

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA



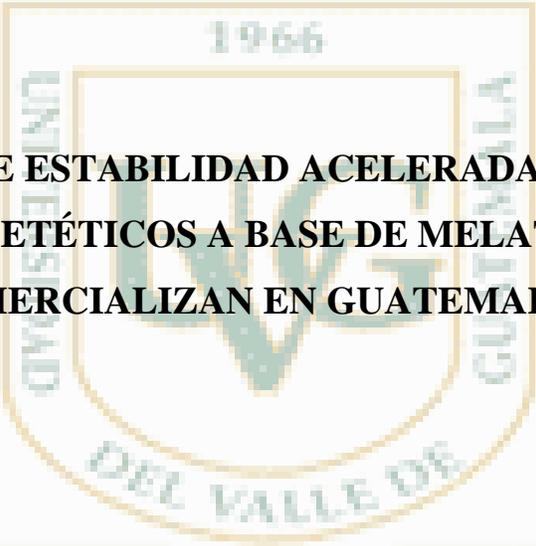
**ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACELERADA PARA
SUPLEMENTOS DIETÉTICOS A BASE DE MELATONINA QUE
SE COMERCIALIZAN EN GUATEMALA**

Trabajo de graduación presentado por Leonel de Gandarias Alfaro para
optar al grado académico de Licenciado en Química Farmacéutica

Guatemala

2006

**ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACELERADA PARA
SUPLEMENTOS DIETÉTICOS A BASE DE MELATONINA QUE
SE COMERCIALIZAN EN GUATEMALA**



Excelencia que trasciende

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA



**ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACELERADA PARA
SUPLEMENTOS DIETÉTICOS A BASE DE MELATONINA QUE
SE COMERCIALIZAN EN GUATEMALA**

Trabajo de graduación presentado por Leonel de Gandarias Alfaro para
optar al grado académico de Licenciado en Química Farmacéutica

Guatemala

2006

Vo. Bo.:

(f) _____
Lic. Élfego Rolando López

Tribunal:

(f) _____
Lic. Élfego Rolando López

(f) _____
Licda. Ana Luisa Mendizábal

(f) _____
Licda. Leticia Vargas de Ponce

Fecha de aprobación: 20 de junio de 2006.

AGRADECIMIENTO

Agradezco profundamente a la Licenciada Ana Luisa de Montenegro, al Lic. Élfego López, a Dios, a mis padres, autoridades y personal de Laboratorios Sanofi-Aventis de Guatemala, a la Universidad del Valle de Guatemala, y al Departamento de Regulación de Productos Farmacéuticos y Afines por brindar su ayuda para el desarrollo de este trabajo de investigación.

CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTO.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO CONCEPTUAL	
A. Antecedentes del problema.....	3
B. Síntesis del artículo: “Melatonin Analysis in Dietary Supplements by HPLC using UV-VIS detector”.....	6
C. Justificación.....	7
D. Planteamiento del problema.....	8
E. Alcances y límites del problema	
1. Alcances.....	8
2. Límites.....	8
III. MARCO TEÓRICO	
A. Definición de suplementos dietéticos.....	9
1. Riesgos de su ingesta.....	9
2. Regulaciones.....	10
B. Melatonina.....	12
1. Metabolismo de la Melatonina.....	13
2. Implicaciones funcionales de la Melatonina.....	14
C. La estabilidad farmacéutica.....	14
1. Propósitos de un estudio de estabilidad.....	16
2. Protocolos de estabilidad.....	18
D. Temperatura de cuarto controlada.....	18

E. Temperatura cinética media (MKT).....	19
F. Zonas climáticas.....	20
G. Envejecimiento acelerado.....	21
1. Relación entre velocidad de reacción y temperatura.....	22
2. Método de Arrhenius.....	22
3. Influencia de la humedad.....	24
H. Definición de estabilidad.....	25
1. Incompatibilidad física y química.....	26
I. Factores que afectan estabilidad del producto.....	26
1. Hidrólisis.....	26
2. Descarboxilación.....	27
3. Beta-ceto descarboxilación.....	27
4. Racemización.....	27
5. Fotoquímica.....	27
6. Energía ultrasónica.....	27
7. Radiación ionizante.....	28
8. Oxidación – reducción.....	28
9. Fuerza iónica.....	28
10. Efecto del pH.....	29
11. La estabilidad del estado sólido.....	29
12. Temperatura.....	29
J. La responsabilidad de los farmacéuticos.....	29
K. Formas posológicas sólidas.....	30
1. Tabletas sin recubrimiento.....	30
2. Tabletas recubiertas.....	30
L. Acción de los excipientes sobre la estabilidad de determinados principios activos.....	30
M. Importancia del envase.....	31

1. Tipos de envase	
a. Recipientes de vidrio.....	32
b. Recipientes de plástico.....	32
c. Recipientes metálicos.....	33
2. Cierre del recipiente.....	33
N. Generación y evaluación de datos de estabilidad.....	33
O. Estudios preliminares.....	34
P. Estudios definitivos.....	35
Q. Condiciones que debe reunir un laboratorio para hacer estudios de estabilidad.....	36
R. Actitud cuando no es posible predecir un periodo útil.....	36
IV. MARCO METODOLÓGICO	
A. Objetivos	
1. Generales.....	38
2. Específicos.....	38
B. Hipótesis.....	38
C. Las variables	
1. Independientes.....	39
2. Dependiente.....	39
D. Población y muestra	
1. Universo de trabajo o población meta.....	39
2. Muestra (población accesible).....	39
E. Procedimiento.....	40
F. Ensayos físicos	
1. Dureza.....	40
a. Equipo.....	40
b. Procedimiento de la operación.....	40
c. Expresión de los resultados.....	41

2.	Variación de peso de suplementos dietéticos.....	41
a.	Tabletas sin recubrimiento y recubiertas con film.....	41
b.	Tabletas recubiertas con materiales distintos al film.....	41
3.	Friabilidad de las tabletas.....	42
4.	Desintegración.....	43
a.	Prueba para tabletas sin cubierta o con cubierta simple para suplementos dietéticos.....	44
b.	Prueba para tabletas sin cubierta o con cubierta simple para productos farmacéuticos.....	44
G.	Ensayos químicos.....	44
1.	Tiempo cero.....	44
2.	Primera evaluación programada (pasados 30 días dentro de las cámaras).....	45
3.	Segunda evaluación programada (60 días).....	45
4.	Tercera evaluación programada (90 días).....	45
H.	Estandarización del método.....	45
J.	Procedimiento del ensayo de cuantificación del principio activo.....	46
K.	Diseño de investigación.....	46
L.	Análisis estadístico	
1.	Ensayo de cuantificación.....	47
2.	Media.....	47
3.	Desviación Estándar, Desviación Estándar Relativa (DER) y Desviación Estándar Relativa porcentual (DER%).....	47
4.	Ecuación de la recta por el método de mínimos cuadrados.	47
V.	MARCO OPERATIVO	
A.	Recabación y tratamiento de datos.....	48
B.	Recursos humanos.....	52
C.	Recursos materiales	

1. Equipo proveniente del laboratorio farmacéutico.....	52
2. Equipo proveniente de la Universidad del Valle de Guatemala.....	52
3. Materiales y cristalería de laboratorio (proveniente de la UVG).....	53
4. Reactivos químicos.....	53
5. Especificaciones del equipo de HPLC que se encuentra en el Laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado de la Universidad del Valle de Guatemala.....	53
VI. RESULTADOS	
A. Ensayos físicos iniciales (“tiempo cero”).....	54
B. Ensayos químicos del “tiempo cero”	
1. Curva de calibración # 1.....	58
2. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).....	59
3. Precisión y factor de coeio.....	60
4. Muestras del “tiempo cero”.....	60
C. Primera evaluación programada (30 días).....	61
D. Segunda evaluación programada (60 días)	
1. Curva de calibración # 2.....	62
E. Tercera evaluación programada (90 días)	
1. Curva de calibración # 3.....	65
2. Precisión y factor de coeio.....	66
3. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).....	66
F. Condiciones del sistema.....	68
G. Resultados cinéticos por muestra individual	
1. Concentraciones porcentuales en función del tiempo.....	70
2. Determinación de orden de reacción.....	74
H. Determinación de la energía de activación (E_a) de la ecuación de	

Arrhenius.....	75
I. Determinación de tiempo de vida (degradación del 90%).....	76
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	77
VIII. CONCLUSIONES.....	82
IX. RECOMENDACIONES.....	83
X. BIBLIOGRAFÍA.....	84

LISTA DE CUADROS

Cuadro No.	Pág.
1. Factores de conversión y rango de temperatura típica de almacenamiento..	20
2. Zonas climáticas internacionales.....	21
3. Criterios de niveles aceptables de estabilidad.....	25
4. Número de tabletas de Melatonina por ensayo físico/químico.....	39
5. Criterio de tolerancias de variación de peso para tabletas sin recubrimiento, tabletas recubiertas con film y tabletas recubiertas (con materiales diferentes al film).....	41
6. Intervalos de análisis de las muestras acorde a la temperatura de almacenamiento temporal.....	44
7. Esquema resumido para tabular los datos a obtener en el estudio.....	49
8. Fórmulas y órdenes de reacción para constante de velocidad.....	49
9. Fórmulas y órdenes de reacción para tiempo de 90% de degradación de principio activo.....	51
10. Ensayo de desintegración.....	54
11. Ensayo de friabilidad.....	54
12. Ensayo de dureza.....	55
13. Ensayo organoléptico de las marcas comerciales de Melatonina en el “tiempo cero”.....	55
14. Ensayo de variación de peso (muestras A – C).....	56
15. Ensayo de variación de peso (muestras D – F).....	57
16. Curva de calibración # 1 válida para “tiempo cero y treinta días”.....	58
17. Determinación de S_m , LOD y LOQ.....	59
18. Precisión y factor de coleccion en el “tiempo cero”.....	60
19. Resultados de las seis marcas comerciales del tiempo cero (en duplicado).	60
20. Resultados de las seis marcas comerciales a los treinta días (Temperatura de 30°C & 75% H.R.).....	61

21. Resultados de las seis marcas comerciales a los treinta días (Temperatura de 35°C & 75% H.R.).....	61
22. Resultados de las seis marcas comerciales a los treinta días (Temperatura de 40°C & 75% H.R.).....	62
23. Curva de calibración # 2 válida para “Evaluación a los sesenta días de iniciado el estudio”.....	62
24. Resultados de las seis marcas comerciales a los sesenta días (Temperatura de 30°C & 75% H.R.).....	63
25. Resultados de las seis marcas comerciales a los sesenta días (Temperatura de 35°C & 75% H.R.).....	64
26. Resultados de las seis marcas comerciales a los sesenta días (Temperatura de 40°C & 75% H.R.).....	64
27. Curva de calibración # 3 válida para “Evaluación a los noventa días”.....	65
28. Precisión y factor de coeico con nueva columna.....	66
29. Determinación de S_m , LOD y LOQ (con la nueva columna).....	67
30. Resultados de las seis marcas comerciales a los noventa días (Temperatura de 30°C & 75% H.R.).....	69
31. Resultados de las seis marcas comerciales a los noventa días (Temperatura de 35°C & 75% H.R.).....	69
32. Resultados de las seis marcas comerciales a los noventa días (Temperatura de 40°C & 75% H.R.).....	70
33. Concentraciones porcentuales según temperatura de almacenamiento.....	70
34. Regresiones lineales que se aproximan mejor a la tendencia de las muestras.....	74
35. Determinación de energía de activación de muestras B y E únicamente.....	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico No.	Pág.
1. Melatonina (5-metoxi-N-acetil-triptamina).....	12
2. Curva de calibración # 1 obtenida con estándares de Melatonina.....	58
3. Curva de calibración # 2 obtenida con estándares de Melatonina.....	63
4. Curva de calibración # 3 obtenida con estándares de Melatonina.....	65
5. Curva de calibración # 4 para calcular LOQ & LOD de columna nueva.....	68
6. Tendencia de muestra A (3 mg) en las tres temperaturas estudiadas.....	71
7. Tendencia de muestra B (0.2 mg) en las tres temperaturas estudiadas.....	72
8. Tendencia de muestra C (1 mg) en las tres temperaturas estudiadas.....	72
9. Tendencia de muestra D (3 mg) en las tres temperaturas estudiadas.....	73
10. Tendencia de muestra E (1 mg) en las tres temperaturas estudiadas.....	73
11. Tendencia de muestra F (5 mg) en las tres temperaturas estudiadas.....	74

RESUMEN

Se desarrolló un estudio de estabilidad acelerada durante tres meses, para seis suplementos dietéticos a base de Melatonina que se comercializan en Guatemala, éstos poseen concentraciones que varían desde 200µg hasta 5mg. Se empleó un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para efectuar las valoraciones periódicas del activo. Se analizó la influencia de un medio degradante, que para este caso fue la temperatura.

En el tiempo inicial del estudio se efectuaron cuatro ensayos físicos para verificar la calidad con la que estos se encuentran manufacturados, comparándolas directamente con las especificaciones descritas en la USP-29 y en la Farmacopea Británica. Se encontró que todas las muestras cumplieron con los ensayos de desintegración, friabilidad y variación de peso, no obstante solamente dos muestras cumplieron con el análisis de dureza.

El fin primordial del trabajo fue verificar la concentración de la Melatonina sometida a condiciones degradantes con el fin de calcular el tiempo de expiración según la expresión de Arrhenius. Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones de Melatonina, en la mayoría de los casos, se mantuvieron dentro del rango permitido por la United States Pharmacopeia. No obstante, se obtuvieron tendencias irregulares bajo las condiciones medioambientales utilizadas, para su almacenamiento durante 90 días.

I. INTRODUCCIÓN

Los suplementos dietéticos son aquellos productos que se ingieren por vía oral, contienen un "ingrediente alimenticio" destinado a complementar la dieta (ejemplos: vitaminas, minerales, hierbas, entre otros). Los suplementos se manufacturan en diferentes presentaciones, como tabletas, cápsulas, cápsulas de gelatina suave, cápsulas de gelatina dura, líquidos y polvos. Estos productos no pueden usarse como alimento único en la dieta, y por este motivo se les conoce como suplementos de la dieta.

La manufactura y comercialización de los suplementos dietéticos está regulada en Estados Unidos por la Food and Drug Administration (FDA), bajo normativas diferentes a la de los fármacos, pues se les clasifica como alimentos.

La Melatonina se utiliza en individuos con trastornos del sueño. Es una hormona secretada por la glándula pineal. La secreción de Melatonina es inhibida por la luz ambiental y estimulada por la oscuridad. Dicha secreción es alta en niños y decrece con la edad. La Melatonina está indicada para combatir el insomnio, cambios de uso de horario y alteraciones del ritmo circadiano. La Melatonina no es considerada como un producto farmacéutico según la FDA, sin embargo ha sido considerada desde 1993 como "droga huérfana" y empleada para ayudar a regular los ritmos circadianos y desórdenes en personas ciegas que no perciben la luz.

Dado a que no existe información disponible respecto a la estabilidad de los productos dietéticos formulados a base de Melatonina en Guatemala, es importante desarrollar un estudio que permita evaluar algunos aspectos de calidad con la que los mismos son manufacturados y si cumplen con lo expuesto en la etiqueta.

Un estudio de estabilidad es un conjunto de ensayos que se realizan a los productos, cuyo propósito es garantizar la integridad de la formulación durante un lapso del tiempo, donde el principio activo y materia prima deben cumplir con los fines para los cuales fueron creados. Con los estudios de estabilidad acelerada se pueden predecir tentativamente el periodo de vida útil del producto y las condiciones adecuadas de almacenamiento.

En este trabajo de investigación se efectuó un estudio de estabilidad acelerada a productos dietéticos formulados a base de Melatonina, con el objetivo de evaluar su fecha de caducidad.

Con los resultados obtenidos se esperaba calcular el orden cinético de las reacciones de degradación que sufre cada muestra en particular, así mismo mediante la expresión de Arrhenius determinar el tiempo de vida útil de las muestras. Sin embargo esto no fue viable, dado a que la Melatonina tuvo tendencias irregulares durante los tres meses del estudio y a la vez la degradación no fue lo suficientemente grande en la mayoría de los casos, para que permitiera hacer una predicción confiable.

II. MARCO CONCEPTUAL

A. Antecedentes del problema

De acuerdo al Acta de la Educación de Salud de Suplementos Dietéticos (DSHEA) de 1994, la adulteración de un suplemento dietético, ocurre cuando se presenta un riesgo significativo de lesión o enfermedad al ser utilizado de acuerdo con lo sugerido en el etiquetado o, si en caso de estar sin etiqueta, bajo condiciones ordinarias de uso. También ocurre adulteración cuando una entidad nueva carece de evidencia o de información adecuada para garantizar su seguridad; además cuando se declare un peligro inminente por la Secretaría del Departamento de los Servicios de Salud y Humanos de los Estados Unidos. Otra situación en la que ocurre adulteración es si un ingrediente dietético está presente en suficiente cantidad como para volver tóxico al producto (según lo descrito para los alimentos adulterados, en el Acta de Cosméticos, Drogas, y Alimentos). (3)

La adulteración, según lo definido por Miller *et. al.* es *«la adición de un componente impuro o inferior que no es ordinariamente parte de esa sustancia que generalmente implica que una sustancia está rebajada consecuentemente»*. La adulteración se define como *«la presencia del material ajeno que rinde un material impuro, cuya composición está degradada»*. La contaminación es, por tanto, una forma de adulteración. Actualmente existe un listado grande de contaminantes que están reportados en la literatura médica. (3)

Con respecto a los suplementos dietéticos que contienen Melatonina, en la FDA y otras organizaciones no se considera obligatorio el desarrollo de análisis de rutina. En el sitio de Internet (www.consumerlab.com) se encontró información respecto a que se han analizado en un laboratorio independiente. En dicho laboratorio se indica que se han llevado a cabo varias pruebas para determinar la cantidad de Plomo presente en dichos productos utilizando para el efecto Espectroscopia de Masas con inducción acoplada de Plasma. Se encontró que 16 de los 18 suplementos comprados cumplieron con no estar contaminados con Plomo. Sin embargo se encontró que uno de los productos contenía solamente el 83% de la cantidad de Melatonina etiquetada y además que otro poseía una cantidad de plomo levemente superior a lo aceptado como dosis diaria recomendada (0.5

mcg de Pb/gramo de polvo del producto de Melatonina). (4)

Los suplementos dietéticos están catalogados por la FDA como alimentos y no como drogas. Esto afecta ya que muchas veces los fabricantes no tienen que probar que el suplemento es eficaz. El fabricante debe indicar si el producto ayuda a tratar una deficiencia nutricional, beneficia la salud o reduce el riesgo de que surja cierto problema de salud, si éste fuera el caso. Además, el fabricante no tiene que brindar pruebas de la calidad del suplemento pues la FDA no analiza la composición de los suplementos dietéticos. (6)

Existen varios factores críticos que deben alcanzarse para regular las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) de los suplementos dietéticos: a) Las BPM deben aplicar para toda la industria de los suplementos dietéticos, b) un régimen apropiado de pruebas debe requerirse, en las que se incluye el uso de certificado de análisis, y pruebas en puntos apropiados durante el proceso de manufactura para que con ello se incluyan pruebas de los lotes basadas en la estadística, c) el personal de la FDA debe estandarizar la industria de los suplementos dietéticos, y d) el personal de la FDA deberá pedir como requisitos procedimientos escritos para ciertas operaciones y la documentación de ciertas áreas cuando sea apropiado. (6)

Los consumidores esperan que la fecha de expiración de los suplementos dietéticos sea confiable. Por ende se recomienda que todos los productos dietéticos lleven una fecha de caducidad. La fecha de expiración debe estar respaldada por suficientes datos que aseguren que el producto cumple con las especificaciones a través del tiempo de vida útil del producto. Los datos que deberán incluir: (6)

- Un documento por escrito de la estabilidad basado, por lo menos, en la evaluación de la compatibilidad de los ingredientes del producto, y también en la experiencia que se tenga del producto en el mercado para indicar que no hay degradación del mismo. (6)
- Estudios de tiempos reales, estudios de estabilidad acelerada o datos de productos similares. (6)

El impacto económico y financiero al mejorar las reglas para los suplementos dietéticos será significativo y perjudicial en la industria de los suplementos dietéticos. También aumentarán los gastos de la FDA (en USA) y en Guatemala del Laboratorio Nacional de Salud (LNS), por el hecho de llevar a cabo un mayor número de análisis. Muchos productos, sobre todo los productos de multi-ingredientes, ya no serán baratos en la fabricación y desaparecerán de los estantes de minoristas. Por ende también el precio de los suplementos dietéticos aumentará considerablemente. (6)

En el Capítulo 2750 de la USP-29: “Prácticas de Manufactura para los Suplementos Dietéticos”, se indica que debe haber un protocolo escrito diseñado para evaluar las características de estabilidad de los suplementos dietéticos. Los resultados de las pruebas que se obtengan deben ser usados para determinar la vida útil del producto, así como las condiciones de almacenamiento idóneas. Este protocolo debe incluir lo siguiente: (6)

- Debe examinarse el número de la muestra e intervalos de prueba basados en criterios estadísticos para cada cualidad con el fin de asegurar estimaciones válidas de estabilidad. (6)
- Las condiciones de almacenamiento para las muestras retenidas que serán puestas a ensayos. (6)
- Deben emplearse métodos de prueba específicos, significativos y confiables.
- El suplemento dietético debe ser evaluado en el mismo tipo de envase, que se emplea para su comercialización. (6)

Un número adecuado de lotes de cada suplemento dietético, se debe evaluar para determinar un tiempo de vida adecuado, y un registro de estos datos debe ser mantenido. Los estudios acelerados combinados con la información de estabilidad básica de las materias primas, suplementos dietéticos, y empaques se pueden utilizar para apoyar y determinar la vida útil tentativa, cuando los estudios completos de la vida útil no están disponibles. Los métodos de prueba de estabilidad simplificados, pueden ser utilizados cuando hay disponibilidad de datos de formulaciones similares del producto para apoyar una valoración de la vida útil de un producto nuevo. Cuando los resultados de estudios

acelerados se utilizan para proyectar una fecha tentativa de vida útil que está más allá de una fecha apoyada por estudios reales de vida útil, se deben efectuar estudios de estabilidad, así como las pruebas del suplemento dietético en intervalos apropiados, hasta que se verifique la vida útil tentativa o se determine la vida útil adecuada. (6)

Los fabricantes deben retener una muestra identificada apropiadamente (como reserva), que sea representativa de cada lote del suplemento dietético, se debe conservar y almacenar bajo condiciones consistentes con lo etiquetado en el producto, hasta por lo menos un año después de la fecha de vencimiento del producto. Esta muestra se debe almacenar en el mismo sistema de empaque en el cual se comercializa al producto terminado, o en uno que tenga esencialmente las mismas características. La muestra reservada debe ser por lo menos dos veces la cantidad necesaria para efectuar todas las pruebas requeridas. (6)

B. Síntesis del artículo: “*Melatonin Analysis in Dietary Supplements by HPLC using UV-VIS detector*” by J. O. Vega, J. Moreno, J. Bloom, FDA

Un método simple fue desarrollado para la determinación y cuantificación de Melatonina en suplementos dietéticos utilizando detección HPLC acoplado a UV/VIS con detector de arreglo de diodos (DAD). Se analizaron varias matrices (cápsulas, tabletas, cápsulas con hierbas) de diferentes productores. Así mismo, se desarrolló, una extracción simple de las muestras con baño de ultrasonido y centrifugación con metanol como solvente de extracción. Los resultados obtenidos del análisis de las muestras se encontraban entre 86 – 105% de lo reportado en la etiqueta. Los resultados de recuperación (95.1-101.2%) mostraron que los componentes de las matrices no interfieren con el análisis o la precisión del método. El rango de linealidad determinado fue de 0.40 µg/mL a 25 µg/mL, con un LOD a 40 ng/mL y un LOQ a 80 ng/mL. El rango de concentraciones utilizadas para realizar las curvas de calibración fue de 1.60 a 25.00 µg/mL como está recomendado por la USP para el ensayo de un producto farmacéutico. Se observó que el pico cromatográfico del analito para la Melatonina estaba a 4.4 minutos y se atribuye únicamente a un pico debido al uso del detector DAD. Además los patrones cromatográficos fueron muy similares entre las muestras. (7)

C. Justificación

Muchos suplementos dietéticos poseen una actividad biológica, por lo tanto debieran ser regulados como sustancias activas, para su registro y consumo. En particular la Melatonina es un suplemento dietético que se utiliza para la inducción del sueño, con lo cual hay una obvia actividad biológica. Las regulaciones implantadas por la FDA, indican que no se exigen pruebas de eficacia y de seguridad a los fabricantes de suplementos dietéticos. La Melatonina no está aprobada por la FDA como droga, sin embargo desde 1993, está clasificada como una “droga huérfana”, para el tratamiento de desórdenes de sueño en personas ciegas.

La importancia de efectuar el estudio de estabilidad en suplementos dietéticos que contienen Melatonina comercializados en Guatemala, radica en verificar si cumplen con las características de pureza bajo las diferentes condiciones ambientales (temperatura y humedad controladas) en las que son expuestos dentro de los límites requeridos por la United States Pharmacopeia 29 por un periodo de 3 meses.

En Guatemala la Melatonina está clasificada como producto farmacéutico dietético (PFD) por el Departamento de Regulación y Control de Productos Farmacéuticos y Afines. Debido a ello, al momento en que algún fabricante y/o proveedor desee efectuar el registro sanitario de estos productos, en el Departamento de Regulación y Control de Productos Farmacéuticos y Afines no se solicitan estudios de estabilidad. Sin embargo, no todas las marcas comerciales están registradas como PFD, ya que varias se encuentran en el mercado como Producto Farmacéutico (PF) lo cual es debido a cuestión de criterios por parte del personal del Departamento de Regulación y Control de Productos Farmacéuticos y Afines. Por lo tanto, con este trabajo también se facilitaron algunos criterios para que los productos comerciales formulados a base de Melatonina estén bajo una misma línea de normas.

Para desarrollar el estudio las muestras fueron colocadas en un equipo que provee condiciones de humedad y temperaturas controladas. Dicho equipo se encontraba debidamente cualificado para su uso. A las muestras se les efectuaron dos pruebas: análisis químico y físico. Se efectuaron cuatro análisis de cuantificación de Melatonina de manera periódica durante 90 días. El análisis químico se efectuó con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por ser un método sensible, exacto y

selectivo.

Inicialmente se evaluaron cuatro aspectos de calidad a las muestras (desintegración, friabilidad, variación de peso y dureza) para determinar si cumplen o no con los requerimientos para suplementos dietéticos. Los resultados obtenidos con la cuantificación periódica de las muestras no permitieron calcular la fecha de expiración de las muestras.

Este estudio se espera que sea de utilidad para el Departamento de Regulación y Control de Productos Farmacéuticos y Afines, con el objeto de que tenga información disponible acerca de la calidad de los suplementos dietéticos.

D. Planteamiento del problema

Según la United States Pharmacopeia 29, los fabricantes de los suplementos dietéticos deben tener disponibles estudios de estabilidad para determinar las condiciones apropiadas de almacenamiento y el tiempo de vida de los productos que manufacturan. Debido a que la FDA (Food and Drug Administration), no exige que los suplementos dietéticos cuenten con pruebas de seguridad o eficacia para su comercialización, ni el Departamento de Regulación y Control de Productos Farmacéuticos y Afines solicita estudios de estabilidad a los productos farmacéuticos dietéticos, y a que cada vez se hace mayor la cantidad de estudios publicados en los que se reportan efectos adversos provocados por la adulteración no intencional de dichos productos, es necesario hacer un estudio de estabilidad de los mismos con el propósito de verificar si las muestras, en particular de Melatonina, cumplen con la pureza, bajo las condiciones extremas en las que son expuestas en función del tiempo. Con ello también se determina si el empaque primario logra preservar el producto.

E. Alcances y límites

1. Alcances. Se determinó la cantidad de principio activo de los 6 suplementos dietéticos de Melatonina comercializados en Guatemala, mediante un método estandarizado de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

2. Límites. Los resultados de este estudio fueron exclusivamente de un lote particular de cada una de las 6 muestras estudiadas. Estos son válidos únicamente para suplementos dietéticos a base de Melatonina, en particular los que se presentan como tabletas de ingestión oral.

III. MARCO TEÓRICO

A. Definición de suplementos dietéticos

En 1994, se estableció en una ley aprobada por el Congreso de los Estados Unidos en la cual se emitió la definición de los suplementos dietéticos así: «*son aquellos que se consumen por vía oral, que contienen un ingrediente alimenticio destinados a complementar la alimentación*». Algunos ejemplos de suplementos dietéticos son las vitaminas, los minerales, las hierbas (una sola hierba o una mezcla de varias), otros productos botánicos, aminoácidos y componentes de los alimentos como las enzimas y los extractos glandulares. Estos productos se expenden en el mercado en diferentes presentaciones, como tabletas, cápsulas, cápsulas de gelatina suave y dura, líquidos y polvos. Estos productos no se presentan como sustituto de un alimento convencional ni como componente único de una comida o de la dieta alimenticia. (3)

Los suplementos dietéticos se comercializan en tiendas de comestibles, tiendas de productos dietéticos, en farmacias y en negocios de descuentos. También se venden por correo y en programas de ventas por televisión, a través de sitios de internet o por ventas directas. (3)

1. Riesgos de su ingesta. Para reducir los riesgos de la ingesta de un suplemento dietético es conveniente contar con la asesoría de algún profesional acerca del suplemento. Esto con el objeto de tener seguridad y establecer un plan integral de tratamiento. Es importante consultar al médico si: (8)

- Se piensa reemplazar su tratamiento médico regular con uno o más suplementos.
- Se está tomando algún medicamento (con o sin receta). Se sabe que algunos suplementos interactúan con los medicamentos. (8)
- Se tiene una enfermedad o trastorno crónico. (8)
- El paciente se halla a punto de ser intervenido quirúrgicamente. Algunos suplementos aumentan los riesgos de hemorragia o interfieren con las anestésicas y los analgésicos. (8)
- Se encuentra la persona embarazada o en periodo de lactancia. (8)

- Se desea proporcionar un suplemento a un niño. Muchos productos que se comercializan como adecuados para uso pediátrico no se han sometido a prueba para determinar la inocuidad y la eficacia en niños. (8)
- No se debe ingerir una dosis mayor que la indicada en la etiqueta del suplemento a menos que un profesional de la salud se lo recomiende. (8)
- Se siente algún efecto secundario que le preocupa, en este caso deberá dejar de ingerir el suplemento y comunicarse con el médico. En USA puede dar a conocer su experiencia al Programa MedWatch, un programa de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) que investiga la información sobre suplementos dietéticos que suministran los consumidores. (8)
- Se considera utilizar suplementos de hierbas, hay algunas precauciones que debe tener en cuenta. Puede consultar la hoja informativa “Herbal Supplements: Consider Safety, Too” publicada por el Centro Nacional de Medicina Complementaria y Alternativa. (8)

2. Regulaciones. El gobierno federal de los Estados Unidos, reglamenta los suplementos por medio de la FDA. En la actualidad, lo hace de acuerdo con las normas para alimentos y no para medicamentos. Por lo general, las leyes para comercializar los alimentos (y los suplementos) y mantenerlos en el mercado son menos estrictas que las leyes para los medicamentos. A continuación se citan algunas diferencias entre los medicamentos versus los suplementos dietéticos: (8)

- A diferencia de los medicamentos, para vender los suplementos no es necesario efectuar estudios previos para demostrar que son inocuos para las personas.
- Contrariamente al caso de los medicamentos, el fabricante no tiene que probar que el suplemento es eficaz. El fabricante puede indicar que el producto ayuda a tratar una deficiencia nutricional, beneficia la salud o reduce el riesgo de que surja cierto problema de salud, si éste fuera el caso. Si el fabricante menciona alguna propiedad del medicamento, ésta debe ir acompañada de la frase: *«Esta declaración no ha sido evaluada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). Este producto no es para diagnosticar, tratar, curar o prevenir ninguna enfermedad»*. (8)
- El fabricante no tiene que brindar pruebas de la calidad del suplemento.

- La FDA no analiza la composición de los suplementos dietéticos. (8)
- Actualmente los fabricantes de suplementos deben cumplir con los requisitos de la FDA conocidos como Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para alimentos. Las BPM describen las condiciones bajo las cuales se deben preparar, envasar y almacenar los productos. Las BPM para los alimentos no abarcan todos los aspectos de la calidad de los medicamentos. Algunos fabricantes de suplementos siguen voluntariamente las normas de BPM de medicamentos emitidas por la FDA, que suelen ser más estrictas que las de los alimentos. (8)
- Algunos fabricantes usan el término "estandarizado" al describir las prácticas para dar uniformidad al producto. Sin embargo, las leyes de los Estados Unidos no definen la estandarización. Por lo tanto, el uso de ese término (y otros similares como "verificado" o "certificado") no garantiza la calidad ni que el producto sea siempre igual. (8)
- Si la FDA, descubre que un suplemento, no es inocuo después de que se haya introducido en el mercado, entonces podrá tomar medidas contra el fabricante y/o el distribuidor. Las medidas consisten en emitir advertencias u ordenar que se retire el producto del mercado. (8)

En marzo de 2003, la FDA publicó una propuesta con las nuevas normas para los suplementos que exigen a los fabricantes que eviten la contaminación de sus productos con otras hierbas, plaguicidas, metales pesados o medicamentos que se venden con receta médica. Estas normas también exigirán que las etiquetas de los suplementos sean precisas. Estas nuevas normas debieran estar vigentes desde 2004. (8)

El gobierno federal también reglamenta la publicidad de los suplementos por medio de la Comisión Federal de Comercio (FTC, por sus siglas en inglés), la cual exige que toda la información acerca de los suplementos sea verdadera y no engañe al consumidor. (8)

Lamentablemente muchas veces el contenido del frasco no siempre coincide con la etiqueta, los problemas que pueden haber ocurrido en estos casos son los siguientes:

- No contenga el ingrediente correcto (especie de planta). Por ejemplo, en un estudio se analizaron 59 preparados de equinácea, determinándose que alrededor de la mitad no contenía la especie indicada en la etiqueta. (8)

- Contenga cantidades mayores o insuficientes del ingrediente activo. Por ejemplo, un estudio financiado por el Centro Nacional de Medicina Complementaria y Alternativa de Estados Unidos (NCCAM, por sus siglas en inglés) sobre productos de ginseng comprobó que la mayoría contenía menos de la mitad de la cantidad estipulada en la etiqueta.
- Esté contaminado con diversos materiales que puedan ser tóxicos. (8)

B. Melatonina

La Melatonina es una neurohormona, que se sintetiza en la glándula pineal (epífisis). Es un derivado del aminoácido triptófano. La glándula pineal en los humanos pesa alrededor de 150 miligramos, y ocupa la depresión entre el colículo superior y la parte posterior del cuerpo caloso. Aunque existen conexiones entre la glándula pineal y el cerebro, aquélla se encuentra *fuera* de la barrera hematoencefálica y está innervada principalmente por los nervios simpáticos que vienen de los ganglios cervicales superiores. (4)

En 1917 se observó *in vitro* que extractos de glándula pineal clareaba la piel de sapo. A finales de los 50, Lerner y colaboradores aislaron la hormona pineal que producía este efecto y describieron su estructura química: 5-metoxi-N-acetiltriptamina (Melatonina). (4)

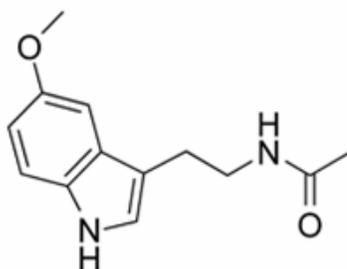


Gráfico No. 1: Melatonina (5-Metoxi-N-acetil-triptamina) (14)

Presentaciones de tabletas sublinguales: 2.5 mg.

Presentación de tabletas de liberación prolongada: 200 mcg, 1 mg, 2 mg, 3 mg y 5 mg.

Indicaciones: Para insomnio, desórdenes del sueño. (4)

La Melatonina es una hormona producida por los pinealocitos de la glándula pineal, localizada en el cerebro, pero que también está presente en la retina y el tracto gastrointestinal. Se deriva del aminoácido *triptófano*. La Melatonina producida en la glándula pineal actúa como una hormona endocrina ya que es liberada hacia el torrente sanguíneo. La Melatonina ayuda a regular los ritmos circadianos. La Melatonina puede suprimir la libido por medio de la inhibición de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) de la glándula pituitaria anterior. (4)

Los betabloqueadores disminuyen la liberación de Melatonina. Las precauciones a considerar con este suplemento dietético son que no debe consumirse si está embarazada o en periodo de lactancia. (4)

1. Metabolismo de la Melatonina. La Melatonina se sintetiza desde la serotonina; la epífisis contiene todas las enzimas necesarias para sintetizar la serotonina desde el triptófano, así como dos enzimas requeridas para convertir la serotonina en Melatonina. La enzima que limita la cantidad de Melatonina es la serotonina N-acetiltransferasa, ya que convierte la serotonina en N-acetilserotonina, la cual posteriormente es convertida a Melatonina por medio de la enzima 5-hidroxi-indol-O-metiltransferasa, que utiliza como donante del grupo metil a la S-adenosil-metionina. (4)

Un rasgo único de la glándula pineal, es que la síntesis y secreción de la Melatonina está profundamente influida por el ciclo día-noche. Durante la luz del día, la síntesis y secreción de Melatonina son reducidas, ya que el impulso va con los nervios simpáticos que inervan la glándula pineal. Al comienzo de la noche, hay una activación de estos nervios, y el incremento en la liberación de noradrenalina desde éstos activa los beta-adrenoceptores de la glándula pineal para aumentar la formación de AMPc (AMP cíclico), con la activación de los alfa₁-adrenoceptores se amplifica más la respuesta. Este segundo mensajero provoca la activación de la serotonina N-acetiltransferasa que incrementa la síntesis de Melatonina. Por tanto, la glándula pineal funciona como un transductor neuroendocrino. En mamíferos, la información fotosensorial que entra por la retina influye en la actividad de sus proyecciones neuronales, que sirve finalmente para inhibir o estimular la secreción de serotonina. En animales aislados en oscuridad

continúa el ritmo circadiano de secreción de Melatonina. Entonces la síntesis de Melatonina se lleva a cabo desde un *reloj* endógeno, probablemente situado dentro del núcleo supraquiasmático del hipotálamo, habiendo sido entrenado normalmente en el ciclo día-noche. (4)

2. Implicaciones funcionales de la Melatonina. Los efectos fisiológicos y conductuales exactos de la Melatonina en humanos aún son inciertos. Quizá lo más comprobado sea su papel en la reproducción, particularmente en mamíferos que se reproducen estacionalmente tales como hámsteres y ovejas que organizan sus ciclos reproductivos a través de cambios en el fotoperiodo. La información concerniente a la duración del día puede ser transmitida por el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal por medio del patrón de producción de Melatonina. Aunque se creía que los efectos de la Melatonina sobre la reproducción eran únicamente antigonadotróficos, estudios recientes señalan que la Melatonina puede ser capaz de causar efectos progonadotróficos. El tipo de efecto provocado por la Melatonina depende del momento en el fotoperiodo en el que es administrada, la especie y la dosis administrada. (4)

C. La estabilidad farmacéutica

El término “estabilidad”, se refiere a la integridad química y física de la unidad posológica así mismo a la habilidad de la unidad posológica de mantener protección contra contaminación microbiológica. La vida útil de la forma posológica es el lapso de tiempo de la preparación inicial a la fecha de expiración especificada. Las especificaciones de la monografía (identidad, fuerza, calidad, y pureza) aplican a lo largo de la vida útil del producto. (6)

Los parámetros de estabilidad de una forma posológica de la droga pueden ser influenciados por las condiciones ambientales de almacenamiento (temperatura, luz, aire, y humedad), así como por los componentes del empaque. En las monografías individuales que aparecen en la Farmacopea se deben incluir las condiciones del almacenamiento requeridas en su etiquetado. Éstas son las condiciones bajo las cuales la fecha de expiración aplicará. Deben observarse los requisitos del almacenamiento especificados en el etiquetado del producto a lo largo de la distribución del mismo (es

decir, más allá del tiempo en el que el producto deja al fabricante, también incluyéndose su manejo por el distribuidor o vendedor del artículo al consumidor). (6)

Aunque en el etiquetado se deben indicar las condiciones de almacenamiento apropiadas, se reconoce que el control más allá del distribuidor o vendedor es difícil. La fecha de expiración debe colocarse en la etiqueta del recipiente. A continuación se citan algunas definiciones importantes para diferenciar los estudios de estabilidad: (6)

- **Definición de estudio de estabilidad:** conjunto de ensayos que se realizan con el propósito de determinar como se afecta la calidad de los productos en función del tiempo, humedad relativa y temperatura. Mediante un estudio de estabilidad se logra establecer el periodo de vida útil del producto y las condiciones adecuadas de almacenamiento. Los estudios pueden efectuarse bajo condiciones aceleradas (estudios acelerados) y bajo condiciones normales a largo plazo. (7)
- **Definición de estudio acelerado de estabilidad:** estudio diseñado con el fin de aumentar la tasa de degradación química o física de un medicamento, empleando condiciones extremas de almacenamiento. Estos estudios tienen como objeto determinar los parámetros cinéticos de los procesos de degradación o predecir la vida útil del medicamento en condiciones normales de almacenamiento. El diseño de estos estudios puede incluir temperaturas elevadas, alta humedad y exposición a la luz intensa. Los resultados de los estudios acelerados de estabilidad, deben ser complementados por los estudios efectuados en condiciones de almacenamiento normales o en condiciones de almacenamiento. (12)
- **Definición de estudios de estabilidad a largo plazo:** son aquellos en que se evalúan las características físicas, químicas, fisicoquímicas, biológicas o microbiológicas del medicamento durante el periodo de vencimiento, bajo condiciones naturales o definidas de almacenamiento. (12)
- **Periodo de vida útil:** intervalo de tiempo, a partir de la manufactura durante el cual un producto mantiene sus especificaciones dentro de los límites establecidos cuando es almacenado bajo las condiciones indicadas en la etiqueta. (12)
- **Fecha de vencimiento:** es la fecha (día, mes, año calendario) colocado en el envase y/o empaque de un medicamento, indica el tiempo hasta el cual se espera permanezca dentro de la especificación de vida útil aprobada si se almacena bajo

condiciones definidas, las cuales debe indicarse en la etiqueta o rótulo, en los envases y cierres aprobados. Para las fechas de expiración indicadas como mes/año, ésta es definida como el último día del calendario del mes. (12)

- **Resultado tiempo cero:** para el caso de estabilidad acelerada son los datos generados al liberar el producto. Siempre que el tiempo no sea mayor a 30 días de la fecha de realizada el último ensayo. (12)
- **Fecha de inicio de estabilidad (tiempo 0):** corresponde a la fecha en que las muestras son colocadas en la cámara. (12)
- **Fecha de retiro programada:** fecha indicada para sacar las muestras de las cámaras de estabilidad indicadas para cada rango de tiempo. (12)

1. Propósitos de un estudio de estabilidad. Para entender cuánta información se requiere en un estudio de estabilidad, es preciso tener alguna perspectiva de la necesidad y la razón de ese estudio, y del propósito que se persigue. (19)

La primera razón es sanitaria. El hecho que una droga sea inocua, no significa necesariamente que sus productos de degradación también lo sean. Además, aún cuando no fueran tóxicos, existe un peligro indirecto; ¿qué sucede cuando un paciente seriamente enfermo recibe un medicamento deteriorado que no contiene la dosis terapéutica prescrita o que, si la contiene, no está en condiciones de ser biológicamente disponibles? (19)

En segundo lugar, hay una razón legal, que exige que todos los medicamentos cumplan con las condiciones de identidad, efectividad, potencia, pureza e inocuidad durante el periodo que se encuentran en el mercado y hasta el momento de ser usados.

Finalmente, existen razones económicas. Un medicamento en malas condiciones, sea porque no contiene las dosis rotuladas (por tanto el médico no logra los efectos esperados), o porque sus características organolépticas no son óptimas y el mismo paciente lo rechaza, no es ciertamente una buena promoción para el producto. (19)

Se hace, pues, necesaria una evaluación de la estabilidad de cada forma farmacéutica que esté a la venta a fin de asegurar la identidad, efectividad, potencia, inocuidad y pureza del medicamento hasta el momento de su uso. (19)

La responsabilidad del laboratorio productor debe llegar, por lo tanto, a asegurar la estabilidad del medicamento hasta el momento de ser usado, y para estar en

condiciones de hacerlo, es preciso que se realicen controles de la estabilidad de la forma farmacéutica tal cual sale a la venta, así como también del preparado, a fin de establecer condiciones de preservación y el periodo útil de ambas formas. (19)

Las leyes requieren que los productos cumplan con las condiciones de pureza, inocuidad, potencia y efectividad y se considera como periodo útil el lapso durante el cual estas condiciones se mantienen dentro de ciertos límites. A continuación se citan las definiciones de estas condiciones: (19)

- **Pureza.** En este punto interesa el mantenimiento de la concentración de la droga o de las drogas activas. El límite general que se usa es que el contenido de cada principio activo no debe ser inferior al 90% del valor declarado. Los caracteres organolépticos, como sabor, olor, color, etc., deben conservarse también dentro de los márgenes aceptables, de la misma manera que otras características físicas. (19)
- **Potencia y eficacia.** No dependen sólo de la concentración de cada principio activo. Para asegurar la conservación de la potencia y eficacia de un medicamento, únicamente los ensayos clínicos son definitivos. No obstante, teniendo en cuenta las dificultades técnicas y económicas que involucra un control de este tipo aplicado a todos los medicamentos, puede aceptarse la realización de ciertos ensayos *in vitro*, que permiten inferir sobre lo que se podría llamar disponibilidad biológica, aun cuando no está de ninguna manera demostrado que esos ensayos puedan predecir totalmente los resultados *in vivo*. (19)
- **Toxicidad.** Si bien se sabe que ciertos productos de degradación son más tóxicos que el principio activo del cual provienen, es difícil encontrar literatura que los estudios de estabilidad se acompañen de una investigación completa de la toxicidad. Queda pues establecido que durante el periodo útil del medicamento deben conservarse, en general, las siguientes condiciones: a) una concentración de droga activa no inferior al 90%; b) eficacia terapéutica; c) inocuidad; d) características farmacotécnicas y e) caracteres organolépticos. (19)

2. Protocolos de estabilidad. La estabilidad de las formas posológicas manufacturadas debe estar demostrada por el fabricante, usando para este propósito métodos apropiados. Los ensayos indicados en la monografía del producto pueden usarse para evaluar la estabilidad si son indicadores de estabilidad (es decir, si diferencian con precisión entre las moléculas de la droga intactas y sus productos de degradación). Las consideraciones de estabilidad no sólo deben incluir los requisitos específicos de los compendios, sino que también los cambios en la apariencia física del producto que advertirían a los usuarios que la integridad continuada del producto es cuestionable. (6)

Los estudios de estabilidad de *sustancias activas* y formas posológicas empacadas son llevados a cabo en “tiempos reales” a largo plazo a temperaturas y humedades relativas específicas, que representan condiciones de almacenamiento experimentales en la cadena de distribución de la zona(s) climática(s) del país o región del mundo involucradas. El etiquetado de la sustancia activa empaquetada o forma posológica deben reflejar los efectos de temperatura, humedad relativa, aire, y luz en su estabilidad. Las advertencias etiquetadas de temperatura de almacenamiento de temperatura reflejarán los resultados de las pruebas de almacenamiento de “tiempo real”, además se permite exclusiones estacionales esperadas de temperatura. (6)

D. Temperatura de cuarto controlada

La temperatura del cuarto controlada define la tolerancia aceptable en las circunstancias de almacenamiento en cualquier locación en la cadena de distribución (ejemplos: farmacias, hospitales, y almacenes). Esta terminología también permite aconsejar a pacientes o consumidores acerca del almacenamiento apropiado para el producto. Los productos pueden etiquetarse ya sea con: “*Almacenar a temperatura de cuarto controlada*” o “*Almacenar a temperaturas no mayores a 25° C*” donde el etiquetado está apoyado por los estudios de estabilidad a largo plazo a la condición del almacenamiento designada de 25° C. (6)

La temperatura del cuarto controlada limita las exclusiones permisibles a aquellas que sean consistentes con el mantenimiento de una temperatura cinética promedio calculada, la cual no debe sobrepasar los 25° C. La pauta internacional común para los estudios de estabilidad a largo plazo especifica 25°C ± 2°C a una humedad relativa de 60 ± 5%. Los estudios acelerados tienen las siguientes especificaciones: 40 °C ± 2, a una

humedad relativa de $75 \pm 5\%$. Los estudios acelerados también permiten la interpretación de datos e información en puntos a corto plazo en condiciones de almacenamiento además de las exclusiones permitidas por la temperatura del cuarto controlada. (6)

El término “*temperatura de cuarto*” es empleado en maneras diferentes en los distintos países, y para los productos que deben ser enviados fuera de EE.UU., es normalmente preferible que en la etiqueta de los productos se haga referencia a una temperatura de almacenamiento máxima o rango de temperatura en grados Celsius. (6)

E. Temperatura cinética media (MKT)

La temperatura cinética media se define como la temperatura única calculada en que la cantidad total de degradación en un periodo particular es igual a la suma de las degradaciones individuales que ocurrirían a varias temperaturas. Entonces, la MKT puede ser considerada como una temperatura isotérmica de almacenamiento que simula los efectos no-isotérmicos de temperaturas de almacenamiento variadas. No es una simple media aritmética. La MKT es calculada de las temperaturas de las facilidades de almacenamiento. Las temperaturas para calcular la MKT, pueden ser recolectadas usando dispositivos electrónicos que miden las temperaturas a frecuentes intervalos convenientes (por ejemplo, cada 15 minutos). La MKT puede calcularse directamente o los datos pueden descargarse a una computadora para ser procesados. Para los sitios de distribución, como las farmacias y hospitales dónde el uso de tales instrumentos no puede ser factible, pueden emplearse termómetros como dispositivos capaces de registrar temperaturas débilmente altas y bajas por un período de 52 semanas. La media aritmética de las temperaturas débilmente altas y bajas se usa entonces para calcular el valor de MKT. El valor de MKT se calcula por medio de la ecuación siguiente (derivada de la ecuación de Arrhenius): (6)

$$T_k = \frac{\Delta H / R}{-\ln\left(\frac{e^{-\Delta H / RT_1} + e^{-\Delta H / RT_2} + \dots e^{-\Delta H / RT_n}}{n}\right)} \quad (\text{ecuación número 1})$$

en la cual T_k es la temperatura cinética media; el ΔH es el calor de la activación, 83.144 kJ/mol (a menos que se tenga información más exacta disponible como resultado de estudios experimentales); R es la constante universal de los gases, 8.3144×10^{-3} kJ/mol * grado centígrado; T_1 es el valor para la temperatura registrada durante el primer periodo, e.g., en la primera semana; T_2 es el valor para la temperatura registrada durante el segundo periodo, e.g. en la segunda semana; y T_n es el valor para la temperatura registrada durante el enésimo periodo, e.g. en la enésima semana, n es el número total de las temperaturas del almacenaje registradas (mínimo de 52 entradas semanalmente) durante el periodo anual de observación (NOTA: Todas las temperaturas T , son temperaturas absolutas dadas en grados Kelvin.) (6)

A continuación se muestra un ejemplo de un rango de temperatura típica de almacenamiento y distribución en grados Kelvin, y los factores de conversión usados para convertir este rango en grados Celsius y Fahrenheit. (6)

Cuadro No: 1: Factores de conversión y rango de temperaturas típicas de almacenamiento		
Kelvin (K)	Fahrenheit (°F)	Celsius (°C)
288.1–303.1	59–86	15–30
Factores de conversión		
Fahrenheit a Kelvin = $\{[(^{\circ}\text{F} - 32) \times 5/9] + 273.1\}$		
Celsius a Kelvin = $273.1 + ^{\circ}\text{C}$		
Fahrenheit a Celsius = $[(^{\circ}\text{F} - 32) \times 5/9]$		

F. Zonas climáticas

Por conveniencia en el planeamiento para empaquetar, almacenar y efectuar estudios de estabilidad, la práctica internacional identifica cuatro zonas climáticas que se describen en el cuadro No. 2. Los Estados Unidos, Europa, y Japón son caracterizados por zonas I y II. (6)

Los valores en el cuadro No. 2, están basados en las temperaturas observadas y humedades relativas, ambas fuera y dentro cuartos, de las cuales las temperaturas cinéticas medias y los valores de humedad promedio son calculados. Los valores derivados están basados en la inspección de datos de ciudades individuales y en las

concesiones para un margen de seguridad en la asignación de estas condiciones especificadas. (6)

Cuadro 2: "Zonas climáticas internacionales"							
Zona climática	Datos calculados				Datos derivados		
	* C*	^o C Temperatura cinética media (MKT)**	% HR	mbar***	^o C	% HR	mbar
I. <i>Templado</i> Japón, Reino Unido, Norte de Europa, Canadá, Rusia, Estados Unidos	20.0	20.0	42	9.9	21	45	11.2
II. <i>Mediterránea subtropical</i> Estados Unidos, Japón, Europa Del Sur (Portugal-Grecia)	21.6	22.0	52	13.5	25	60	19.0
III. <i>Caliente, seco</i> : Irán, Iraq Sudán	26.4	27.9	35	11.9	30	35	15.0
IV. <i>Caliente, húmedo</i> : Brazil, Ghana Indonesia, Nicaragua, Filipinas	26.7	27.4	76	26.6	30	70	30.0
* Los datos registrados como 19° se calcularon como de <math>19^{\circ}< math=""> ** Es la temperatura cinética media calculada *** Presión parcial de vapor de agua </math>19^{\circ}<>							

La fuente de datos y la información del Cuadro 2 es proveniente de la Internacional Conference on Harmonization (ICH) patrocinado por la Federación Internacional de Asociaciones de Fabricantes Farmacéuticos. (6)

G. Envejecimiento acelerado

Los factores que pueden alterar un producto con el tiempo son: temperatura, radiaciones, humedad, oxígeno u otros gases atmosféricos, presión, solventes, cambios de pH, interacciones, contaminación microbiana, etc. Todos los métodos para estudiar la estabilidad deben tener en cuenta estos factores. (19)

Generalmente, los procesos de degradación son reacciones químicas que consumen energía y que pueden acelerarse por aumento de la temperatura. La mayoría de los métodos de envejecimiento acelerado toman en cuenta este hecho y se fundan en mediciones de la velocidad de degradación a temperaturas superiores a la normal, para luego obtener inferencias de lo que sucedería a la temperatura ambiente. Están basados en principios fisicoquímicos, y por ello se hace imprescindible un conocimiento básico de cinética química a fin de poder interpretar los resultados. Diversas publicaciones pueden servir de introducción, y su consulta será de utilidad. (19)

De los métodos de envejecimiento acelerados propuestos, los que más se utilizan son: la aplicación directa de la ecuación de Arrhenius, exhaustivamente desarrollado por Garrett para la predicción de la estabilidad; el de la tabla de estabilidades; el del coeficiente de temperatura; el de relación de pendientes y el de temperaturas oscilantes.

En una publicación se comparan entre sí los métodos mencionados en primer lugar y los resultados obtenidos por envejecimiento natural. Si la degradación es provocada por una reacción fotolítica, ésta no puede acelerarse por el aumento de la temperatura, ya que la energía de activación es muy baja (2-3 kcal/mol) y la temperatura no tienen una influencia notable sobre la velocidad de reacción. La velocidad del proceso se puede incrementar por irradiación con fuentes luminosas de intensidad relativamente alta. Lo mismo sucede si la difusión es el factor dominante; en este caso, se consigue un envejecimiento forzado mediante el aumento de la presión. (19)

1. Relación entre velocidad de reacción y temperatura. Mediante la temperatura pueden acelerarse la mayoría de los procesos que producen degradación de las drogas y preparados farmacéuticos, y ésta es la base de gran parte de los métodos de envejecimiento artificial. Debe recalarse que si bien la temperatura acelera casi todos los procesos degradativos, hay algunos pocos en los que ésta tiene escasa influencia. Entre ellos se pueden mencionar las reacciones fotolíticas, cuya energía de activación es relativamente baja (2-3kcal/mol) y que no se aceleran notoriamente por aumento de la temperatura. De igual modo, algunas reacciones de oxidación y descomposición en que intervienen procesos de difusión tampoco son muy sensibles a cambios térmicos, aunque si a variaciones de presión. Por otro lado, están las reacciones de pirólisis, las que a causa de su elevada energía de activación (~50kcal/mol), solo se producen a altas temperaturas, mientras que en condiciones normales prácticamente no tienen lugar. En estos casos especiales no se puede aplicar un método de envejecimiento acelerado por temperatura y deberán ensayarse otras condiciones. (19)

2. Método de Arrhenius. El método de Arrhenius se denomina también de Garret por el hecho de que este autor fue quien desarrolló su aplicación al cálculo de estabilidad de productos farmacéuticos. La relación cuantitativa entre velocidad de reacción y temperatura dada por la ecuación de Arrhenius es:

$$k = Ae^{-\Delta H' / RT} \text{ (ecuación número 2)}$$

$$\ln k = \ln A - \Delta H^{\ddagger}/RT \quad (\text{ecuación número 3})$$

donde ΔH^{\ddagger} es la entalpía de activación, A una constante, R la constante de los gases y T la temperatura *absoluta*. De la ecuación se deduce que si se representa $\ln k$ en función de $1/T$ se obtiene una recta pendiente de $\Delta H_a/RT$. (19)

Asimismo, si se conocen A y ΔH^{\ddagger} se puede calcular la velocidad de reacción a la temperatura que se desee. Es importante señalar que para muchas reacciones la entalpía de activación está tabulada (entre otros, el National Bureau of Standards de los Estados Unidos ha hecho una recopilación entre 1951 y 1964, y hay también otras tablas de estabilidades); de modo que, determinando la constante de velocidad de reacción a una temperatura y conociendo el ΔH^{\ddagger} , se puede calcular el valor de la constante A con la ecuación (2) o con la (3) y con ese dato recalcularse el valor de la constante de velocidad de reacción a otra temperatura. (19)

Esto es importante cuando se hacen pequeñas modificaciones en la formulación. Se sabe que una leve variación en las concentraciones de los excipientes o en el contenido de una droga activa no modifica apreciablemente el valor de ΔH^{\ddagger} , aunque sí el de A. De modo que si, por ejemplo, se tiene el valor de ΔH^{\ddagger} para determinada formulación (sea porque está publicado o porque el laboratorio lo ha determinado experimentalmente con anterioridad) y se quiere saber la estabilidad de un preparado con ligeras variantes con respecto a aquella, no es necesario efectuar el estudio de envejecimiento acelerado a tres temperaturas: sólo bastará ensayar una (por supuesto, será la más elevada compatible con la muestra) y obtener el valor de k. Con éste se calcula A, y con A y ΔH^{\ddagger} se obtiene el valor de k a 25°, mediante el cual se calcula luego el periodo útil (es decir $t_{90\%}$) en la forma conocida. (19)

Para la aplicación correcta del método de Arrhenius deben tomarse en cuenta algunas consideraciones: 1) seguridad sobre el orden de reacción. Para ello es necesario que la reacción haya avanzado lo suficiente, ya que en el primer 10% de reacción es muy difícil distinguir un orden de otro. Una descomposición del 50% es adecuada, aunque en algunos casos pueden obtenerse buenos datos con 30 ó 35%, pero no con un porcentaje menor. 2) Exactitud en la medición de las temperaturas. Esto es tanto más necesario cuando menor sea la diferencia entre una y otra; por ejemplo, si entre T_1 y T_2 hay sólo 10°

(y esta es la mínima diferencia que puede usarse), un error de $\pm 2.0^\circ \text{C}$ en la temperatura llevará a valores muy erróneos. Como máximo podrá admitirse una discrepancia de $\pm 0.5^\circ \text{C}$. El error en la medición del tiempo es menos común, ya que generalmente se trata de valores altos y no es fácil equivocarse en más o menos un día. Sin embargo, puede suceder que se extraiga una muestra de la estufa y no se analice inmediatamente. Si la reacción no se ha detenido por algún procedimiento de frenado: congelamiento, agregado de reactivos, etc., seguirá avanzando a la temperatura ambiente, que dentro de un laboratorio puede llegar a los 30° . Tenemos entonces un error en la medida del tiempo, y el valor de degradación que se obtenga no corresponderá exactamente al tiempo de almacenamiento a temperatura elevada, sino a un tiempo algo mayor.

En consecuencia, la muestra debe ser analizada en el momento en que se extrae del termostato o la estufa, o de lo contrario, deberá congelarse la reacción hasta el momento de la valoración. (19)

3. Influencia de la humedad. Hay que considerar la humedad proveniente de dos fuentes distintas: el agua residual que contiene el producto elaborado y la humedad atmosférica. La influencia del envase es fundamental al respecto.

La influencia de la humedad sobre la velocidad de reacción depende directamente de la temperatura, la cual acelera, en la gran mayoría de los casos, todas las reacciones provocadas por aquella. Es decir que si tenemos un recipiente hermético que contiene una droga con cierto porcentaje de agua residual, será posible acelerar el proceso de degradación aumentando la temperatura. Si se analizan distintos valores de ese porcentaje, se puede encontrar cuál es el límite de humedad permisible para obtener un periodo útil razonable, que podría ser de 3 años. (19)

El dato que así se obtenga será tanto más cercano a la realidad cuanto más hermético sea el envase. Si éste es permeable a la humedad, al elevar la temperatura se provocará un descenso del contenido de agua por evaporación y difusión a través del envase. De esta manera disminuirá la concentración del componente causante de la degradación y se obtendrá un dato irreal. Lo mismo puede decirse de cualquier otro disolvente que haya quedado retenido durante la elaboración y de lugar a reacciones de solvólisis. (19)

Otra influencia que debe considerarse es la de la humedad circundante o ambiental que, lógicamente, no será necesario considerar en caso de envases herméticos, o de, preparados en solución. La influencia de la humedad relativa ambiente también está en relación directa con la temperatura, y cualquier estudio de su efecto debe hacerse a temperatura controlada. (19)

Lo aconsejable es determinar la velocidad de reacción en ambientes de distintos porcentajes de humedad a temperaturas medidas y extrapolar luego los valores a condiciones normales. En la práctica pueden tenerse 3 estufas, por ejemplo a 50, 60 y 70° C. En cada una de ellas se colocan recipientes herméticos en los que se tienen distintos porcentajes de humedad obtenidos con mezclas salinas (existen tablas que dan los porcentajes de humedad que se consiguen con diferentes mezclas y en función de la temperatura). Se tiene así un conjunto de nueve condiciones distintas, para los cuales se calcula la constante de velocidad de reacción. (19)

Para cada grupo de igual contenido de humedad se extrapola después el valor a 25° C. Con estos datos se grafica el logaritmo de la constante de velocidad de reacción a 25° C en función de la presión de vapor de agua y se obtienen, por extrapolación, los valores para las condiciones de humedad requeridas según los distintos tipos de clima.

Si se desea efectuar menos determinaciones, se puede colocar la muestra en las condiciones más deletéreas, es decir, 100% de humedad a 3 temperaturas, y calcular el periodo útil en esas condiciones. El periodo que se obtenga será inferior al que se dará en la práctica. (19)

H. Definición de estabilidad

Es la capacidad de un principio activo o producto de mantener en el tiempo sus propiedades físicas, químicas y de pureza originales dentro de las especificaciones establecidas. Se reconocen cinco tipos de estabilidad, se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro No. 3: Criterios de niveles aceptables de estabilidad
<i>Estabilidad química.</i> Cada ingrediente activo mantiene su integridad química y potencia que se indica en la etiqueta entre los límites especificados.
<i>Estabilidad física.</i> Las propiedades físicas originales, incluyendo apariencia, uniformidad, disolución, suspendabilidad son mantenidas
<i>Estabilidad microbiológica.</i> La esterilidad o resistencia al crecimiento microbiano son mantenidas según las especificaciones requeridas. Los agentes antimicrobianos presentes mantienen su efectividad dentro de los límites especificados.
<i>Estabilidad terapéutica.</i> El efecto terapéutico se mantiene sin cambio.
<i>Estabilidad toxicológica.</i> No ocurre aumento significativo en la toxicidad.

1. Incompatibilidad física y química. Entre las causas obvias de inestabilidad farmacéutica figura la incompatibilidad de los diversos componentes en una fórmula. La incompatibilidad física se define como una alteración reconocible a simple vista: precipitado, turbiedad o alteración del color. (12)

En cambio, la incompatibilidad química se la considera una reacción en la que no se produce ningún cambio visible. Puesto que no hay evidencias visibles de deterioro, este tipo de incompatibilidad debe ser reconocida por personal experimentado, en caso de que ocurra. (16)

A la incompatibilidad terapéutica se la ha definido como una interacción farmacológica indeseable entre dos o más componentes que conduce a: 1) potenciación de los efectos terapéuticos de los componentes, 2) la destrucción de la eficacia de uno o más componentes, o 3) la ocurrencia de una manifestación tóxica en el paciente. (16)

I. Factores que afectan la estabilidad del producto

Cada ingrediente, sea o no terapéuticamente activo o farmacéuticamente necesario, puede afectar la estabilidad de las drogas y sus formas posológicas. Los factores medioambientales primarios que pueden reducir la estabilidad incluyen la exposición a temperaturas adversas, luz, humedad, oxígeno, y dióxido de carbono. Los factores que más influyen en la estabilidad de la droga de las formas posológicas incluyen el tamaño de la partícula (sobre todo en las emulsiones y suspensiones), el pH, la composición del sistema solvente (es decir, porcentaje de agua "libre" y la polaridad global), compatibilidad de aniones y cationes, fuerza iónica de la solución, recipiente primario, aditivos químicos específicos, enlaces moleculares y difusión de las drogas y excipientes.

En las formas posológicas, las reacciones siguientes causan normalmente pérdida de droga activa, y ellas normalmente no proporcionan evidencia visual u olfativa obvia de su ocurrencia. Dentro de las reacciones que afectan la estabilidad del producto están: (6)

1. Hidrólisis. Las drogas que contienen enlace éster o amida (e.g. β -lactamas) son propensas a hidrólisis en presencia de agua. La magnitud de la hidrólisis depende de la temperatura y pH de la solución. Una regla muy citada es que por cada 10° que sube la temperatura de almacenamiento, la reacción se duplica o se triplica, pero es un empirismo y no siempre aplica. (6)

2. Descarboxilación. La degradación pirolítica en estado sólido mediante descarboxilación no suele verse en farmacia porque esta reacción requiere calores de activación grandes (25-30kcal). La reacción que sigue una cinética de primer orden, depende mucho del pH (en valores de pH muy bajos y altas temperaturas) y es catalizada por los iones hidronio. Por tanto el producto resultante tiene una potencia farmacológica reducida. (6)

3. Beta-ceto descarboxilación. Puede ocurrir en algunos antibióticos sólidos que contienen un grupo carbonilo en el carbono beta del ácido carboxílico o anión carboxilato. (6)

4. Racemización. La acción o proceso de pasar de un compuesto óptimamente activo a un compuesto racémico o mezcla óptimamente inactiva, de las respectivas formas dextrógira (*d* ó *+*) y levógira (*l* ó *-*) es un factor primordial en estabilidad farmacéutica. Muchas veces la forma *l* posee mayor actividad farmacológica que la *d*. La racemización sigue una cinética de primer orden y depende de la temperatura, del disolvente, del catalizador y la presencia o no de la luz. La racemización dependería del enlace del grupo funcional con el átomo de carbono asimétrico y los grupos aromáticos tienden a acelerar el proceso. (16)

5. Fotoquímica. Una droga puede ser afectada químicamente por la radiación de una determinada longitud de onda sólo: 1) si absorbe radiación a esa longitud de onda y 2) si la energía excede un umbral. La radiación ultravioleta, que posee un alto nivel energético, ocasiona muchas reacciones de degradación, como por ejemplo fotólisis y fotooxidación de los enlaces covalentes. Si la molécula que absorbe la radiación reacciona, se dice que la reacción es fotoquímica. Cuando las moléculas absorbentes no participan de modo directo en la reacción sino que transfieren su energía a otras moléculas que reaccionan, se dice que la sustancia absorbente es fotosensibilizante. La mayoría de las veces se usan recipientes de vidrio de color para proteger a las fórmulas fotosensibles. El vidrio verde amarillento es el que más protege en la región UV, en tanto que el ámbar confiere una protección considerable para radiación UV pero poca para la infrarroja. (16)

6. Energía ultrasónica. Consiste en vibraciones y ondas de frecuencias mayores a 20,000/seg, promueve la formación de radicales libres y altera la estructura molecular de las drogas. (16)

7. Radiación ionizante. En particular los rayos gama, se emplearon para esterilizar ciertos productos farmacéuticos. A la dosis esterilizante usual de 2.5 Mrad raras veces ocasiona una degradación química apreciable. En general, las fórmulas que están en estado sólido o congelado resisten más la degradación por la radiación ionizante que las que se hallan en forma líquida. (16)

8. Oxidación – reducción. La oxidación es una causa primordial de inestabilidad de los productos farmacéuticos y a menudo pero no siempre, intervienen la adición de oxígeno o la sustracción de hidrógeno. Cuando se trata de oxígeno molecular la reacción se conoce como autooxidación porque es espontánea y ocurre con lentitud a temperatura ambiental. (16)

La oxidación o pérdida de electrones de un átomo muchas veces afecta a radicales libres y origina reacciones en cadena. Basta una cantidad muy pequeña de oxígeno para iniciar una reacción en cadena. En la práctica es fácil retirar la mayor parte del oxígeno que hay en un recipiente pero muy difícil extraerla en su totalidad. Por ende se desplaza el espacio aéreo de los recipientes farmacéuticos con nitrógeno y dióxido de carbono para contribuir a reducir a un mínimo el deterioro por oxidación. (16)

Las estructuras moleculares que se oxidan más fácilmente son aquellas con grupo hidroxilo enlazadas a un anillo aromático, dienos conjugados, anillos aromáticos heterocíclicos, derivados nitrosos y nitritos, y aldehídos. Los productos de oxidación usualmente carecen de actividad terapéutica. (6)

La oxidación se cataliza por valores de pH mayores al óptimo, iones de metales pesados polivalentes (ej., cobre e hierro), exposición a oxígeno e iluminación de UV. (6)

9. Fuerza iónica. El efecto de la concentración total de electrólitos disueltos, en la velocidad de reacciones de hidrólisis resulta de la influencia de la fuerza iónica o atracción interiónica. En general, la constante de velocidad de hidrólisis es inversamente proporcional a la fuerza iónica con iones cargados opuestamente (e.g. droga catión y aniones de los excipientes) y directamente proporcional a la fuerza iónica con iones de misma carga. Una reacción que produce un ion de carga opuesta al ion de la droga original debido al aumento de la fuerza iónica, puede incrementar la tasa de hidrólisis conforme la reacción sigue. La gran fuerza iónica de sales inorgánicas también puede reducir la solubilidad de algunas otras drogas. (6)

10. Efecto del pH. La degradación de muchas drogas en solución se acelera o disminuye exponencialmente conforme el pH es disminuido o aumentado sobre un rango de valores específicos de pH. (6)

Un sistema buffer de pH, que normalmente es un ácido débil o base y su sal, es un excipiente común usado en las preparaciones líquidas para mantener el pH en un rango que minimiza la tasa o velocidad de degradación de la droga. El pH de drogas en solución puede ser amortiguado o ajustado para lograr la solubilidad de la droga. (6)

11. La estabilidad del estado sólido. Las reacciones en estado sólido son relativamente lentas; por ende la estabilidad de drogas en estado sólido raramente es una preocupación de la distribución. La velocidad de degradación de los sólidos secos normalmente se caracteriza por ser de cinética del primer orden o una curva sigmoideal.

Cuando la humedad está presente, la descomposición de droga sólida puede cambiar a un orden cero de cinética química porque la tasa de degradación es controlada por el fragmento relativamente pequeño de la droga que existe en una solución saturada que se localiza (normalmente imperceptible) en la superficie o dentro del producto de droga sólido. (6)

12. Temperatura. En general, la velocidad de una reacción química aumenta exponencialmente por cada 10° que aumenta la temperatura. Esta relación se ha observado para casi todas las drogas que sufren hidrólisis y algunas reacciones de oxidación. El factor real de incremento de velocidad depende de la energía de activación de la reacción particular. (6)

El farmacéutico también debe ser consciente que las temperaturas frías inapropiadas pueden causar daño. Por ejemplo, la refrigeración puede causar una extrema viscosidad en algunas drogas líquidas y supersaturación de la causa en otros. El congelamiento puede romper o causar un aumento grande en el tamaño de la gota de emulsiones; puede desnaturalizar las proteínas; y en casos raros, puede causar el estado polimórfico menos soluble de algunas drogas que se desean formar. (6)

J. La responsabilidad de los farmacéuticos

Los farmacéuticos ayudan asegurar que los productos bajo su supervisión cumplan con criterios aceptables de estabilidad con las siguientes acciones: (1) distribuyendo el stock más viejo primero y observando la fecha de caducidad, (2)

almacenando los productos bajo las condiciones ambientales declaradas en las monografías individuales, en el etiquetado, o ambos, (3) observando los productos para evidenciar inestabilidad, (4) tratando apropiadamente y etiquetando los productos que son reempacados, diluidos, o mezclados con otros, (5) distribuyendo en el recipiente apropiado con el cierre apropiado, e (6) informando y educando a los pacientes acerca del almacenamiento apropiado y uso de los productos, incluso la disposición de prescripciones obsoletas o excesivamente viejas. (6)

Una pérdida clara de potencia en el ingrediente(s) activo(s) puede ser el resultado de la difusión de la droga o combinación, con la superficie del sistema de cierre del recipiente. Una ganancia clara en la potencia normalmente es causada por la evaporación solvente o lixiviando de materiales del sistema de cierre del recipiente. (6)

K. Formas posológicas sólidas

Muchas formas posológicas sólidas están diseñadas para almacenarse bajo condiciones de baja humedad. Estos requieren protección del agua ambiental y por consiguiente debe guardarse en los recipientes apretados o en el recipiente proporcionado por el fabricante. La apariencia de gotas de líquido, o agrupamiento del producto, dentro del recipiente significa que las condiciones son inapropiadas. La presencia de un agente desecante dentro el recipiente del fabricante indica que debe tenerse ese cuidado especial en la dispensación. (6)

1. Tabletas sin recubrimiento. Puede mostrarse evidencia de inestabilidad física en las tabletas sin recubrimiento por el polvo excesivo y/o pedazos (es decir, desmenuzando distinto de la rotura) de la tableta en el fondo del recipiente (tabletas desgastadas, aplastadas o rotas); grietas o astillas en las superficies de la tableta; hinchazón; moteado; el descoloramiento; fusión entre las tabletas; o la apariencia de cristales que obviamente no son parte propia de las tabletas, en las paredes del recipiente o en las tabletas. (6)

2. Tabletas recubiertas: se muestra evidencia de inestabilidad física en las tabletas recubiertas por grietas, moteado, pegado y el agrupamiento de las tabletas. (6)

L. Acción de los excipientes sobre la estabilidad de determinados principios activos

Se ha comprobado que los “componentes inertes” aceleran a menudo la degradación química del principio activo; causan modificación de sus características farmacotécnicas, como el tiempo de disgregación, tiempo de disolución, friabilidad,

dureza, etc.; influyen de otra forma sobre la disponibilidad biológica del medicamento modificando sus posibilidades de absorción, o provocan cambios organolépticos indeseables. (19)

La higroscopicidad del excipiente es también un factor de importancia. Cuando el excipiente no es higroscópico, su influencia en distintas condiciones de humedad resulta prácticamente despreciable. La naturaleza química del excipiente tiene mucha importancia y, pueden producirse reacciones entre éste y el principio activo. También debe recalcarse la influencia del lubricante o agente granulante sobre las características físicas del comprimido. Esto puede causar una reducción o pérdida de la efectividad terapéutica. (19)

M. Importancia del envase

La finalidad del envase es proteger eficazmente al contenido de factores degradantes externos e, indirectamente, también de los internos. En los casos en que se liberan componentes volátiles que aceleran o catalizan la degradación, un envase que permita su eliminación será más eficaz para prolongar la estabilidad del producto que un recipiente hermético. (19)

El envase, así como también el proceso de envasado, condicionan la estabilidad y, en consecuencia, los estudios al respecto deben hacerse con el producto envasado en el mismo recipiente y con el mismo procedimiento de envase que será usado en escala industrial. (19)

Entre otros factores deberán tenerse en cuenta:

- Aspecto (especialmente de la superficie interior).
- Migración de la droga al plástico, goma, butadieno, etc.
- Migración del plastificante u otros aditivos a la forma farmacéutica.
- Penetración de humedad o gases atmosféricos perjudiciales.
- Integridad de los cierres.
- Cambios en la naturaleza física del material de envase

Todos los ensayos recién indicados se realizan *in vitro*. Para evaluar fehacientemente la eficacia terapéutica del medicamento, los ensayos realmente decisivos son los clínicos, ya que no se sabe con certeza que correlación existe entre ellos, es decir cuál es en cada caso la característica física que determina la variación de la disponibilidad

biológica de la formulación. (19)

1. Tipos de envase.

a. Recipientes de vidrio. A causa de sus características técnicas el vidrio es el material de elección, siempre que se use el tipo adecuado para la formulación. (11)

La mayor interacción química proviene de la alcalinidad de algunos tipos de vidrio, y en algunos casos, se recomienda el depósito de una película de óxido de titanio u óxido de circonio en su superficie interior para prevenir el ataque químico. La mejor solución ante ataques químicos, es utilizar el vidrio neutro o borosilicato, que es el que se recomienda para todos los inyectables. (11)

Hay vidrio que recibe un tratamiento especial para conferirle ciertas características, y en estos casos las interacciones químicas con el producto envasado suelen ser distintas. Para proporcionarle color, reañaden al vidrio óxidos metálicos que pueden ser de hierro, níquel, cobalto o manganeso, o metales como oro, plata y cobre. A fin de modificar la tensión superficial para facilitar el deslizamiento del líquido, suele aplicarse una capa de siliconas sobre la superficie. (19)

Una desventaja del vidrio es su transparencia a la radiación visible y ultravioleta cercana. Si bien puede reducirse usando vidrio ámbar, ello no ofrece una protección total, y las drogas fotosensibles deben ser envasadas siempre en recipientes opacos. Esto se consigue con el estuche exterior de cartulina en cuyo rótulo deberá constar la recomendación: *“Protéjase de la luz”*, al igual que en la etiqueta del recipiente para asegurar la conservación del producto hasta el momento de su uso. (19)

b. Recipientes de plástico. Como consecuencia de la creación de más y mejores materiales (polietileno, poliisopropileno, poliestireno, cloruro de polivinilo (PVC), etc.), la tendencia actual se orienta hacia el uso de recipientes de plástico. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que muchos plásticos contienen componentes que se han añadido al producto de polimerización, como agentes plastificantes o estabilizantes, lubricantes, moldeantes, antiestáticos, etc., y que pueden pasar al contenido del recipiente. (19)

Con respecto a la luz, los recipientes de plástico opalescente ofrecen mejor protección que el vidrio, y en algunos casos de drogas fotosensibles, puede recomendarse su uso, especialmente si se trata de formulaciones sólidas. La calidad del plástico y la posibilidad de usarlo para determinadas formulaciones también pueden ser controladas

por métodos analíticos. (19)

Los recipientes de polietileno de alta densidad, que se usan para envasar cápsulas y comprimidos, poseen propiedades térmicas características, un espectro de absorción infrarroja distintivo y una densidad de 0.941 a 0.965 g/cm³. Además, estos recipientes son ensayados para verificar la transmisión de la luz, la permeabilidad al vapor de agua, sustancias extraíbles, residuo no volátil y metales pesados. (19)

Una desventaja importante de los recipientes de plástico es el pasaje de ambas direcciones o “respiración” a través de las paredes del recipiente. Es común que una fórmula pierda humedad. Los gases, como el oxígeno, dióxido de carbono del aire, pueden migrar a través de las paredes del recipiente y alterar el producto. (16)

c. Recipientes metálicos. Los envases de aluminio, estaño, plomo, etc., deben ser muy controlados en lo que atañe a su interacción; por lo general, su superficie interior se cubre con una película de material inerte. La desventaja del aluminio es su sensibilidad al ataque por ácidos y álcalis, por sales metálicas que son reducidas, o por el yodo, que reacciona con el aluminio en presencia de agua. (19)

2. Cierre del recipiente. Tan importante como la calidad del material del recipiente es la del cierre o tapa y muchas veces se ha olvidado que con respecto a la estabilidad, además del recipiente, hay que considerar su cierre, el cual forma parte de aquel. (19)

Es importante que el cierre no permita ninguna pérdida del producto, que impida en el mayor grado posible el intercambio con los agentes atmosféricos (humedad, oxígeno, anhídrido carbónico), y que no interaccione con ninguno de los componentes del producto. Puede ser goma, plástico, corcho, metal, papel, etc., y frecuentemente tiene un recubrimiento laminar que está en contacto directo con el preparado. Algunas veces el envase estrictamente cerrado ofrece menos protección al producto; son los casos en que se produce desprendimiento de agua o de otros componentes volátiles que facilitan la degradación. Se procura entonces que el cierre no sea hermético a fin de favorecer la eliminación de los vapores deletéreos. (19)

N. Generación y evaluación de datos de estabilidad

En los últimos años, las pruebas de estabilidad de las drogas han sido revolucionadas por dos técnicas muy avanzadas, a saber, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y los programas computadorizados para la adquisición de datos,

almacenamiento, análisis y reporte. Dado a que el personal de la FDA se ha vuelto muy estricto en los requerimientos de las fechas de expiración de los productos, éstas deben estar basadas en datos de estabilidad que han sido obtenidos por medio del uso de métodos indicadores de estabilidad y dichos datos analizados por medio de cálculos estadísticos válidos. Por ende, HPLC y los programas computarizados se han vuelto esencialmente indispensables para llenar estos requisitos. (13)

Casi todas las nuevas drogas que se desarrollan hoy en día, usan la técnica HPLC como método de elección para analizar la estabilidad de la forma farmacéutica. La técnica de HPLC puede separar y cuantificar el ingrediente activo de sus productos de degradación en la forma posológica. (13)

Una desventaja de la metodología HPLC es que consume tiempo; sin embargo esto puede remediarse mediante automatización. (13)

O. Estudios preliminares

Con éstos se pretende determinar cuáles son los principales factores que afectan el contenido de droga activa, la toxicidad, la efectividad y los caracteres farmacotécnicos y organolépticos. Para ello, lo primero que debe efectuarse es un estudio bibliográfico exhaustivo de las drogas activas puras y de sus combinaciones, si las hubiere. Prácticamente no existe droga pura usada en la industria farmacéutica cuyo estudio de estabilidad no haya sido publicado. Con los datos de la literatura ya se tiene una idea bastante exacta sobre la forma farmacéutica que *a priori* es más estable para la formulación. (19)

Luego se somete el fármaco elaborado a condiciones extremas de temperatura, luz, humedad, presión de gases, etc., y se determinan los factores que más lo afectan, para decidir a posteriori, y sobre la base de esos datos, cuál es la formulación más estable, así como también el envase más conveniente. (19)

El término “condiciones extremas” se refiere a condiciones realmente *degradativas* de la formulación, aunque sean muy anormales con respecto a las condiciones naturales, puesto que lo que se pretende es determinar los parámetros que deterioran eficazmente al fármaco. (19)

Seguidamente se hace una predeterminación cinética de la degradación, la cual servirá de guía para la elección de las condiciones que se usaran en los ensayos

definitivos. (11)

La elección de la temperatura “orientadora”, así como también el intervalo para el retiro de cada muestra, dependerán de lo que hayan indicado los ensayos previos y lo que se conozca sobre la estabilidad del producto. (19)

También en esta etapa pueden efectuarse mediciones con formulaciones diferentes (variación de excipientes, pH, forma farmacéutica, etc.) y envases distintos (variación en la calidad del material de envase, del cierre, del agente conservador, del agente deshidratante, etc.) a fin de decidir los más adecuados. Lo importante es tener el mayor porcentaje de descomposición, en el menor tiempo posible. Al extremar las condiciones de degradación, las diferencias se acentúan y la elección de la formulación más aceptable se simplifica. (19)

En esta etapa corresponde, naturalmente, resolver sobre el método o los métodos de valoración por utilizar. Es necesario tener presente que la finalidad de la valoración consiste en determinar si ha habido o no degradación y, en consecuencia, el método deberá ser suficientemente específico como para detectarla. (19)

Asimismo, se analizarán los métodos de detección de productos de degradación y se controlarán con las muestras degradadas drásticamente (por ejemplo, con las sometidas a 100° durante 2 ó 3 días, o los que fueren necesarios para lograr una gran degradación). Por otra parte, se deberá tener una idea de los límites de sensibilidad y de la cuantitatividad de las determinaciones, lo que permitirá distinguir, por ejemplo entre 10, 30 ó 50% de degradación. (19)

P. Estudios definitivos

En el estudio definitivo se analiza el comportamiento del medicamento en su envase definitivo frente a distintos valores medidos de los factores que lo afectan y se extrapola a valores “normales” de éstos. (19)

Generalmente, uno de los factores degradantes (temperatura, humedad, oxígeno, luz, etc.) provoca la degradación con más efectividad que los otros, y entonces se somete la droga a condiciones extremas de ese parámetro. Puede suceder, no obstante, que haya dos factores bastante similares en capacidad degradativa (como temperatura y humedad). En ese caso, manteniendo constante uno de ellos (por ejemplo, temperatura a 60°), se somete el fármaco a valores extremos del otro parámetro (por ejemplo 80, 90 y 100%) de

humedad y se estudia la influencia de este último haciendo valoraciones periódicas. Paralelamente, debe analizarse la influencia del otro factor manteniendo constante el que antes se variaba (por ejemplo, 50, 60 y 70° de temperatura con 80% de humedad), y así se tendrá, por separado, el efecto de cada uno de los dos factores. Mediante cálculos sencillos se extrapola a valores normales de ambos. (19)

En general, puede asegurarse que no habrá más de dos factores importantes de degradación que actúen en forma conjunta, de modo que nunca se tendrá 3 ó más variables por considerar. Los ensayos preliminares habrán permitido decidir el factor degradante y la magnitud de éste, es decir, habrán dado una idea aproximada de la cinética de degradación. Con estos datos podrá planificarse el estudio definitivo, lo cual involucra la elección de las condiciones extremas a que se someterá el medicamento (por ejemplo 50, 60 y 70°), así como también la periodicidad en la toma de muestras (por ejemplo, cada 3 días, en la de 70°, cada 6 días en la de 60°, etc.). (19)

Q. Condiciones que debe reunir un laboratorio para hacer estudios de estabilidad

Varios son los factores que se deben tener en cuenta: cantidad de productos por analizar, cantidad de formas farmacéuticas distintas, volumen de los envases, capacidad humana y material del laboratorio de control, etc. (19)

Dentro de las variaciones posibles, habrá desde cámaras climáticas, o cuartos con humedad y temperaturas reguladas, y secciones exclusivamente dedicadas a estudios de estabilidad con equipos, personal y elementos propios, hasta solamente una porción de un laboratorio de control destinada a esta tarea, con muy pocas facilidades “exclusivas”.

También se deberá contar con equipo de control de calidad: espectrofotómetros, cromatógrafos, potenciómetros, etcétera, o bien de los medios para efectuar esas determinaciones. (19)

R. Actitud cuando no es posible predecir un periodo útil

Por una razón u otra, en los casos comentados precedentemente no es posible predecir un periodo útil. Muchas veces, la eficacia terapéutica de un medicamento es suficientemente importante como para que se justifique su comercialización aun cuando no cumpla con todos los requisitos que se deben exigir para la introducción de un medicamento en el mercado. (19)

En estas circunstancias, la actitud, más razonable es proponer un periodo útil relativamente corto (según el medicamento de que se trate) y controlar periódicamente al producto en su envejecimiento natural con todos los métodos posibles: químicos, físicos, microbiológicos, biológicos y clínicos. Cualquier alteración que modifique su disponibilidad biológica durante el periodo útil estimado debe ser comunicada inmediatamente a la autoridad sanitaria, y se han de retirar del mercado todas las partidas que hayan sufrido esa alteración. Esto es de fundamental importancia en medicamentos como sueros, vacunas, etcétera. (19)

IV. MARCO METODOLÓGICO

A. Objetivos

1. Generales.

- Desarrollar un estudio de estabilidad acelerada de productos comerciales formulados a base de Melatonina que se comercializan en Guatemala.
- Comprobar si la fecha de expiración que se declara en la etiqueta de los productos, es congruente con los resultados obtenidos en este estudio de estabilidad acelerada.

2. Específicos.

- Evaluar la calidad física de los productos en estudio mediante los siguientes análisis físicos: variación de peso, desintegración, friabilidad y dureza.
- Determinar si la concentración de las muestras de Melatonina al iniciar el estudio se encuentra dentro de los límites preestablecidos por la USP, para con ello verificar la calidad de los productos.
- Verificar si la concentración de Melatonina durante el estudio de estabilidad se mantiene dentro de los límites predeterminados por la USP.
- Comparar el efecto degradante de las temperaturas utilizadas (a humedad relativa controlada), sobre las marcas comerciales evaluadas de Melatonina durante el estudio de estabilidad.
- Identificar que empaque primario, es el que provee mayor estabilidad al producto comercial de Melatonina.

B. Hipótesis

“Los suplementos dietéticos a base de Melatonina son estables, es decir que mantienen su integridad y concentración dentro de los límites preestablecidos por la USP, durante un período de noventa días en los que se sometían a tres distintas temperaturas y humedades relativas controladas”.

C. Las variables

1. Independientes.

- Temperatura y humedad de las cámaras en las que se sometieron los suplementos dietéticos a base de Melatonina, que se incluyeron en el estudio.

2. Dependiente.

- La concentración del principio activo (Melatonina) durante el periodo de 90 días debe estar dentro de los límites preestablecidos por la USP.

D. Población y muestra

1. Universo de trabajo o población meta: suplementos dietéticos formulados a base de Melatonina que se comercializan en Guatemala.

2. Muestra (población accesible): trescientas treinta tabletas de un mismo lote de cada una de las marcas comerciales de Melatonina. Dichas marcas comerciales son las que se reportan con registro en el Departamento de Regulación y Control de Productos Farmacéuticos y Afines. En el siguiente cuadro se señala el número a utilizar en cada prueba a efectuar:

Cuadro No. 4: Número de tabletas de Melatonina por ensayo físico/químico	
<i>Prueba</i>	<i>Número de tabletas empleadas</i>
Desintegración	18
Friabilidad	Máximo 40 (varía acorde al peso promedio)
Variación de peso	20
Dureza	10
Cuantificación del principio activo	240
Total	328-330*
* Nota: Para la cuantificación del principio activo se necesitan 10 tabletas, sin embargo el análisis se hizo en duplicado, además de que se efectuaron 4 mediciones periódicas en total con muestras que provenían de 3 cámaras con condiciones ambientales distintas.	

E. Procedimiento

Los ensayos que el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) debe efectuar a los suplementos dietéticos previo a la obtención de registro sanitario son: a) microbiológico (bacterias: *E. coli*, *Salmonella*, *S. auerus*, *Vibrio Cholerae.*), b) depende de lo declarado en la etiqueta (vitaminas, minerales proteínas), c) evaluación de ingredientes que no contienen, d) cuantificación de preservantes, e) cualificación de colorantes.

Por otro lado, los ensayos que el Laboratorio Nacional de Salud debe llevar a cabo a los productos farmacéuticos previo a obtener el registro sanitario son: a) microbiológico (bacterias, hongos y levaduras), b) identificación (con infrarrojo generalmente), cuantificación, desintegración, y organolépticos. En la USP-29 se indica que se deben efectuar los análisis antes mencionados, sin embargo deben efectuarse también los siguientes ensayos: disolución, friabilidad y dureza.

Inicialmente se efectuaron cuatro ensayos físicos a las tabletas: variación de peso, friabilidad, dureza y desintegración con base a los lineamientos que se señalan en la United States Pharmacopeia 29, 2006. También se efectuó un ensayo organoléptico inicial de las tabletas y de los empaques primarios comerciales de Melatonina. No se efectuó el ensayo de disolución por carecerse de una metodología analítica estandarizada.

F. Ensayos físicos

1. Dureza. El fin de esta prueba es determinar bajo condiciones definidas la resistencia a la compresión medida por la fuerza necesaria para romperlas por compresión. (1)

a. Equipo. El equipo consiste en dos mandíbulas frente a frente, una que se mueve hacia la otra. Las superficies lisas de las mandíbulas son perpendiculares a la dirección del movimiento. Las superficies de compresión de las mandíbulas son planas y más largas que la zona de contacto de la tableta. El equipo se calibra con una precisión de 0.1019716 kg fuerza. (1)

b. Procedimiento de operación. Colocar entre las mandíbulas la tableta, tome en cuenta la forma, la marca de incisión y la inscripción. Para cada medida orientar la tableta de la misma manera con respecto a la dirección de aplicación de la fuerza. Llevar a cabo la medida en 10 tabletas, remover todos los fragmentos de la tableta anterior antes de cada determinación. (1)

c. Expresión de los resultados. Los resultados se expresan en media mínimo y máximo de las fuerzas medidas, todas expresadas en kg fuerza (1 Newton = 0.101976 kg fuerza). Indicar el tipo de equipo y cuando aplique la orientación de la tableta. Se aceptan generalmente resistencias a la compresión entre 4.08-10.1976 kg fuerza. (1)

2. Variación de peso de suplementos dietéticos. La siguiente prueba, provee límites para las variaciones permisibles de peso permitida en tabletas o cápsulas individuales, expresadas en términos de la desviación permitida del peso promedio de la muestra. (6)

a. Tabletillas sin recubrimiento y recubiertas con film. Pesar individualmente 20 tabletas completas y calcular el peso promedio. Los requerimientos se cumplen si los pesos de no más de 2 de las tabletas difieren del peso promedio por más que el porcentaje que se declara en el siguiente cuadro a continuación y ninguna tableta difiere en peso por más del doble de ese porcentaje. (6)

Cuadro No. 5: Criterio de tolerancias de variación de peso para tabletas sin recubrimiento, tabletas recubiertas con film y tabletas recubiertas (con materiales diferentes al film)	
<i>Promedio del peso de las tabletas en mg</i>	<i>Diferencia en porcentaje del promedio (Desviación Estándar Relativa porcentual, DER %)</i>
130 ó menos	10
De 130 a 324	7.5
Más de 324	5

b. Tabletillas recubiertas con materiales distintos al film. Pesar individualmente 20 tabletas completas y calcular el peso promedio. Si las tabletas recubiertas no cumplen con el criterio del cuadro anterior, colocar 20 tabletas en un beaker de agua a 37° C, y agitar moderadamente por no más de 5 minutos. Examinar los núcleos para evidenciar la desintegración y repetir el procedimiento por un periodo más corto si la desintegración ya ha comenzado. Secar los núcleos a 50° C por 30 minutos. Pesar exactamente 20 tabletas de manera individual y calcular el peso promedio. Los requerimientos se cumplen si los pesos de no más de 2 de las tabletas difieren del peso promedio por más que el porcentaje declarado en el cuadro No. 6 y ninguna tableta difiere en peso por más del doble de ese porcentaje. (6)

3. Friabilidad de las tabletas. La prueba presentada es aplicable a la mayoría de comprimidos. La medida de friabilidad compensa otras pruebas de fuerza física como la dureza. (6)

Usar un tambor con las siguientes especificaciones: diámetro interno entre 283 y 291 mm y una profundidad de 36-40 mm, hecho de un polímero sintético transparente con superficies internas pulidas y no estar sujeto a acumulación estática. Un lado del tambor tiene la opción de ser removible. (6)

Las tabletas son volteadas en cada giro del tambor por una proyección encorvada con un radio interior entre 75.5 y 85.5 mm que se extiende del medio del tambor a la pared exterior. El tambor está unido al eje horizontal mediante un dispositivo que gira a 25 ± 1 rpm. Por tanto en cada giro o vuelta las tabletas ruedan, se deslizan y caen sobre la pared del tambor o sobre ellas mismas. (6)

Para tabletas con masa igual o menor de 650 mg por unidad, seleccionar una muestra de tabletas enteras que corresponda a 6.5 gramos. Para tabletas con una masa mayor de 650 mg, seleccionar una muestra de 10 tabletas enteras. Las tabletas deben ser cuidadosamente despolvadas previo a efectuar la prueba. Pesar la muestra de tabletas con exactitud y colocarlas en el tambor. Rotar el tambor 100 veces, y luego retirar las tabletas. Quitar cualquier polvo suelto de las tabletas como antes, y pesarlas con exactitud. (6)

Generalmente, la prueba se corre una vez. Si evidentemente ocurren quebraduras, rajaduras, o fisuras, las tabletas no cumplen con las especificaciones. Si los resultados son dudosos o si la pérdida de peso es mayor que la especificada, la prueba debe repetirse dos veces más y calcularse la media de las tres pruebas. Una pérdida máxima promedio no mayor de 1% del peso de la muestra se considera aceptable para la mayoría de productos. (6)

Si el tamaño o forma de la tableta causa que la caída de las tabletas sea irregular, ajustar la base del tambor para que forme un ángulo de aproximadamente 10° con el borde del banco y las tabletas, ya no se unirán entre sí pues podrán caer libremente en el tambor. En el caso de formulaciones nuevas, una pérdida de peso de 0.8% es permitida hasta obtener información completa del empaque final. (6)

4. Desintegración. Este ensayo se efectúa para determinar que se cumplan con los límites de desintegración declarados en cada monografía individual excepto en el caso en el que la cápsula o tableta este diseñada como masticable o de liberación controlada. (4)

Se determina el tipo de unidad, para la prueba de la etiqueta del producto y de observación y se aplica el procedimiento apropiado para 6 ó más unidades posológicas. Para el propósito de esta prueba, la desintegración no implica la disgregación completa de la unidad o incluso de su constituyente activo. La desintegración completa se define como el estado en el que cualquier residuo de la unidad, excepto el cuerpo de la cápsula o fragmentos del recubrimiento insoluble, quedan remanentes dentro del equipo y que posean una masa suave que no tenga una naturaleza firme palpable (6).

El equipo consiste en una canasta ensamblada dentro de un beaker de 1000 mL, con una altura de 138 a 155 mm, un diámetro interno de 97-110 mm para el líquido de inmersión, un arreglo termostático para calentar el fluido entre 35° y 39° C y un mecanismo para elevar o bajar la canasta en el líquido de inmersión con una frecuencia de 29 a 32 ciclos por minuto, a una distancia no menor de 5.3 cm y no mayor de 5.7 cm.

El volumen del líquido en el recipiente es tal que al punto mayor del ciclo de inmersión el entramado de alambre estará por lo menos 2.5 cm debajo de la superficie y descienda a no menos de 2.5 cm del fondo del recipiente en el punto más bajo del ciclo. El tiempo que se requiere para la elevación es el mismo, que para la inmersión y el cambio de dirección es leve, sin movimientos abruptos. La canasta ensamblada se mueve a lo largo de su eje vertical y no hay movimiento horizontal apreciable a movimiento del eje de la vertical. (6)

La canasta consiste en 6 tubos transparentes abiertos cada uno de 7.75 +/- 0.25 cm de largo y con diámetro interno de 20.7 a 23 mm y paredes de 1.0 a 2.8 mm de ancho. Los tubos están colocados en posición vertical por dos planchas plásticas con 8.8 a 9.2 cm de diámetro y 5 a 7 mm de ancho con seis agujeros cada uno de 22 a 26 mm de diámetro, equidistantes del centro de la placa y de cada uno. Unido a la superficie del plato inferior esta un entramado de alambre de acero inoxidable, que tiene un entramado de 1.8 a 2.2 mm de apertura y esta sostenido rígidamente por tres cerrojos a través de las placas plásticas. (6)

a. Prueba para tabletas sin cubierta o con cubierta simple para suplementos dietéticos. Colocar una tableta o un comprimido en cada uno de los tubos, agregar un disco a cada tubo y operar el equipo manteniendo el agua a una temperatura de $37^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C que rodea el líquido de inmersión (que es agua si no se especifica en la monografía). Al final de los 30 minutos, levantar la canasta del fluido y observar las tabletas o comprimidos. Todas deben de desintegrarse completamente. Si 1 ó 2 tabletas fallan en desintegrarse, repetir la prueba con otras 12 tabletas adicionales: no menos de 16 de 18 tabletas deben desintegrarse completamente (6).

b. Prueba para tabletas sin cubierta o con cubierta simple para productos farmacéuticos. Colocar una tableta en cada uno de los tubos y opere el equipo con agua a una temperatura de $37^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C como líquido de inmersión si no se especifica en la monografía. Al final del tiempo límite especificado en la monografía levantar la canasta del fluido y observar las tabletas. Si 1 ó 2 tabletas no se desintegran completamente repetir la prueba con otras 12 tabletas adicionales: no menos de 16 de 18 tabletas deben desintegrarse completamente. Si las tabletas tienen recubrimiento simple, desarrolle la prueba como se describió anteriormente (6).

G. Ensayos químicos

Se efectuó un ensayo de cuantificación del principio activo de las 6 diversas marcas de Melatonina en cuatro tiempos distintos. Los intervalos de análisis para dicho ensayo fueron de la siguiente manera:

Cuadro No. 6: Intervalos de análisis de las muestras acorde a la temperatura de almacenamiento temporal		
<i>Temperatura en °C</i>	<i>Intervalos de análisis químico en días</i>	<i>Tiempo total que las muestras permanecerán en el ambiente controlado</i>
30	0, 30, 60, 90	90
35	0, 30, 60, 90	90
40	0, 30, 60, 90	90

1. Tiempo cero. Se seleccionaron aleatoriamente 20 tabletas de cada una de las muestras adquiridas y se colocaron en contenedores identificados para evitar confusiones. Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de cuantificación de Melatonina. Esto se hizo usando un método analítico estandarizado previamente con el equipo de HPLC de la UVG. El mismo día en que se seleccionaron las tabletas del “tiempo cero”, se colocaron

las muestras de Melatonina con su envase primario, en tres condiciones distintas de temperatura (a humedad relativa controlada). Dicho equipo se encuentra en un laboratorio farmacéutico, cualificado para su uso. Posterior a finalizar la primera medición, los datos obtenidos fueron analizados y tabulados.

2. Primera evaluación programada (pasados 30 días dentro de las cámaras). Se seleccionaron aleatoriamente 20 tabletas de cada una de las muestras adquiridas que se encontraban en las tres condiciones ambientales controladas. Se colocaron en recipientes identificados apropiados, luego se efectuó la preparación de muestra y posteriormente se efectuó por segunda vez el ensayo de cuantificación de Melatonina, por medio de metodología con HPLC. Finalizada la segunda medición, los datos obtenidos fueron analizados y tabulados nuevamente.

3. Segunda evaluación programada (60 días). Nuevamente, se seleccionaron al azar 20 tabletas de cada una de las muestras adquiridas que se encontraban en las tres condiciones ambientales predeterminadas. Luego las muestras fueron preparadas acorde al procedimiento estandarizado con HPLC, para que con ello fuera viable efectuar el ensayo de cuantificación de Melatonina por tercera vez. Se tabularon los datos de la tercera medición y se analizaron los resultados obtenidos.

4. Tercera evaluación programada (90 días). Las muestras restantes de adquiridas que se encontraban en los tres sitios de condiciones ambientales controladas se retiraron finalmente de las mismas. Luego se efectuó la preparación de muestra y posteriormente se efectuó por cuarta vez el ensayo de cuantificación de Melatonina, mediante la técnica analítica estandarizada. Se compararon los resultados y se hizo el análisis global de resultados.

Nota: Antes de retirar la muestra del ambiente en que se encontraba, debió llevarse el recipiente a temperatura ambiente, a fin de no alterar la composición interna de la mezcla que provee la atmósfera de humedad controlada.

H. Estandarización del método

Se estandarizó un método para cuantificar Melatonina en suplementos dietéticos usando para el efecto HPLC con un detector UV/Vis acoplado. Se efectuó una curva de Calibración con soluciones estándares de Melatonina en metanol: agua (50:50) con concentraciones que variaban de 0.10 µg/mL hasta 20.00 µg/mL como está recomendado

por la USP para el ensayo de un producto farmacéutico. Se utilizaron los siguientes reactivos: Materia prima grado estándar, metanol y agua. La fase móvil se componía de: acetonitrilo: buffer de fosfatos pH 4.5 (35:65). (7)

J. Procedimiento del ensayo de cuantificación del principio activo

Pesar individualmente 10 tabletas de cada una de las muestras, luego obtener el peso promedio por tableta. Posteriormente se pulverizaron con mortero y pistilo (los cuales deben ser limpiados previamente con acetona antes de cada prueba). Se pesa el equivalente a una tableta. Luego se disuelve el polvo de las tabletas con la adición de 100 mL de una solución de metanol grado HPLC: agua desmineralizada (50:50). Para ayudar a la disolución de las muestras se emplea un baño de ultrasonido por 25 minutos. Se miden 30 mL de la solución de tabletas y luego se centrifuga por 10 minutos a 3000 rpm. En un balón aforado de 10 mL se colocan 2mL del sobrenadante y se afora con una solución de metanol HPLC: agua HPLC (50:50). Esta solución es desgasificada y purificada con un filtro para soluciones orgánicas y sellada para su inyección manual en el equipo de HPLC.

K. Diseño de Investigación

Se inició el análisis en un “tiempo cero” en el cual se seleccionaron aleatoriamente 20 tabletas de cada una de las muestras adquiridas y se colocaron en contenedores identificados para evitar confusiones. Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de cuantificación de Melatonina. Esto se efectuó mediante un método analítico estandarizado previamente con el equipo de HPLC de la UVG. El mismo día en que se seleccionaron las tabletas del “tiempo cero”, se colocaron las muestras de Melatonina con su envase primario, en tres sitios distintos de condiciones ambientales predeterminadas, a saber: cuarto climatizado, una cámara de estabilidad y una incubadora (área de Microbiología). Se varió la temperatura en 5° C en cada uno de los equipos utilizados, no obstante la humedad relativa ambiental se encontraba controlada a 75% ± 5% HR.

Luego se efectuó de manera programada tres evaluaciones de las muestras que se hallan en los lugares con condiciones ambientales específicas, usando un procedimiento similar al llevado a cabo en el “tiempo cero”.

Los ensayos de cuantificación del principio activo se efectuaron en base lo indicado para productos farmacéuticos en la USP-29.

En el caso de cuantificación del principio activo se satisfacen los requerimientos si las muestras están dentro de los límites de concentración, los cuales se encuentran en un rango de 85-115%.

L. Análisis estadístico

1. Ensayo de cuantificación. Para llevar a cabo esta prueba se utilizó el número de tabletas sugeridas por la USP-29. Se utilizó estadística descriptiva para determinar la concentración de Melatonina en forma de porcentaje y se comparó con los rangos recomendados por la USP-29.

A continuación se mencionan las operaciones estadísticas efectuadas:

2. Media. Se calculó la media para la obtención de los promedios de todas las inyecciones que se llevarán a cabo, incluyéndose las de la curva de calibración con estándares. Se trabajó en duplicado.

3. Desviación Estándar, Desviación Estándar Relativa (DER) y Desviación Estándar Relativa porcentual (DER %). Fue necesario calcular la desviación estándar y la RSD de los tiempos de retención y de las áreas relativas de los cromatogramas al momento de evaluar la precisión del método. La desviación estándar porcentual se calculó para el análisis de variación de peso.

4. Ecuación de la recta por el método de mínimos cuadrados. Este cálculo se efectuó para la obtención de la ecuación de la recta de las concentraciones estándares para la curva de calibración. Así mismo se utilizó el método de mínimos cuadrados para determinar el orden de reacción de degradación para cada una de las seis muestras estudiadas.

XI. MARCO OPERATIVO

A. Recabación y tratamiento de los datos

Inicialmente se consiguieron las muestras comerciales de Melatonina. Posteriormente a las muestras se les efectuó un ensayo de cuantificación de Melatonina (“tiempo cero”) mediante la utilización de un método previamente estandarizado con el equipo HPLC del laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado de la UVG. Con esto, se pudo observar si los resultados de concentración estaban dentro de los límites predeterminados en la USP-29, y si lo que se indicaba en la etiqueta de las muestras concordaba con lo esperado.

El día en que se efectuó la primera valoración del principio activo, las tabletas fueron distribuidas y almacenadas en tres sitios con condiciones degradantes de humedad y temperatura controlada (un cuarto climatizado, una cámara de estabilidad y una incubadora).

Dicho equipo se encuentra ubicado en un laboratorio farmacéutico, y está debidamente cualificado para su uso. Luego, se llevaron a cabo valoraciones del principio activo de manera periódica (ver cuadro No. 6), usando el mismo procedimiento de la primera medición. Cada vez que se efectuaba la valoración de las muestras, se hizo en duplicado.

Inicialmente se evaluaron cuatro aspectos de calidad a las muestras (desintegración, friabilidad, variación de peso y dureza) para determinar si cumplían o no con los requerimientos para suplementos dietéticos.

Los resultados de concentración de principio activo fueron obtenidos mediante el software CHEMSTATION propio del aparato de HPLC, éstos fueron convertidos a sus porcentajes y con ello se evaluó si cumplen o no durante el tiempo que dura el estudio de estabilidad.

Luego se pudo observar si los factores de degradación aplicados en conjunto (temperatura y humedad), tenían un efecto degradante apropiado como para emplear el método de Arrhenius. También se pudo evaluar la calidad del empaque con el que cuentan las muestras. A continuación se muestra un ejemplo de cómo se tabularon los resultados:

Cuadro No. 7: Esquema resumido para tabular los datos a obtener en el estudio			
Muestra:	Concentración:		
Lote NO:	Límites según USP-29: 85-115% de lo indicado en la etiqueta		
Envase:	Fecha en que inicia el estudio:		
Días transcurridos en la cámara	Concentración en % de Melatonina en porcentaje en las 3 distintas condiciones de almacenamiento		
	<i>Incubadora: 35° C +/- 2° C & 75% ± 5% de HR</i>	<i>Cuarto Climatizado: 30 ± 2 °C & 75% ± 5% de HR. (condiciones de almacenamiento a largo plazo región IV)</i>	<i>Cámara de Estabilidad: 40° C ± 2° C y HR de 75% ± 5% (condiciones de almacenamiento acelerado región IV)</i>
0			
30			
60			
90			

Posteriormente se verifica si es viable aplicar el método de Arrhenius para predecir la fecha de vencimiento, pues es necesario que el nivel de degradación del principio activo se encuentre en un valor entre 50 ó 60 %. En los casos donde no se cumple esta ecuación es imposible efectuar una predicción, pues la constante de velocidad extrapolada a la temperatura de almacenamiento deseada para el fármaco, estaría bastante alejada de la realidad y la predicción diferiría mucho de la hallada en la vida de estante del medicamento. *Nótese que se tiene solamente una condición degradante variable (temperatura) y las demás fijas (iluminación, humedad, etc.) por tanto es viable aplicar la ecuación de Arrhenius.*

La secuencia de pasos a seguir para determinar el orden cinético de reacción y luego la fecha de caducidad de las muestras es la siguiente:

- Para una serie de pares de valores de concentración y tiempo se calcula el valor de K (constante de velocidad de reacción) con las fórmulas descritas a continuación:

Cuadro No. 8: Fórmulas y órdenes de reacción para constante de velocidad	
<i>Orden de reacción</i>	<i>Fórmula a emplear</i>
Cero (0)	$K = (C_0 - C)/t$
Primer (1)	$K = (\ln C_0/C)/t$
Segundo (2)	$K = (1/C - 1/C_0)/t$
Donde C_0 = concentración inicial, C = concentración final y t = tiempo	

El orden de reacción será aquel en el que el valor de K calculado para cada par sea aproximadamente el mismo. Las fórmulas expuestas en el cuadro No. 8 fueron obtenidas del *método gráfico de rapidez integrada*. Este indica que usando el cálculo integral las leyes de rapidez tienen una ecuación específica dependiendo del orden de la reacción para reacciones del tipo: (2)

- **Orden cero, $n = 0$** (separando variables e integrando)

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A]^0 = -k \quad \text{ecuación número 4}$$

$$d[A] = -kdt \quad \text{ecuación número 5}$$

$$\int_{[A]_0}^{[A]} d[A] = -k \int_0^t dt \quad \text{ecuación número 6}$$

$$[A] - [A]_0 = -kt \quad \text{ecuación número 7}$$

$$[A] = -kt + [A]_0 \quad \text{ecuación número 8}$$

- **Orden uno, $n = 1$** (usando el mismo método de separación de variables e integración) (5)

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A] \Rightarrow \ln[A] = -kt + \ln[A]_0 \quad \text{ecuación número 9}$$

- **Orden dos, $n = 2$**

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A]^2 \Rightarrow \frac{1}{[A]} = +kt + \frac{1}{[A]_0} \quad \text{ecuación número 10}$$

- Presuponiendo que la velocidad de reacción, es sólo función de la concentración de la droga degradable, el orden de reacción puede determinarse también mediante la representación gráfica de tres funciones de concentración de activo en función del tiempo. Las gráficas se generan con los datos de concentración y tiempo para las temperaturas de 30, 35 y 40° C. En el eje “x” se coloca el tiempo

y en el eje “y” a los valores de concentración (C). Se efectúa un ajuste por mínimos cuadrados con el objeto de obtener K a las distintas temperaturas trabajadas para órdenes de reacción: a) cero (lineal, si se representa C vs. tiempo), b) primer orden (semilogarítmica, log C ó ln C vs. tiempo) y c) segundo orden (potencial, 1/C vs. tiempo). La función que de la curva más lineal, es decir la que más se aproxime a una recta (según el coeficiente de correlación r^2), decidirá el orden de reacción. Nótese que se obtiene un valor de K (pendiente) para cada temperatura trabajada, acorde al orden de reacción conveniente. (5)

- Posteriormente es necesario graficar los datos de log K (de las K's obtenidas en cada temperatura) vs. el inverso de la temperatura absoluta. Con dicha gráfica se calcula una ecuación de la recta (regresión lineal) y se relaciona la expresión con la ecuación de Arrhenius:

$$\text{Log } K = - (E_a/2.303 * RT) + \text{Log } A \quad \text{ecuación número 11}$$

Donde K = constante de velocidad de reacción

R = 1.987 calorías/mol · °K (constante de los gases)

T = temperatura absoluta

A = factor de frecuencia

E_a = energía de activación

- De la ecuación anterior es posible obtener la energía de activación, despejando el valor que se obtenga de pendiente con la curva de mínimos cuadrados.
- Con el valor de energía de activación recién encontrado es viable finalmente calcular el valor de K a 25° C (298.15° K) usando nuevamente la ecuación # 11, para poder luego calcular el tiempo en el que el activo se degrada en un 90%, acorde al orden de reacción. Se toma como referencia ese tiempo ya que es el correspondiente para la fecha de expiración, para la mayoría de principios activos. Las ecuaciones a emplear se muestran en el siguiente cuadro: (10)

Cuadro No. 9: Fórmulas y órdenes de reacción para tiempo de 90% de degradación de principio activo	
<i>Orden de reacción</i>	<i>Fórmula a emplear</i>
Cero (0)	$t_{90\%} = 0.10C_0/K_{25^\circ}$
Primer (1)	$t_{90\%} = 0.105360/ K_{25^\circ}$
Segundo (2)	$t_{90\%} = 0.111111/ K_{25^\circ}C_0$
Donde C ₀ = concentración inicial, K _{25°} = constante de velocidad a 25° C	

B. Recursos Humanos

- Autor: Leonel de Gandarias Alfaro.
- Asesor: Lic. Élfego Rolando López.
- Coasesoras: Licda. Ana Luisa Mendizábal y Licda. Leticia Vargas de Ponce.

C. Recursos materiales

1. Equipo proveniente del laboratorio farmacéutico

- Cuarto climatizado con las siguientes ambientales controladas: temperatura de 30° C \pm 2° C y humedad relativa (HR) de 75% \pm 5%.
- Cámara de estabilidad con las siguientes condiciones ambientales controladas: temperatura de 40° C \pm 2° C y HR de 75% \pm 5%.
- Incubadora del área de Microbiología con la siguiente condición ambiental controlada: temperatura de 35° C \pm 2° C y HR de 75% \pm 5%.
- Tornillo de Vernier para ensayos organolépticos.
- Durómetro Erweka modelo TBK 30.
- Desintegrador Erweka modelo ZT41.
- Cronómetro marca Fisherbrand con precisión de 0.5 segundos.
- Friabilizador marca Erweka.
- Balanza analítica Mettler modelo AG204, rango 0-210 g con precisión de 0.1 miligramos.

2. Equipo proveniente de la Universidad del Valle de Guatemala

- Cromatógrafo para HPLC Hewlett-Packard 1100 con detector UV/Visible, bomba cuaternaria y software Chemstation.
- Impresora del Laboratorio de Instrumental Avanzado de la UVG.
- Balanza analítica.
- Baño de ultrasonido.
- Equipo para filtrar fase móvil y muestras analíticas.
- Potenciómetro.
- Centrifugadora y tubos de centrífuga.
- Campana de extracción.
- Guantes de látex.

3. Materiales y cristalería de laboratorio (proveniente de la UVG)

- Beakers, erlenmeyers.
- Balones aforados de 10mL y 100mL.
- Pipetas, pisetas.
- Jeringas para llenar viales de HPLC.
- Espátulas y varillas de vidrio.
- Viales para HPLC.
- Filtros para HPLC, 0.45 μm x 47 mm y de 0.5 μm x 13 mm (muestras en medio orgánico).

4. Reactivos químicos

- Fase móvil: acetonitrilo grado reactivo: buffer de fosfatos pH 4.5 (35:65).
- Metanol grado HPLC, agua grado HPLC y agua desmineralizada.
- Acetona, grado industrial.
- Estándar de Melatonina.

5. Especificaciones del equipo de HPLC que se encuentra en el Laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado de la Universidad del Valle de Guatemala

- Marca: Hewlett Packard.
- Modelo: HP 1100 Series bomba cuaternaria.
- Rango de flujo: 0.2 a 10.0 mL/min.
- Rango de flujo estable: 0.001 a 10 mL/min.
- Precisión de flujo: 0.3% basado en un tiempo de retención en 1 mL/min.
- Aplicación de presión: amplitud de 2 %.
- Compresibilidad: se selecciona basada en la compresibilidad de la fase móvil.
- Columna marca HP 005, modelo Hypersil 5 μm ; 200 * 2.1 mm.
- Rango de pH recomendado: 1.5 a 12.5.
- Salida analógica: para monitorear presión 2 mV/bar.
- Tipo de detector: fotómetro de doble haz.
- Fuente: lámpara de deuterio.
- Rango de longitud de onda: 190 a 600 nm.
- Linealidad \approx 2 AU.

VI. RESULTADOS

A. Ensayos físicos iniciales (“tiempo cero”)

Cuadro No. 10: Ensayo de desintegración	
Muestra y concentración expuesta en la etiqueta	Minutos de desintegración (+/- 0.002 minutos)
A (3 mg)	5.43 minutos
B (200 mcg)	0.93 minutos
C (1 mg)	2.13 minutos
D (3 mg)	4.05 minutos
E (1 mg)	10.70 minutos
F (5 mg)	13.08 minutos
Especificación	Todas las tabletas deben desintegrarse en un tiempo menor o igual a 30 minutos. Si una ó dos tabletas fallan en desintegrarse, repetir la prueba con otras 12 tabletas adicionales; no menos de 16 de 18 tabletas deben desintegrarse completamente
Conclusión:	Todas las muestras comerciales presentaron tiempos de desintegración menores al límite establecido por lo tanto cumplen con este ensayo.
<i>Descripción del equipo empleado: Desintegrador Erweka modelo ZT41 y cronómetro marca Fisherbrand con precisión de 0.5 segundos</i>	

Cuadro No. 11: Ensayo de friabilidad			
Muestra y concentración expuesta en la etiqueta	peso inicial (+/- 0.0001g)	peso final (+/- 0.0001g)	Variación de peso (%)
A (3 mg)	6.5589	6.5464	0.1906
B (200 mcg)	6.6762	6.6353	0.6126
C (1 mg)	6.5095	6.4973	0.1874
D (3 mg)	6.596	6.5955	0.0076
E (1 mg)	6.6297	6.6185	0.1689
F (5 mg)	6.6694	6.6628	0.0989
Especificación:	La variación de peso debe ser menor a 1%		
Conclusión:	Todas las muestras comerciales presentaron friabilidades menores al límite establecido por lo tanto cumplen con el ensayo.		
<i>Descripción del equipo empleado: friabilizador marca Erweka y balanza analítica Mettler modelo AG204, rango 0-210 g con precisión de 0.1 miligramos</i>			

Cuadro No. 12: Ensayo de dureza						
Tableta	Muestra A (3 mg)	Muestra B (200 mcg)	Muestra C (1 mg)	Muestra D (3 mg)	Muestra E (1 mg)	Muestra F (5 mg)
1	5.91	5.40	4.28	6.42	6.32	7.65
2	5.40	6.42	4.38	7.44	8.06	7.14
3	9.38	6.12	4.49	5.61	7.85	8.16
4	6.12	5.20	4.59	6.83	5.61	6.53
5	6.63	6.93	4.69	7.04	6.83	7.95
6	9.59	5.81	4.49	7.04	9.18	7.55
7	6.32	6.02	4.18	6.93	9.48	6.93
8	5.81	6.32	4.89	7.85	6.53	7.65
9	9.59	7.24	5.40	6.42	7.55	9.18
10	5.71	6.42	4.89	7.44	9.28	7.04
Media	7.05	6.19	4.63	6.90	7.67	7.58
DE	1.74	0.63	0.36	0.64	1.35	0.75
DER %	24.67	10.16	7.78	9.24	17.62	9.89
Especificación:	Dureza entre 4.08-10.1976 kg fuerza y 10 % DER					
Conclusión:	Se aprecia que solamente las muestras C y D cumplen con las especificaciones para el ensayo de dureza					
<i>Descripción del equipo empleado: durómetro Erweka modelo TBK 30</i>						

Cuadro No. 13: Ensayo organoléptico de las marcas comerciales de Melatonina en el “tiempo cero”		
Muestra	Características de las tabletas	Características de los empaques primarios
A (3 mg)	Inodoras, blancas, biplanas. Dimensiones: altura 4.47mm y diámetro 8.02 mm	Recipiente plástico opaco Color: cobre
B (0.2 mg)	Inodoras, blancas, biplanas. Dimensiones: altura 5.00mm y diámetro 8.07 mm	Recipiente plástico translúcido Color: ámbar
C (1 mg)	Inodoras, biplanas, celestes, ranuradas de un lado. Dimensiones: altura 3.59mm y diámetro 8.28 mm	Recipiente plástico opaco Color: blanco
D (3 mg)	Inodoras, biplanas blancas, ranuradas de un lado. Dimensiones: altura 3.64 mm y diámetro 8.31 mm	Recipiente plástico opaco Color: blanco
E (1 mg)	Inodoras, biplanas, verdes, ranuradas de un lado. Dimensiones: diámetro 8.82 mm y altura 3.36 mm	Blister de PVC/aluminio Color: ámbar
F (5 mg)	Inodoras, biplanas, blancas, ranuradas de un lado. Dimensiones: diámetro 8.83 mm y altura 3.30 mm	Blister de PVC/aluminio Color: ámbar

Cuadro No. 14: Ensayo de variación de peso (muestras A – C)						
	Muestra A (3 mg)		Muestra B (0.2 mg)		Muestra C (1 mg)	
Tableta	peso mg (+/- 0.1mg)	DSR %	peso mg (+/- 0.1mg)	DSR %	peso mg (+/- 0.1mg)	DSR %
1	296.8	0.3592	347.4	1.1130	172.5	0.7005
2	297.0	0.2921	353.1	0.5095	173.1	1.0508
3	298.4	0.1779	351.3	0.0028	172.8	0.8757
4	298.1	0.0772	352.7	0.3957	172.8	0.8757
5	299.0	0.3794	346.6	1.3407	171.0	0.1751
6	297.9	0.0101	354.8	0.9934	171.8	0.2919
7	298.3	0.1444	345.8	1.5684	168.0	1.9264
8	298.7	0.2786	347.8	0.9991	169.4	1.1092
9	299.0	0.3794	355.2	1.1073	172.3	0.5838
10	297.5	0.1242	356.0	1.3350	167.7	2.1016
11	298.0	0.0436	350.6	0.2021	170.2	0.6421
12	296.1	0.5942	351.0	0.0882	176.4	2.9772
13	297.9	0.0101	367.1	4.4946	171.6	0.1751
14	297.7	0.0571	351.3	0.0028	171.3	0.0000
15	297.0	0.2921	347.2	1.1699	173.1	1.0508
16	297.2	0.2249	347.9	0.9707	171.9	0.3503
17	297.8	0.0235	347.2	1.1699	170.8	0.2919
18	298.4	0.1779	354.6	0.9365	169.0	1.3427
19	298.2	0.1108	349.4	0.5437	169.8	0.8757
20	298.4	0.1779	349.2	0.6006	170.5	0.4670
Promedio (+/- 0.1 mg)	297.87		351.31		171.3	
Desviación Estándar	0.7561		4.8605		2.0173	
Desviación Estándar Relativa porcentual DER (%)	0.2538		1.3835		1.1776	
Lote	0218AF1090		6573207		J0966-A	
Fecha expiración	enero del 2008		septiembre del 2007		agosto del 2006	
Registrado como	PFD		PFD		PF	
Especificación	Ver página 41.					
Conclusión	Acorde a lo dicho en la página 41, puede decirse que las marcas comerciales A - C cumplen con el ensayo de variación de peso por poseer variaciones estándar relativas porcentuales menores a los límites permitidos respectivos.					

Cuadro No. 15: Ensayo de variación de peso (muestras D – F)						
Tableta	Muestra D (3 mg)		Muestra E (1 mg)		Muestra F (5 mg)	
	peso mg (+/- 0.1mg)	DSR %	peso mg (+/- 0.1mg)	DSR %	peso mg (+/- 0.1mg)	DSR %
1	178.6	2.4905	204.6	0.0175	201.9	0.2101
2	173.5	0.4361	198.4	0.0133	203.6	0.6302
3	173.6	0.3787	200.3	0.0039	199.1	1.5940
4	173.5	0.4361	198.4	0.0133	204.2	0.9267
5	174.5	0.1377	199.9	0.0059	200.5	0.9020
6	173.0	0.7231	198.6	0.0123	203.9	0.7785
7	174.2	0.0344	198.2	0.0143	205.8	1.7175
8	172.8	0.8378	199.0	0.0103	197.1	2.5825
9	175.1	0.4820	197.8	0.0163	200.3	1.0009
10	173.8	0.2640	201.0	0.0004	200.2	1.0503
11	174.8	0.3099	207.8	0.0334	205.2	1.4210
12	172.8	0.8378	199.6	0.0074	205.3	1.4704
13	174.2	0.0344	208.9	0.0389	202.1	0.1112
14	174.0	0.1492	200.9	0.0009	201.0	0.6549
15	173.0	0.7231	197.6	0.0173	202.5	0.0865
16	176.7	1.4002	205.8	0.0235	202.5	0.0865
17	173.8	0.2640	200.7	0.0019	201.4	0.4572
18	176.0	0.9985	205.4	0.0215	201.4	0.4572
19	173.7	0.3214	201.2	0.0006	204.2	0.9267
20	173.6	0.3787	197.5	0.0178	204.3	0.9762
Promedio (+/- 0.1 mg)	174.26		201.08		202.33	
Desviación Estándar	1.4354		3.5008		2.2669	
Desviación Estándar Relativa porcentual DER (%)	0.8237		1.7410		1.1204	
Lote	B0294		17115		12095	
Fecha expiración	febrero del 2007		noviembre del 2008		octubre del 2008	
Registrado como	PF		PF		PF	
Especificación	Ver página 41.					
Conclusión	Acorde a lo dicho en la página 41, puede decirse que las marcas comerciales D - F cumplen con el ensayo de variación de peso por poseer variaciones estándar relativas porcentuales menores a los límites permitidos respectivos.					

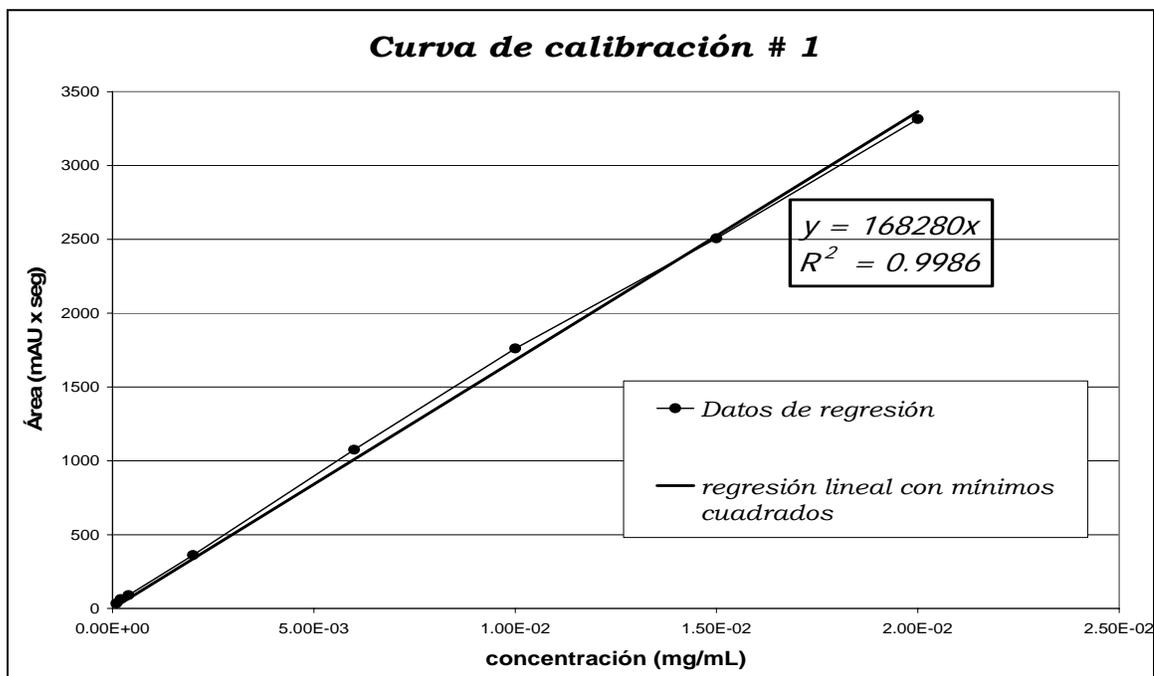
B. Ensayos químicos del “tiempo cero”

1. **Curva de calibración # 1.** Inicialmente se inyectaron 8 estándares de concentración conocida de Melatonina, que van de 0.0001 mg/mL a 0.02 mg/mL (mezcla de MeOH:H₂O en igual proporción, grado HPLC) con el fin de obtener una curva de calibración. Los resultados se muestran a continuación:

Cuadro No. 16: Curva de calibración # 1 válida para “tiempo cero y treinta días”				
Tiempo de retención (t_R) promedio	Número	mg de Melatonina equivalentes	Cantidad (mg/mL)	Área (mAU * seg)
2.342	1	0.05	1.0000 x 10 ⁻⁰⁴	34.10017
	2	0.1	2.0000 x 10 ⁻⁰⁴	63.70043
	3	0.2	4.0000 x 10 ⁻⁰⁴	91.06963
	4	1.0	2.0000 x 10 ⁻⁰³	361.31772
	5	3.0	6.0000 x 10 ⁻⁰³	1075.86584
	6	5.0	1.0000 x 10 ⁻⁰²	1761.75159
	7	7.5	1.5000 x 10 ⁻⁰²	2507.29517
	8	10.0	2.0000 x 10 ⁻⁰²	3315.59106

A continuación se muestra el gráfico obtenido a partir de los datos anteriores:

Gráfico No. 2: Curva de calibración # 1 obtenida con estándares de Melatonina



* Nótese que en este caso se trazo la curva de calibración intersectandola con el cero (0) para que fuera viable calcular el LOD y LOQ.

2. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). En el “tiempo cero” se efectuó la inyección de 30 blancos, los cuales se componían de metanol HPLC: agua HPLC (50:50). Esto se realiza para poder calcular el LOD y el LOQ a partir de la mínima señal distinguible (S_m).

Cuadro No. 17: Determinación de S_m, LOD y LOQ			
No. de Blanco	Tiempo de retención	Área (mAU x seg)	Concentración de Melatonina (mg/mL)
1	2.277	17.97396	1.06810×10^{-04}
2	2.279	16.31295	9.69396×10^{-05}
3	2.282	15.69051	9.32408×10^{-05}
4	2.297	18.78773	1.11646×10^{-04}
5	2.284	20.10074	1.19449×10^{-04}
6	2.284	17.60399	1.04612×10^{-04}
7	2.285	18.30383	1.08770×10^{-04}
8	2.28	20.16389	1.19824×10^{-04}
9	2.279	17.67072	1.05008×10^{-04}
10	2.259	14.56053	8.65259×10^{-05}
11	2.276	18.27939	1.08625×10^{-04}
12	2.273	18.96004	1.12670×10^{-04}
13	2.286	18.44635	1.09617×10^{-04}
14	2.281	19.76374	1.17446×10^{-04}
15	2.27	19.45203	1.15594×10^{-04}
16	2.264	18.62297	1.10667×10^{-04}
17	2.267	16.48263	9.79479×10^{-04}
18	2.284	20.93372	1.24398×10^{-04}
19	2.271	18.21374	1.08235×10^{-04}
20	2.266	19.98128	1.18739×10^{-04}
21	2.271	18.43231	1.09534×10^{-04}
22	2.262	18.2415	1.08400×10^{-04}
23	2.26	19.62856	1.16643×10^{-04}
24	2.267	18.96314	1.12688×10^{-04}
25	2.261	19.91807	1.18363×10^{-04}
26	2.262	19.85688	1.17999×10^{-04}
27	2.269	19.09401	1.13466×10^{-04}
28	2.279	18.35514	1.09075×10^{-04}
29	2.258	19.6216	1.16601×10^{-04}
30	2.257	18.66572	1.10921×10^{-04}
Media	2.273	18.569389	1.10348×10^{-04}
Desviación Estándar (RSD%)	0.01025	1.40679	8.359814×10^{-06}
Mínima señal analítica distinguible (S_m) $S_m = S_{bl} + k S_{bl}$ Donde S_{bl} = Señal promedio del blanco; $k = 3$ & S_{bl} = desviación estándar del blanco			1.35428×10^{-04} mg/mL
Límite de detección LOD = $(S_m - S_{bl})/m$ donde m = pendiente de la regresión lineal de la curva de calibración No. 1			1.490344×10^{-10} mg/mL
Límite de cuantificación LOQ = $10 S_{bl}$			8.35981×10^{-05} mg/mL

3. Precisión y factor de coleo. Seguidamente se tuvieron que realizar 5 inyecciones de un estándar de Melatonina de concentración de 0.01 mg/mL, disuelto en metanol HPLC: agua HPLC (50:50), para evaluar 2 parámetros que aseguran la validación del método a saber, precisión y factor de coleo. Los resultados se muestran a continuación:

Cuadro No. 18: Precisión y factor de coleo en el “tiempo cero”			
Número	Tiempo de retención (minutos)	Área (mAU * s)	Factor de coleo (95%)
1	2.277	1770.56775	1.169
2	2.275	1799.14038	1.159
3	2.278	1763.11816	1.166
4	2.277	1769.11633	1.160
5	2.275	1750.65637	1.159
Promedio	<i>2.276</i>	<i>1770.51979</i>	<i>1.163</i>
Desviación Estándar	<i>0.001</i>	<i>17.821684</i>	<i>0.005</i>
RSD %	<i>0.059</i>	<i>1.00658</i>	<i>0.397</i>
Especificación	La RSD % del área no debe ser mayor de 2.0% y el factor de coleo no mayor que 2.5		
Conclusión	Los parámetros de factor de coleo y precisión cumplen con las especificaciones en las condiciones iniciales “tiempo cero”.		

4. Muestras del “tiempo cero”

Cuadro No. 19: Resultados de las seis marcas comerciales del tiempo cero (en duplicado)							
Muestra	t_R	Área mAU*s	Concentración (mg/mL) *	Concentración (mg)	% De lo etiquetado	Promedio del %	Cumple (85-115%)
A.1 (3mg)	2.349	1024.13879	6.08594×10^{-3}	3.04297	101.43231	101.08918	Sí
A.2 (3mg)	2.343	1017.20984	6.04476×10^{-3}	3.02238	100.74605		
B.1 (0.2mg)	2.348	82.15589	4.88211×10^{-4}	0.24411	122.05271	134.95974	No
B.2 (0.2mg)	2.351	99.53179	5.91467×10^{-4}	0.29573	147.86676		
C.1 (1mg)	2.350	349.79617	2.07866×10^{-3}	1.03933	103.93308	103.48557	Sí
C.2 (1mg)	2.350	346.78391	2.06076×10^{-3}	1.03038	103.03806		
D.1 (3mg)	2.349	1076.68201	6.39818×10^{-3}	3.19909	106.63627	105.45910	Sí
D.2 (3mg)	2.344	1052.91077	6.25691×10^{-3}	3.12846	104.28193		
E.1 (1mg)	2.348	378.10175	2.24687×10^{-3}	1.12343	112.34336	112.36426	Sí
E.2 (1mg)	2.349	378.24243	2.24770×10^{-3}	1.12385	112.38516		
F.1 (5mg)	2.352	1788.97046	1.06309×10^{-2}	5.31547	106.30946	110.10584	Sí
F.2 (5mg)	2.356	1916.74109	1.13902×10^{-2}	5.69511	113.90222		

* *Obtenida con curva de calibración No. 1*

C. Primera evaluación programada (30 días)

A continuación se muestran los resultados obtenidos a los 30 días que las muestras de Melatonina han permanecido a 3 temperaturas diferentes con humedad relativa (H.R.) controlada de $75\% \pm 5\%$.

Cuadro No. 20: Resultados de las seis marcas comerciales a los treinta días (Temperatura de 30°C & 75% H.R.)							
Muestra	t _R	Área mAU*s	Concentración (mg/mL) *	Concentra- ción (mg)	% De lo etiquetado	Promedio del %	Cumple (85- 115%)
A.1 (3mg)	2.358	990.88959	5.88836×10^{-3}	2.94418	98.13925	98.65357	Sí
A.2 (3mg)	2.355	1001.27557	5.95007×10^{-3}	2.97504	99.16790		
B.1 (0.2mg)	2.352	71.66534	4.25871×10^{-4}	0.21294	106.46771	108.06346	Sí
B.2 (0.2mg)	2.351	73.8136	4.38637×10^{-4}	0.21932	109.65921		
C.1 (1mg)	2.354	338.67209	2.01256×10^{-3}	1.00628	100.62784	103.86429	Sí
C.2 (1mg)	2.358	360.45721	2.14201×10^{-3}	1.07101	107.10074		
D.1 (3mg)	2.357	1087.57458	6.46291×10^{-3}	3.23145	107.71508	106.53710	Sí
D.2 (3mg)	2.356	1063.78699	6.32155×10^{-3}	3.16077	105.35912		
E.1 (1mg)	2.357	394.56793	2.34472×10^{-3}	1.17236	117.23587	114.92803	Sí
E.2 (1mg)	2.354	379.03342	2.25240×10^{-3}	1.12620	112.62019		
F.1 (5mg)	2.352	2117.86865	1.25854×10^{-2}	6.29271	125.85421	118.63741	No
F.2 (5mg)	2.355	1874.98059	1.11421×10^{-2}	5.57103	111.42060		

* Obtenida con curva de calibración No. 1

Cuadro No. 21: Resultados de las seis marcas comerciales a los treinta días (Temperatura de 35°C & 75% H.R.)							
Muestra	t _R	Área mAU*s	Concentración (mg/mL) *	Concentra- ción (mg)	% De lo etiquetado	Promedio del %	Cumple (85- 115%)
A.1 (3mg)	2.346	1052.47327	6.25432×10^{-3}	3.12716	104.23860	115.75303	No
A.2 (3mg)	2.358	1284.99048	7.63605×10^{-3}	3.81802	127.26746		
B.1 (0.2mg)	2.357	88.84126	5.27939×10^{-4}	0.26397	131.98466	134.13530	No
B.2 (0.2mg)	2.362	91.73653	5.45144×10^{-4}	0.27257	136.28594		
C.1 (1mg)	2.362	341.02557	2.02654×10^{-3}	1.01327	101.32712	106.82944	Sí
C.2 (1mg)	2.345	378.06274	2.24664×10^{-3}	1.12332	112.33177		
D.1 (3mg)	2.374	1087.33313	6.46147×10^{-3}	3.23074	107.69117	108.48862	Sí
D.2 (3mg)	2.372	1103.43640	6.55716×10^{-3}	3.27858	109.28606		
E.1 (1mg)	2.374	386.47568	2.29663×10^{-3}	1.14831	114.83146	112.77926	Sí
E.2 (1mg)	2.369	372.66193	2.21454×10^{-3}	1.10727	110.72706		
F.1 (5mg)	2.371	1866.61963	1.10924×10^{-2}	5.54619	110.92375	111.94265	Sí
F.2 (5mg)	2.374	1900.91150	1.12962×10^{-2}	5.64808	112.96155		

* Obtenida con curva de calibración No. 1

Cuadro No. 22: Resultados de las seis marcas comerciales a los treinta días (Temperatura de 40°C & 75% H.R.)							
Muestra	t _R	Área mAU*s	Concentración (mg/mL) *	Concentración (mg)	% De lo etiquetado	Promedio del %	Cumple (85-115%)
A.1 (3mg)	2.365	771.85937	4.58677 x 10 ⁻³	2.29338	76.44616	88.98792	Sí
A.2 (3mg)	2.368	1025.12207	6.09178 x 10 ⁻³	3.04589	101.52969		
B.1 (0.2mg)	2.362	75.5347	4.48864 x 10 ⁻⁴	0.22443	112.21612	111.29217	Sí
B.2 (0.2mg)	2.365	74.29085	4.41473 x 10 ⁻⁴	0.22074	110.36823		
C.1 (1mg)	2.358	358.47772	2.13025 x 10 ⁻³	1.06513	106.51258	107.89058	Sí
C.2 (1mg)	2.36	367.7533	2.18537 x 10 ⁻³	1.09269	109.26858		
D.1 (3mg)	2.357	1065.04211	6.32901 x 10 ⁻³	3.16450	105.48343	104.60191	Sí
D.2 (3mg)	2.356	1047.24109	6.22322 x 10 ⁻³	3.11161	103.72039		
E.1 (1mg)	2.357	382.48145	2.27289 x 10 ⁻³	1.13645	113.64468	111.89641	Sí
E.2 (1mg)	2.356	370.7135	2.20296 x 10 ⁻³	1.10148	110.14813		
F.1 (5mg)	2.358	1858.3269	1.10431 x 10 ⁻²	5.52155	110.43096	109.92709	Sí
F.2 (5mg)	2.354	1841.36865	1.09423 x 10 ⁻²	5.47116	109.42322		

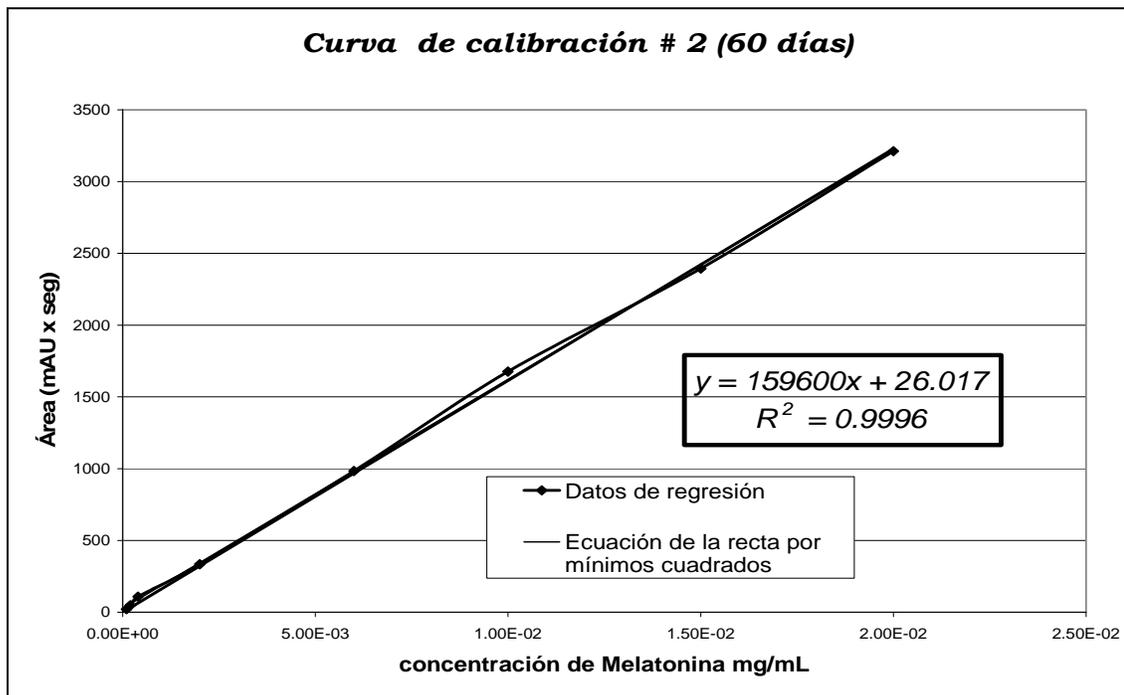
* Obtenida con curva de calibración No. 1

D. Segunda evaluación programada (60 días)

1. **Curva de calibración # 2.** A los dos meses de iniciado este estudio de estabilidad se decidió efectuar nuevamente una curva de calibración, inyectando 8 estándares de concentración conocida de Melatonina, que van de 0.0001 mg/mL a 0.02 mg/mL (mezcla de MeOH:H₂O en igual proporción, grado HPLC). Los resultados se muestran a continuación:

Cuadro No. 23: Curva de calibración # 2 válida para "Evaluación a los sesenta días de iniciado el estudio"				
Tiempo de retención promedio (t _R)	No.	mg de Melatonina equivalentes	Cantidad (mg/mL)	Área (mAU * seg)
2.431	1	0.05	1.0000 x 10 ⁻⁰⁴	21.52904
	2	0.1	2.0000 x 10 ⁻⁰⁴	49.08514
	3	0.2	4.0000 x 10 ⁻⁰⁴	108.32859
	4	1	2.0000 x 10 ⁻⁰³	334.17166
	5	3	6.0000 x 10 ⁻⁰³	983.97388
	6	5	1.0000 x 10 ⁻⁰²	1676.40405
	7	7.5	1.5000 x 10 ⁻⁰²	2394.01221
	8	10	2.0000 x 10 ⁻⁰²	3211.12915

A continuación se muestra el gráfico obtenido a partir de los datos anteriores:
Gráfico No. 3: Curva de calibración # 2 obtenida con estándares de Melatonina



Seguidamente se muestran los resultados obtenidos a los 60 días que las muestras de Melatonina han permanecido a tres temperaturas diferentes con H.R. controlada de $75\% \pm 5\%$.

Cuadro No. 24: Resultados de las seis marcas comerciales a los sesenta días (Temperatura de 30°C & 75% H.R.)							
Muestra	t_R	Área mAU*s	Concentración (mg/mL) *	Concentración (mg)	% De lo etiquetado	Promedio del %	Cumple (85-115%)
A.1 (3mg)	2.427	896.44043	5.45379×10^{-3}	2.72690	90.89650	93.01025	Sí
A.2 (3mg)	2.433	936.92157	5.70744×10^{-3}	2.85372	95.12400		
B.1 (0.2mg)	2.427	74.17007	3.01710×10^{-4}	0.15085	75.42750	76.12363	No
B.2 (0.2mg)	2.427	75.05889	3.07279×10^{-4}	0.15364	76.81975		
C.1 (1mg)	2.370	209.23434	1.14798×10^{-3}	0.57399	57.39900	73.37475	No
C.2 (1mg)	2.429	311.22360	1.78701×10^{-3}	0.89351	89.35050		
D.1 (3mg)	2.427	973.30188	5.93538×10^{-3}	2.96769	98.92300	101.68692	Sí
D.2 (3mg)	2.429	1026.23547	6.26705×10^{-3}	3.13353	104.45083		
E.1 (1mg)	2.423	342.94867	1.98579×10^{-3}	0.99289	99.28950	98.59400	Sí
E.2 (1mg)	2.426	338.50919	1.95797×10^{-3}	0.97899	97.89850		
F.1 (5mg)	2.430	1754.39807	1.08295×10^{-2}	5.41475	108.29500	103.63140	Sí
F.2 (5mg)	2.421	1605.53918	9.89678×10^{-3}	4.94839	98.96780		

* Obtenida con curva de calibración No. 2

Cuadro No. 25: Resultados de las seis marcas comerciales a los sesenta días (Temperatura de 35°C & 75% H.R.)							
Muestra	t _R	Área mAU*s	Concentración (mg/mL) *	Concentra- ción (mg)	% De lo etiquetado	Promedio del %	Cumple (85- 115%)
A.1 (3mg)	2.430	999.60248	6.10018 x 10 ⁻³	3.05009	101.66967	108.38108	Sí
A.2 (3mg)	2.431	1128.14014	6.90555 x 10 ⁻³	3.45278	115.09250		
B.1 (0.2mg)	2.299	60.09992	2.13551 x 10 ⁻⁴	0.10678	53.38775	67.33500	No
B.2 (0.2mg)	2.302	77.90764	3.25129 x 10 ⁻⁴	0.16257	81.28225		
C.1 (1mg)	2.297	314.36597	1.80670 x 10 ⁻³	0.90335	90.33500	83.25125	No
C.2 (1mg)	2.292	269.14383	1.52335 x 10 ⁻³	0.76168	76.16750		
D.1 (3mg)	2.306	939.83466	5.72569 x 10 ⁻³	2.86285	95.42817	96.39575	Sí
D.2 (3mg)	2.303	958.36560	5.84180 x 10 ⁻³	2.92090	97.36333		
E.1 (1mg)	2.305	390.38824	2.28303 x 10 ⁻³	1.14152	114.15150	109.09625	Sí
E.2 (1mg)	2.304	358.11548	2.08082 x 10 ⁻³	1.04041	104.04100		
F.1 (5mg)	2.305	1767.64429	1.09125 x 10 ⁻²	5.45625	109.12500	108.34500	Sí
F.2 (5mg)	2.300	1742.74377	1.07565 x 10 ⁻²	5.37825	107.56500		

* Obtenida con curva de calibración No. 2

Cuadro No. 26: Resultados de las seis marcas comerciales a los sesenta días (Temperatura de 40°C & 75% H.R.)							
Muestra	t _R	Área mAU*s	Concentración (mg/mL) *	Concentra- ción (mg)	% De lo etiquetado	Promedio del %	Cumple (85- 115%)
A.1 (3mg)	2.300	902.68256	5.49291 x 10 ⁻³	2.74646	91.54850	89.70608	Sí
A.2 (3mg)	2.298	867.39783	5.27182 x 10 ⁻³	2.63591	87.86367		
B.1 (0.2mg)	2.302	70.83667	2.80824 x 10 ⁻⁴	0.14041	70.20600	68.50825	No
B.2 (0.2mg)	2.296	68.66892	2.67242 x 10 ⁻⁴	0.13362	66.81050		
C.1 (1mg)	2.299	326.12646	1.88039 x 10 ⁻³	0.94019	94.01950	91.32875	Sí
C.2 (1mg)	2.3	308.94891	1.77276 x 10 ⁻³	0.88638	88.63800		
D.1 (3mg)	2.303	986.6579	6.01907 x 10 ⁻³	3.00954	100.31783	101.53517	Sí
D.2 (3mg)	2.298	1009.97278	6.16515 x 10 ⁻³	3.08258	102.75250		
E.1 (1mg)	2.301	338.39575	1.95726 x 10 ⁻³	0.97863	97.86300	98.81600	Sí
E.2 (1mg)	2.302	344.47952	1.99538 x 10 ⁻³	0.99769	99.76900		
F.1 (5mg)	2.301	1653.3053	1.01961 x 10 ⁻²	5.09805	101.96100	103.58400	Sí
F.2 (5mg)	2.301	1705.1145	1.05207 x 10 ⁻²	5.26035	105.20700		

* Obtenida con curva de calibración No. 2

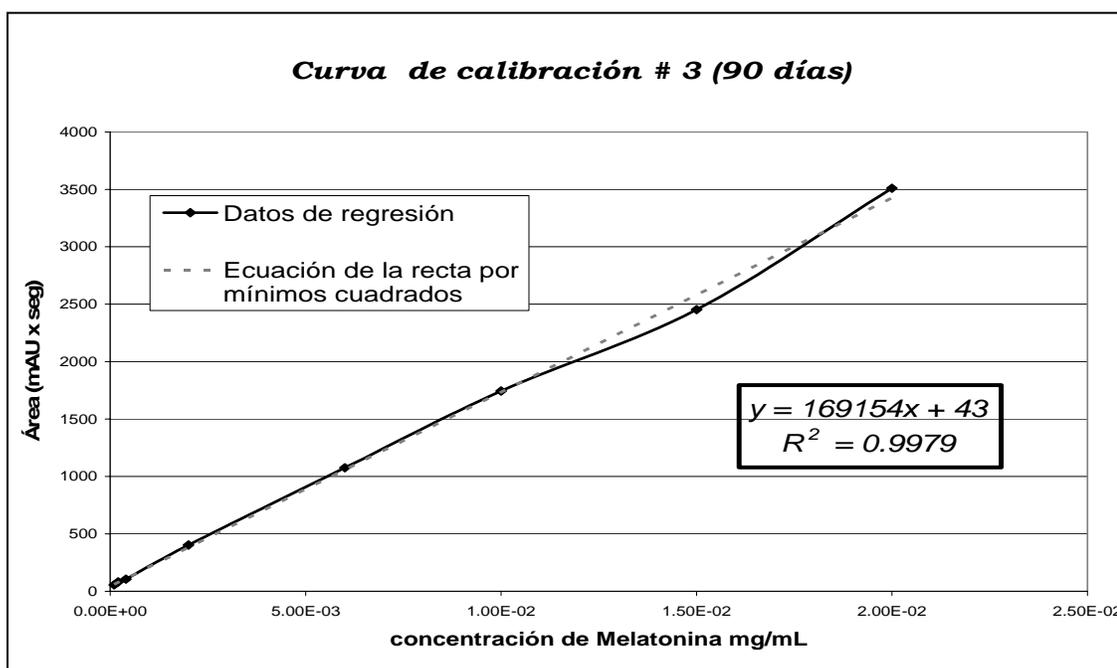
E. Tercera evaluación programada (90 días)

1. Curva de calibración # 3. A los tres meses de iniciado este estudio de estabilidad se decidió efectuar nuevamente una curva de calibración, inyectando 8 estándares de concentración conocida de Melatonina, en concentraciones que van desde 0.0001 mg/mL hasta 0.02 mg/mL (solvente: mezcla de MeOH:H₂O en igual proporción, grado HPLC). Los resultados se muestran a continuación:

Cuadro No. 27: Curva de calibración # 3 válida para “Evaluación a los noventa días”				
Tiempo de retención (t_R) promedio	Número	mg de Melatonina equivalentes	Cantidad (mg/mL)	Área (mAU * seg)
2.082	1	0.05	1.0000 x 10 ⁻⁰⁴	56.03059
	2	0.1	2.0000 x 10 ⁻⁰⁴	80.75404
	3	0.2	4.0000 x 10 ⁻⁰⁴	106.40583
	4	1	2.0000 x 10 ⁻⁰³	402.67108
	5	3	6.0000 x 10 ⁻⁰³	1075.56628
	6	5	1.0000 x 10 ⁻⁰²	1743.66797
	7	7.5	1.5000 x 10 ⁻⁰²	2452.37378
	8	10	2.0000 x 10 ⁻⁰²	3510.11694

El siguiente gráfico ilustra los resultados de la curva de calibración:

Gráfico No. 4: Curva de calibración # 3 obtenida con estándares de Melatonina



En esta etapa tuvo que evaluarse nuevamente los parámetros de LOD, LOQ, precisión de las áreas según su RSD% y el factor de coleo debido a que al cromatógrafo de la UVG le colocaron una columna nueva, con las mismas especificaciones que la anterior. Luego de haber inyectado los ocho estándares correspondientes a la curva de calibración, se procedió a evaluar la precisión y el factor de coleo.

2. Precisión y factor de coleo. Se inyectaron cinco veces un estándar de Melatonina de concentración de 0.01 mg/mL, disuelto en metanol HPLC: agua HPLC (50:50), para evaluar dos parámetros que aseguran la estandarización del método, a saber, precisión y factor de coleo. Los resultados se muestran a continuación:

Cuadro No. 28: Precisión y factor de coleo con nueva columna			
Número	Tiempo de retención (minutos)	Área (mAU * s)	Factor de coleo (95%)
1	2.078	1631.5000	1.619
2	2.076	1588.2000	1.609
3	2.077	1632.9000	1.609
4	2.073	1613.2000	1.597
5	2.074	1674.6000	1.601
Promedio	2.0756	1628.0800	1.607
Desviación Estándar	0.002074	31.66571	0.008485
RSD %	0.099906	1.944972	0.52802
Especificación	La RSD % del área no debe ser mayor de 2.0% y el factor de coleo no mayor que 2.5		
Conclusión	Los parámetros de factor de coleo y precisión cumplen con las especificaciones en las condiciones aún cuando la columna es nueva (columna marca HP 005, modelo Hypersil 5 μ m; 200 * 2.1 mm).		

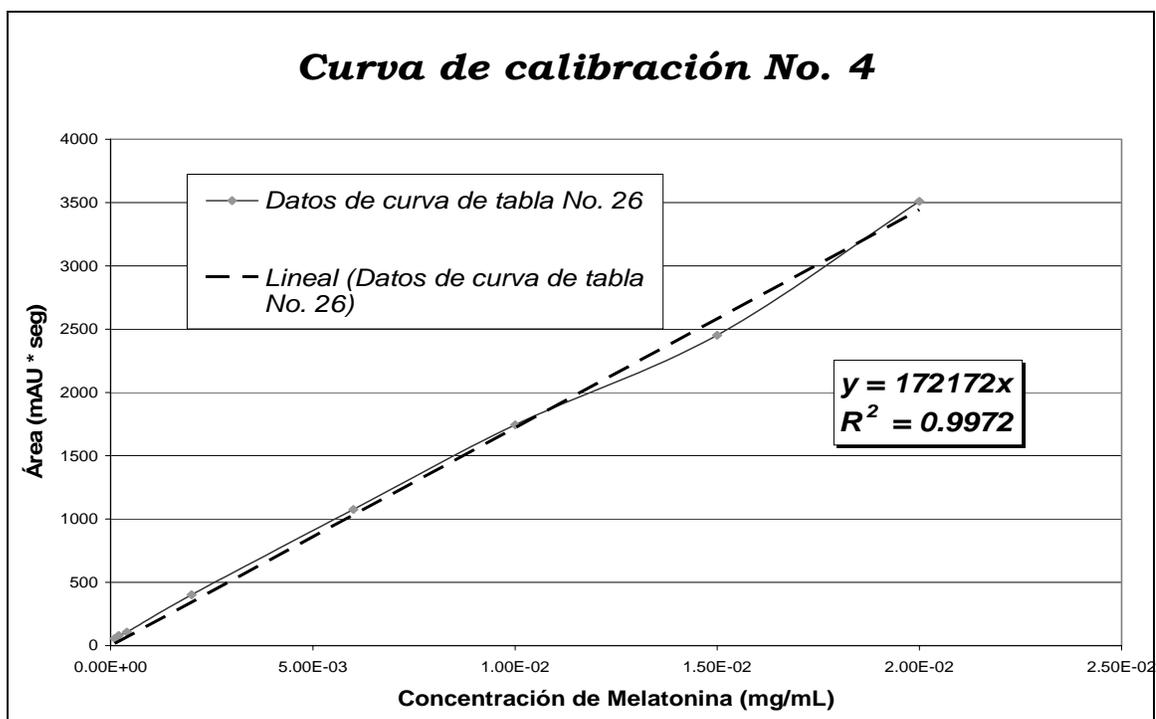
3. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Posteriormente se evaluó el LOD y LOQ por medio de la inyección de 30 blancos, los cuales se componían de metanol HPLC: agua HPLC (50:50). Esto se hace para poder calcular el LOD y el LOQ a partir de la mínima señal distinguible (S_m).

Esto también dará evidencia que el sistema con el que se trabajó estuvo bajo condiciones apropiadas a lo largo del estudio.

Cuadro No. 29: Determinación de S_m, LOD y LOQ (con la nueva columna)			
No. de Blanco	Tiempo de retención	Área (mAU x seg)	Concentración de Melatonina (mg/mL)
1	2.1	23.3449	1.35591×10^{-04}
2	2.092	20.7405	1.20464×10^{-04}
3	2.08	17.68149	1.02697×10^{-04}
4	2.085	16.79559	9.75513×10^{-05}
5	2.089	16.53497	9.60375×10^{-05}
6	2.086	17.1157	9.94105×10^{-05}
7	2.089	16.51857	9.59423×10^{-05}
8	2.089	16.83089	9.77563×10^{-05}
9	2.088	16.21828	9.41982×10^{-05}
10	2.084	33.94719	1.97170×10^{-04}
11	2.09	19.85696	1.15332×10^{-04}
12	2.094	17.49156	1.01594×10^{-04}
13	2.091	16.62806	9.65782×10^{-05}
14	2.092	16.9176	9.82599×10^{-05}
15	2.091	15.5873	9.05333×10^{-05}
16	2.104	6.36647	3.69774×10^{-05}
17	2.103	7.98794	4.63951×10^{-05}
18	2.103	33.40748	1.94036×10^{-04}
19	2.103	9.84449	5.71783×10^{-05}
20	2.097	10.75455	6.24640×10^{-05}
21	2.102	11.42235	6.63427×10^{-05}
22	2.093	11.3715	6.60474×10^{-05}
23	2.101	12.3459	7.17068×10^{-05}
24	2.099	12.10662	7.03170×10^{-05}
25	2.098	10.09225	5.86173×10^{-05}
26	2.105	24.68367	1.43366×10^{-04}
27	2.101	10.77968	6.26100×10^{-05}
28	2.108	11.75901	6.82981×10^{-05}
29	2.102	9.54979	5.54666×10^{-05}
30	2.101	10.31812	5.99292×10^{-05}
Media	<i>2.095</i>	<i>15.83331</i>	<i>9.19622 \times 10^{-05}</i>
Desviación Estándar (RSD%)	<i>0.00734</i>	<i>6.55991</i>	<i>3.81009 \times 10^{-05}</i>
Mínima señal analítica distinguible (S_m) $S_m = S_{bl} + k s_{bl}$ Donde S_{bl} = Señal promedio del blanco; $k = 3$ & s_{bl} = desviación estándar del blanco	$2.06265 \times 10^{-04} \text{ mg/mL}$		
Límite de detección LOD = $(S_m - S_{bl})/m$ donde m = pendiente de la regresión lineal de la curva de calibración No. 4	$6.63888 \times 10^{-10} \text{ mg/mL}$		
Límite de cuantificación LOQ = $10 s_{bl}$	$3.81009 \times 10^{-04} \text{ mg/mL}$		

Cabe señalar que la ecuación empleada para calcular la concentración de Melatonina en mg/mL de los blancos fue obtenida a partir de los datos del cuadro No. 26, intersectándola con el cero con el fin de que fuera viable calcular LOD y LOQ.

Gráfico No. 5: Curva de calibración # 4 para calcular LOQ & LOD de columna nueva



F. Condiciones del sistema

- Columna marca HP 005, modelo Hypersil 5 μ m; 200 * 2.1 mm.
- Fase móvil: buffer de fosfatos (pH = 4.5): acetonitrilo (35:65).
- Solvente de los estándares y muestras: metanol: agua (50:50) ambos grado HPLC.
- Flujo 0.5 mL/min; tiempo por corrida = 5 minutos.
- Volumen de inyección 20 microlitros (loop de 20 μ L).
- Detector UV/VIS a 228 nm para la cuantificación de Melatonina.
- LOD: 1.490344×10^{-10} mg/mL (columna vieja) & LOD = 6.63888×10^{-10} mg/mL (columna nueva).
- LOQ: 8.35981×10^{-05} mg/mL & LOQ = 3.81009×10^{-04} mg/mL.
- Tiempo de retención de Melatonina de curva de calibración: 2.431 min (columna vieja), 2.082 min (columna nueva).

En los siguientes tres cuadros se muestran los resultados obtenidos a los 90 días de que las muestras comerciales de Melatonina han permanecido a tres temperaturas diferentes con H.R. controlada $75\% \pm 5\%$.

Cuadro No. 30: Resultados de las seis marcas comerciales a los noventa días (Temperatura de 30°C & 75% H.R.)							
Muestra	t _R	Área mAU*s	Concentración (mg/mL) *	Concentración (mg)	% De lo etiquetado	Promedio del %	Cumple (85-115%)
A.1 (3mg)	2.079	998.12592	5.64648×10^{-3}	2.82324	94.10800	94.25867	Sí
A.2 (3mg)	2.086	1001.18555	5.66456×10^{-3}	2.83228	94.40933		
B.1 (0.2mg)	2.084	97.6618	3.23149×10^{-4}	0.161575	80.78725	80.15513	No
B.2 (0.2mg)	2.083	96.80653	3.18092×10^{-4}	0.159046	79.52300		
C.1 (1mg)	2.085	380.2261	1.99360×10^{-3}	0.996800	99.68000	95.94400	Sí
C.2 (1mg)	2.084	354.94690	1.84416×10^{-3}	0.922080	92.20800		
D.1 (3mg)	2.084	1042.74402	5.91025×10^{-3}	2.95513	98.50417	100.03808	Sí
D.2 (3mg)	2.086	1073.87988	6.09432×10^{-3}	3.04716	101.57200		
E.1 (1mg)	2.087	376.93585	1.97415×10^{-3}	0.987075	98.70750	98.80925	Sí
E.2 (1mg)	2.085	377.62378	1.97822×10^{-3}	0.989110	98.91100		
F.1 (5mg)	2.084	1765.83496	1.01850×10^{-2}	5.09250	101.85000	103.42350	Sí
F.2 (5mg)	2.085	1819.06775	1.04997×10^{-2}	5.24985	104.99700		

* Obtenida con curva de calibración No. 3

Cuadro No. 31: Resultados de las seis marcas comerciales a los noventa días (Temperatura de 35°C & 75% H.R.)							
Muestra	t _R	Área mAU*s	Concentración (mg/mL) *	Concentración (mg)	% De lo etiquetado	Promedio del %	Cumple (85-115%)
A.1 (3mg)	2.076	1024.14868	5.80032×10^{-3}	2.90016	96.67200	93.97417	Sí
A.2 (3mg)	2.079	969.38708	5.47658×10^{-3}	2.73829	91.27633		
B.1 (0.2mg)	2.082	89.2754	2.81239×10^{-4}	0.140620	70.30987	71.40494	No
B.2 (0.2mg)	2.078	92.0563	2.90000×10^{-4}	0.145000	72.50000		
C.1 (1mg)	2.084	383.61111	2.01361×10^{-3}	1.00681	100.68050	96.27150	Sí
C.2 (1mg)	2.078	353.77798	1.83725×10^{-3}	0.918625	91.86250		
D.1 (3mg)	2.082	1078.70459	6.12284×10^{-3}	3.06142	102.04733	102.74958	Sí
D.2 (3mg)	2.08	1092.95898	6.20711×10^{-3}	3.10356	103.45183		
E.1 (1mg)	2.082	380.08694	1.99278×10^{-3}	0.996390	99.63900	103.49900	Sí
E.2 (1mg)	2.08	406.20398	2.14718×10^{-3}	1.07359	107.35900		
F.1 (5mg)	2.079	1878.99951	1.08540×10^{-2}	5.42700	108.54000	107.62800	Sí
F.2 (5mg)	2.079	1848.14673	1.06716×10^{-2}	5.33580	106.71600		

* Obtenida con curva de calibración No. 3

Cuadro No. 32: Resultados de las seis marcas comerciales a los noventa días (Temperatura de 40°C & 75% H.R.)							
Muestra	t_R	Área mAU*s	Concentración (mg/mL) *	Concentra- ción (mg)	% De lo etiquetado	Promedio del %	Cumple (85- 115%)
A.1 (3mg)	2.080	1062.00537	6.02412 x10 ⁻³	3.01206	100.40200	95.89400	Sí
A.2 (3mg)	2.082	970.50006	5.48316 x10 ⁻³	2.74158	91.38600		
B.1 (0.2mg)	2.078	97.45206	3.21909 x10 ⁻⁴	0.160955	80.47725	72.84725	No
B.2 (0.2mg)	2.080	87.12697	2.60869 x10 ⁻⁴	0.130435	65.21725		
C.1 (1mg)	2.077	358.57254	1.86559 x10 ⁻³	0.932795	93.27950	96.82950	Sí
C.2 (1mg)	2.079	382.59235	2.00759 x10 ⁻³	1.00380	100.37950		
D.1 (3mg)	2.080	1065.63745	6.04559 x10 ⁻³	3.02280	100.75983	100.26892	Sí
D.2 (3mg)	2.077	1055.67297	5.98668 x10 ⁻³	2.99334	99.77800		
E.1 (1mg)	2.083	395.20538	2.08216 x10 ⁻³	1.04108	104.10800	103.29825	Sí
E.2 (1mg)	2.078	389.72803	2.04977 x10 ⁻³	1.02489	102.48850		
F.1 (5mg)	2.085	1876.48279	1.08391 x10 ⁻²	5.41955	108.39100	106.46000	Sí
F.2 (5mg)	2.078	1811.15637	1.04529 x10 ⁻²	5.22645	104.52900		

** Obtenida con curva de calibración No. 3*

G. Resultados cinéticos por muestra individual

1. Concentraciones porcentuales en función del tiempo.

Cuadro No. 33: Concentraciones porcentuales según temperatura de almacenamiento				
Muestra	tiempo (días)	Conc. % a 30°C	Conc. % a 35°C	Conc. % a 40°C
A (3 mg)	0	101.08918	101.08918	101.08918
	30	98.65357	115.75303	88.98792
	60	93.01025	108.38108	89.70608
	90	94.25867	93.97417	95.894
B (0.2 mg)	0	134.95974	134.95974	134.95974
	30	108.06346	134.13530	111.29217
	60	76.12363	67.33500	68.50825
	90	80.15513	71.40494	72.84725
C (1 mg)	0	103.48557	103.48557	103.48557
	30	103.86429	106.82944	107.89058
	60	73.37475	83.25125	91.32875
	90	95.944	96.2715	96.8295
D (3 mg)	0	105.45910	105.45910	105.45910
	30	106.53710	108.48862	104.60191
	60	101.68692	96.39575	101.53517
	90	100.03808	102.74958	100.26892

E (1 mg)	0	112.36426	112.36426	112.36426
	30	114.92803	112.77926	111.89641
	60	98.59400	109.09625	98.81600
	90	98.80925	103.499	103.29825
F (3 mg)	0	110.10584	110.10584	110.10584
	30	118.63741	111.94265	109.92709
	60	103.63140	108.34500	103.58400
	90	103.4235	107.628	106.46

Gráfico No. 6: Tendencia de muestra A (3 mg) en las tres temperaturas estudiadas

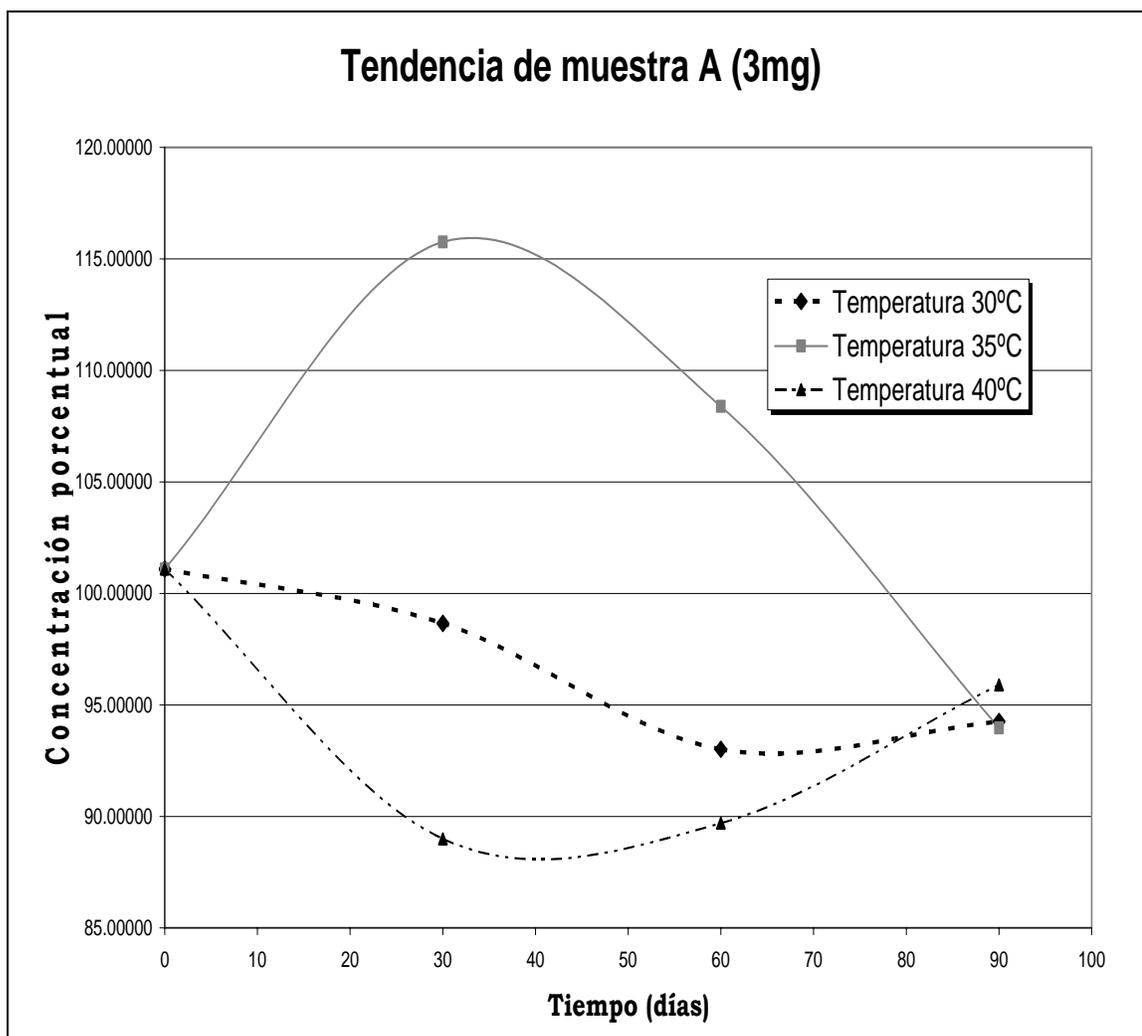


Gráfico No. 7: Tendencia de muestra B (200 mcg) en las tres temperaturas estudiadas

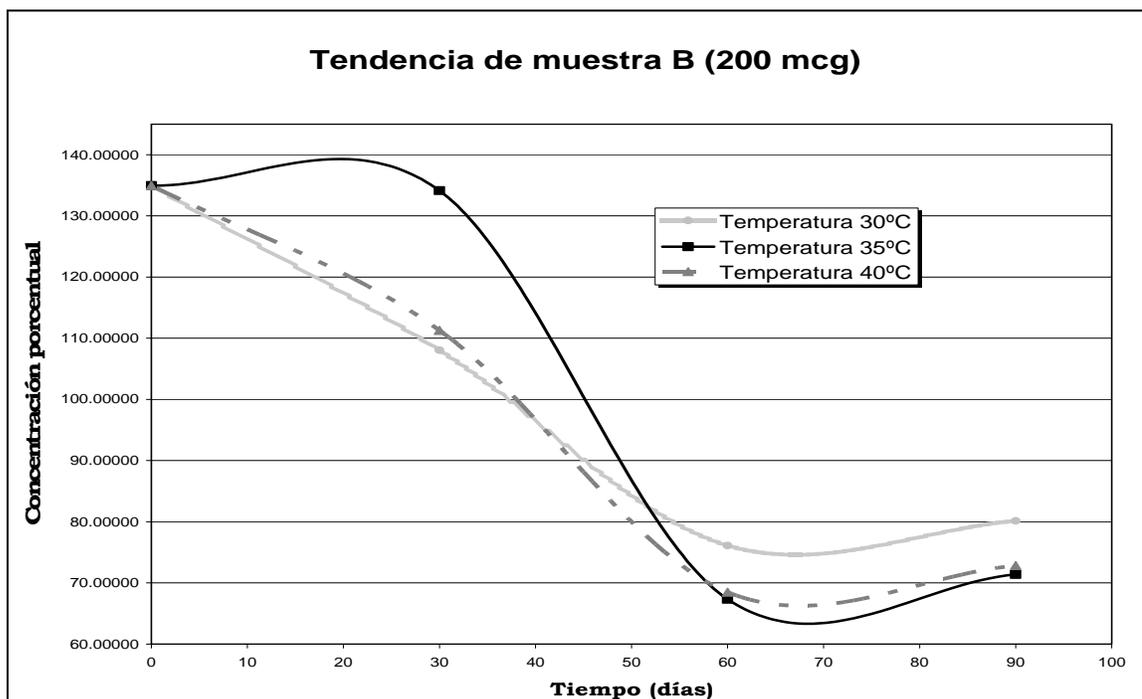


Gráfico No. 8: Tendencia de muestra C (1 mg) en las tres temperaturas estudiadas

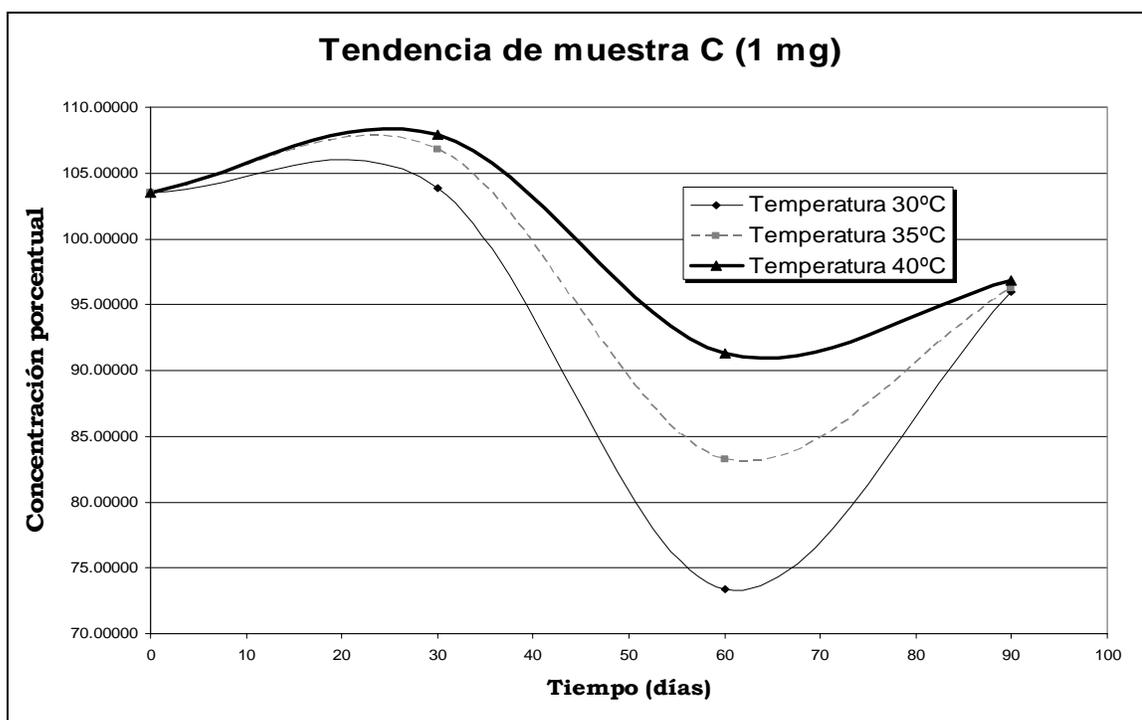


Gráfico No. 9: Tendencia de muestra D (3 mg) en las tres temperaturas estudiadas

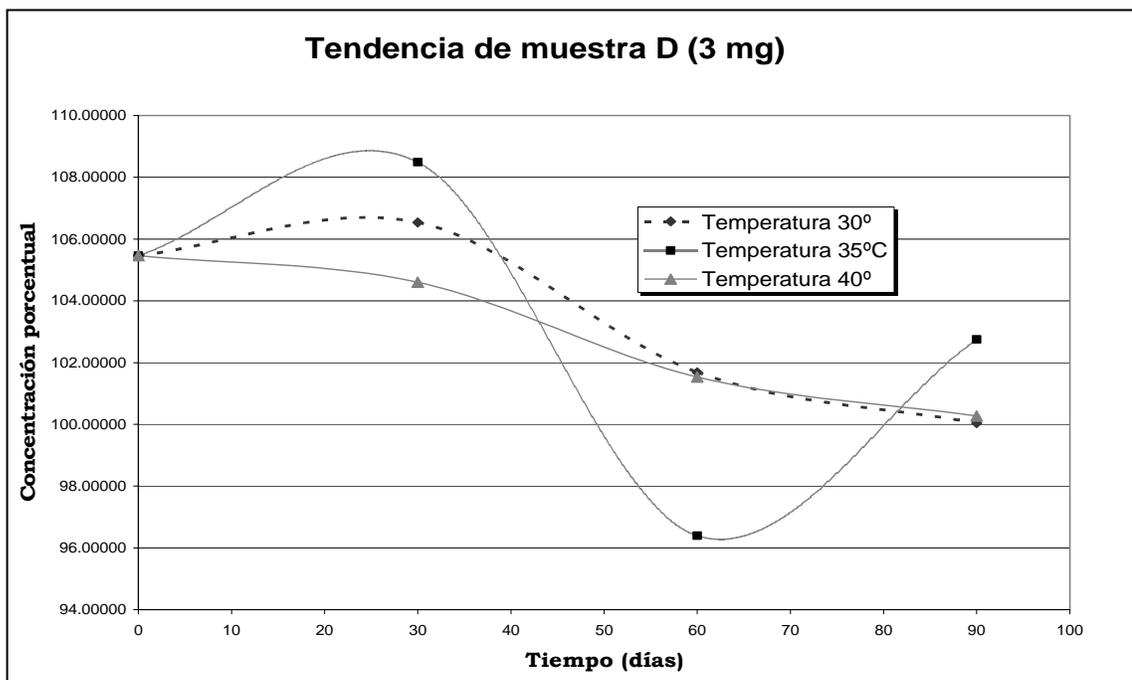


Gráfico No. 10: Tendencia de muestra E (1 mg) en las tres temperaturas estudiadas

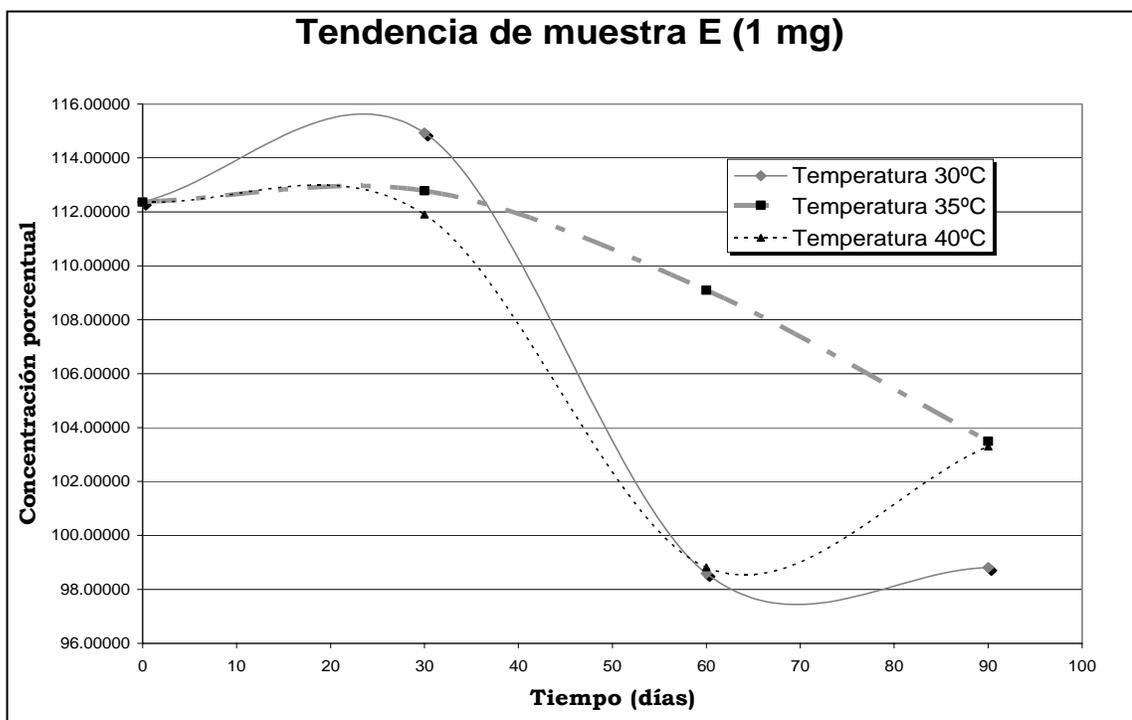
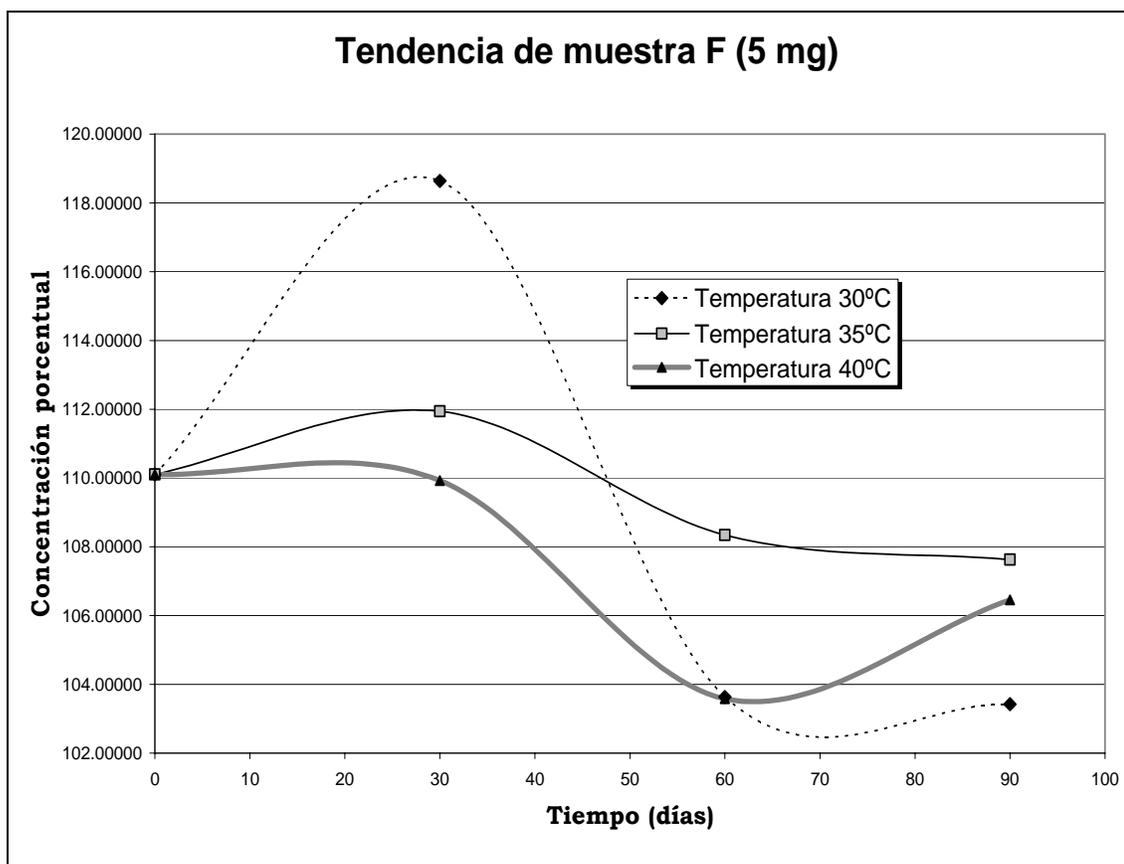


Gráfico No. 11: Tendencia de muestra F (5 mg) en las tres temperaturas estudiadas

2. Determinación de orden de reacción. Con los datos que se muestran en el cuadro No. 32 se obtuvieron 3 gráficas representadas por las funciones siguientes: a) cero (lineal, si se representa C vs. tiempo), b) primer orden (semilogarítmica, $\ln C$ vs. tiempo) y c) segundo orden (potencial, $1/C$ vs. tiempo). Con estas se efectuó un ajuste por mínimos cuadrados con el objeto de obtener K a las distintas temperaturas trabajadas. La función que se aproximó más a una recta (según el coeficiente de correlación r^2), fue la que decidió el orden de reacción.

Cuadro No. 34: Regresiones lineales que se aproximan mejor a la tendencia de las muestras				
Muestra	Temperatura ° K	Regresión lineal que más se ajustó	Pendiente (K)	Orden
A (3mg)	303.15° K	$y = -0.0871x + 100.67$ & $r^2 = 0.8008$	0.0871	Cero
	308.15° K	$y = 9.448 \cdot 10^{-6}x + 9.175E-03$ & $r^2 = 0.17996$	$9.448 \cdot 10^{-6}$	Dos
	313.15° K	$y = -0.0496x + 96.149$ & $r^2 = 0.1135$	0.0496	Cero
B (0.2mg)	30° C (303.15° K)	$y = -0.6545x + 129.28$ & $r^2 = 0.8564$	0.6545	Cero
	35° C (308.15° K)	$y = -0.8582x + 140.58$ & $r^2 = 0.7786$	0.8582	Cero
	40° C (313.15° K)	$y = -0.7637x + 131.27$ & $r^2 = 0.8633$	0.7637	Cero

C (1mg)	30° C (303.15° K)	$y = -0.177x + 102.13$ & $r^2 = 0.2289$	0.177	Cero
	35° C (308.15° K)	$y = -0.1507x + 104.24$ & $r^2 = 0.3123$	0.1507	Cero
	40° C (313.15° K)	$y = -0.1218x + 105.36$ & $r^2 = 0.4181$	0.1218	Cero
D (3mg)	30° C (303.15° K)	$y = 6.6308 \cdot 10^{-6}x + 9.37638E-03$ & $r^2 = 0.7949$	$6.6308 \cdot 10^{-6}$	Dos
	35° C (308.15° K)	$y = -0.0674x + 106.31$ & $r^2 = 0.257$	0.0674	Cero
	40° C (313.15° K)	$y = -0.0621x + 105.76$ & $r^2 = 0.9536$	0.0621	Cero
E (1mg)	30° C (303.15° K)	$y = 1.701 \cdot 10^{-5}x + 8.700 \cdot 10^{-3}$ & $r^2 = 0.7269$	$1.701 \cdot 10^{-5}$	Dos
	35° C (308.15° K)	$y = -0.1009x + 113.98$ & $r^2 = 0.8317$	0.1009	Cero
	40° C (313.15° K)	$y = -0.1343x + 112.64$ & $r^2 = 0.611$	0.1343	Cero
F (5mg)	30° C (303.15° K)	$y = 9.937 \cdot 10^{-6}x + 8.760 \cdot 10^{-3}$ & $r^2 = 0.4313$	$9.937 \cdot 10^{-6}$	Dos
	35° C (308.15° K)	$y = 3.080 \cdot 10^{-6}x + 8.996 \cdot 10^{-3}$ & $r^2 = 0.5548$	$3.080 \cdot 10^{-6}$	Dos
	40° C (313.15° K)	$y = -0.0576x + 110.11$ & $r^2 = 0.5132$	0.0576	Cero
<p><i>Nota: Los r^2 que se encuentran sombreados indican la baja correlación que hay entre las variables. A pesar de que son las ecuaciones de mínimos cuadrados que más se ajustan, dan una predicción débil y probablemente son estadísticamente independientes. Por tanto no es práctico continuar con los cálculos posteriores.</i></p>				

3. Determinación de energía de activación (Ea) de la ecuación de Arrhenius. La muestra en la que se puede determinar la energía de activación, solamente es la muestra B dado al valor de r^2 expuesto en el cuadro No. 34. Nótese que no se aplica para la muestra E, tampoco debido a que no hay convergencia en el orden de reacción de las tres temperaturas, ya que dos poseen orden de reacción cero (35 y 40°C) y una es de segundo orden (30°C).

Cuadro No. 35: Determinación de energía de activación de muestras B y E únicamente					
Muestra	k obtenida	1/Temp. absoluta en °K (x)	log K (y)	Regresión lineal y r^2 obtenidos graficando Log k vs inverso T	Ea (despejando ec. # 11)
B (0.2mg)	0.6545 (303.15° K)	0.003299	-0.18409	$y = -644.75x + 1.9702$ & $r^2 = 0.331$	2950.41533 cal/°K mol
	0.8582 (308.15 ° K)	0.003245	-0.06641		
	0.7637 (313.15° K)	0.003193	-0.11708		
	0.1343 (313.15° K)	0.003193	-0.87192		
<p><i>Nota: Se aprecia que el coeficiente de correlación no es favorable para la muestra B pues indica que solamente el 33.1% de la variación de log K (y) se atribuye con relación a la inversa de la temperatura absoluta (x)</i></p>					

4. Determinación de tiempo de vida (degradación del 90%). El valor de energía de activación (E_a) registrado en el cuadro anterior no tiene un margen de confiabilidad aceptable debido a que fue calculado a partir de una ecuación en la que el coeficiente de correlación es 0.331, lo cual denota la pobre relación entre las variables planteadas en este caso ($1/\text{Temp}$ vs. $\log k$). Con base a los resultados se determinó que no es viable continuar con el cálculo de la ecuación de Arrhenius para determinar K a 25°C (298.15°K). Así mismo, la ecuación de Arrhenius es aplicable si y sólo si la concentración de la muestra ha llegado a un mínimo de 50% de lo etiquetado, aunque con un 30-35% se pueden hacer buenas predicciones algunas veces.

En cuanto a las restantes muestras puede decirse que sus concentraciones no variaron significativamente a lo largo de los 90 días, pues se obtuvieron valores que están dentro de los límites predeterminados por la USP-29 para suplementos dietéticos (85-115% de lo etiquetado). Para estos casos la literatura indica que usualmente se les concede a los medicamentos una fecha de vencimiento tentativa de tres años, la cual debe corroborarse con un estudio a largo plazo, empleando las condiciones respectivas acorde a la región climática en la que se clasifica al país.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al elaborar este estudio de estabilidad, inicialmente se encontró divergencia en cuanto a la forma como se encuentran registrados los suplementos dietéticos a base de Melatonina, ya que algunos se encuentran clasificados como productos farmacéuticos (fabricados en Guatemala), y otros como productos farmacéuticos dietéticos (marcas estadounidenses). Esto provoca que previo a obtener el registro sanitario en Guatemala, los análisis de calidad que debe efectuar el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) sean de diferente grado de exigencia.

Como puede apreciarse al inicio de la sección del procedimiento, en el LNS no se efectúan todos los ensayos que indica la USP-29 para los fármacos y suplementos alimenticios, lo cual afecta ya que se obvian parámetros de calidad que son fundamentales para evaluar la calidad de estos productos.

Inicialmente se evaluaron cuatro aspectos de calidad de los suplementos dietéticos, comparándose los resultados con lo indicado en la USP-29 y la Farmacopea Británica. El primer ensayo que se observa es el del cuadro No. 10, que se refiere al de desintegración. En este se puede concluir que todas las muestras comerciales cumplen con este ensayo físico por presentar tiempos de desintegración menores al límite establecido (tiempo menor o igual a 30 minutos).

El segundo ensayo físico practicado a las muestras, es el de friabilidad (ver cuadro No. 11), en el que se puede apreciar que todas las muestras comerciales cumplen con la especificación propuesta por la USP-29 (variación de peso menor a 1%). Esto asegura entonces que durante su manipulación las tabletas mantendrán su integridad.

Al llevar a cabo el ensayo de dureza (ver cuadro No. 12), se observa que únicamente las muestras C y D (marcas nacionales) cumplen con las especificaciones del ensayo propuestas por la Farmacopea Británica. El hecho de que las restantes cuatro muestras no cumplan con la especificación denota que probablemente en la etapa del tableteado en el proceso de Manufactura, no haya un Procedimiento Estándar de Operación (SOP) completo para validar el proceso en su totalidad.

En el cuadro No. 13, se presentan las características organolépticas de las tabletas comerciales de Melatonina analizadas, así como sus empaques primarios antes de

iniciado el estudio de estabilidad. Durante todo el tiempo que incluyó este estudio de estabilidad estas características se mantuvieron invariables y no se observaron cambios en ninguna de las tres temperaturas en estudio.

Los cuadros No. 14 y 15 muestran los resultados obtenidos en el ensayo de variación de peso. Las especificaciones propuestas por la USP-29 para las tabletas sin recubrimiento (todas las marcas comerciales) son cumplidas por todas las muestras de Melatonina ya que acorde a los pesos particulares de cada una, sus variaciones estándar relativas porcentuales son menores a los límites permitidos respectivos.

El método que se utilizó para hacer las cuantificaciones periódicas de Melatonina fue el de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este sistema cumplió con los parámetros especificados por Bloom *et.al*, tanto al inicio (tiempo cero), como al final del estudio (noventa días). Los ensayos que se efectuaron fueron el límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), precisión y factor de coe. Sin embargo, esto no asegura que el sistema fuera el adecuado para llevar a cabo el estudio de estabilidad, debido a que no se encontró información disponible acerca de los productos de degradación de la Melatonina. Dichos posibles productos de degradación, pueden ser interferentes en el análisis si absorben a la misma longitud de onda que el activo (228 nm), lo cual afectaría directamente a los resultados y por ende el sistema no sería apropiado para el estudio acelerado de estabilidad.

En cada intervalo de muestreo se llevó a cabo también una curva de calibración con soluciones estándares de reciente preparación, para comprobar la linealidad con la que se relacionan las variables (concentración mg/mL vs. área). Con las cuatro curvas de calibración obtenidas (gráficos No. 2 al 5), se aprecia que hay una relación lineal entre las variables (valores de $r^2 \sim 0.99$) con lo cual es estadísticamente correcto llevar a cabo las cuantificaciones.

Hubo una variante significativa con la prueba efectuada al inicio y al final, ésta es que el equipo de HPLC requirió que se le cambiarán distintas piezas en las que se incluía la columna cromatográfica marca HP 005, modelo Hypersil 5 μ m; 200 * 2.1 mm. La nueva columna presentaba exactamente las mismas especificaciones que la anterior, con lo que no había problema en cuanto a ese aspecto. Por el cambio de columna había una razón de mayor peso para volver a evaluar la adecuación del sistema, y como se dijo

anteriormente, éste es adecuado para efectuar las cuantificaciones ya que el límite de detección encontrado en ambos casos (columna vieja y nueva) es de tal magnitud que indican que es viable cuantificar las muestras de variadas concentraciones.

Una diferencia apreciable en el sistema con la columna nueva, fue el corrimiento en el tiempo de retención (t_R) de las muestras y de los estándares pues era menor el tiempo que tardaba en eluir la muestra de la columna, y por consiguiente ser detectada por el detector UV a 228nm. El corrimiento del tiempo de retención no causó problema alguno, ya que mediante la curva de calibración y las pruebas de adecuación del sistema se puede asegurar que el área del pico cromatográfico cuantificado, corresponde efectivamente a la Melatonina.

Como se dijo anteriormente, desafortunadamente no se cuenta con información acerca de los productos de degradación de la Melatonina, con lo cual no se puede determinar si de alguna manera intervinieron aumentando el área de los picos cromatográficos que se analizaron.

En el tiempo cero se hizo un ensayo de cuantificación inicial en el cual se aprecia que cinco de las seis muestras comerciales cumplen con los requerimientos pautados por la USP-29. La muestra que tenía la menor concentración no cumplió con el ensayo ya que presentó una concentración mayor al límite superior preestablecido (115% de lo etiquetado). Esto denota que el fabricante probablemente no tiene validado el proceso de mezclado de activo con excipientes en la manufactura de las tabletas y no hay uniformidad de contenido del ingrediente activo en las tabletas. No obstante, esto no puede asegurarse ya que no se llevó a cabo el ensayo de disolución por no contarse con una metodología analítica validada.

En los cuadros No's. 20 a 22 se muestran los resultados de la primer evaluación programada, (30 días de encontrarse a 75% H.R. y temperatura determinada) se encontró que en la mayor parte de las valoraciones, las concentraciones de las muestras se mantuvieron dentro del rango permitido (85-115%). Sin embargo, se observó un comportamiento muy peculiar en algunas muestras, pues en lugar de obtenerse valores de concentración de Melatonina menores, hubo un aumento de la concentración de las muestras. Esto puede deberse a tres causas. La primera es que, el área del pico cromatográfico incluya tanto al activo como al (los) producto (s) de degradación, lo cual

tendría sentido en este caso debido al aumento observado, y por tanto el método no sea adecuado para efectuar un estudio acelerado de estabilidad de la Melatonina, sino que únicamente para ensayos de cuantificación. La segunda es que, los 30 días no sean suficientes para causar una degradación significativa del activo. La tercera, es que el aumento de concentración porcentual, se pudo deber a que no había uniformidad de contenido en los lotes particulares de las muestras estudiadas.

En la segunda evaluación programada (cuadros No. 24 a 26) se aprecia que en todos los casos (cuantificaciones de muestras a 30, 35 y 40°C) hubo un decaimiento de la concentración de Melatonina con respecto al valor obtenido en el primer retiro, y en algunos casos se observaba que disminuyeron en el tiempo, como el caso de la muestra A almacenada a 30° por ejemplo (ver cuadro No. 33). Esto daba idea de que la concentración de las muestras de Melatonina, a calcular en el último retiro programado iba a ser aun menor que la encontrada hasta el momento. En particular con la muestra B se podía apreciar que las condiciones drásticas estaban afectando al activo.

Al llevar a cabo la última evaluación programada de las muestras se encontraron de nuevo casos en el que la concentración había aumentado, si se compara con el resultado obtenido en el segundo retiro. Este hecho es similar al ocurrido en el primer retiro, pues nuevamente hay una contradicción de lo que se cree será el comportamiento de las muestras. Por ende se vuelven a considerar las tres causas mencionadas anteriormente.

Luego de que se tuvieran completos los datos de concentración de los 90 días, el paso siguiente era encontrar el orden de reacción y la constante de velocidad para cada muestra en particular en cada una de las tres temperaturas trabajadas. Los resultados se muestran en el cuadro No. 34. Se aprecia que hay varios valores de coeficiente de correlación con valor bajo lo cual refleja la poca relación entre las variables, con lo que para estos casos es preferible no continuar con el cálculo posterior que implica determinar la *energía de activación* de la reacción con él orden acorde a lo encontrado en el paso anterior.

Solamente a la muestra B se le hizo el cálculo para determinar la energía de activación debido a que presentaba valores de r^2 que indicaban una correlación ligeramente lineal aunque no eran de confianza plena. Si se observa el cuadro No. 34, se

aprecia que la muestra E, también posee valores de coeficiente de correlación cercanos a 0.80, sin embargo a ésta no se le puede continuar calculando la energía de activación por presentarse divergencia en el orden de reacción de las tres temperaturas trabajadas, ya que dos poseen orden de reacción cero (35 y 40°C) y una es de segundo orden (30°C).

En el cuadro No. 35 se muestra el resultado encontrado para la energía de activación para la muestra B, sin embargo acorde al valor del r^2 (0.331) encontrado indica que no hay una clara relación causa-efecto, entre las variables $\log K$ (y) & $1/\text{Temperatura absoluta}$ (x), con lo que resulta impreciso continuar con el cálculo de extrapolación para hallar K a 298.15°K y la determinación del tiempo de vida (degradación del 90%).

Otra razón por la que la ecuación de Arrhenius no es aplicable en el caso de la muestra B, es debido a que la concentración de Melatonina aparentemente no llegó a un mínimo de 50% de lo etiquetado, con lo que la predicción que se encontraría no iba a ser totalmente confiable. No obstante, esto no puede asegurarse porque se desconoce si los productos de degradación provocaron un efecto aditivo en las áreas de los picos cromatográficos analizadas para la cuantificación.

Sobre las restantes muestras puede decirse que aparentemente sus concentraciones no variaron significativamente a lo largo de los 90 días, ya que los resultados muestran que están dentro de los límites predeterminados por la USP-29 para suplementos dietéticos (85-115% de lo etiquetado). Para estos casos la literatura indica que usualmente se les concede a los medicamentos una fecha de vencimiento tentativa de tres años, la cual debe corroborarse con un estudio a largo plazo.

Puede indicarse que, los resultados obtenidos no son concluyentes ya que no se puede comprobar la hipótesis acerca de la estabilidad de la Melatonina, debido a las tendencias irregulares y al desconocimiento acerca de los productos de degradación de la misma. Así mismo, debido al comportamiento variable en los resultados del análisis, se interfiere también con uno de los objetivos generales del estudio que es la comprobación de la fecha de expiración declarada en la etiqueta de los productos comerciales.

VIII. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un estudio de estabilidad acelerada con los productos comerciales formulados a base de Melatonina que se comercializan en Guatemala, por un período de tres meses.
- Debido a la tendencia irregular que se presenta en las muestras comerciales de Melatonina, no se pudo aplicar la ecuación de Arrhenius para comprobar si la fecha de expiración que se declaraba en la etiqueta de los productos, guardaba relación con el resultado a obtenerse.
- Los ensayos físicos efectuados demuestran que las muestras cumplen con la variación de peso, desintegración y friabilidad acorde a los requerimientos de la USP-29, no obstante únicamente dos muestras cumplen con el análisis de dureza según las especificaciones de la Farmacopea Británica.
- Cinco de las muestras comerciales de Melatonina (A, C, D, E, F) al inicio del estudio de estabilidad muestran concentraciones que oscilan dentro del rango preestablecido por la USP-29 (85-115% de lo etiquetado) con lo que se concluye que las mismas cumplen con el ensayo de cuantificación en el tiempo cero.
- La concentración de Melatonina solamente se mantiene dentro de los límites predeterminados en dos muestras, sin embargo en la mayoría de las valoraciones periódicas efectuadas la concentración del activo está en el rango permitido, excepto en la muestra B.
- La muestra comercial B es la que posee un empaque primario que no provee aparentemente tanta estabilidad al activo, ya que la fue la que presentó las concentraciones más bajas (hasta del 67% de lo etiquetado). Las restantes muestras poseen un empaque primario que las protege de manera muy similar.

IX. RECOMENDACIONES

1. Determinar los productos de degradación de Melatonina, para que se pueda asegurar que no son interferentes al momento de llevar a cabo la cuantificación de este activo, y con ello darle mayor validez al método empleado.
2. Desarrollar una metodología analítica estandarizada apropiada y validada que permita la cuantificación de la Melatonina en un estudio de estabilidad acelerado.
3. Efectuar un estudio a largo plazo con las muestras de Melatonina registradas en Guatemala, en el que se pueda corroborar fehacientemente la fecha de expiración.
4. Llevar a cabo un estudio de estabilidad acelerado empleando varios lotes de la misma marca comercial, para verificar la varianza que pueda presentarse en los ensayos físicos y químicos.
5. Efectuar un estudio de estabilidad acelerado de la Melatonina, con una metodología y sistemas validados con el fin de comprobar la fecha de expiración declarada en las etiquetas comerciales de las muestras que se distribuyen en Guatemala.
6. Que en el Departamento de Regulación de Productos Farmacéuticos y Afines, se preste mayor atención al evaluar los productos farmacéuticos dietéticos, previo a la obtención de su registro sanitario, ya que gran parte de éstos estimulan una actividad biológica y el hecho de no cumplirse con lo declarado en la etiqueta de los mismos, representa un riesgo para la población.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. *British Pharmacopoeia* Commission Adendum. 2006. [online]. (<http://www.pharmacopoeia.org.uk>)
2. Cervera, M., Fernández, T., García, B., Gutiérrez, J. Iraizoz, A. *Estabilidad acelerada de tabletas de Levodopa-Carbidopa 250-25 mg*. Revista Cubana Farm. [online]. 2001, vol.35, no.2 [citado 20 Enero 2006], p.90-94 (www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol35_2_01/far02201.htm)
3. Cole, M., Fetrow, C. 2003. *Adulteration of Dietary Supplements*. American Society of Health-System Pharmacists. Volumen 60, Chapter 15. Páginas 1576-1580. (http://www.medscape.com/viewarticle/460319_4)
4. Coperman, T. 2005. ConsumerLab.com, *Product Review Melatonin Supplements*. LLC. 2005. (<http://www.consumerlab.com/results/melatonin.asp>)
5. Martínez, L., Lara, M., Castro, M. y y Torres, M. *Estabilidad de tabletas de Rifampicina 300 mg*. Revista Cubana Farm. [online]. ene.-abr. 2001, vol.35, no.1 [citado 20 Enero 2006], p.18-22. (http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152001000100003&lng=es&nrm=iso)
6. United States Pharmacopeia 29 (versión electrónica). *General Chapters: 2750, 1150, 1191, 2091, 2040, 1216*. The Standard of Quality 2006. (<http://www.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=29&nf=24&s=0>)
7. Vega J., J. Moreno , J. Bloom, FDA. *Melatonin Analysis in Dietary Supplements by HPLC using UV-VIS detector*. FDA Board Number I-PO-61. Abstract Research Category I Analytical Chemistry: Methods Development and Applications. (http://www.accessdata.fda.gov/scripts/oc/scienceforum/sf2005/Search/preview.cfm?abstract_id=398&backto=category)

8. Wikipedia, Org. 2005. *Suplemento dietético*. Wikipedia Enciclopedia Edición en Español versión electrónica. Última actualización: 10 de diciembre de 2005. (http://es.wikipedia.org/wiki/Suplemento_diet%C3%A9tico)
9. Yimin, He. 2003. *Current Good Manufacturing Practice in Manufacturing, Packing, or Holding Dietary Ingredients and Dietary Supplements*. Zhejiang Medicine Co., Ltd Xinchang Pharmaceutical Factory. (http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/03/Aug03/081803/96N-0417_emc-000189-01.doc)
10. Chavarría, M. 2002. *Estabilidad Acelerada de tabletas parenterales recubiertas empacadas en blister de aluminio – PVDC*. Universidad de San Carlos de Guatemala. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). pp32.
11. Helman, J. 1984. *Farmacotecnia Teórica y Práctica*. CIA Editorial Continental, S.A. de C.V. México. Tomos I-VIII.
12. ICH Steering Committee. 2003. *Stability Testing of New Drug Substances and Products*. International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticas for human use.
13. Lachman, L., Lieberman, H., Kanig, J. 1986. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. 3rd edition. Lea & Febiger. USA. pp902.
14. *The Merck Index*. 1983. 10th ed. Rahway, New Jersey: Merck and Co.
15. Moreira, D. 1997. *Estudio de estabilidad acelerada de Ácido Acetil Salicílico de polvos en sobres que se comercializan en Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 50pp
16. Remington. 1995. *The Science and Practice of Pharmacy*. 19th Edición. Volumen I y II. Mack Publishing Company. USA. pp1934.

17. Saldanha, L., Betz, J., Coates, P. *Development of the Analytical Methods and Referente Materials Program for Dietary Supplements at The National Institutes Health*. Journal of AOAC International. Vol 87, Number 1, pages 162-165, 2004. Copyright 2004 by AOAC INTERNATIONAL.
18. Sapón, A. 1992. *Estudio de estabilidad acelerada en cuatro formulaciones de Elixir de Acetaminofén*. Universidad de San Carlos de Guatemala. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). pp65.
19. Sbarbati, N. 1975. *Estabilidad de Medicamentos*. Editorial el Ateneo. Buenos Aires. pp187.
20. Skoog, D, Leary, J. 1994. *Análisis Instrumental*. Cuarta edición. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A. España. pp935.