1 cm de la pared del vaso (Figura 33b), y se filtró la muestra utilizando un filtro de pirinola (PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$ ), desechando los primeros 5 mL del filtrado. Finalmente, se colocó la parte restante del filtrado en un tubo de ensayo, que se etiquetó y se dejó enfriar a temperatura ambiente para el análisis de concentración por HPLC MS/MS y espectrofotometría UV-Vis. Las muestras se analizaron en un intervalo de 24 horas.



**Figura 33. (a) Imagen de dosificación y (b) extracción de la muestra de la PVT (Elaboración propia).**

De acuerdo con la hoja de certificación de la tableta de prednisona DPVS, se determinó el porcentaje de masa disuelta de prednisona para cada tableta (ecuación 7) y su % CV (ecuación 5). El certificado de calibración de la tableta establece como criterio de aceptación que el

porcentaje promedio de prednisona disuelta debe estar dentro del intervalo de 48 a 57 %, con un % CV máximo de 4.6 %.

$$\% \text{ de masa de prednisona disuelta} = 500 \text{ mL} * \left( \frac{C(\text{mg})}{1000\text{mL}} \right) \left( \frac{100 \%}{10 \text{ mg}} \right) \quad (7)$$

Donde:

$C$  = Concentración recuperada por el método analítico

#### 4.6.4 Desarrollo de la PVT en el modelo dinámico, IV-DGS

##### **a) Especificaciones**

Para el IV-DGS, los parámetros se establecieron para una persona adulta en estado de alimentación con líquido, de acuerdo con el trabajo de Donis Rabanales (2023), titulado *Diseño de modelos dinámicos in vitro del sistema gastrointestinal*. Adicionalmente, se utilizó el mismo medio de disolución, tiempo de muestreo y la tableta de prednisona DPVS de 10 mg en los ensayos realizados para el aparato 2 de la USP.

- *Presiones en el compartimento distal:* entre 14 y 25 mmHg
- *Frecuencia de operación:* 3 cpm
- *Temperatura de operación:*  $37 \pm 0.4$  °C
- *Tiempo de muestreo:* 30 min  $\pm$  36 s.
- *Medio de disolución:* 150 mL  $\pm$  1% de agua destilada, filtrada y deaireada.
- *Primera etapa para la prueba de dos de la PVT:* 6 pruebas.
- *Condición instrumental para el espectrofotómetro UV-Vis:* Longitud de onda analítica aproximadamente 242 nm.

##### **b) Pruebas preliminares de la PVT con medicamento genérico**

Al igual que en el aparato 2 de la USP, antes de llevar a cabo la prueba PVT con la tableta estándar, se realizaron pruebas preliminares con el objetivo de familiarizarse con el simulador y verificar la repetibilidad del simulador con un volumen de 150 mL de medio de disolución. Se realizaron 6 experimentos en un solo día siguiendo el mismo procedimiento y especificaciones que para la PVT, con la única diferencia de que se dosificaron dos tabletas genéricas de prednisona de 5 mg de la marca Farmacia del Ahorro, para alcanzar la equivalencia de 10 mg de una tableta estándar. Durante esta prueba, se verificó que la forma de dosificación implementada fuera adecuada.

##### **c) Desarrollo de la PVT con el estándar de referencia de prednisona DPVS**

Se realizó el montaje experimental según lo descrito en el subtema 4.4.2.2. Antes de introducir el medio de disolución, se colocó la tableta estándar de prednisona USP en la parte



superior del modelo para evitar que el medio de disolución ascienda a través del puerto (Figura 34). Se verificó el volumen del medio de disolución utilizando matraces volumétricos de 100 mL y 50 mL, respectivamente. Con una jeringa y una manguera flexible conectada a la tapa superior, se introdujo cuidadosamente el medio de disolución deaireado, evitando la formación de burbujas y manteniendo una temperatura aproximada de 39 °C.



**Figura 34. Dosificación de la tableta estándar de prednisona USP (Elaboración propia).**

Posteriormente, se nivelaron manualmente los niveles de agua en las cámaras de complianza como se describe en el subtema 4.4.2.2. Una vez ajustados los niveles de las cámaras de complianza: (1) se verificó que las tapas de las cámaras sellaran en su totalidad, ya que al no tener un cierre adecuado se podría ver alterada la forma del perfil de presión observada en el osciloscopio, (2) se verificó en el panel de control que la temperatura del medio de disolución sea de  $37 \pm 0.4$  °C y las presiones de las líneas (A y B) sean de 205.80 y 95.55 mmHg para la respectivamente. Para dar inicio a la PVT, se dosificó la tableta de prednisona en el simulador, de manera inmediata, se cerró el sistema y se abrió la válvula B. En ese momento, se seleccionó la opción "on" en el panel de control y se encendió el cronómetro para medir el tiempo de la prueba. Transcurridos los 30 minutos de la prueba, se extrajeron 20 mL del medio de disolución, los cuales se desecharon con el fin de obtener una muestra única del proceso de disolución de inmediato se tomó una alícuota de 30 mL, la cual se filtró con un filtro de jeringa (tipo PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$ ), desechando los primeros 5 mL del filtrado, el resto se transfirió a un tubo de ensayo para su posterior análisis mediante los dos métodos analíticos. Se deben de cumplir los mismos criterios de aceptación que para el modelo estático, utilizando la ecuación (8).

$$\% \text{ de masa de prednisona disuelta} = 150 \text{ mL} * \left( \frac{C(\text{mg})}{1000\text{mL}} \right) \left( \frac{100 \%}{10 \text{ mg}} \right) \quad (8)$$

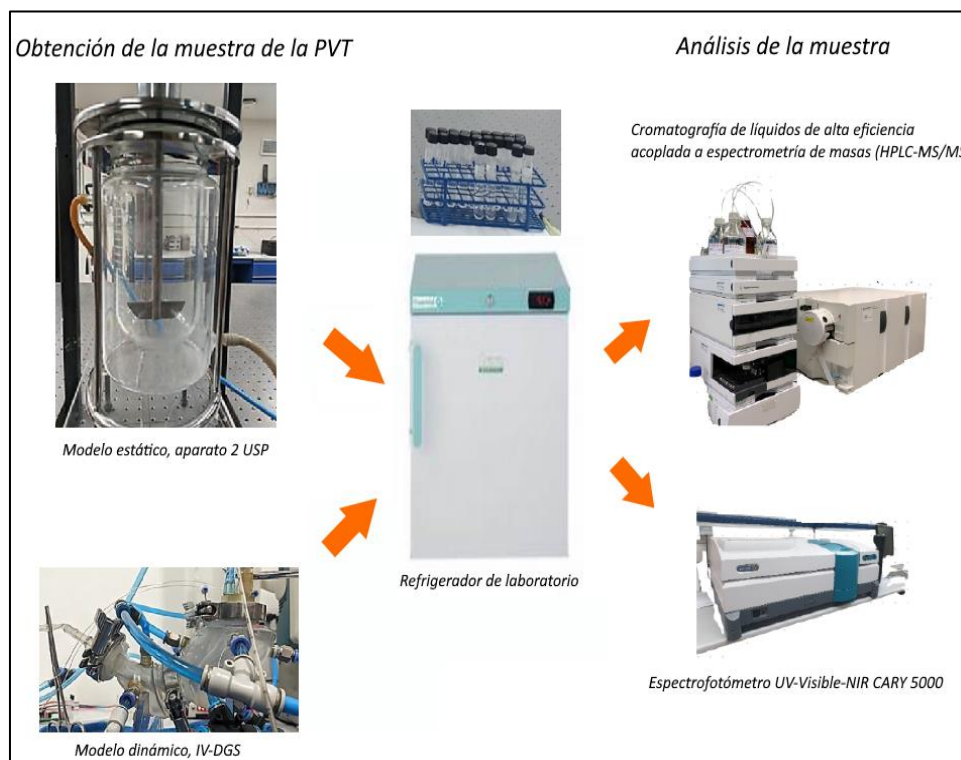
Donde:

$C$  = Concentración recuperada por el método analítico

#### 4.7 Análisis de las muestras

Para el análisis de las muestras, se utilizaron dos métodos analíticos: HPLC-MS/MS y espectrofotometría UV-Vis como se muestra en la Figura 35. El objetivo fue compararlos en el contexto de la validación de métodos analíticos y en la determinación del porcentaje de prednisona disuelta en el modelo estático y en el dinámico. Al finalizar la prueba PVT en cada modelo, las muestras se refrigeraron para mantener su estabilidad hasta completar las seis pruebas y se analizaron dentro de un intervalo de 24 horas. Para su traslado a los diferentes laboratorios de análisis, las muestras se envolvieron en papel aluminio, dado que agentes externos pueden deteriorarlas (luz solar). Es fundamental medir las muestras a temperatura ambiente, ya que tanto la cromatografía como la espectroscopia se ven influenciadas por la temperatura de la muestra.

Para ambos métodos analíticos, cada vez que se analizaron las muestras, se preparó una curva de calibración correspondiente para cada método (ver Apéndice C: 1 y 4).



**Figura 35. Análisis de muestras en los métodos analíticos (Elaboración propia).**

### 4.7.1 Análisis de las muestras en HPLC MS/MS

Para el análisis de las muestras en el método analítico HPLC MS/MS, se utilizó un cromatógrafo de líquidos Infinity 1200 (Agilent Technologies), equipado con una columna Zorbax Eclipse SB C18 (150 mm × 4.6 mm y 5 µm de espesor de fase estacionaria). La fase móvil consistió en una mezcla 60:40 de acetonitrilo y ácido fórmico al 0.1% (v/v), manteniendo un flujo de 0.6 mL/min en modo isocrático durante 6.0 minutos de análisis. El volumen de inyección fue de 5 µL. La detección se llevó a cabo con un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo (Agilent Technologies 6400, modelo 6420), utilizando ionización de electrospray en modo positivo (ESI+), con N<sub>2</sub> como gas de secado a 300 °C y un flujo de 12 L/min. El voltaje del capilar se fijó en 4000 V y la presión del nebulizador en 15 psi. La identificación de la prednisona se realizó en modo de adquisición MRM (Monitoreo de Reacción Múltiple), utilizando el ión  $m/z = 359.2 [M-H]^+$  como precursor y los iones  $m/z = 341.3$  y  $m/z = 313.4$  como productos. El voltaje de fragmentación se estableció en 110 V, la energía de colisión en 3 eV y el voltaje de la celda de aceleración en 5 V.

Con el método analítico establecido las muestras se analizaron en LUNA del ICAT (Laboratorio Universitario de Nanotecnología Ambiental) para determinar la concentración de prednisona disuelta. En el caso del aparato 2 USP, se realizó una dilución<sup>14</sup> 1:1<sup>15</sup> de la muestra de la PVT, es decir, se tomó una alícuota de 500 µL de la muestra y se diluyó en 500 µL del medio de disolución, colocándola en un vial de vidrio de 1 mL. Para la muestra del IV-DGS, se llevó a cabo una dilución 1:4, tomando 200 µL de la muestra y añadiendo 800 µL del medio de disolución como se muestra en la Figura 36. Las diluciones se realizaron con el propósito de que las concentraciones se encontraran dentro del intervalo de la curva de calibración. En el caso del modelo estático, se esperaba una concentración recuperada de 20 ppm<sup>16</sup>(m/v) y tras diluir la muestra, se tenía una concentración de 10 ppm, la cual se encontró dentro del intervalo de la curva de calibración. Para el modelo dinámico, la concentración esperada era de 66.66 ppm<sup>17</sup> (m/v) y al diluir la muestra, se tenía una concentración de 13.33 ppm. Al realizar los cálculos de la concentración recuperada, se tomó en cuenta el factor de dilución, que se multiplicó según el modelo utilizado.

---

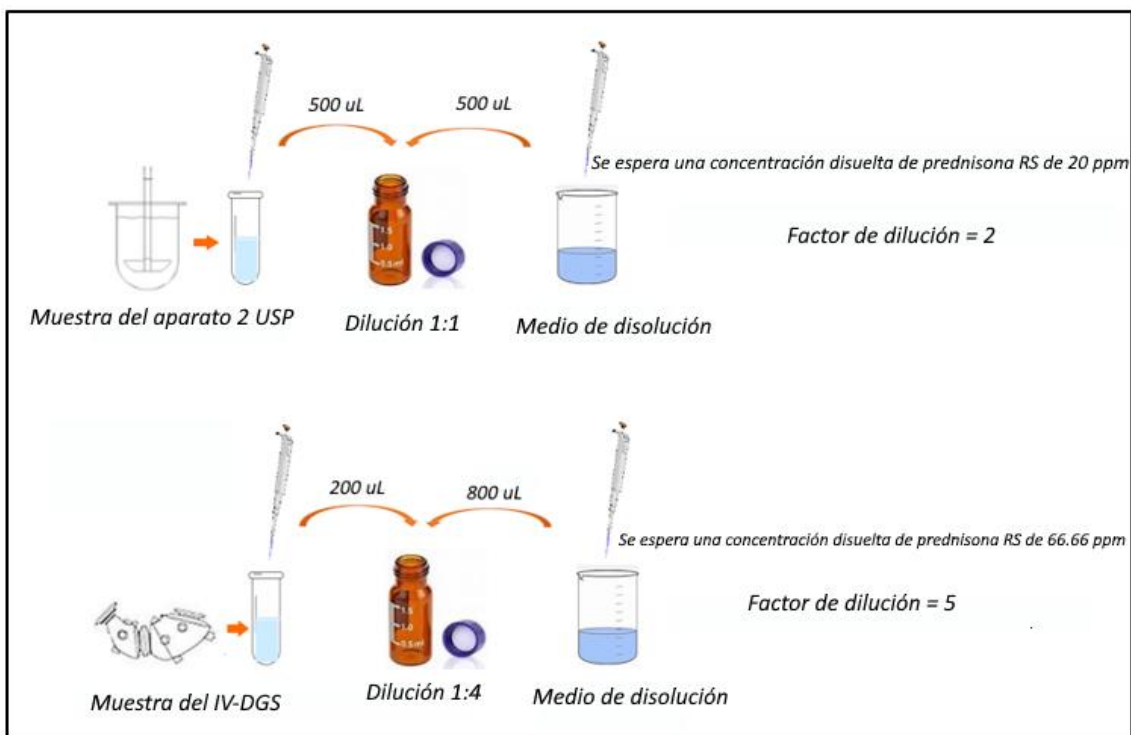
<sup>14</sup> Es una solución menos concentrada a partir de otra más concentrada.

<sup>15</sup> Esta notación se entiende como una parte de la solución original en un total de partes de la solución final que incluye al soluto más disolvente, es decir, 1:1 es igual a 2 que es factor de disolución.

<sup>16</sup> Es decir, una tableta de 10 mg de prednisona RS disuelta en 500 mL de medio de disolución, utilizando el aparato 2 de la USP.

<sup>17</sup> Es decir, una tableta de 10 mg de prednisona RS disuelta en 150 mL de medio de disolución, utilizando el IV-DGS.



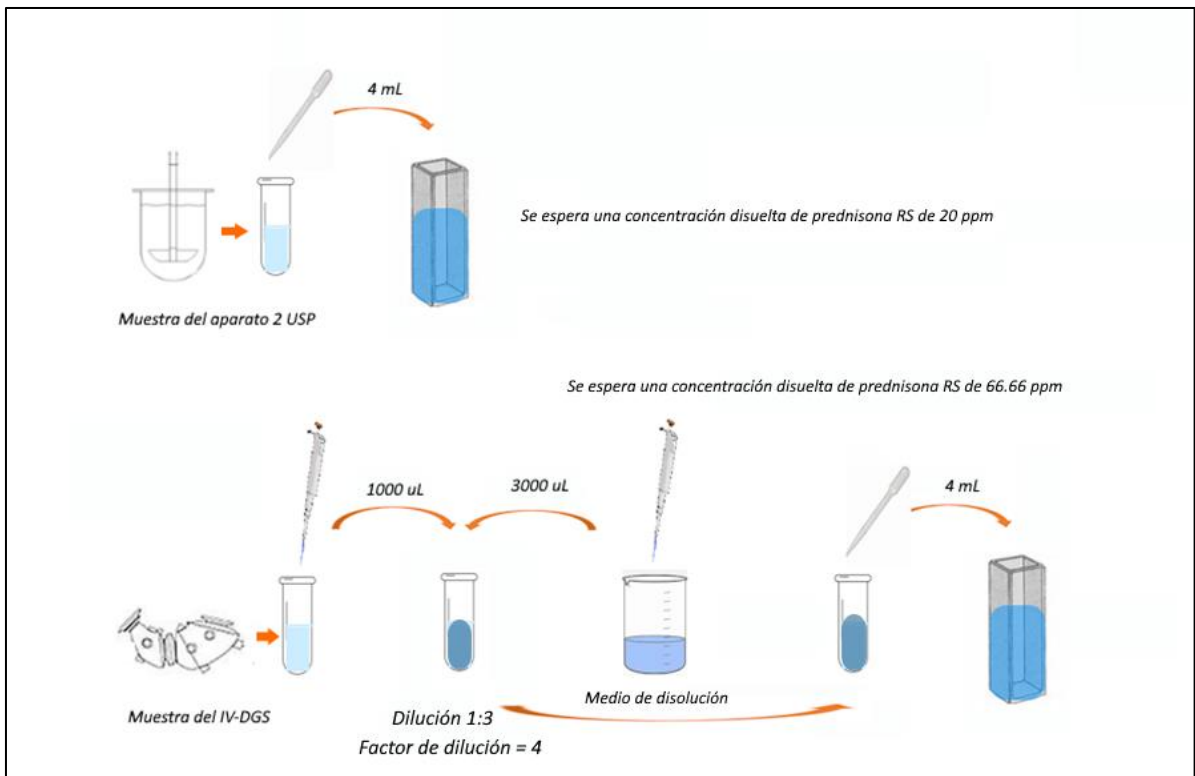


**Figura 36. Diluciones de las muestras para el análisis en HPLC MS/MS (Elaboración propia).**

#### 4.7.2 Análisis de las muestras en espectrofotometría UV-Vis

En el laboratorio LUCE del ICAT (Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica), se analizaron las muestras mediante el espectrofotómetro UV-Visible-NIR CARY 5000 (Agilent Technologies). Primero se seleccionaron las condiciones experimentales, se estableció un rango de trabajo de longitud de onda de 200 a 500 nm y el modo de adquisición de datos fue absorbancia. Posteriormente, se bloqueó el haz de luz del espectrofotómetro con un cuadrado negro para medir la línea cero y se retira para mediar la línea base al 100 %, estas mediciones se utilizaron para eliminar de los espectros la señal que se genera por la interacción de la lámpara con el detector. De esta manera, se lograron las condiciones de trabajo necesarias para analizar las muestras de la PVT.

Para la adquisición de los espectros en el espectrofotómetro, primero se tomaron 4 mL de la muestra del aparato 2 de la USP con una pipeta de plástico y se vertieron en una celda de cuarzo de 1 cm y 5 mL (Aldrich Chemical), la cual se colocó en el espectrofotómetro. En el caso de la muestra del IV-DGS, se realizó una dilución 1:3; es decir, se tomó una alícuota de 1000  $\mu$ L con una micropipeta y se diluyó en 3000  $\mu$ L del medio de disolución, para garantizar que los resultados se encontraran dentro del intervalo de trabajo. La solución diluida se colocó en la celda de cuarzo hasta  $\frac{3}{4}$  de su capacidad, como se muestra en la Figura 37. Se manipuló la celda por la parte esmerilada, asegurándose de que esta estuviera en contra de la posición del haz de luz en el equipo. Posteriormente, se utilizó el software Cary WinUV para adquirir y observar el espectro de absorción de cada muestra de prednisona RS a 242 nm.



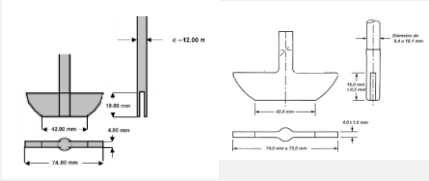
**Figura 37. Diluciones de las muestras para el análisis en el espectrofotómetro UV-Vis Cary 5000 (Elaboración propia).**

## 5. Resultados y discusión

### 5.1 Calibración mecánica en el aparato 2 USP

Los resultados de los parámetros de calibración mecánica del aparato 2 de disolución se organizaron en la Tabla 6, facilitando su registro y análisis. Se incluyeron los valores medidos de cada parámetro fijo y las tolerancias aceptadas en conformidad con la USP descritas en el subtema 4.4.1.1. Esta disposición permitió una visualización de los datos y confirmó que todos los parámetros evaluados cumplieron con los requisitos de calibración, asegurando la validez de la PVT.

**Tabla 6. Resultados del protocolo de calibración del aparato 2 USP.**

Calibración mecánica					
Aparato de disolución: <u>Aparato 2 USP</u>		Realizó: <u>Itzel Martínez Camacho</u>			
Fecha de calibración: <u>16/04/2024</u>					
Operación	Valor obtenido	Tolerancia	Cumple		Observaciones
			Sí	No	
Entorno	Nivelación de la mesa de trabajo	La inclinación para dos direcciones ortogonales fue de 0°	≤ 1°	✓	Se verificó la nivelación sin y con aparato colocado en la mesa de trabajo, ambos cumplen con la tolerancia
	Nivelación de la base y soporte del vaso	La inclinación en dos direcciones ortogonales fue de 0° para la base y de 0.2° para el soporte	≤ 0.5°	✓	Se verificó la inclinación de la base con el vaso lleno
	Nivelación de la tapa del aparato	La inclinación en dos direcciones ortogonales fue de 0° y 0.1°	≤ 0.5°	✓	La inclinación de la tapa se verificó con el vaso disolutor vacío.
Dimensiones	Elemento de agitación *			✓	Las dimensiones de la paleta y el eje se presentan en la Figuras 15;17, donde todas cumplen con las especificaciones, excepto el diámetro del eje. La paleta esta libre de corrosión y rapaduras.
	Vaso de disolución	<b>Diámetro interno:</b> 100 mm <b>Altura:</b> 200 mm	<b>Diámetro interno:</b> 98-106 mm <b>Altura:</b> 160-210 mm	✓	En la inspección visual el vaso no presentó raspaduras internas
Alineaciones de los componentes	Verticalidad del elemento de agitación	90°	90° ± 0.5°	✓	Se verificó la verticalidad del eje acoplado a la flecha del motor
	Verticalidad del vaso	La verticalidad del vaso en dos posiciones internas fue de 90°.	90° ± 0.5°	✓	Ambas mediciones fueron de 90°
	Centrado	La diferencia entre la lectura más grande y pequeña fue de 1 mm.	≤ 2 mm	✓	Las cuatro mediciones se realizaron en sentido horario
Motor y transmisión	Altura del elemento de agitación	25 mm	25 ± 2 mm	✓	Se utilizó un escantillón para verificar la altura y se utilizó prisionero en el eje sobre la tapa para fijar la altura del eje, con el fin de asegurar siempre la misma altura en todas las pruebas
	Velocidad de rotación	50 -51 rpm	50 ± 1 rpm	✓	Se utilizó un regulador de frecuencia que se fijó a 50 rpm y se verificó con un tacómetro
Control de temperatura	Oscilación del elemento de agitación	0.066 mm	≤ 1.0 mm	✓	Se determinó la media de 5 lecturas: 0.05, 0.03, 0.05, 0.1 y 0.1 mm
	Temperatura	37 °C	37 °C ± 0.5 °C	✓	Se verificó que la temperatura del medio de disolución se encontrara dentro de lo establecido durante las condiciones de la prueba de disolución

\* Las dimensiones del elemento de agitación se detallan en la Figura 15 (subtema 4.4.1.1), donde se muestran los valores obtenidos, y las tolerancias correspondientes se encuentran en la Figura 17 (subtema 4.4.1.1).

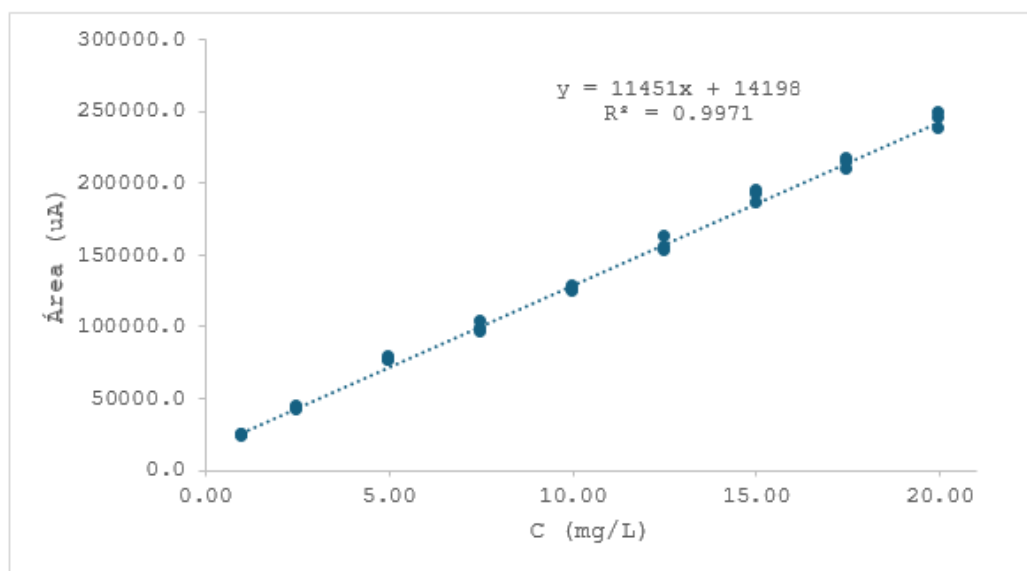
## 5.2 Validación de los métodos analíticos

### 5.2.1 Validación instrumental de los métodos analíticos

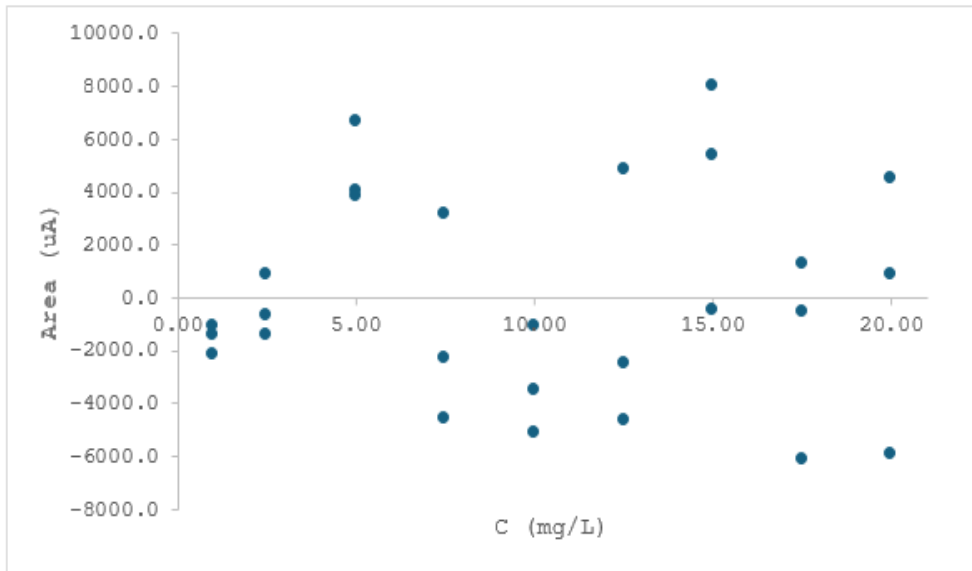
Un aspecto relevante en este trabajo fue la validación de ambos métodos analíticos, con el fin de garantizar la exactitud y precisión en la cuantificación de prednisona durante la prueba, asegurando que los resultados fueran confiables, reproducibles, exactos y conforme a los requerimientos regulatorios. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la validación; el método 1 correspondió al método analítico HPLC MS/MS y el método 2 al método analítico UV-Vis.

#### a) Linealidad del método HPLC MS/MS

El intervalo lineal para el método 1 se estableció graficando el área bajo la curva en función de la concentración dentro del rango de 0.10 a 20.0 mg/L, mediante una inspección visual del gráfico, se determinó que el intervalo de trabajo es entre 1.0 mg/L y 20.0 mg/L, en el que se observó un comportamiento lineal, como se muestra en la Figura 38. Adicionalmente, en la Figura 39 se presenta la gráfica de residuales correspondiente a este intervalo, donde se observó una distribución aleatoria de los valores negativos y positivos, lo que indicó que el modelo lineal es adecuado para describir la tendencia de los datos dentro del intervalo de trabajo. Cabe destacar que los valores residuales son menores cuando la respuesta analítica, en el eje y, es baja, lo que reveló que, a concentraciones más altas los residuales tienden a aumentar.



**Figura 38. Gráfica del intervalo de trabajo para el análisis de prednisona entre concentraciones de 1.00 a 20.00 mg/L para el método analítico HPLC MS/MS (Elaboración propia).**



**Figura 39. Gráfico de residuales del intervalo de trabajo para el método analítico HPLC MS/MS (Elaboración propia).**

Los valores de la pendiente y la ordenada al origen se obtuvieron mediante regresión lineal con su error asociado (ver Apéndice C-2), el cual se determinó considerando el estadístico t Student al 95% de confianza con n-2 grados de libertad al igual que el coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Este último se determinó en 0.9971 lo que cumple con el criterio de aceptación de la USP ( $r^2 \geq 0,98$ ). Los parámetros de regresión lineal se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7. Parámetros de la regresión lineal para el intervalo de trabajo en el método HPLC MS/MS.**

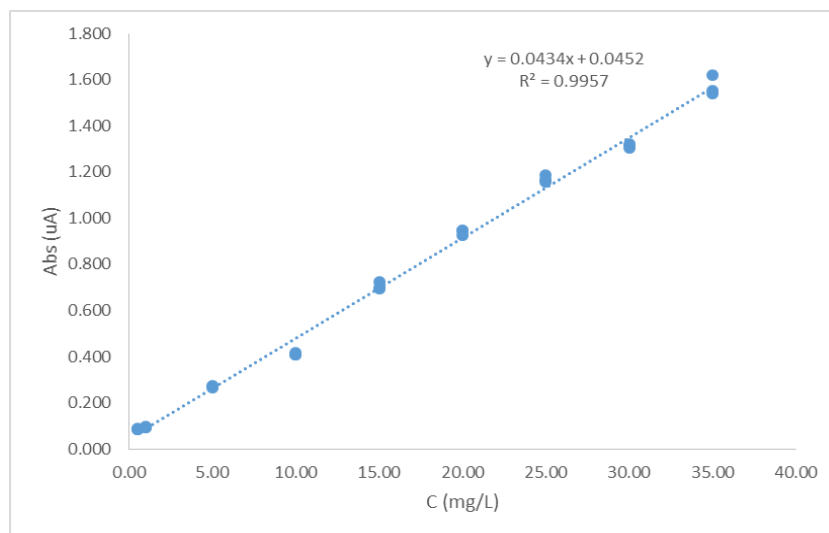
Parámetro	Valor
Intervalo lineal (mg/L)	1.0 – 20.0
Intervalo de trabajo (mg/L)	1.0 – 20.0
Pendiente	11450.75 ± 48.6
Ordenada al origen	14198.29 ± 579.3
Ecuación lineal	$\text{Área} = 11450.75 \pm 48.63 C + 14198.29 \pm 579.30$
Coefficiente de correlación (r)	0.9986
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9971

Además, se llevó a cabo una prueba de hipótesis utilizando el estadístico t-Student para evaluar la pendiente (Apéndice C-3), la cual resultó estadísticamente diferente de cero. Esto indicó que hay una dependencia significativa entre la variable independiente (concentración de prednisona) y la variable dependiente (respuesta analítica o área bajo la curva), lo que

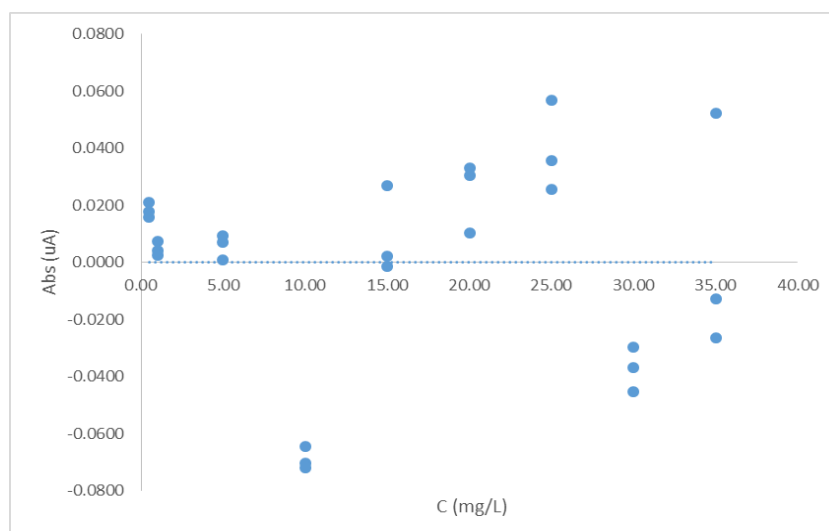
sugiere que el método analítico fue efectivo para detectar respuestas específicas en disoluciones de diversas concentraciones de prednisona dentro del intervalo de trabajo.

**b) Linealidad del método UV-Vis**

De forma similar a lo realizado en el método 1, en el método 2 se determinó el intervalo de trabajo, donde se graficó la absorbancia (Abs) en función de la concentración en un rango de 0.5 a 35.0 mg/L, como se muestra en la Figura 40. Se observó un comportamiento lineal, lo cual se verificó con la gráfica de residuales (Figura 41), en la que se evidenció una distribución aleatoria de los valores, indicando que el modelo lineal fue el adecuado para describir la relación entre concentración y absorbancia en este intervalo de trabajo.



**Figura 40. Gráfica del intervalo de trabajo para el análisis de prednisona entre concentraciones de 0.50 a 35.00 mg/L para el método analítico UV-Vis (Elaboración propia).**



**Figura 41. Gráfico de residuales del intervalo de trabajo para el método analítico UV-Vis (Elaboración propia).**

Los valores de la pendiente y la ordenada al origen se obtuvieron con su error asociado (ver Apéndice C-5), el cual se determinó de la misma manera que en el método 1. El valor de  $r^2$  fue de 0.9957, que cumplió con el criterio de aceptación de la USP ( $r^2 \geq 0.98$ ). La pendiente resultó estadísticamente diferente de cero (Apéndice C-6), lo que indicó una dependencia significativa entre la concentración de prednisona y la absorbancia. Por lo tanto, el método analítico es efectivo para detectar respuestas específicas en disoluciones de diversas concentraciones de prednisona dentro del intervalo de trabajo. Los parámetros de regresión lineal se presentan en la Tabla 8.

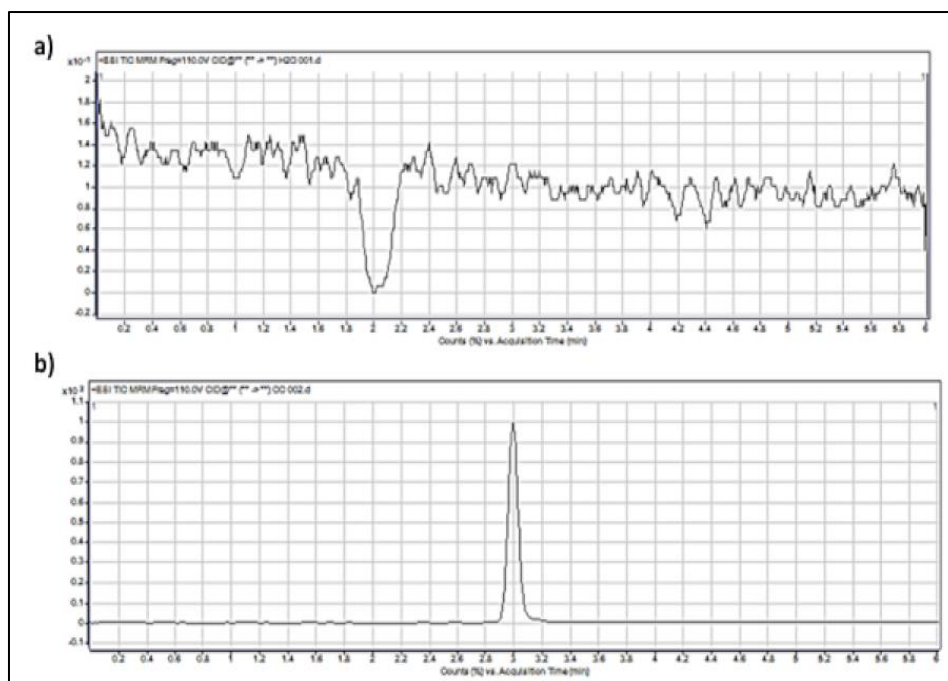
**Tabla 8. Parámetros de la regresión lineal para el intervalo de trabajo en el método UV-Vis.**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Intervalo lineal (mg/L)	0.5 – 35.0
Intervalo de trabajo (mg/L)	0.5 – 35.0
Pendiente	$0.0434 \pm 0.0002$
Ordenada al origen	$0.0052 \pm 0.0045$
Ecuación lineal	$Abs = 0.0434 \pm 0.0002 C + 0.0452 \pm 0.0045$
Coefficiente de correlación (r)	0.9978
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9957

Se observó y determinó que ambos métodos analíticos cumplieron con los criterios de aceptación de linealidad establecidos por la USP, mostrando un comportamiento lineal. Los coeficientes de correlación (r) fueron cercanos a la unidad y positivos, lo que indica una fuerte correlación entre los valores de concentración y la respuesta analítica. Esto sugiere que las variables son directamente proporcionales, ya que un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) cercano a la unidad implica que la mayor parte de la variabilidad en la respuesta analítica puede ser explicada por la variación en la concentración, confirmando así la calidad del ajuste lineal de los modelos.

### **c) Selectividad del método HPLC MS/MS**

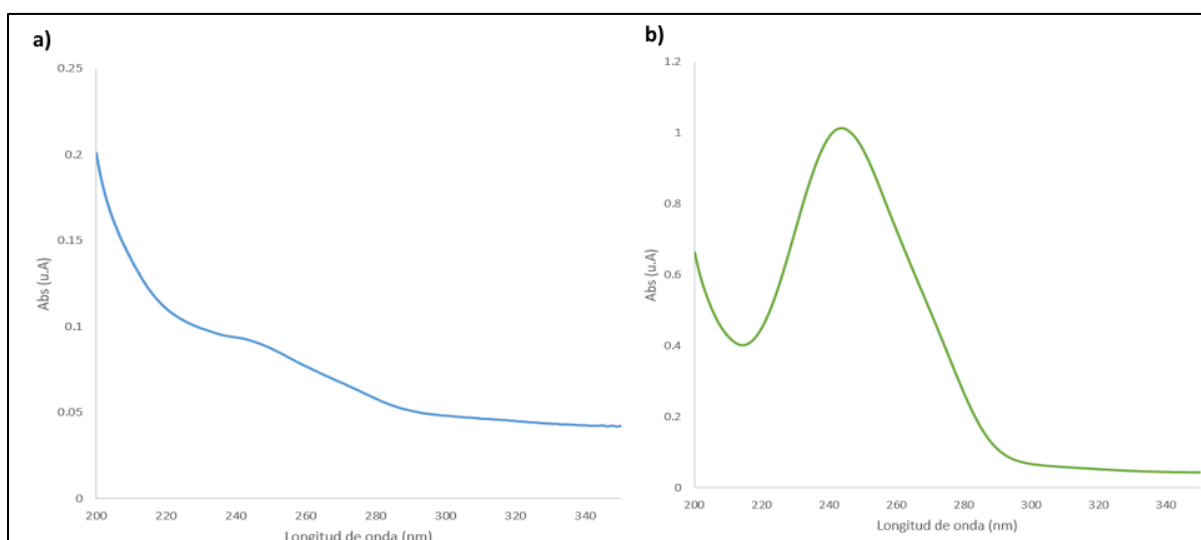
Para evaluar la selectividad del método 1, se realizó una comparación visual entre el cromatograma del medio de disolución (Figura 42a) y el cromatograma de una muestra con aproximadamente 1.0 mg/L de prednisona (Figura 42b). Esta evaluación permitió observar la capacidad proporcionada por el espectrómetro de masas para distinguir de manera inequívoca el analito en el medio de disolución.



**Figura 42. Cromatogramas de HPLC MS/MS a) medio de disolución y b) un estándar de prednisona a 1.0 mg/L (Elaboración propia).**

**d) Selectividad del método UV-Vis**

Se realizó una evaluación cualitativa de la selectividad del método 2, al comparar los espectros de absorbancia a una longitud de onda de (241-243 nm) del medio de disolución (Figura 43a) y una muestra extraída del aparato 2 USP con una concentración de 20 mg/L de prednisona (Figura 43b). Esta comparación demostró que el método logró una identificación clara y precisa del analito en el medio de disolución.



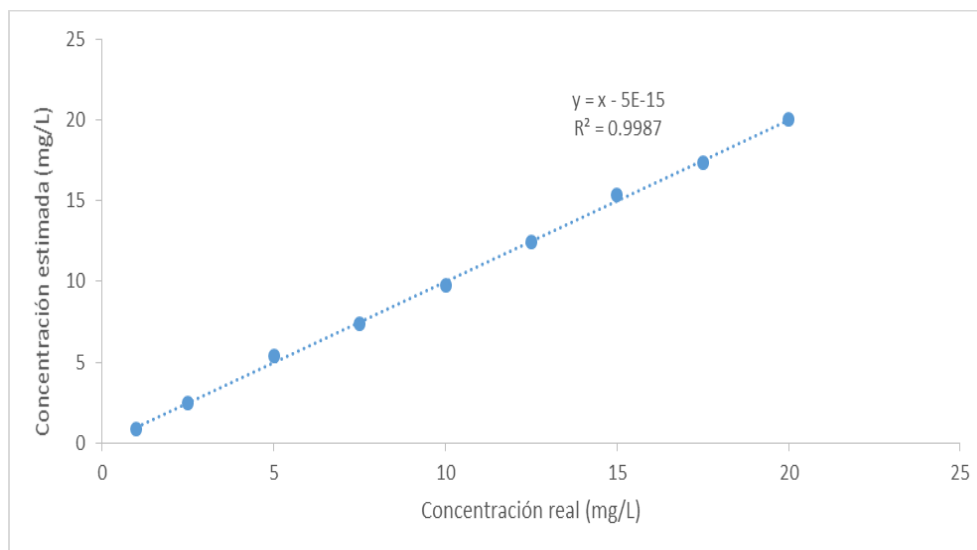
**Figura 43. Espectro de absorbancia a una longitud de onda de aproximadamente 242 nm a) medio de disolución y b) Estándar de prednisona a 20 mg/L (Elaboración propia).**

Por lo tanto, ambos métodos analíticos cumplieron con el criterio de selectividad, ya que se evidenció que los resultados del analito no se vieron afectados por el medio de disolución.



### e) Exactitud del método HPLC MS/MS

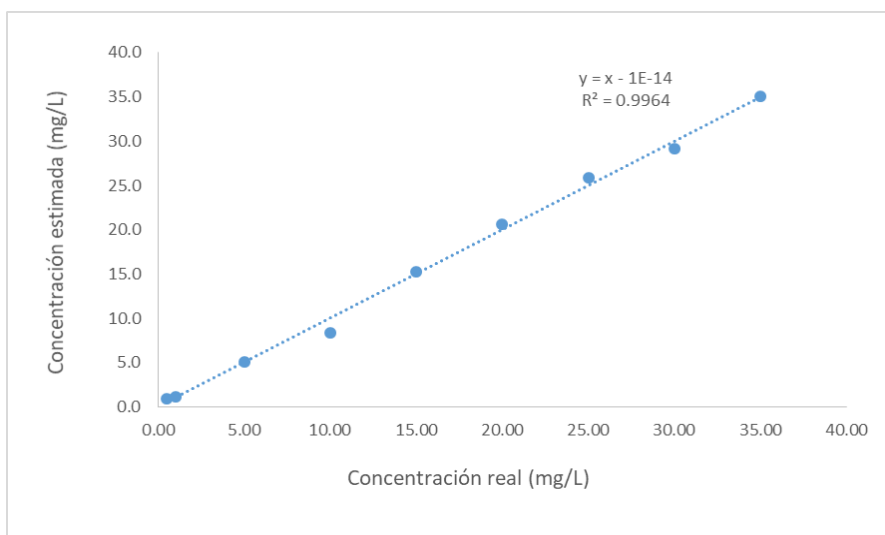
Para evaluar la exactitud del método 1, se graficó la concentración real de prednisona frente a la concentración estimada o recuperada en todo el intervalo de trabajo (Figura 44). Mediante una regresión lineal, se determinó la pendiente y su intervalo de confianza ( $1.0000 \pm 0.0054$ , (ver Apéndice C-7) con una  $r^2$  de 0.9987. Además, se realizó una prueba de hipótesis para la pendiente (ver Apéndice C-8), en la cual se rechazó la hipótesis nula y se confirmó que la pendiente incluye el valor de la unidad, lo que comprueba la exactitud del método 1.



**Figura 44. Gráfica de exactitud de la concentración estimada en función de la concentración real para evaluar la exactitud del método HPLC MS/MS (Elaboración propia).**

### f) Exactitud del método UV-Vis

De manera similar al método 1, para el método 2, se graficó la concentración real de prednisona frente a la concentración recuperada a lo largo de todo el intervalo de trabajo (Figura 45). Mediante una regresión lineal, se determinó la pendiente y su intervalo de confianza ( $1.0000 \pm 0.0090$ , ver Apéndice C-9), con una  $r^2$  de 0.9964 y se realizó una prueba de hipótesis (ver Apéndice C-10), en la cual se rechazó la hipótesis nula y se confirmó que la pendiente incluye el valor de la unidad, lo que corroboró la exactitud del método 2.



**Figura 45. Gráfica de exactitud de la concentración estimada en función de la concentración real para evaluar la exactitud del método UV-Vis (Elaboración propia).**

Para ambos métodos, se cumplió con la característica de desempeño de exactitud establecida por la USP. En ambos casos, la pendiente es igual a 1, lo que indica que no es significativamente diferente de este valor. Esto sugiere que el método es exacto, es decir, la concentración estimada es proporcional a la concentración real. Además, dado que la pendiente incluye la unidad, se puede afirmar que no presenta errores sistemáticos.

#### **g) Precisión para el método HPLC MS/MS**

Se determinó la precisión del método 1 en términos de repetibilidad y reproducibilidad. Primero, se midieron por triplicado e independientemente tres niveles de concentración (1.0, 10.0 y 20.0 mg/L) en un día por la misma analista (repetibilidad). Para la reproducibilidad, se prepararon y midieron los mismos niveles de concentración por la misma analista, pero en diferente día. La Tabla 9 muestra los valores promedio de recuperación ( $n = 3$ ) para cada nivel de concentración en ambos días, además del intervalo de confianza para la recuperación de prednisona en cada nivel de concentración. En ambos casos, se cumplió el criterio de aceptación, que establece que la recuperación debe estar dentro del rango de 95-105 % con una DER tanto para la repetibilidad como para la reproducibilidad menor o igual del 2 %.

**Tabla 9. Valores de precisión obtenidos para el análisis de prednisona para HPLC–MS/MS.**

Analista	Día	Concentración adicionada (mg/L)	Concentración recuperada (mg/L)	Media de la concentración recuperada (mg/L)	Intervalo de confianza de recuperación (%)	% DER Repetibilidad/Reproducibilidad		
1	1	1	1.00	0.9916	99.12 ± 1.07	0.65		
			0.99					
			0.99					
		10	9.89	9.8915	98.84 ± 0.37			
			9.88					
			9.91					
	20	20	20.02	20.0392	100.04 ± 0.69			
			20.10					
			20.00					
							1.13	
		2	1	1	0.99	0.9813	98.52 ± 1.40	1.52
					0.97			
0.98								
10	9.91			9.8568	99.08 ± 1.39			
	9.80							
	9.86							
20	20		20.40	20.2206	101.97 ± 2.04			
			20.17					
			20.08					

El intervalo de confianza de recuperación de cada nivel se calculó utilizando el estadístico t-Student con un 95 % de confianza, considerando n-1 grados de libertad en una prueba de dos colas (Ver Apéndice C-11).

#### ***h) Precisión para el método UV-Vis***

Para el método 2 se midieron por triplicado e independientemente tres niveles de concentración (0.5, 15.0 y 35.0 mg/L), siguiendo el mismo procedimiento previamente descrito para el método 1. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10. Valores de precisión obtenidos para el análisis de prednisona en UV-Vis.**

Analista	Día	Concentración adicionada (mg/L)	Concentración recuperada (mg/L)	Media de la concentración recuperada (mg/L)	Intervalo de confianza de recuperación (%)		% DER Repetibilidad/Reproducibilidad	
1	1		0.50					
		0.50	0.50	0.5005	100.10	± 2.13		
			0.50					
		15.00	15.06					
			14.98	15.2206	100.38	± 5.88	<b>1.96</b>	
		15.63						
	35.00	34.72						
		34.41	35.1141	99.20	± 6.86			
		36.22						
		0.50	0.49				<b>1.877</b>	
2		0.50	0.4948	97.12	± 4.22			
		0.50						
	15.00	15.21						
		15.48	15.1831	101.41	± 5.15	<b>1.88</b>		
		14.86						
	35.00	35.13						
	34.97	35.3599	100.36	± 3.84				
	35.98							

El intervalo de confianza de recuperación de cada nivel se calculó utilizando el estadístico t-Student con un 95% de confianza, considerando n-1 grados de libertad en una prueba de dos colas (ver Apéndice C-12).

Para ambos métodos se cumplió con el criterio de aceptación de precisión, tanto la repetibilidad como la reproducibilidad, donde ambos parámetros deben presentar un % DER inferior al 2%. En este sentido, la repetibilidad fue de 0.65 % para HPLC MS/MS y 1.96 % para UV-Vis, mientras que la reproducibilidad fue de 1.13 % para HPLC MS/MS y 1.87 % para UV-Vis. En términos de precisión, el método HPLC MS/MS es superior al UV-Vis debido a su menor % DER en ambos parámetros, lo que indica una mayor consistencia en los resultados. Sin embargo, ambos métodos cumplieron con los criterios de aceptación establecidos, lo que valida su uso en análisis cuantitativos de prednisona.

## 5.2.2 Validación de los modelos *in vitro*

### a) Compatibilidad del filtro

Para determinar la compatibilidad del filtro con el medio de disolución y la prednisona, de acuerdo con lo indicado en la USP, la diferencia absoluta entre el promedio de los valores de al menos 3 muestras de solución filtrada y sin filtrar de tres niveles de concentración diferentes dentro del intervalo de trabajo, debe ser igual o menor al 1%. En la Tabla 11, se observó que la diferencia absoluta (ver Apéndice C-13) de las muestras en cada nivel de concentración fue inferior al 1%. Por lo tanto, se comprobó que no existió adherencia significativa de prednisona al filtro de nylon tipo PVDF de 0.45 µm.

**Tabla 11. Compatibilidad del filtro en muestras filtradas y sin filtrar de prednisona por HPLC MS/MS y UV-Vis.**

Método analítico	Concentración de prednisona estándar (mg/L)	Concentración sin filtro (mg/L)	Media sin filtro	Concentración con filtro (mg/L)	Media con filtro	Diferencia absoluta (%)
<b>HPLC MS/MS</b>	1.00	0.99	0.99	0.99	0.99	0.26
		0.99		0.99		
		1.00		0.99		
	10.00	10.04	10.05	10.00	10.00	0.45
		9.97		9.89		
		10.13		10.11		
		20.08		19.98		
20.00	20.18	20.04	20.02	19.94	0.52	
	19.87		19.80			
<b>UV-Vis</b>	10.00	9.95	9.99	9.95	9.92	0.64
		9.89		9.87		
		10.11		9.94		
	20.00	20.09	20.12	19.96	20.01	0.56
		20.10		20.06		
		20.17		20.00		
		30.24		29.65		
30.00	30.01	30.05	29.99	29.81	0.79	
	29.90		29.79			

Los resultados de la validación de precisión de ambos modelos se analizaron y se presentaron en conjunto con las PVT, donde se utilizó prednisona genérica de la marca farmacia del ahorro.

### 5.3 Pruebas preliminares para desarrollar la PVT

#### a) Prueba de deaireación

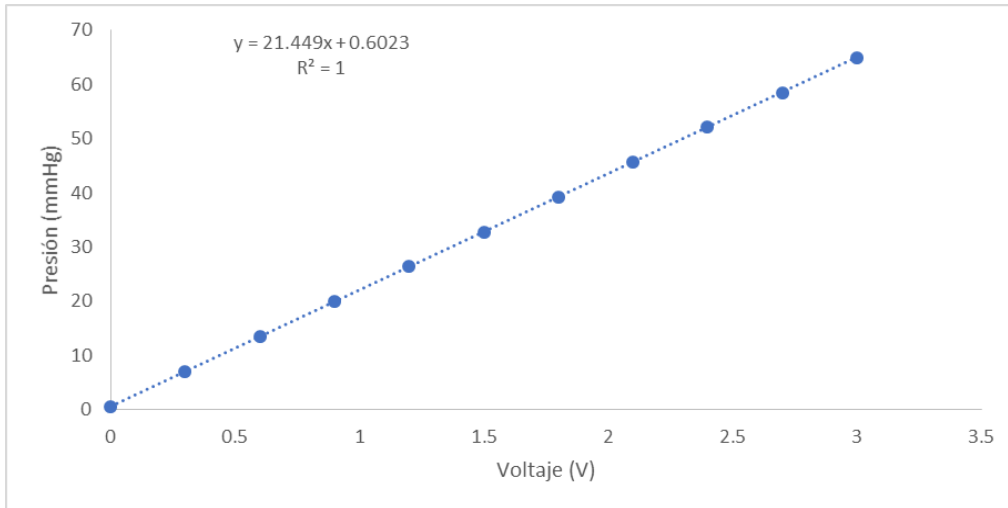
Una especificación de la PVT es la deaireación del medio de disolución, ya que el oxígeno disuelto puede generar burbujas de aire durante el desarrollo de la prueba y podrían atrapar partículas de prednisona, impidiendo su contacto adecuado con el medio de disolución. En la Tabla 12, se presentan los resultados obtenidos de las muestras de medios de disolución con y sin deaireación. Se observó que la metodología de deaireación fue adecuada para el desarrollo de las pruebas PVT, ya que la media de la concentración de oxígeno disuelto se redujo aproximadamente de 6.67 a 4.9 ppm en ambos analizadores. Los resultados obtenidos fueron consistentes, lo que confirma la efectividad del método de deaireación y la fiabilidad de las mediciones para realizar la disolución de manera efectiva.

**Tabla 12. Prueba del método de deaireación para el medio de disolución.**

	Muestra	Oxígeno Disuelto (ppm) - METTLER TOLEDO O2 4100e	Oxígeno Disuelto (ppm) - Detector Portátil	Media de Oxígeno Disuelto (ppm) - METTLER TOLEDO O2 4100e	Media de Oxígeno Disuelto (ppm) - Detector Portátil
<i>Medio de disolución sin deaireación</i>	1	6.93	6.9	6.66	6.67
	2	6.47	6.5		
	3	6.57	6.6		
<i>Medio de disolución con deaireación</i>	1	4.96	4.9	4.91	4.87
	2	4.95	4.9		
	3	4.81	4.8		

#### b) Prueba de la presión interna del modelo IV-DGS

Los resultados de la caracterización del catéter de manometría esofágica (ver Apéndice B) determinaron la ecuación lineal (ecuación 9) y la gráfica de presión en función del voltaje (Figura 46) para obtener el perfil de presión interna en las membranas flexibles del modelo IV-DGS durante la PVT. Se observó que la gráfica presenta un comportamiento lineal, con un  $r^2$  de 1, lo que indica que no existen errores ni desviaciones en los datos respecto a la línea de ajuste.



**Figura 46. Curva promedio de caracterización del sensor (Elaboración propia).**

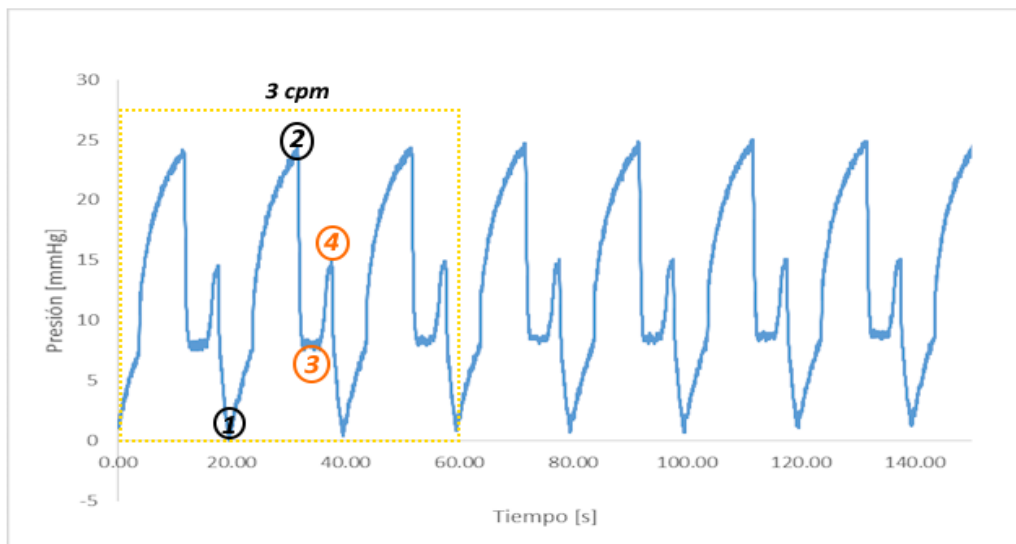
Para obtener el valor de la presión del modelo dinámico, se utilizó la ecuación (9):

$$P \text{ (mmHg)} = 21.449 * X + 0.6023 \quad (9)$$

Donde:

$X$  = Valor de voltaje obtenido durante las pruebas de disolución

Utilizando la ecuación (9) se determinó el perfil de la presión para el modelo dinámico (Figura 47), se observó que la presión máxima es de 25 mmHg para el flujo de propulsión, en el flujo de retropulsión fue de 15 mmHg y 3 cpm por cada ciclo, valores fisiológicos cercanos a los reportados en la literatura.



**Figura 47. Perfil de presión para la disolución de prednisona (1) Inicio de la fase de propulsión; (2) Fin de la fase de propulsión; (3) Inicio de la fase de retropulsión; (4) Fin de la fase de retropulsión (Elaboración propia).**

**c) PVT con prednisona genérica en el aparato 2 USP**

Se realizaron seis experimentos bajo las especificaciones de la PVT de la USP para la primera etapa de dos utilizando el medicamento genérico de prednisona. En la Tabla 13, se presentan los resultados obtenidos de las pruebas preliminares, se analizaron mediante los métodos analíticos 1 y 2. Para el método 1, se registró un porcentaje promedio de prednisona disuelta de  $95.80 \pm 1.86$  % con un % DER de 2.43. Por otro lado, para el método 2, se obtuvo un  $96.70 \pm 2.01$  % con un % DER de 2.61. Ambos métodos mostraron porcentajes muy similares de prednisona disuelta, lo que sugirió que ambos fueron efectivos para medir la disolución. Además, los bajos porcentajes de DER indicaron que los resultados tuvieron poca dispersión, lo que reafirmó la precisión, en la repetibilidad del modelo estático.

**Tabla 13. PVTs con tabletas de prednisona genérica para el aparato 2 USP.**

Modelo	Volumen del medio de disolución (mL)	Método analítico	Prueba	C (mg/L)	m(mg)	% de la masa de prednisona disuelta	% de Media Geométrica, de la masa de prednisona disuelta	s	% DER
Aparato 2 USP	500	HPLC MS/MS	1	19.23	9.62	96.16	$95.80 \pm 1.86$ *	2.33	2.43
			2	19.10	9.55	95.49			
			3	19.05	9.52	95.24			
			4	19.95	9.97	99.73			
			5	19.15	9.57	95.74			
			6	18.49	9.24	92.45			
	500	UV-Vis	1	19.29	9.64	96.44	$96.70 \pm 2.01$ *	2.52	2.61
			2	19.23	9.62	96.17			
			3	19.17	9.59	95.87			
			4	20.27	10.13	101.35			
			5	19.34	9.67	96.71			
			6	18.74	9.37	93.68			

\* El IC del porcentaje de prednisona disuelta se calculó utilizando el estadístico t-Student con un 95 % de confianza, considerando n-1 grados de libertad en una prueba de dos colas.

**d) PVT con prednisona genérica en el modelo IV-DGS**

Al igual que la anterior prueba se realizaron seis experimentos para el modelo IV-DGS, donde la PVT se realizó con medicamento genérico de prednisona. En la Tabla 14, se presentan los resultados obtenidos. Para el método 1, se registró un porcentaje promedio de prednisona disuelta de  $75.99 \pm 3.07$  % con un % DER de 5.06, mientras que para el método 2 se obtuvo un  $74.38 \pm 3.09$  % con un % DER de 5.20. Con los resultados obtenidos se confirmó la precisión



en cuestión de repetibilidad del modelo con la finalidad de realizar las pruebas con las tabletas estandarizadas. Cabe destacar, que el uso de un volumen de medio de disolución reducido de 500 mL (aparato 2 USP) a 150 mL en el IV-DGS reflejó condiciones más exigentes de disolución, que a su vez destacó la complejidad de realizar esta parte experimental para la disolución de la tableta al emular de manera más realista los movimientos peristálticos en el modelo IV-DGS. Un aspecto que se infiere que influyó en los resultados de disolución es que no se utilizó una mesa neumática para evitar vibraciones externas.

**Tabla 14. PVTs con tabletas de prednisona genérica para el modelo IV-DGS.**

Modelo	Volumen del medio de disolución (mL)	Método analítico	Prueba	C (mg/L)	m(mg)	% de la masa de prednisona disuelta	% de Media Geométrica, de la masa de prednisona disuelta	s	% DER
IV-DGS	150	HPLC MS/MS	1	52.94	7.94	79.41	75.99 ± 3.07 *	3.85	5.06
			2	51.14	7.67	76.71			
			3	49.90	7.48	74.85			
			4	52.97	7.95	79.46			
			5	50.98	7.65	76.47			
			6	46.03	6.90	69.05			
	150	UV-Vis	1	51.48	7.72	77.22	74.38 ± 3.09 *	3.87	5.20
			2	50.08	7.51	75.12			
			3	48.98	7.35	73.47			
			4	52.51	7.88	78.77			
			5	49.40	7.41	74.10			
			6	45.06	6.76	67.59			

\*El IC del porcentaje de prednisona disuelta se determinó mediante la prueba estadística t-Student con un 95 % de confianza, considerando n-1 grados de libertad en una prueba de dos colas.

#### 5.4 PVT de disolución en el modelo estático y dinámico

En la Tabla 15, se muestra el porcentaje de masa de prednisona disuelta para cada tableta DPVS, analizados en ambos métodos analíticos. Para HPLC MS/MS en el aparato 2 USP, se logró una disolución promedio de  $54.83 \pm 1.05$  % de la masa del fármaco, con un CV de 2.40 %, mientras que para el método UV-Vis se obtuvo un  $55.28 \pm 1.70$  % y un CV de 3.85 %. En cambio, para el modelo IV-DGS el porcentaje de disolución promedio por HPLC MS/MS fue de  $57.77 \pm 2.54$  %, con un CV de 5.51 % y por UV-Vis de  $57.91 \pm 2.77$  % con un CV de 6.00 %. El certificado de calibración de la tableta establece que el porcentaje promedio de prednisona disuelta para la primera etapa de dos debe estar dentro del intervalo de 48 a 57 % con un CV

máximo de 4.6 %, los cuales se cumplieron en ambos métodos analíticos para el aparato 2 USP, lo que indica que la PVT fue exitosa para el modelo estático, en cambio para el modelo IV-DGS no se cumplió el porcentaje de disolución que tuvo una diferencia de al menos 0.91 % y en el CV se obtuvo una diferencia de al menos 1.4 %. Estas diferencias se compararon con respecto al procedimiento y material estandarizado del aparato 2 de la USP. Sin embargo, cabe destacar que el modelo IV-DGS es un método no compendial, es decir, no está estandarizado, que alcanzó valores aproximados a los establecidos de la PVT de la USP, como se ha mostrado en los datos de la Tabla 15.

**Tabla 15. PVTs con tabletas de prednisona estándar de referencia USP para el aparato 2 USP y modelo IV-DGS.**

Modelo	Volumen del medio de disolución (mL)	Método analítico	PVT	C (mg/L)	m(mg)	% de la masa de prednisona disuelta	% de Media Geométrica, de la masa de prednisona disuelta	s	%cv
Aparato 2 USP	500	HPLC MS/MS	1	11.29	5.65	56.46	54.83 ± 1.05 *	1.31	2.40
			2	10.77	5.38	53.84			
			3	10.97	5.48	54.85			
			4	11.28	5.64	56.40			
			5	10.76	5.38	53.79			
			6	10.73	5.36	53.63			
	500	UV-Vis	1	11.17	5.58	55.85	55.28 ± 1.70 *	2.13	3.85
			2	10.63	5.32	53.17			
			3	11.49	5.75	57.46			
			4	11.00	5.50	54.99			
			5	10.51	5.25	52.55			
			6	11.53	5.77	57.66			
IV-DGS	150	HPLC MS/MS	1	37.49	5.62	56.24	57.77 ± 2.54 *	3.18	5.51
			2	36.03	5.40	54.04			
			3	38.52	5.78	57.78			
			4	36.94	5.54	55.41			
			5	40.86	6.13	61.28			
			6	41.22	6.18	61.84			
	150	UV-Vis	1	36.91	5.54	55.36	57.91 ± 2.77 *	3.47	6.00
			2	35.84	5.38	53.77			
			3	39.39	5.91	59.08			
			4	37.10	5.56	55.65			
			5	41.30	6.19	61.95			
			6	41.09	6.16	61.64			

\*El IC del porcentaje de prednisona disuelta se determinó mediante la prueba estadística t-Student con un 95 % de confianza, considerando n-1 grados de libertad en una prueba de dos colas.

Para completar la validación del modelo dinámico, de acuerdo con la hoja certificación de la tableta DPVS, se deben realizar la segunda etapa de dos, que consiste en otras seis pruebas experimentales más, para alcanzar los parámetros del porcentaje de disolución en un intervalo de 46 a 59 % y un CV de 6.1 %, dichos criterios de aceptación permiten validar bajo una mayor variabilidad en las pruebas, así como, un mayor porcentaje de disolución. Como se observó en los resultados de la primera etapa, se infiere que el modelo IV-DGS entrará en los criterios establecidos de la segunda etapa de la PVT. Por lo que se realizó un análisis de varianza.

Para poder realizar una comparación de la PVT realizada en el aparato 2 USP y en el IV-DGS que tienen diferentes diseños, comportamiento hidrodinámico, capacidad volumétrica y otras diferencias, se utilizó un instrumento estadístico denominado ANOVA al 95% de confianza por cada método analítico, donde se compararon los porcentajes de recuperación obtenidos de cada modelo utilizando la ecuación (10), como se muestra a continuación:

Para el método analítico HPLC MS/MS,

Sí

$H_0: \mu_1 = \mu_2$ , la media del porcentaje de disolución de prednisona DPVS en los grupos son similares

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ , la media del porcentaje de disolución de prednisona DPVS en los grupos son diferentes

Donde  $F$  es igual a;

$$F = \frac{\text{Varianza entre grupos}}{\text{Varianza dentro de los grupos}} \quad (10)$$

De acuerdo con la Tabla 16, dado que  $F_{\text{Calculada}}(4.3675) < F_{\text{Crítica}}(4.9646)$  y el valor  $P(0.0631) > \alpha(0.05)$ , se aceptó la hipótesis nula.

**Tabla 16. Resultados de la prueba ANOVA del método HPLC MS/MS de los rendimientos de disolución obtenidos para los modelos probados.**

<i>Variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>F Calculada</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>F Crítica</i>
<i>Entre grupos</i>	25.87	1	25.87	4.3675	0.0631	4.9646
<i>Dentro de los grupos</i>	59.33	10	5.93			
<i>Total</i>	85.2	11				

Para el caso del método analítico espectrofotometría UV-Vis:

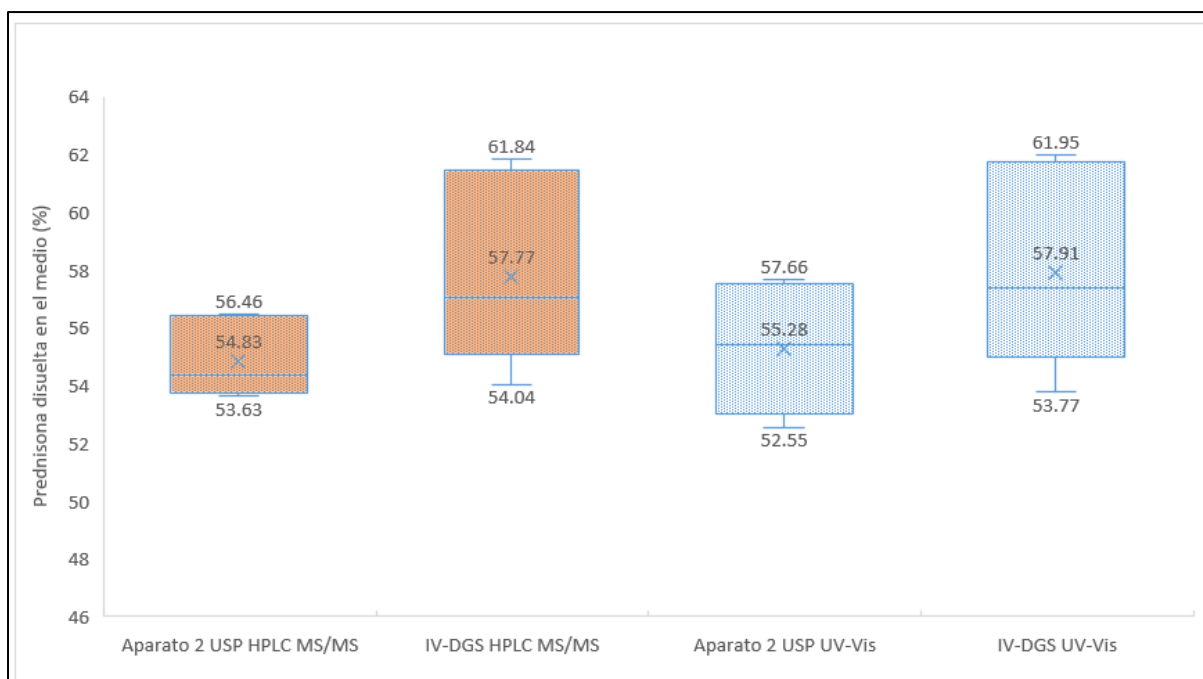
De acuerdo con la Tabla 17, dado que  $F_{\text{Calculada}}(2.4944) < F_{\text{Crítica}}(4.9646)$  y el valor  $P(0.1453) > \alpha(0.05)$ , se aceptó la hipótesis nula.

**Tabla 17. Resultados de la prueba ANOVA del método espectrofotómetro UV-Vis de los rendimientos de disolución obtenidos para los modelos probados.**

<i>Variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>F Calculada</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>F Crítica</i>
<i>Entre grupos</i>	20.72	1	20.72	2.4944	0.1453	4.9646
<i>Dentro de los grupos</i>	83.08	10	8.31			
<i>Total</i>	103.81	11				

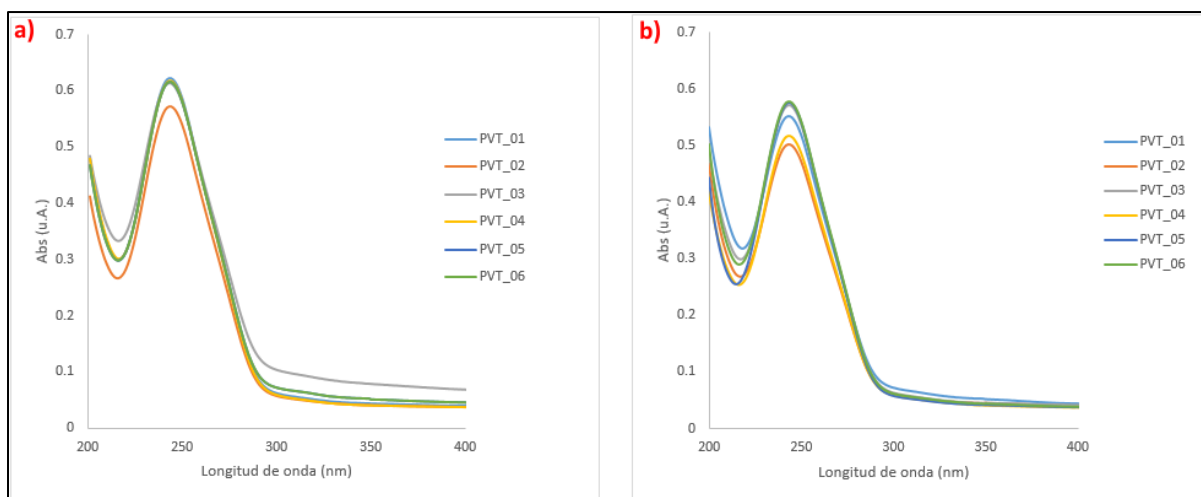
En ambos modelos se aceptó la hipótesis nula de la herramienta estadística confirmando que no hay diferencia significativa para decir que los grupos analizados son estadísticamente diferentes. Es decir, a pesar de que el modelo IV-DGS no cumplió con los criterios de aceptación de la primera etapa de la hoja de calibración de la tableta, con el análisis de varianza se afirmó que fueron similares los valores obtenidos de la PVT del aparato 2 USP y el modelo IV-DGS. Por lo tanto, se validó el uso del modelo IV-DGS, lo que abre la posibilidad de emplearlo en estudios futuros de cinética de disolución de fármacos a diferentes tiempos, esto permitirá evaluar la concentración máxima de disolución y determinar el rendimiento de disolución en el modelo.

En la Figura 48, se presenta la gráfica de los porcentajes de masa disuelta obtenidos de la PVT para ambos modelos dependiendo del método analítico utilizado. Se observó que el modelo dinámico IV-DGS logró una disolución ligeramente mayor con un promedio de  $57.77 \pm 2.54$  % en comparación con el aparato 2 de la USP que obtuvo un promedio de  $54.83 \pm 1.05$  % utilizando el método analítico HPLC MS/MS. En el caso del espectrofotómetro UV-Vis, el modelo dinámico alcanzó un promedio de disolución de  $57.91 \pm 2.77$  % mientras que el modelo estático mostró un promedio de  $55.28 \pm 1.70$  %, pero estadísticamente son similares los resultados, por lo que se cumplió con la validación operativa en ambos modelos. Ambos resultados del espectrofotómetro UV-Vis fueron similares a los obtenidos con HPLC MS/MS, aunque con una ligera variabilidad, la cual, puede deberse a que el detector de masas del HPLC proporciona mayor selectividad que el espectrofotómetro UV-Vis, que podría sobrestimar el porcentaje de disolución debido a la interferencia de componentes de la matriz, como excipientes o fragmentos no disueltos.



**Figura 48. Gráfica de cajas y bigotes del porcentaje de disolución de las tabletas de la prednisona DPVS para el modelo estático y dinámico analizadas en el método HPLC MS/MS y espectrofotometría UV-Vis (Elaboración propia).**

En la Figura 49, se muestran los espectros de absorción de las tabletas de prednisona estandarizada utilizadas para la PVT en ambos modelos de disolución, donde se observó la variabilidad de los espectros entre los modelos de disolución. Lo cual, sugiere que el modelo IV-DGS emuló de manera más realista el comportamiento dinámico de la disolución, como los flujos de propulsión y retropulsión, esta mayor dispersión en los resultados podría atribuirse a que para el modelo dinámico no existen parámetros estandarizados de la PVT, por lo cual, se sugiere realizar un protocolo de calibración mecánica para el IV-DGS con el fin de disminuir la variabilidad de los resultados y tener exactitud en el modelo dinámico con respecto al modelo estático.



**Figura 49. Espectros de absorbancia de la prednisona DPVS en el a) aparato 2 USP y b) IV-DGS. La longitud de onda máxima absorbida por la prednisona es de aproximadamente 242 nm (Elaboración propia).**

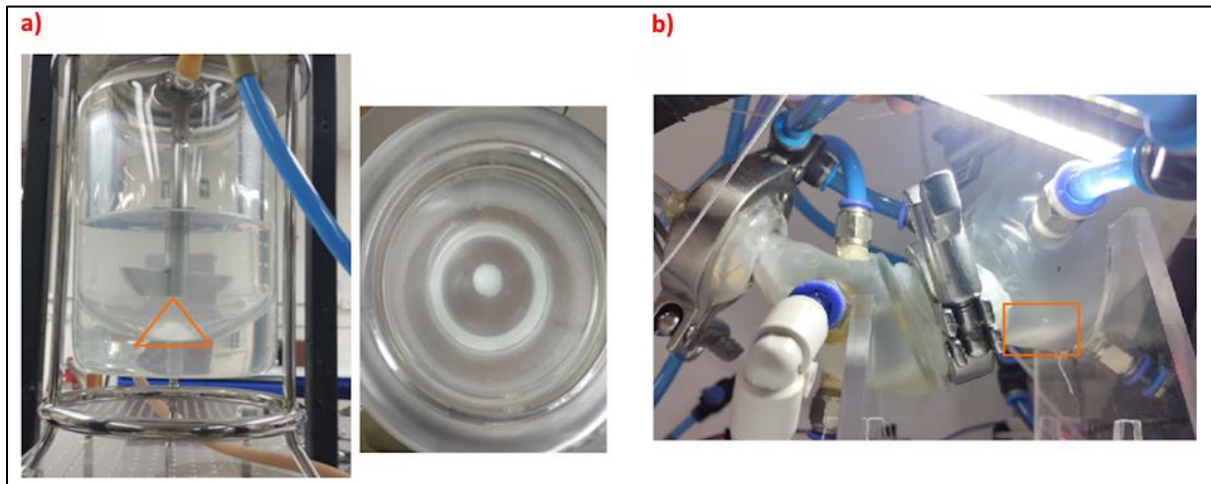
En esta comparación de la PVT los volúmenes de disolución fueron distintos: en el modelo IV-DGS se empleó un volumen de 150 mL, mientras que en el aparato 2 de la USP se utilizaron 500 mL. A pesar del menor volumen en el modelo IV-DGS fue suficiente para disolver la tableta estándar de referencia, por lo que se confirmó que se cumplió con la condición de sumidero. Aclarando que esta afirmación se validó en un único tiempo de 30 minutos de disolución en ambos modelos.

Además, como enfatizan Brito-de la Fuente et al. (2019), el rendimiento del fármaco puede verse significativamente afectado por cambios en la fisiología gastrointestinal, como los movimientos peristálticos, el tiempo de vaciado del estómago, cambios luminales y variaciones en el tiempo de tránsito, aspectos que no proporciona el modelo estático. En consecuencia, el aparato 2 de la USP no es adecuado para evaluar la bioaccesibilidad de fármacos de baja o escasa solubilidad, como es el caso de la prednisona, que pertenece a la clase II del BCS. La disolución de estos fármacos depende en gran medida de variables fisiológicas gastrointestinales, por lo que el uso del modelo dinámico que incorpore estas variables es de mayor complejidad al intentar imitar ese comportamiento real. Por lo tanto, el IV-DGS se puede utilizar en un futuro para estudios relacionados con bioaccesibilidad y biodisponibilidad.

Finalmente, como observaciones experimentales de la PVT, la Figura 50 presenta imágenes de la prueba de la tableta de prednisona DPVS, donde se observó sedimentación del material estándar en ambos modelos (Figura 50 a;b). Para el aparato 2 de la USP se observó el efecto cono debido a la zona muerta de los flujos de disolución reportada en la literatura que son menores en la parte inferior de la paleta en comparación de las esquinas de la paleta, en cambio con el movimiento peristáltico del modelo dinámico favoreció el desplazamiento de las partículas y mezcla del medio de disolución, reduciendo así la acumulación de sedimentos en forma de cono, a pesar de contar con un volumen menor que el modelo estático, por lo

que se sugiere en un futuro realizar pruebas de velocimetría de imágenes de partículas (PIV, por sus siglas en inglés) para estudiar el flujo hidrodinámico en el modelo.

Cabe mencionar que el estudio se realizó considerando únicamente un proceso mecánico de la digestión, por lo que sería necesario incluir también los procesos químicos de la digestión, es decir, utilizar un medio biorrelevante (ver Apéndice A) con enzimas y jugos gástricos para determinar si existe sedimentación en condiciones más cercanas a la fisiología gastrointestinal.



**Figura 50. Sedimentación de prednisona estándar de referencia USP en a) aparato 2 USP y b) modelo IV-DGS (Elaboración propia).**

## Conclusiones

El desempeño operativo de los modelos se realizó mediante la evaluación de la primera de dos etapas de la PVT utilizando tabletas estandarizadas de prednisona DPVS con un intervalo de 48 a 57 % de disolución de la tableta y un CV de 4.60 % como criterios de aceptación. Los resultados de la evaluación para el aparato 2 de la USP fueron de  $54.83 \pm 1.05$  % y un CV de 2.40 % utilizando el método analítico HPLC MS/MS y de  $55.28 \pm 1.70$  % con un CV de 3.85 % para el espectrofotómetro UV-Vis ambos métodos analíticos lograron los criterios de aceptación en conformidad con la hoja de certificación de la tableta estandarizada. La importancia de estos datos obtenidos es que se validó la operatividad del aparato 2 USP manufacturado en el ICAT. Dicha validez fue la referencia estandarizada para cumplir la implementación de la PVT en el modelo dinámico IV-DGS.

En lo que respecta a la evaluación del IV-DGS se obtuvo una media del porcentaje de disolución de la tableta de  $57.77 \pm 2.54$  % con un CV de 5.51 % para el HPLC MS/MS y de  $57.91 \pm 2.77$  % con un CV de 6.00 % mediante espectrofotómetro UV-Vis, resultados cercanos a los criterios de aceptación, sin embargo, no se lograron resultados dentro del intervalo establecido por el modelo estático, ya que al ser un modelo no estandarizado presentó variabilidad en los resultados del CV de la prueba, la cuál podría ser atribuida a la falta de calibración mecánica, a la posición de la tableta y al volumen gástrico diferente entre los modelos, que impactaron en los resultados para alcanzar los criterios de aceptación.

No obstante, a través del instrumento ANOVA se confirmó que los valores de la PVT en el IV-DGS y aparato 2 USP fueron estadísticamente similares, lo que permitió cumplir con la PVT en el modelo dinámico, incluso con solo seis experimentos realizados para ambos modelos y diferentes valores. Sin embargo, aunque los resultados de la PVT fueron comparables, esto no implica que los modelos sean equivalentes en su funcionamiento, ya que presentan diferencias significativas en su diseño, comportamiento hidrodinámico y capacidad volumétrica, si no que ambos modelos mostraron resultados comparables en términos de precisión en la disolución de las tabletas de prednisona. Por lo tanto, se logró validar la operatividad del IV-DGS, un método no estandarizado, mediante el desarrollo del protocolo experimental de la PVT y la comparación de sus valores con los obtenidos en el aparato 2 de la USP. Esta validación garantiza resultados reproducibles y confiables, y abre la posibilidad de utilizar el IV-DGS en futuros estudios para analizar la cinética de disolución de fármacos.

Es evidente que los métodos estáticos no representan adecuadamente las condiciones fisiológicas gastrointestinales debido a limitaciones en su diseño, como no poder simular los flujos de retropulsión, propulsión, vaciado gástrico y cambios en el pH, aspectos que un modelo dinámico intentan emular. La prueba de disolución en el aparato 2 de la USP, tiene inconvenientes como: la sensibilidad a vibraciones, al medio no deaireado y a la posición de la tableta en el vaso de disolución, entre otros (Cascone et al., 2016). En este sentido, las condiciones descritas en los capítulos 711 y 1092 de la USP para el aparato 2, están enfocadas



en el control de calidad del fármaco, por lo que difieren significativamente del entorno *in vivo*, incluyendo el volumen, la composición del medio de disolución, el pH y los mecanismos de agitación, lo que limita su correlación *in vivo-in vitro* con el rendimiento de disolución de los fármacos. Por lo que, el principal reto al elaborar pruebas de disolución en modelos dinámicos es incluir variables fisiológicas gastrointestinales, lo que incrementa su complejidad, pero es fundamental, ya que la disolución de fármacos depende de estas variables.

Se simuló el comportamiento dinámico de la parte distal del estómago humano con tres contracciones por minuto, mediante los movimientos peristálticos, los cuales fueron más suaves y controlados en comparación con la mezcla “forzada” del elemento de agitación del aparato 2 USP, donde el IV-DGS alcanzó un perfil de presión con amplitudes de 25 mmHg en la fase de propulsión y 14 mmHg en la fase de retropropulsión, que son valores fisiológicos similares a los reportados en la literatura (Bellmann et al., 2016; Maqbool et al., 2009; Urbain et al., 1990; Kelly et al., 1980). Se validó la repetibilidad del IV-DGS que ofrece resultados precisos y confiables, además proporciona una perspectiva realista para estudios de disolución de fármacos de liberación inmediata de administración oral bajo una condición dinámica que los métodos tradicionales no proporcionan. Esto refuerza su utilidad como alternativa o complemento al aparato 2 de la USP en perfiles de disolución, ofreciendo un enfoque más representativo del comportamiento mecánico del estómago humano.

Asimismo, ambos métodos analíticos fueron validados con éxito para el análisis de la tableta de prednisona estandarizada, cumpliendo con las características de desempeño y criterios de aceptación de validación establecidos. No obstante, el método HPLC MS/MS mostró una variabilidad menor en los datos en comparación con el espectrofotómetro UV-Vis, lo que sugiere una mayor selectividad, exactitud y precisión en las mediciones para la evaluación de la disolución en condiciones de laboratorio. Sin embargo, ambos métodos analíticos fueron válidos y pueden ser utilizados de manera independiente para la PVT y pruebas de disolución de fármacos.

Finalmente, el desarrollo de las PVTs en modelos dinámicos es un tema poco estudiado, de ahí su relevancia académica en comparación con los aparatos 1 y 2 de la USP, donde existe abundantes estudios sobre la variabilidad de los resultados de estas pruebas usando condiciones estandarizadas. Aunque, si existen estudios sobre disolución *in vitro* de formas farmacéuticas orales sólidas de liberación inmediata en modelos dinámicos que simulan diversas condiciones gástricas con un enfoque de cinética de disolución, suelen utilizar fármacos genéricos como objeto de estudio y no un material estandarizado, como las tabletas de prednisona DPVS. Esto limita la comparabilidad de los resultados entre los modelos dinámicos.

### ***Trabajo a futuro***

Como actividades futuras encaminadas a las pruebas de disolución de fármacos en el simulador gástrico IV-DGS y en el modelo estático se sugieren las siguientes:

- Realizar otro conjunto de seis pruebas de la segunda etapa de la PVT para validar la exactitud del IV-DGS.
- Desarrollar protocolos de calibración mecánica para el IV-DGS que incluyan el uso de una mesa neumática como superficie de trabajo, con el fin de eliminar las vibraciones del entorno.
- Realizar perfiles de disolución que incluyan la digestión mecánica y química, utilizando un medio biorrelevante con enzimas y fluidos gástricos simulados en diferentes fases de la digestión, con el fin de evaluar el rendimiento de disolución y la cinética de fármacos genéricos en condiciones más cercanas a la fisiología gastrointestinal.
- Realizar estudios hidrodinámicos mediante pruebas de PIV para analizar el comportamiento del flujo en ambos modelos.

## Referencias

Abdou, H. M. (2003). Disolución. En Remington, Farmacia (20a ed., Vol. I, pp. 765-768). Argentina: Editorial Panamericana.

Almukainzi, M., Bou-Chacra, N. A., Walker, R. B., y Löbenberg, R. (2014). Biorelevant dissolution testing. In *Therapeutic Delivery Solutions* (pp. 335–365). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118903681.ch12>.

Aranda, M., y Rosasco, M. A. (2019). La farmacia de los medicamentos genéricos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(2), 357-371.

Atole, D. M., y Rajput, H. H. (2018). ULTRAVIOLET SPECTROSCOPY AND ITS PHARMACEUTICAL APPLICATIONS- A BRIEF REVIEW. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(2), 59. doi:10.22159/ajpcr.2018.v11i2.21361

Azarmi, S., Roa, W., y Löbenberg, R. (2007). Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 328(1), 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.001>

Barros, L., Retamal, C., Torres, H., Zúñiga, R. N., y Troncoso, E. (2016). Development of an in vitro mechanical gastric system (IMGS) with realistic peristalsis to assess lipid digestibility. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 90, 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.04>

Bellmann, S., Lelieveld, J., Gorissen, T., Minekus, M., & Havenaar, R. (2016). Development of an advanced in vitro model of the stomach and its evaluation versus human gastric physiology. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.030>

Bhardwaj, S. K., Dwivedia, K., y Agarwala, D. D. (2015). A review: HPLC method development and validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 5(4), 76-81.

Bornhorst, G. M., y Singh, R. P. (2014). Gastric digestion in vivo and in vitro: How the structural aspects of food influence the digestion process. *Annual Review of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092346>

Brito-de la Fuente, E., Secouard, S., Siegert, N., Perelló, F. P., y Gallegos, C. (2019). Determination of dissolution profile and bioaccessibility of ketosteril using an advanced gastrointestinal in vitro model. *Dissolution Technologies*, 26(2), 30–38. <https://doi.org/10.14227/dt260219p30>

Brown, W., Perivilli, S., Podolsky, D., Stippler, E. S., y Walfish, S. (2019). The critical role of the USP performance verification test in dissolution testing and qualification of the paddle apparatus. *Dissolution Technologies*, 26(1), 6–12. <https://doi.org/10.14227/dt260119p6>

Casanova-Godoy, L. A. M., Castillo-Saavedra, E. F., Reynoso-Leyva, E. M., y Ayala-Jara, C. I. (2018). Estudio comparativo de perfiles de disolución de tabletas de prednisona 20 mg

comercializados en Perú. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 16(3), 13-21.

Cascone, S., Lamberti, G., Marra, F., Titomanlio, G., Amore, M., y Barba, A. A. (2016). Gastrointestinal behavior and ADME phenomena: I. In vitro simulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 35, 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.08.002>

Deng, G., Ashley, A. J., Brown, W. E., Eaton, J. W., Hauck, W. W., Kikwai, L. C., Liddell, M. R., Manning, R. G., Munoz, J. M., Nithyanandan, P., Glasgow, M. J., Stippler, E., Wahab, S. Z., y Williams, R. L. (2008). The USP performance verification test, part I: USP lot P prednisone tablets—quality attributes and experimental variables contributing to dissolution variance. *Pharmaceutical Research*, 25(5), 1100–1109. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9498-7>

Diana M., y Daniel R., (2023). The importance of digestive process. Gastrointestinal simulators. Implications in nutraceutical research. *Nutrición Clínica En Medicina*, XVII, 207–220. DOI: 10.7400/NCM.2023.17.3.5128

DiPiro, J. T. (2003). Biopharmaceuticals. En *Encyclopedia of Clinical Pharmacy* (págs. 82-101). USA: MerceL Dekker

Dissolution Toolkit Procedures for Mechanical Calibration and Performance Verification Test; Apparatus 1 and Apparatus 2; version 2.0. Dosage Form Performance Laboratory, United States Pharmacopeia.,(2010),<https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/chemical-medicines/dissolution-toolkit-version2.pdf>

Dokoumetzidis, A., y Macheras, P. (2006). A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *International Journal of Pharmaceutics*, 321(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.011>

Donis Rabanales, L.F., (2018). Estudio hidrodinámico in vitro del flujo gástrico [En línea, Universidad Nacional Autónoma de México] [https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/8QK9KV5IBCBLNJFCT79NMVYN91ECGMESMPJESVY4GIUTFG4KX6-01146?func=full-set-setyset\\_number=083640yset\\_entry=000002yformat=999](https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/8QK9KV5IBCBLNJFCT79NMVYN91ECGMESMPJESVY4GIUTFG4KX6-01146?func=full-set-setyset_number=083640yset_entry=000002yformat=999)

Donis Rabanales, L.F., (2023). Diseño de los modelos dinámicos in vitro del sistema gastrointestinal [En línea, Universidad Nacional Autónoma de México] [https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/8QK9KV5IBCBLNJFCT79NMVYN91ECGMESMPJESVY4GIUTFG4KX6-09032?func=full-set-setyset\\_number=083629yset\\_entry=000001yformat=999](https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/8QK9KV5IBCBLNJFCT79NMVYN91ECGMESMPJESVY4GIUTFG4KX6-09032?func=full-set-setyset_number=083629yset_entry=000001yformat=999)

Donis-Rabanales, F., López-Ruiz, T., Ruiz-Huerta, L., Ascanio, G., Brito-de la Fuente, E., y Caballero-Ruiz, A. (2022). Development of an in vitro distal gastric simulator to mimic the mechanical action of the human stomach. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 161(111902), 111902. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111902>

Dressman, J. B., y Krämer, J. (Eds.). (2005). *Pharmaceutical dissolution testing* (No. 21892). Boca Raton

Escalona Ortiz, M., (2018). Automatización e instrumentación de un simulador gástrico [En línea, Universidad Nacional Autónoma de México]

[https://tesiuam.dgb.unam.mx/F/52BUKGBP2PY5LKVNSAKK63TMIU6YC9RQ2IF1IBUF7BBJ9MJTC10577?func=findbylocal\\_base=TES01yrequest=simulador+gastricoyfind\\_code=WRyadjacent=Nyfilter\\_code\\_2=WYRyfilter\\_request\\_2=yfilter\\_code\\_3=WYRyfilter\\_request\\_3=](https://tesiuam.dgb.unam.mx/F/52BUKGBP2PY5LKVNSAKK63TMIU6YC9RQ2IF1IBUF7BBJ9MJTC10577?func=findbylocal_base=TES01yrequest=simulador+gastricoyfind_code=WRyadjacent=Nyfilter_code_2=WYRyfilter_request_2=yfilter_code_3=WYRyfilter_request_3=)

FDA. (2018). Guía para la Industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata. FDA. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guia-para-la-industria-pruebas-de-disolucion-de-formas-de-dosificacion-oral-solidas-de-liberacion>

FEUM. (2023). Validación de métodos analíticos. <https://farmacopea.org.mx/Repositorio/Documentos/1874.pdf>

Lucas-González, R. (2016). Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión in vitro. *Revista Doctorado UMH*, 2(2), 5-pp5. <https://revistas.innovacionumh.es/index.php/doctorado/article/view/625>

Gray, V. A., y Rosanske, T. W. (2014). Dissolution. En *Specification of Drug Substances and Products* (pp. 245–263). Elsevier.

Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., y Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591–600. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>

Huayanay-Falconí, L. (2012). Bioequivalencia en medicamentos. *Revista Médica Herediana*, 23(4), 221-222.

Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., y McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>

Juárez Olguín, H. (2019). Comportamiento del proceso LADME de los medicamentos en niños. <http://repositorio.pediatrica.gob.mx:8180/handle/20.500.12103/1728>

Kaur, V., y Mehara, N. (2016). A review on: Importance of superdisintegrants on immediate release tablets. *International Journal of Research and Scientific Innovation*, 3(2), 39-43.

Kelly, K. A. (1980). Gastric emptying of liquids and solids: roles of proximal and distal stomach. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 239(2), G71–G76. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1980.239.2.g71>

Kong, F., y Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, 73(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x>

Kong, Fanbin, y Singh, R. P. (2010). A Human Gastric Simulator (HGS) to study food digestion in the human stomach. *Journal of Food Science*, 75(9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01856.x>

Kostewicz, E. S., Abrahamsson, B., Brewster, M., Brouwers, J., Butler, J., Carlert, S., Dickinson, P. A., Dressman, J., Holm, R., Klein, S., Mann, J., McAllister, M., Minekus, M., Muenster, U.,

Lawrence, A. J., y DrugBank. (2023). *DrugBank: A comprehensive resource for drug information*. DrugBank. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00635>

Maqbool, S., Parkman, H. P., & Friedenberg, F. K. (2009). Wireless capsule motility: Comparison of the smartPill® GI monitoring system with scintigraphy for measuring whole gut transit. *Digestive Diseases and Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s10620-009-0899-9>

Merck y Co., Inc. (2017). *The Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals* (15.<sup>a</sup> ed.). Merck Research Laboratories. <https://merckindex.rsc.org/monographs/m9112>

Müllertz, A., Verwei, M., Vertzoni, M., Weitschies, W., y Augustijns, P. (2014). In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 57, 342–366. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.024>

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food y Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>.

Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., y Huis In 't Veld, J. (1995). A multicompartimental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA. Alternatives to Laboratory Animals*.

Montalvo González J., (2021). Instrumentación y protocolos de digestibilidad para modelos gástricos in vitro [En línea, Universidad Nacional Autónoma de México] [https://tesiuam.dgb.unam.mx/F/TNUCCNKNUXIGVLUYFGTGLM9XB1SNY76TNGUHHMFL321DRSIQSF04466?func=findbylocal\\_base=TESO1yrequest=protocolos+de+digestibilidadyfind\\_code=WRDyadjacent=Nyfilter\\_code\\_2=WYRYfilter\\_request\\_2=yfilter\\_code\\_3=WYRYfilter\\_request\\_3=](https://tesiuam.dgb.unam.mx/F/TNUCCNKNUXIGVLUYFGTGLM9XB1SNY76TNGUHHMFL321DRSIQSF04466?func=findbylocal_base=TESO1yrequest=protocolos+de+digestibilidadyfind_code=WRDyadjacent=Nyfilter_code_2=WYRYfilter_request_2=yfilter_code_3=WYRYfilter_request_3=)

Moore, K. L., Dailey, A. F., Agur, A.M.R. (2013). *Anatomía con orientación clínica*. Wolters Kluwer.

National Center for Biotechnology Information. (2023). *PubChem compound summary for prednisona*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/prednisona>

Pande, V., Karale, P., Goje, P., y Mahanavar, S. (2016). An overview on emerging trends in immediate release tablet technologies. *Austin Therapeutics*, 3(1), 1026.

Palma-Aguirre, J. A. (1998). Medicamentos genéricos, biodisponibilidad y bioequivalencia. *Gac Med Mex*, 134(4), 491-494.

Rocha, F. S., Gomes, A. J., Lunardi, C. N., Kaliaguine, S., y Patience, G. S. (2018). Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 96(12), 2512–2517. <https://doi.org/10.1002/cjce.23344>

Saavedra, I., Iturriaga, V., Ávila, L., y Quiñones, L. (2011). Estudios de bioexención (in vitro) para establecer equivalencia de medicamentos. *Cuadernos médico sociales*, 51(2), 66-79.

Shah, V. P. (2001). Dissolution: A Quality Control Test vs. A Bioequivalence Test. *Dissolution technologies*, 8(4), 6–7. <https://doi.org/10.14227/dt080401p6>

Shah, V. P., y Amidon, G. L. (2014). G.L. amidon, H. lennernas, V.p. shah, and J.r. crison. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, *pharm res* 12, 413–420, 1995—backstory of BCS. *The AAPS Journal*, 16(5), 894–898. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9620-9>

Siddiqui, M. R., AlOthman, Z. A., y Rahman, N. (2017a). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1409–S1421. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016>

Talevi, A., Quiroga, P., y Ruiz, M. E. (2016). Procesos biofarmacéuticos. Series: Libros de Cátedra.

Uddin, R., Saffron, N., y Sutradhar, K. B. (2011). Dissolution and dissolution apparatus: a review. *Int. J. Curr. Biomed. Pharm. Res*, 1(4), 201-207.

Urbain, J. L., Van Cutsem, E., Siegel, J. A., Mayeur, S., Vandecruys, A., Janssens, J., De Roo, M., y Vantrappen, G. (1990). Visualization and characterization of gastric contractions using a radionuclide technique. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 259(6), G1062–G1067. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1990.259.6.g1062>

USP (2010). <711> Dissolution. In USP–NF. United States Pharmacopeia.

USP. (2018) . <1025> MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA LA VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS, [https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp\\_pdf/ES/gc-1210-esp.pdf](https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/ES/gc-1210-esp.pdf)

USP. (2023) Guía de la USP sobre procedimientos para la prueba de calibración mecánica y verificación del rendimiento (aparato 1 y aparato 2) . [https://usp.mastercontrol.com/usp/index.cfm#/documents/IKPKZIO35BCABOBICX/view?backPath=%2Findex.cfm%23%2Fhubs%2FdocumentsyfilePath=%2Fusp%2FMain%2FMASTERControl%2Fvault%2Fview\\_pdf.cfm%3Fmd%3D4%26withSettings%3Dfalse%26infoCardID%3DIKPKZIO35BCABOBICX%26documentTitle%3DPDF%20Viewer%26packetID%3D%26training%3Dfalse%26checkRights%3Dfalse](https://usp.mastercontrol.com/usp/index.cfm#/documents/IKPKZIO35BCABOBICX/view?backPath=%2Findex.cfm%23%2Fhubs%2FdocumentsyfilePath=%2Fusp%2FMain%2FMASTERControl%2Fvault%2Fview_pdf.cfm%3Fmd%3D4%26withSettings%3Dfalse%26infoCardID%3DIKPKZIO35BCABOBICX%26documentTitle%3DPDF%20Viewer%26packetID%3D%26training%3Dfalse%26checkRights%3Dfalse)

USP. (2024). General Chapter, <1225> Validation of Compendial Procedures. USP-NF. Rockville, DOI:[https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M99945\\_04\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M99945_04_01)

USP. (2024). General Chapter, <1092> The Dissolution Procedure: Development and Validation. USP-NF. Rockville, [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M643\\_05\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M643_05_01)

Vardakou, M., Mercuri, A., Barker, S. A., Craig, D. Q. M., Faulks, R. M., y Wickham, M. S. J. (2011). Achieving antral grinding forces in biorelevant in vitro models: Comparing the USP dissolution apparatus II and the dynamic gastric model with human in vivo data. *AAPS PharmSciTech*, 12(2), 620–626. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9616-z>

Wickham, M. J. S., Faulks, R. M., Mann, J., y Mandalari, G. (2012). The design, operation, and application of a dynamic gastric model. *Dissolution technologies*, 19(3), 15–22. <https://doi.org/10.14227/dt190312p15>

Zaborenko, N., Shi, Z., Corredor, C. C., Smith-Goettler, B. M., Zhang, L., Hermans, A., Neu, C. M., Alam, M. A., Cohen, M. J., Lu, X., Xiong, L., y Zacour, B. M. (2019). First-principles and empirical approaches to predicting in vitro dissolution for pharmaceutical formulation and process development and for product release testing. *The AAPS Journal*, 21(3). <https://doi.org/10.1208/s12248-019-0297-y>



## Apéndice A. Medios de disolución biorrelevantes

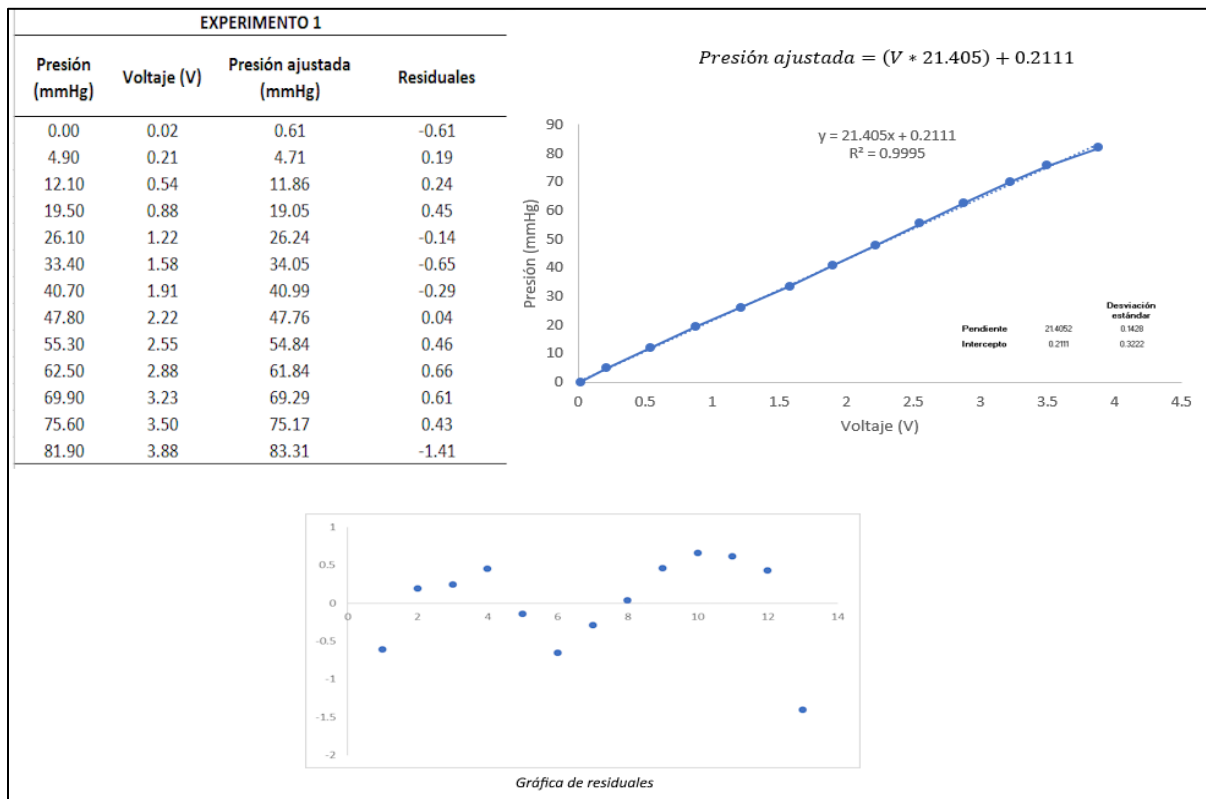
Condición	Medio de Disolución	Composición	pH
<b>Medios convencionales USP</b>			
<b>Contenido Gástrico en Ayuno</b>	Medio Ácido (USP)	Solución de ácido clorhídrico	1,2
	Medio Ácido con Pepsina (USP)	Solución de ácido clorhídrico, pepsina	1,2
<b>Contenido Gástrico en Alimentación</b>	Medio Tampón (USP)	Solución tampón de acetato	4,5
<b>Contenido Intestinal en Ayuno</b>	Medio Tampón Intestinal (USP)	Solución tampón de fosfato	6,8
<b>Contenido Intestinal en Alimentación</b>	Medio Tampón Intestinal en Alimentación (USP)	Solución tampón de fosfato	7,2
	Medio Acuoso (USP)	Solución acuosa tamponada	5,5
<b>Medios Biorrelevantes</b>			
<b>Contenido Gástrico en Ayuno</b>	Fluido Gástrico Simulado (SGF)	Solución de ácido clorhídrico con pepsina; tensión superficial similar al agua.	1,2
	Líquido Gástrico Simulado en Ayunas (FaSSGF)	Simula el jugo gástrico basal humano con un vaso de agua. Contiene pepsina, sales biliares y lecitina.	1,6
<b>Contenido Gástrico en Alimentación</b>	Secuencia de Medios de Disolución	Medios secuenciales que simulan diferentes etapas de digestión (temprana, media, tardía).	variable (3-1.2)
	Medio con pH Variable Continuo	Ajuste continuo del pH para simular el contenido gástrico	6.8
<b>Contenido Intestinal en Ayunas</b>	Líquido Intestinal Simulado (SIF)	Solución con pancreatina.	6.8
<b>Contenido Intestinal en Alimentación</b>	Líquido Intestinal Simulado en Estado de Ayuno (FaSSIF)	Solución con lecitina	6.5
	Fluido Simulado en Estado de Alimentación (FeSSIF)	Solución con lecitina, ácido acético, hidróxido de sodio y cloruro de sodio.	5
<b>Contenido Colónico</b>	Líquido Colónico Simulado (SCoF)	Ácidos grasos, solución con pH ajustable	variable

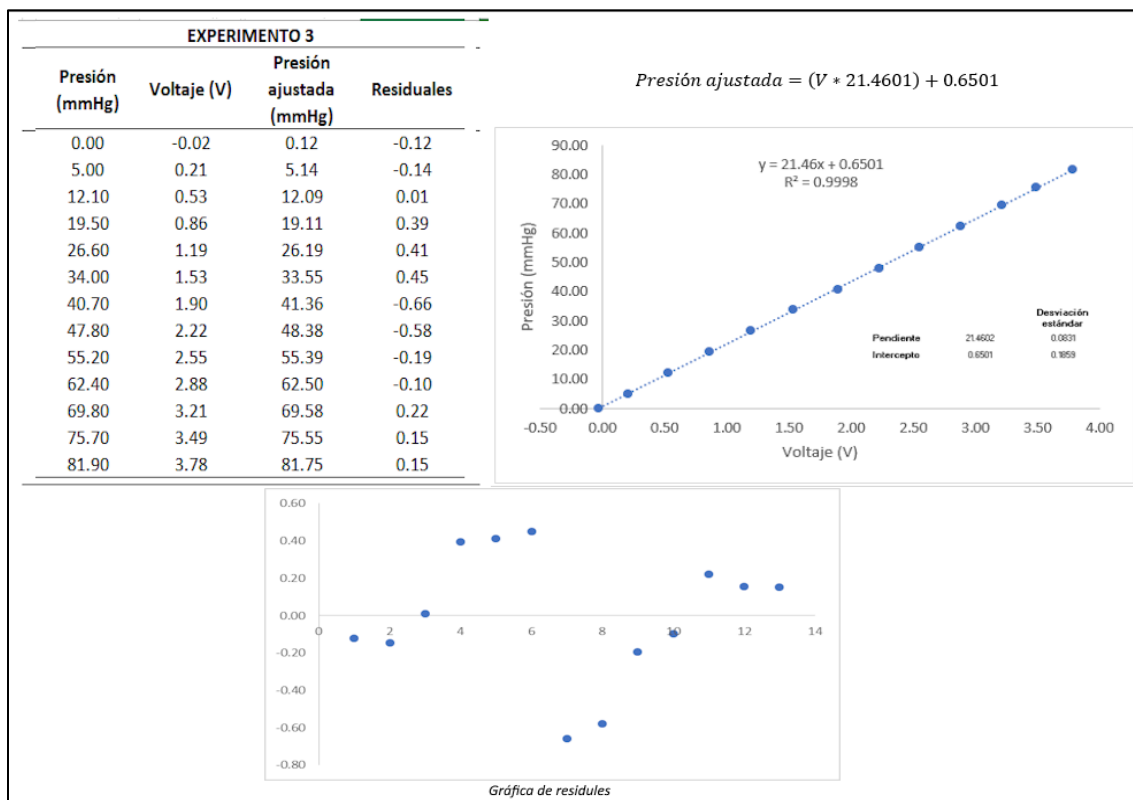
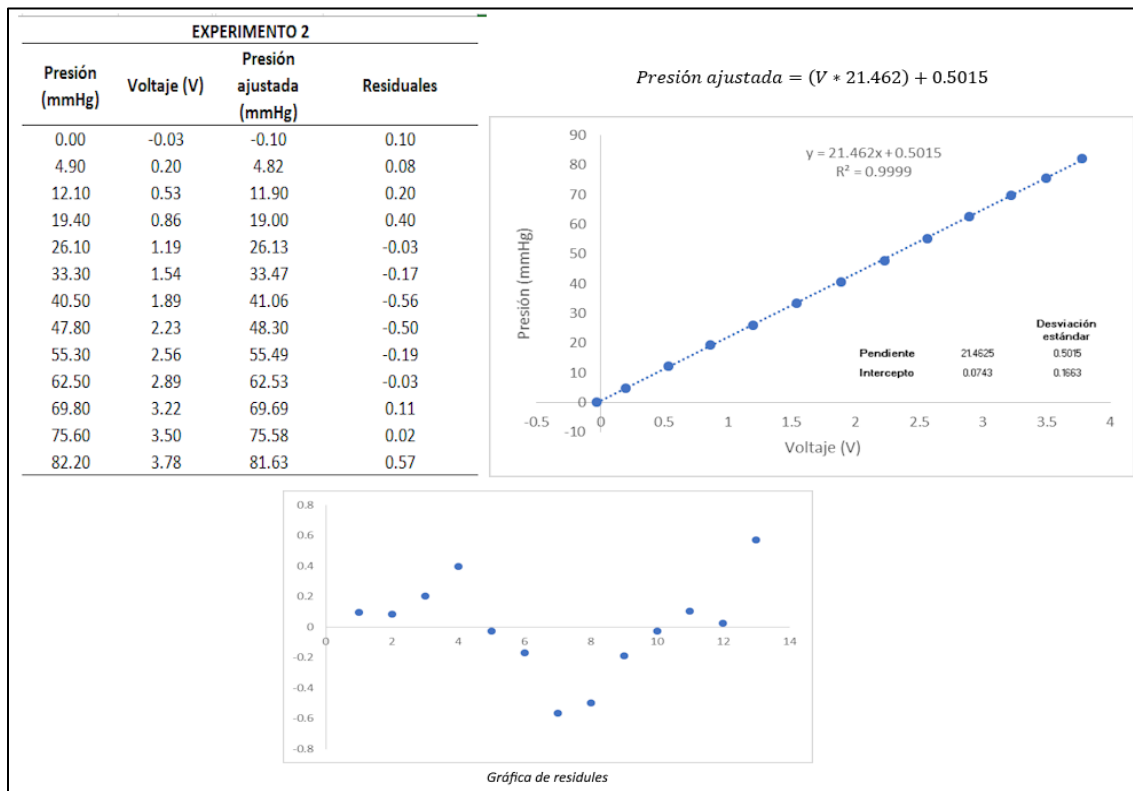
## Apéndice B. Implementación del catéter de manometría esofágica para medir la presión

Con base en los resultados obtenidos durante la medición, se utilizó un software de análisis matemático para graficar la recta que describe el comportamiento del sensor circunferencial amarillo para los seis experimentos, el cual corresponde a la parte distal del catéter de manometría esofágica. Posteriormente, se realizó un ajuste de los valores de presión utilizando la ecuación (11), con el fin de obtener los valores de los residuales para los seis experimentos.

Donde:  $P =$  Valor de la presión ajustada,  $V =$  Voltaje (11)

$$P = (\text{pendiente} * V) + \text{ordenada al origen}$$

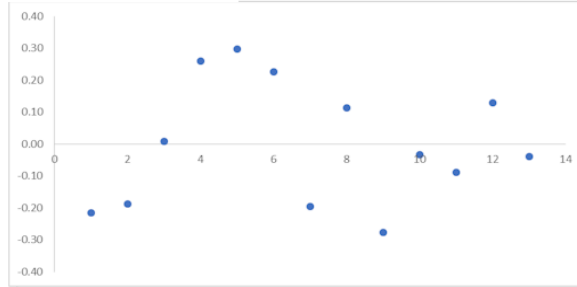
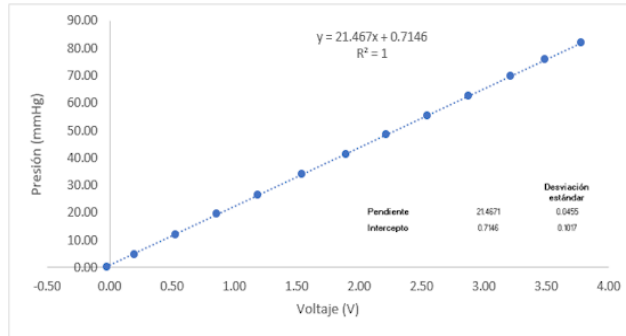




**EXPERIMENTO 4**

Presión (mmHg)	Voltaje (V)	Presión ajustada (mmHg)	Residuales
0.00	-0.02	0.21	-0.21
4.80	0.20	4.99	-0.19
12.10	0.53	12.09	0.01
19.50	0.86	19.24	0.26
26.60	1.19	26.30	0.30
34.00	1.54	33.77	0.23
41.20	1.90	41.39	-0.19
48.40	2.22	48.29	0.11
55.20	2.55	55.48	-0.28
62.40	2.88	62.43	-0.03
69.60	3.21	69.69	-0.09
75.70	3.49	75.57	0.13
81.80	3.78	81.84	-0.04

$Presión\ ajustada = (V * 21.4670) + 0.7146$

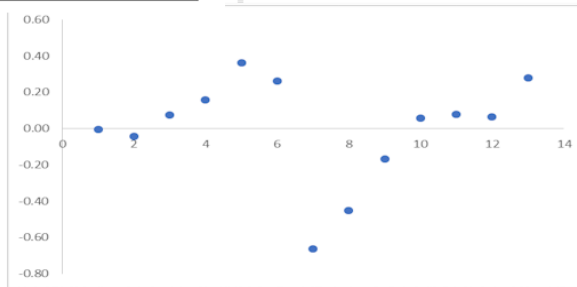
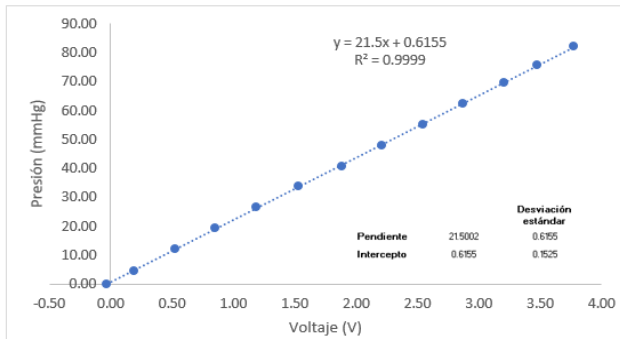


Gráfica de residuales

**EXPERIMENTO 5**

Presión (mmHg)	Voltaje (V)	Presión ajustada (mmHg)	Residuales
0.00	-0.03	0.00	0.00
4.70	0.19	4.74	-0.04
12.00	0.53	11.92	0.08
19.20	0.86	19.04	0.16
26.50	1.19	26.14	0.36
33.90	1.54	33.64	0.26
40.50	1.89	41.16	-0.66
47.70	2.21	48.15	-0.45
55.10	2.54	55.27	-0.17
62.40	2.87	62.34	0.06
69.60	3.21	69.52	0.08
75.50	3.48	75.44	0.06
82.10	3.78	81.82	0.28

$Presión\ ajustada = (V * 21.500) + 0.61553$

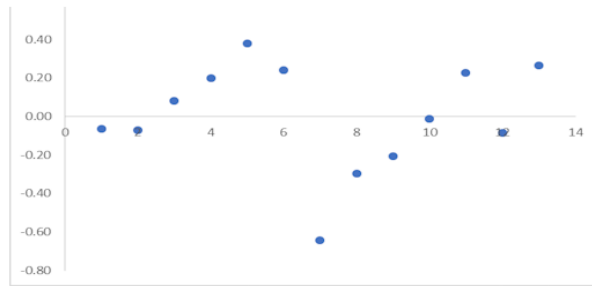
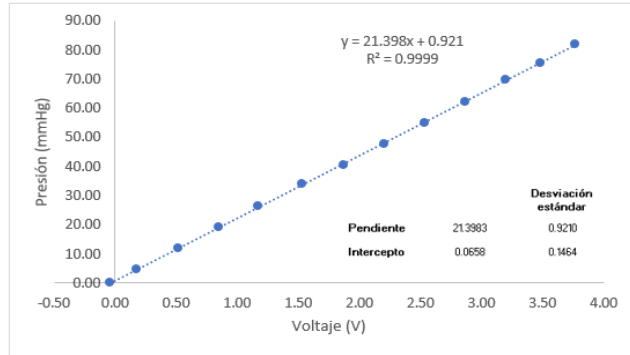


Gráfica de residuales

EXPERIMENTO 6

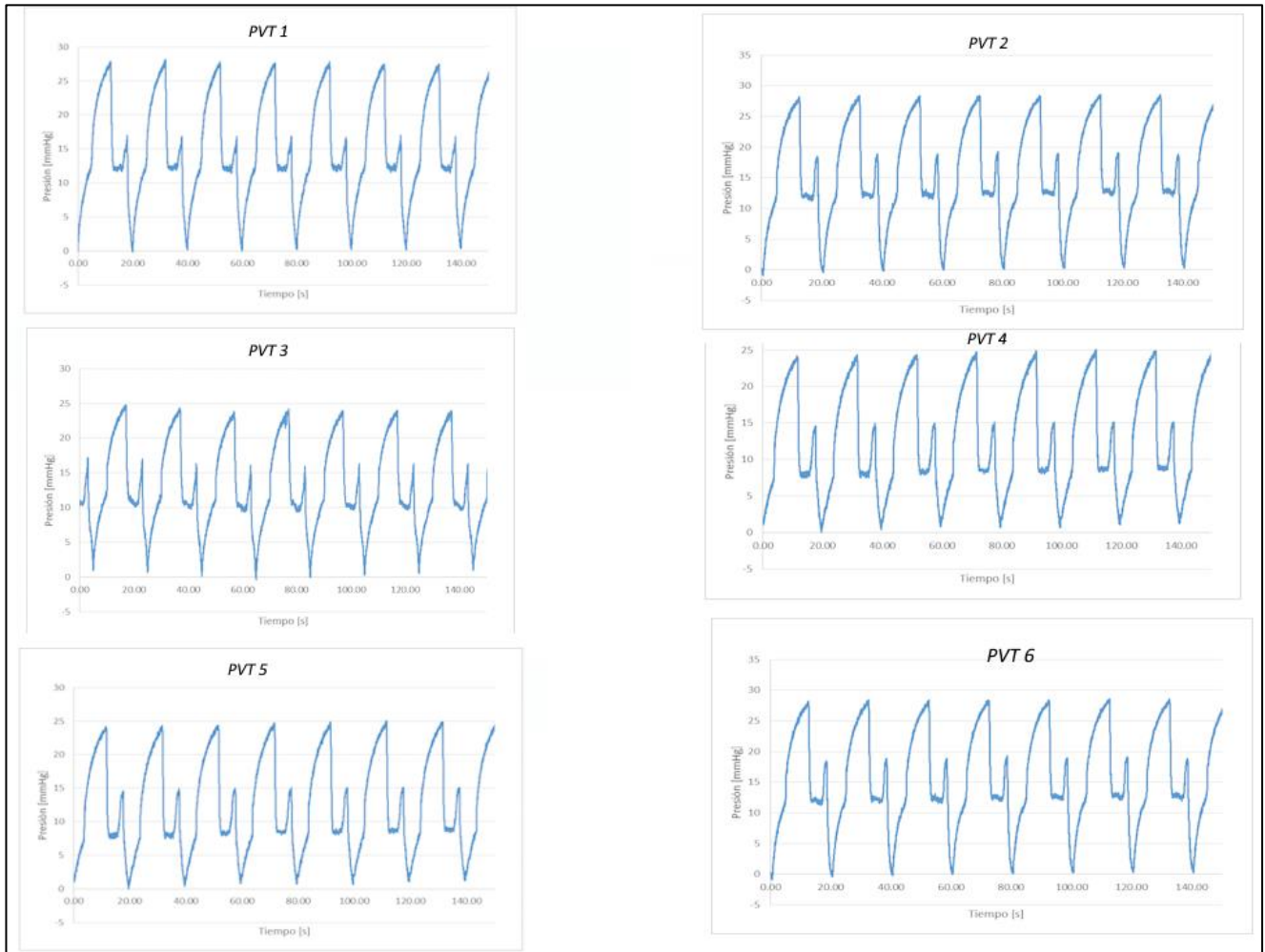
Presión (mmHg)	Voltaje (V)	Presión ajustada (mmHg)	Residuales
0.00	-0.04	0.07	-0.07
4.70	0.18	4.77	-0.07
12.00	0.51	11.92	0.08
19.20	0.85	19.00	0.20
26.40	1.17	26.02	0.38
33.90	1.53	33.66	0.24
40.40	1.88	41.04	-0.64
47.70	2.20	48.00	-0.30
55.00	2.54	55.21	-0.21
62.30	2.87	62.31	-0.01
69.60	3.20	69.37	0.23
75.30	3.48	75.39	-0.09
81.90	3.77	81.63	0.27

$Presión\ ajustada = (V * 21.398) + 0.921$



Gráfica de residuales

## Perfiles de presión de las PVTs



## Apéndice C. Cálculos de la validación de los métodos analíticos (HPLC MS/MS y UV-Vis)

### Linealidad

#### 1-Tabla para la curva de calibración (HPLC MS/MS)

Pureza del estándar			STD		STD 50 ppm			
			mg/L	Real (mg/L)	Vol <sub>calc</sub> (mL)	Vol <sub>calc</sub> (uL)	Vol <sub>real</sub> (uL)	C <sub>real</sub> (mg/L)
<b>Prednisona</b>	0.98	mg/mg	1460	1430.8	0.874	873.6	874.0	50.02

Punto de la curva	Concentración final (mg/L)	Volumen final (uL)	Concentración de la solución 1 y 2 de referencia (mg/L)	Volumen de la alícuota de la solución 1 y 2 de referencia (uL)
1	1.00		5.00	200.00
2	2.50		5.00	500.00
3	5.00		5.00	1000.00
4	7.50		50.00	150.00
5	10.00	1000.00	50.00	200.00
6	12.51		50.00	250.00
7	15.01		50.00	300.00
8	17.51		50.00	350.00
9	20.01		50.00	400.00

#### 2-Cálculos para el IC de los parámetros de regresión lineal (HPLC MS/MS)

Se determinó el intervalo de confianza para los parámetros de la ecuación lineal, tanto para la pendiente como para la ordenada al origen, utilizando la ecuación 2 (ver subtema 4.5.2). Para ello, se aplicó una prueba de t-Student con un nivel de confianza del 95% y n-2 grados de libertad, considerando dos colas en la distribución y el valor crítico en tablas con el valor  $\alpha$ .

**Para la pendiente:**

Donde  $t = 2.06$ ,  $s = 122.7$  y  $n = 27$ ,

$$\text{Error asociado} = 2.06_{(0.05,25)} * \frac{122.7}{\sqrt{27}} = 48.63 \text{ (dos colas)}$$

Por lo tanto, el intervalo de confianza de la pendiente es  $11450.75 \pm 48.6$

**Para la ordenada al origen:**

Donde  $t = 2.06$ ,  $s = 1461.2$  y  $n = 27$ ,

$$\text{Error asociado} = 2.06_{(0.05,25)} * \frac{1461.2}{\sqrt{27}} = 579.30 \text{ (dos colas)}$$

Por lo tanto, el intervalo de confianza de la pendiente es  $14198.29 \pm 579.30$

**3-Prueba t-Student sobre la pendiente de la curva de calibración (HPLC MS/MS).**

Mediante una prueba de hipótesis, se buscó determinar si la pendiente de la recta de la curva de calibración era estadísticamente diferente de cero. Para ello, se realizó una prueba de t-Student, comparando la pendiente con el valor de referencia que es una media de cero ( $\mu$ ). El valor de t se calculó utilizando la ecuación 3 (ver subtema 4.5.2).

$$H_0: \bar{x} = \mu$$

$$H_1: \bar{x} > \mu$$

Donde  $\bar{x} = 11450.75$  es la pendiente,  $\mu = 0$ ,  $n = 27$  y  $s = 122.7$

$$t_0 = \frac{(11450.75 - 0)\sqrt{27}}{122.7} = 484.92$$

Sí  $n - 2 = 25$  y  $\alpha = 0.05$ ;  $t_c = 1.7081$  (una cola)

como  $t_0 > t_c$  se rechaza  $H_0$

Por lo tanto, la diferencia entre las medias es estadísticamente significativa.

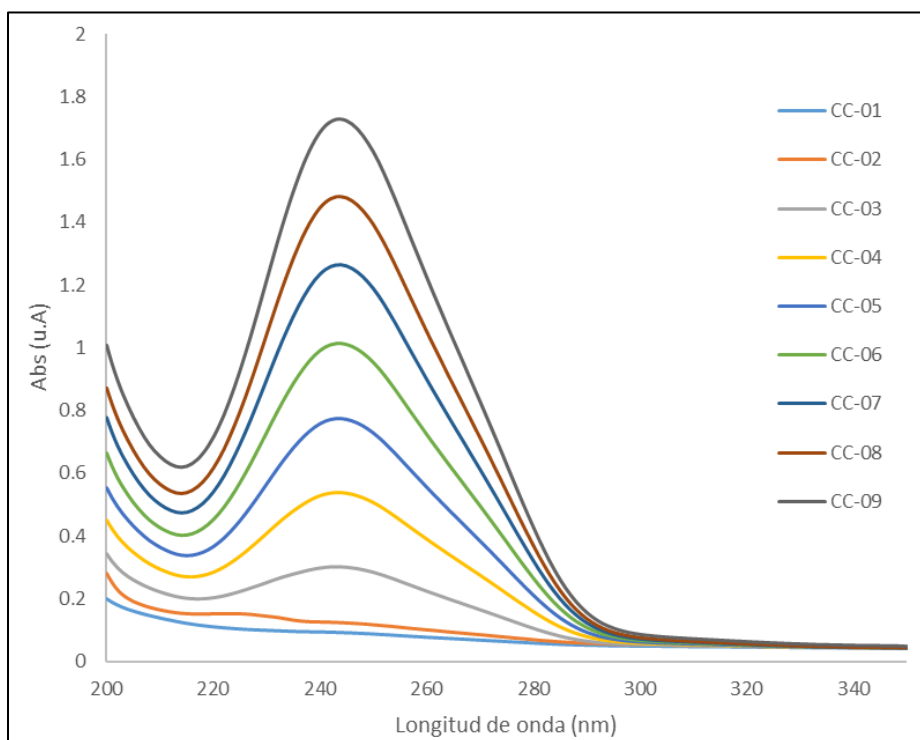


#### 4-Tabla para la curva de calibración (UV-Vis)

Pureza del estándar	STD			STD 100 ppm			
	mg/L	Real (mg/L)	Vol <sub>calc</sub> (mL)	Vol <sub>calc</sub> (uL)	Vol <sub>real</sub> (μL)	C <sub>real</sub> (mg/L)	
Prednisona	0.98 mg/mg	1450	1421	1.759	1759.3	1760.0	100.04

Punto de la curva	Concentración final (mg/L)	Volumen final (μL)	Concentración de la solución de referencia (mg/L)	Volumen de la alícuota de la solución de referencia (μL)
1	0.50			25.00
2	1.00			50.00
3	5.00			250.00
4	10.00			500.00
5	15.01	5000.00	100.00	750.00
6	20.01			1000.00
7	25.01			1250.00
8	30.01			1500.00
9	35.01			1750.00

En la siguiente grafica se muestra los espectros de absorción de las diluciones de prednisona estándar Sigma-Aldrich del intervalo de trabajo de la curva de calibración, donde se observó que la longitud de onda máxima absorbida por la prednisona fue de 242 nm en la región UV-Vis, lo cual coincidió con la longitud de onda establecida en la “Guía de la USP sobre procedimientos para la prueba de calibración mecánica y verificación del rendimiento (aparato 1 y aparato 2)” (USP, 2023), así como con el capítulo general 711 de la USP. Esto confirmo que las mediciones se realizaron bajo los parámetros oficiales.



### 5- Cálculos para el IC de los parámetros de regresión lineal (UV-Vis)

Se determinó el intervalo de confianza para los parámetros de la ecuación lineal, tanto para la pendiente como para la ordenada al origen, utilizando la ecuación 2 (ver subtema 4.5.2). Para ello, se aplicó una prueba de t-Student con un nivel de confianza del 95% y n-2 grados de libertad, considerando dos colas en la distribución.

#### Para la pendiente:

Donde  $t = 2.06$ ,  $s = 0.0005$  y  $n = 27$ ,

$$\text{Error asociado} = 2.06_{(0.05,25)} * \frac{0.0005}{\sqrt{27}} = 0.0002 \text{ (dos colas)}$$

Por lo tanto, el intervalo de confianza de la pendiente es  $0.0434 \pm 0.0002$

#### Para la ordenada al origen:

Donde  $t = 2.06$ ,  $s = 0.0113$  y  $n = 27$ ,

$$\text{Error asociado} = 2.06_{(0.05,25)} * \frac{0.0113}{\sqrt{27}} = 0.0045 \text{ (dos colas)}$$

Por lo tanto, el intervalo de confianza de la pendiente es  $0.0452 \pm 0.0045$

### 6- Prueba t-Student sobre la pendiente de la curva de calibración (UV-Vis)

Mediante una prueba de hipótesis, se buscó determinar si la pendiente de la recta de la curva de calibración era estadísticamente diferente de cero. Para ello, se realizó una prueba de t-Student, comparando la pendiente con el valor de referencia (cero). El valor de t se calculó utilizando la ecuación 3 (ver subtema 4.5.2).

$$H_0: \bar{x} = \mu$$

$$H_1: \bar{x} > \mu$$

Donde  $\bar{x} = 0.0434$ ,  $\mu = 0$ ,  $n = 27$  y  $s = 0.0005$

$$t_0 = \frac{(0.0434 - 0)\sqrt{27}}{0.0005} = 451.026$$

Sí  $n - 2 = 25$  y  $\alpha = 0.05$ ;  $t_c = 1.7081$  (una cola)

como  $t_0 > t_c$  se rechaza  $H_0$

Por lo tanto, la diferencia entre las medias es estadísticamente significativa.

### Exactitud

#### 7- Cálculos para el IC de la pendiente para la exactitud (HPLC MS/MS)

Se determinó el intervalo de confianza para la pendiente, utilizando la ecuación 2 (ver subtema 4.5.2). Para ello, se aplicó una prueba de t-Student con un nivel de confianza del 95% y n-2 grados de libertad, considerando dos colas en la distribución.

#### Para la pendiente:

Donde  $t = 2.06$ ,  $s = 0.0136$  y  $n = 27$ ,

$$\text{Error asociado} = 2.06_{(0.05,25)} * \frac{0.0136}{\sqrt{27}} = 0.0054 \text{ (dos colas)}$$

Por lo tanto, el intervalo de confianza de la pendiente es  $1.0000 \pm 0.0054$

### 8- Prueba t-Student sobre la pendiente del parámetro de exactitud (HPLC MS/MS)

Mediante una prueba de hipótesis, se buscó determinar si la pendiente de la recta de la curva de calibración era estadísticamente diferente de cero. Para ello, se realizó una prueba de t-Student, comparando la pendiente con el valor de referencia (cero). El valor de t se calculó utilizando la ecuación 3 (ver subtema 4.5.2).

$$H_0: \bar{x} = \mu$$

$$H_1: \bar{x} > \mu$$

Donde  $\bar{x} = 1.0000$ ,  $\mu = 0$ ,  $n = 27$  y  $s = 0.0136$

$$t_0 = \frac{(1.0000 - 0)\sqrt{27}}{0.0136} = 382.0700$$

Sí  $n - 2 = 25$  y  $\alpha = 0.05$ ;  $t_c = 1.7081$  (una cola)

como  $t_0 > t_c$  se rechaza  $H_0$

Por lo tanto, la diferencia entre las medias es estadísticamente significativa.

### 9- Cálculos para el IC de la pendiente para la exactitud (UV-Vis)

Se determinó el intervalo de confianza para la pendiente, utilizando la ecuación 2 (ver subtema 4.5.2). Para ello, se aplicó una prueba de t-Student con un nivel de confianza del 95% y n-2 grados de libertad, considerando dos colas en la distribución.

**Para la pendiente:**

Donde  $t = 2.06$ ,  $s = 0.0228$  y  $n = 27$ ,

$$\text{Error asociado} = 2.06_{(0.05,25)} * \frac{0.0228}{\sqrt{27}} = 0.0090 \text{ (dos colas)}$$

Por lo tanto, el primer intervalo de confianza de la pendiente es  $1.0000 \pm 0.0090$

### 10- Prueba t-Student sobre la pendiente del parámetro de exactitud (UV-Vis)

Mediante una prueba de hipótesis, se buscó determinar si la pendiente de la recta de la curva de calibración era estadísticamente diferente de cero. Para ello, se realizó una prueba de t-Student, comparando la pendiente con el valor de referencia (cero). El valor de t se calculó utilizando la ecuación 3 (ver subtema 4.5.2).

$$H_0: \bar{x} = \mu$$

$$H_1: \bar{x} > \mu$$

Donde  $\bar{x} = 1.0000$ ,  $\mu = 0$ ,  $n = 27$  y  $s = 0.013$

$$t_0 = \frac{(1.0000 - 0)\sqrt{27}}{0.013} = 399.7040$$

Sí  $n - 2 = 25$  y  $\alpha = 0.05$ ;  $t_c = 1.7081$  (una cola)

como  $t_0 > t_c$  se rechaza  $H_0$

Por lo tanto, la diferencia entre las medias es estadísticamente significativa.

### **Precisión**

#### **11- Cálculos para el IC para la recuperación (HPLC MS/MS)**

Para determinar el intervalo de confianza para la recuperación de cada nivel de concentración, se utilizó la ecuación 4 (ver subtema 4.5.2), junto con una prueba *t-Student* al 95% de confianza y con  $n-1$  grados de libertad (ecuación 2, subtema 4.5.2). A continuación, se presentan los cálculos realizados para el primer nivel de concentración, y el mismo procedimiento se repite para los diferentes niveles de concentración.

Donde  $C_r = 0.9916$ ,  $C_a = 1.0004$ ,  $s = 0.4310$

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{0.9916}{1.0004} * 100 = 99.12$$

$$\text{Error asociado} = 4.303_{(0.05,2)} * \frac{0.4310}{\sqrt{3}} = 1.0707 \text{ (dos colas)}$$

Por lo tanto, el primer intervalo de confianza del porcentaje de recuperación es  $99.12 \pm 1.07$

Además, se calculó el porcentaje de la DER utilizando la ecuación 5 (ver subtema 4.5.2) para cada día y para ambos días en conjunto. A continuación, se presenta el cálculo realizado con los valores obtenidos durante el primer día, los cuales se repiten para el día 2 y posteriormente para ambos días.

Donde  $s = 0.6470$ ,  $\bar{x} = 99.3812$  es la media de todos los niveles del primer día

$$\% \text{ DER} = \frac{0.6470}{99.3812} * 100 = 0.6510$$

Por lo tanto, el %DER para el día 1 es de 0.6510 %

### 12- Cálculos para el IC para la recuperación (UV-Vis).

Para determinar el intervalo de confianza para la recuperación de cada nivel de concentración, se utilizó la ecuación 4 (ver subtema 4.5.2), junto con una prueba *t-Student* al 95% de confianza y con  $n-1$  grados de libertad (ecuación 2, subtema 4.5.2). A continuación, se presentan los cálculos realizados para el primer nivel de concentración, y el mismo procedimiento se repite para todos los niveles de concentración evaluados.

Donde  $C_r = 0.5006$ ,  $C_a = 0.5001$ ,  $s = 0.8573$

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{0.5006}{0.5001} * 100 = 100.10$$

$$\text{Error asociado} = 4.303_{(0.05,2)} * \frac{0.8573}{\sqrt{3}} = 2.13 \text{ (dos colas)}$$

Por lo tanto, el intervalo de confianza del porcentaje de recuperación es  $100.10 \pm 2.13$

Además, se calculó el porcentaje de la DER utilizando la ecuación 5 (ver subtema 4.5.2) para cada día y para ambos días en conjunto. A continuación, se presentan los cálculos realizados con los valores obtenidos durante el primer día, los cuales se repiten para el día 2 y posteriormente para ambos días.

Donde  $s = 1.9579$ ,  $\bar{x} = 99.8933$ ,

$$\% \text{ DER} = \frac{1.9579}{99.8933} * 100 = 1.96$$

Por lo tanto, el porcentaje de DER para el día 1 es de 1.96 %.

### 13-Cálculos de la diferencia absoluta de compatibilidad del filtro.

Para la evaluación de la compatibilidad del filtro se utilizó la ecuación 6 (ver subtema 4.5.3), con el fin de determinar el porcentaje de adherencia del filtro. A continuación, se presenta un ejemplo para una muestra con una concentración de 1 mg/L, preparada y medida mediante HPLC MS/MS. Se utilizó el mismo procedimiento para todos los niveles de concentración

Donde  $C_{SF} = 0.9941$ ,  $C_{CF} = 0.9915$

$$\% \text{ Adherencia del filtro} = \left| \frac{0.9941 - 0.9915}{0.9941} \right| * 100 = 0.26$$