

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍ-**  
**MICAS**  
**MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA Y CON-**  
**TROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS**



**Desarrollo, Estandarización y Validación de un Método**  
**Analítico Indicador de Estabilidad por Cromatografía Líquida**  
**de Alta Eficiencia para Estudios de Estabilidad de Enalapril**  
**Maleato, Tableta.**

Tesis presentada para obtener el grado académico de Magíster en “Tecnología Farmacéutica y Control de Calidad de Medicamentos”

**POR: LIC. FABIOLA PACHECO CALLE**

**TUTORA: MSC. MARÍA LUISA DAZA CALDERÓN**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2019**

***DEDICATORIA:** Esta tesis va dedicada con todo mi amor y cariño a la memoria de mi querido abuelito Florentino Pacheco quién me dio los mejores recuerdos de mi vida. Su ejemplo me mantiene soñando cuando quiero rendirme y a mi querida familia por darme todo su apoyo incondicional*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar dando mi agradecimiento más grande a Dios por darme vida, por guiarme a lo largo de este camino, por ser mi apoyo, mi luz y por su amor infinito. Cada paso en mi vida no ha sido casualidad sé que es parte de su propósito para mi vida, así lo creo, tu palabra es mi fortaleza, mi ánimo para emprender y seguir creciendo en todos los aspectos de mi vida. Mis fuerzas vienen de ti porque sé que en ti todo lo puedo.

Quiero dar gracias a todos los que de una forma u otra forman parte de mi vida. Y en especial quiero dar gracias a mi familia.

Muchas gracias mamá, muchas gracias papá por apoyarme en todo momento, por los valores que me han enseñado y por haberme dado la oportunidad de tener una educación, gracias por enseñarme que con esfuerzo y dedicación todo se puede lograr, que no hay barreras cuando tus fortalezas superan tus debilidades, mis mentores en la vida.

Esta tesis representa un esfuerzo y reto personal en mi formación académica, una satisfacción profesional y una forma de contribuir a la investigación en el campo farmacéutico.

Muchas gracias a mis hermanos por ser parte importante en mi vida, a mis pequeños amigos Mateo y Antonio por llenarme de alegrías, sonrisas, los amo con todo mi corazón.

Muchas gracias a mis amigos en cada lugar que tuve el privilegio de conocer en el mundo, no importa el tiempo y la distancia cuando se es amigo, son una bendición y la muestra del verdadero significado de una amistad, gracias por escribirme, darme palabras de aliento cuando lo necesitaba y me sentía solitaria en mis ideas, los amigos son los profesores de la vida, por enseñarme el valor de la vida, por despertar en mí algo que no conocía, conocerlos ha impactado en mí de manera positiva y me ha motivado a querer ser mejor persona con cada día, a no rendirme, superar mis miedos y no dejar mis sueños inconclusos en el camino. La culminación de esta tesis es parte de ese aprendizaje, no tengo duda de que la formación es una de las mejores formas de invertir en ti mismo y contribuir al crecimiento de un país.

Gracias a mí querida Dra. María Luisa Daza, una docente excepcional, de éxito y muestra de que con trabajo, investigación, esfuerzo y dedicación todo en la vida se puede lograr;

muchas gracias por confiar en mí y por haber aceptado ser mi tutora en la realización de este trabajo de investigación.

Mis agradecimientos a Laboratorios Droguería INTI S.A por brindarme sus instalaciones, equipos y reactivos, gracias al Sr. Christian Schilling, Gerente General de Droguería INTI, al Dr. Gonzalo Muñoz, Gerente Técnico de Laboratorios INTI, Dra Guísela Palma, Directora de Control de Calidad de Laboratorios INTI por brindarme su apoyo en el inicio y culminación de esta tesis.

Muchas gracias al Dr. Fernando Gallo, Gerente de Calidad de Droguería INTI, por inspirarme disciplina, respeto, amabilidad y el hábito de la lectura a quien tengo un cariño y admiración especial.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo y compañía. Al personal de seguridad, limpieza y administración de Talento Humano de Laboratorio Droguería Inti S.A por ayudarme de manera indirecta. Algunos están aquí conmigo, otros en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mi vida, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Soy agradecida a cada uno.

## RESUMEN

En el presente estudio de desarrollo, estandarización y validación del método analítico indicador de estabilidad de Enalapril Maleato Tableta, se describe la degradación del principio activo sobre la base de las directrices indicadas de la ICH Q1A para diferentes condiciones de estrés (Hidrólisis ácida, Hidrólisis alcalina, Hidrólisis neutra, Oxidación, Termólisis y Fotólisis), el método desarrollado utilizó una columna de Zorbax Stable Bond C18, fase móvil 60 % de metanol grado cromatográfico y 40 % de buffer fosfato pH 2.2 a una temperatura de columna 35°C. El método desarrollado es capaz de separar el Enalapril Maleato de sus productos de degradación. La degradación del principio activo se da en medio ácido, básico y neutro mientras que la molécula no sufre una degradación frente a la luz y el calor. En el ensayo de termólisis a la temperatura de 60°C y 80°C se pudo determinar que la cinética de degradación del principio activo es de orden uno. El método fue optimizado, estandarizado, validado y demostró tener una especificidad aceptable, linealidad, exactitud, precisión, robustez y estabilidad de las soluciones. El método analítico es capaz de separar el principio activo de sus productos de degradación con una resolución(R) mayor a 3, con un tiempo de ejecución de 25 min para la solución de aptitud. La eficiencia de la columna (N) para Enalaprilat es mayor a 1000 platos teóricos, mayor a 300 para Enalapril y mayor a 2500 para Enalapril Dicetopiperazina con una simetría adecuada para la cuantificación del principio activo. De acuerdo al ensayo de robustez se observó que el método no se ve afectado con cambios en el rango de pH del buffer, temperatura, concentración del buffer y volumen de inyección. El método es lineal en un rango de 80 % a 120 % de concentración de principio activo. El valor del coeficiente de variación obtenido para la Repetibilidad del método es de 0.140 % menor al valor aceptable según la AEFI (3.88 %) lo que indica que el método tiene una precisión óptima. La recuperación media en cuanto a la exactitud fue de 100.03 % con un intervalo de confianza de 99.9 % a 100.1 % de recuperación. Sobre la base de los resultados obtenidos con un nivel de confianza del 95 % para el análisis estadístico, el método es indicador de estabilidad ya que nos permite cuantificar el principio activo de manera inequívoca frente a sus productos de degradación.

## SUMMARY

In the present study of development, standardization and validation of the analytical method of stability indicator of Enalapril Maleato Tablet, describe the degradation of the active substance based on the indicated guidelines of the ICH Q1A for different stress conditions (Acid hydrolysis, Alkaline hydrolysis, Neutral hydrolysis, Oxidation, Thermolysis and Photolysis), the method developed in a Zorbax Stable Bond C18 column, 60% mobile phase of chromatographic grade methanol and 40% pH 2.2 phosphate buffer at a 35°C column temperature. The method developed is capable of separating Enalapril Maleate from its degradation products. The degradation of the active substance occurs in acidic, basic and neutral medium, while the molecule does not suffer degradation against light and heat. In the thermolysis test at the temperature of 60 °C and 80 °C it was possible to determine that the degradation kinetics of the active substance is of order one. The method was optimized, standardized, validated and proved to have an acceptable specification, linearity, precision, precision, robustness and stability of the solutions. The analytical method is capable of separating the active substance from its degradation products with a resolution (R) greater than 3, with an execution time of 25 minutes for the suitability solution. The efficiency of the column (N) for Enalaprilat is greater than 1000 theoretical plates, greater than 300 for Enalapril and greater than 2500 for Enalapril Dicotopiperazine with adequate symmetry for the quantification of the active substance. According to the robustness test, the method will not be affected with changes in the buffer's pH range, temperature, buffer concentration and injection volume. The method is linear in a range of 80% to 120% active ingredient concentration. The value of the coefficient of variation obtained for the repeatability of the method is 0.140% lower than the acceptable value according to the AEFI (3.88%), which indicates the method has optimum precision. The average recovery in terms of accuracy was 100.03% with a confidence interval of 99.9% to 100.1% recovery. Based on the results selected with a 95% confidence level for the statistical analysis, the method is an indicator of stability since it allows us to quantify the active principle unequivocally against its degradation products.

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1. Estructura química del Enalapril Maleato.....	25
Figura 2. Estructura y propiedades del Enalapril y Enalaprilat.....	26
Figura 3. Obtención de Enalapril Dicotopiperazina a partir de Enalapril Maleato por ciclación térmica.....	30
Figura 4. Degradación de Enalapril Maleato en medio ácido y base.....	30
Figura 5. Blanco de Hidrolisis ácida sin reflujo.....	68
Figura 6. Hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo) .....	68
Figura 7. Hidrólisis ácida con reflujo (principio activo) .....	69
Figura 8. Blanco de hidrólisis alcalina.....	69
Figura 9. Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo) .....	70
Figura 10. Hidrólisis alcalina con reflujo (principio activo).....	70
Figura 11. Hidrólisis neutra blanco.....	71
Figura 12. Hidrólisis neutra sin reflujo (principio activo).....	72
Figura 13. Hidrólisis neutra con reflujo (principio activo).....	72
Figura 14. Blanco de la oxidación sin reflujo.....	73
Figura 15. Oxidación sin reflujo (principio activo).....	74
Figura 16. Oxidación con reflujo (principio activo).....	74
Figura 17. Blanco de Hidrolisis ácida.....	76
Figura 18. Hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo + matriz).....	77
Figura 19. Hidrólisis ácida con reflujo (principio activo + matriz).....	77
Figura 20. Blanco de hidrólisis alcalina sin reflujo.....	78
Figura 21. Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo + matriz).....	78
Figura 22. Hidrólisis alcalina con reflujo (principio activo + matriz).....	79
Figura 23. Preparación de la solución estándar de Enalapril Maleato.....	80
Figura 24. Preparación de la solución estándar de Enalapril Maleato + matriz.....	80
Figura 25. Preparación de la matriz de Especificidad.....	81
Figura 26. Preparación del blanco de Especificidad.....	81
Figura 27. Preparación de la Fase Móvil de Especificidad.....	82
Figura 28. Linealidad del sistema nivel 80 % .....	83
Figura 29. Linealidad del sistema nivel 90 % .....	83
Figura 30. Linealidad del sistema nivel 100 % .....	84
Figura 31. Linealidad del sistema nivel 110 % .....	84
Figura 32. Linealidad del sistema nivel 120 % .....	85
Figura 33. Linealidad del método nivel 80 % .....	86
Figura 34. Linealidad del método nivel 90 % .....	86
Figura 35. Linealidad del método nivel 100 % .....	87

Figura 36. Linealidad del método nivel 110 %.....	87
Figura 37. Linealidad del método nivel 120 %.....	88
Figura 38. Exactitud (principio activo a la concentración de 80 %).....	89
Figura 39. Exactitud (principio activo a la concentración de 100 %).....	89
Figura 40. Exactitud (principio activo a la concentración de 120 %).....	90
Figura 41. Exactitud (principio activo + matriz a la concentración de 80 %).....	90
Figura 42. Exactitud (principio activo + matriz a la concentración de 100 %).....	91
Figura 43. Exactitud (principio activo + matriz a la concentración de 120 %).....	91
Figura 44. Espectro de IR Enalapril Maleato.....	95
Figura 45. Espectro de IR Enalaprilat.....	96
Figura 46. Espectro de IR Enalapril Dicetopiperazina.....	97
Figura 47. Cromatopla de Enalapril Maleato y Enalaprilat obtenido con sistema Cromatográfico 1.....	98
Figura 48. Cromatopla de Enalapril Maleato y Enalapril Dicetopiperazina obtenido con sistema cromatográfico 1.....	98
Figura 49. Cromatopla de Enalapril Maleato, Enalaprilat y Enalapril Dicetopiperazina en sistema cromatográfico 2.....	99
Figura 50. Cromatopla de Enalapril Maleato y Enalapril Dicetopiperazina en sistema cromatográfico 2.....	100
Figura 51. Cromatopla de Enalapril Maleato y Enalaprilat en sistema cromatográfico 2.....	100
Figura 52. Barrido espectral de absorción de las soluciones de Enalapril Maleato y Productos de degradación.....	101
Figura 53. Barrido espectral de Enalapril Maleato.....	102
Figura 54. Barrido espectral de Producto de degradación Enalaprilat.....	102
Figura 55. Barrido espectral de Enalapril Dicetopiperazina.....	103
Figura 56. Pureza de pico de Ácido Maleíco.....	103
Figura 57. Pureza de pico de Enalaprilat USP, producto de degradación.....	104
Figura 58. Topograma en 3D de Enalaprilat producto de degradación.....	105
Figura 59. Cromatograma de Identificación por Cromatografía Líquida de Alta Performance de Enalaprilat producto de degradación.....	105
Figura 60. Pureza de pico de Enalapril, principio activo.....	106
Figura 61. Topograma en 3D de Enalapril principio activo.....	106
Figura 62. Cromatograma de Identificación por Cromatografía Líquida de Alta Performance de Enalapril principio activo.....	107
Figura 63. Pureza de pico de Enalapril Dicetopiperazina producto de degradación.....	107
Figura 64. Topograma en 3D de Enalapril Dicetopiperazina producto de degradación..	108



Figura 65. Cromatograma de Identificación por Cromatografía Líquida de Alta Performance de Enalapril Dicotopiperazina.....	108
Figura 66. Experimento 1 (Diseño factorial fraccionado).....	110
Figura 67. Experimento 2 (Diseño factorial fraccionado).....	111
Figura 68. Experimento 3 (Diseño factorial fraccionado).....	111
Figura 69. Experimento 4 (Diseño factorial fraccionado).....	111
Figura 70. Experimento 5 (Diseño factorial fraccionado).....	112
Figura 71. Experimento 6 (Diseño factorial fraccionado).....	112
Figura 72. Experimento 7 (Diseño factorial fraccionado).....	112
Figura 73. Experimento 8 (Diseño factorial fraccionado).....	113
Figura 74 Gráfica normal de efectos para el Factor de asimetría de Ácido Maleíco.....	114
Figura 75. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta del Factor de Asimetría de Ácido Maleíco.....	114
Figura 76. Gráfica de efectos normales para los platos teóricos de Ácido Maleíco.....	115
Figura 77. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de los platos teóricos de Ácido Maleíco.....	115
Figura 78. Gráfica normal de efectos para el factor de asimetría de Enalaprilat.....	116
Figura 79. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta el Factor de asimetría de Enalaprilat.....	117
Figura 80. Gráfica de los efectos normales para la respuesta de platos teóricos Enalaprilat.....	117
Figura 81. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de platos teóricos de Enalaprilat.....	118
Figura 82. Gráfica de efectos normales para la respuesta de resolución de Enalaprilat..	118
Figura 83. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de la Resolución de Enalaprilat.....	119
Figura 84. Gráfica de efectos normales para la respuesta de resolución de Enalapril....	120
Figura 85: Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta del Factor de Asimetría de Enalapril.....	120
Figura 86. Gráfica de efectos normales para la respuesta de platos teóricos de Enalapril	121
Figura 87. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de platos teóricos de Enalapril.....	121
Figura 88. Gráfica de efectos normales para la respuesta de resolución de Enalapril....	122
Figura 89. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de resolución de Enalapril.....	122
Figura 90. Gráfica de efectos normales para la respuesta de Factor de Asimetría de Enalapril Dicotopiperazina.....	123

Figura 91. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de Factor de Asimetría de Enalapril Dicetopiperazina.....	124
Figura 92. Gráfica de efectos normales para la respuesta de platos teóricos de Enalapril Dicetopiperazina.....	124
Figura 93. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de platos teóricos de Enalapril Dicetopiperazina.....	125
Figura 94. Gráfica de efectos normales para la respuesta de resolución de Enalapril Dicetopiperazina.....	125
Figura 95. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de la resolución de Enalapril Dicetopiperazina.....	126
Figura 96. Gráfica de regresión lineal de estabilidad de la solución estándar (24h).....	127
Figura 97. Gráfica de residuos de estabilidad de la solución estándar (24h).....	128
Figura 98. Gráfica de regresión lineal de estabilidad de la solución estándar (18h).....	129
Figura 99. Gráfica de residuos de estabilidad de la solución estándar (18h).....	130
Figura 100. Gráfica de regresión lineal de estabilidad de la solución estándar (12h).....	131
Figura 101. Gráfica de residuos de estabilidad de la solución estándar (12h).....	132
Figura 102. Gráfica de regresión lineal de estabilidad de la solución estándar (8h).....	133
Figura 103. Gráfica de residuos de estabilidad de la solución estándar (8h).....	134
Figura 104. Gráfica de línea ajustada estabilidad de la muestra (24 h).....	136
Figura 105. Gráfica de residuos para la estabilidad de la muestra (24 h).....	136
Figura 106. Gráfica de línea ajustada de la solución aptitud de sistema (Enalaprilat)....	139
Figura 107. Gráfica de residuos para Enalaprilat de la solución aptitud de sistema.....	140
Figura 108. Gráfica de línea ajustada de la solución aptitud de sistema (Enalapril).....	141
Figura 109. Gráfica de residuos para Enalapril de la solución aptitud de sistema.....	142
Figura 110. Gráfica de línea ajustada de la solución aptitud de sistema (Enalapril Dicetopiperazina).....	143
Figura 111. Gráfica de residuos de la solución aptitud de sistema (Enalapril Dicetopiperazina).....	144
Figura 112. Reporte de Aptitud de Sistema de Ácido Maleíco.....	146
Figura 113. Reporte de Aptitud de Sistema de Enalaprilat.....	147
Figura 114. Reporte de Aptitud de Sistema de Enalapril.....	147
Figura 115. Reporte de Aptitud de Sistema de Dicetopiperazina.....	148
Figura 116. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	149
Figura 117. Blanco de Hidrólisis ácida con reflujo.....	150
Figura 118. Hidrólisis ácida con reflujo (principio activo).....	150
Figura 119. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	152
Figura 120. Blanco de Hidrólisis ácida sin reflujo.....	152
Figura 121. Cromatograma de Hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo).....	153

Figura 122. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	154
Figura 123. Blanco de hidrólisis alcalina sin reflujo.....	154
Figura 124. Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo).....	155
Figura 125. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	156
Figura 126. Blanco de hidrolisis alcalina con reflujo.....	156
Figura 127. Hidrólisis alcalina con reflujo (principio activo).....	156
Figura 128. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	157
Figura 129. Blanco Hidrólisis neutra sin reflujo.....	158
Figura 130. Hidrólisis neutra sin reflujo (principio activo).....	158
Figura 131. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	159
Figura 132. Blanco de Hidrólisis neutra con reflujo.....	159
Figura 133. Hidrólisis neutra con reflujo (principio activo).....	160
Figura 134. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	162
Figura 135. Blanco de Oxidación sin reflujo.....	162
Figura 136. Oxidación sin reflujo.....	162
Figura 137. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	163
Figura 138. Blanco de Oxidación con reflujo.....	164
Figura 139. Oxidación con reflujo (principio activo).....	164
Figura 140. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	165
Figura 141. Termólisis a la temperatura de 60 °C por 24 horas.....	165
Figura 142. Termólisis a la temperatura de 80 °C por 24 horas.....	166
Figura 143. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	166
Figura 144. Termólisis a la temperatura de 60 °C por 48 horas.....	166
Figura 145. Termólisis a la temperatura de 80 °C por 48 horas.....	167
Figura 146. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	168
Figura 147. Resultados de degradación por Fotólisis.....	168
Figura 148. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	169
Figura 149. Blanco de Hidrólisis ácida sin reflujo.....	170
Figura 150. Hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo + matriz de la tableta).....	170
Figura 151. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	171
Figura 152. Blanco de Hidrolisis ácida con reflujo.....	172
Figura 153. Cromatograma de Hidrolisis ácida con reflujo (principio activo + matriz)..	172
Figura 154. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	174
Figura 155. Blanco de hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo + matriz).....	175
Figura 156. Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo + matriz).....	175
Figura 157. Estándar de Enalapril Maleato sin stress.....	176
Figura 158. Blanco de hidrolisis alcalina con reflujo.....	177
Figura 159. Hidrólisis alcalina con reflujo (principio activo + matriz).....	177

Figura 160. Solución estándar (sin interferencia).....	179
Figura 161. Solución estándar + matriz (con interferencia).....	179
Figura 162. Cromatograma de la matriz de la Enalapril Maleato.....	180
Figura 163. Cromatograma de la fase móvil.....	180
Figura 164. Cromatograma del blanco.....	180
Figura 165. Gráfica de caja para las áreas del Estándar en Especificidad.....	181
Figura 166. Gráfica de caja para las Áreas del estándar + matriz en Especificidad.....	181
Figura 167. Grafica de Probabilidad de Área del Estándar, Especificidad.....	182
Figura 168. Grafica de Probabilidad de Área del Estándar + matriz, Especificidad.....	182
Figura 169. Prueba de varianzas iguales: Estándar (Áreas), Estándar + matriz (Áreas)..	183
Figura 170. Cromatograma de la Linealidad de Sistema.....	185
Figura 171. Cromatograma de la Linealidad de Sistema al 80 %.....	186
Figura 172. Cromatograma de la Linealidad de Sistema al 90 %.....	186
Figura 173. Cromatograma de la Linealidad de Sistema al 100 %.....	186
Figura 174. Cromatograma de la Linealidad de Sistema al 110 %.....	187
Figura 175. Cromatogramas de la Linealidad de Sistema al 120 %.....	187
Figura 176. Grafica de Linealidad de Sistema.....	187
Figura 177. Graficas de residuos para la linealidad del Sistema.....	188
Figura 178. Cronogramas de Linealidad de Método.....	191
Figura 179. Cromatograma de la Linealidad de Método al 80 %.....	192
Figura 180. Cromatograma de la Linealidad de Método al 90 %.....	192
Figura 181. Cromatograma de la Linealidad de Método al 100 %.....	192
Figura 182. Cromatograma de la Linealidad de Método al 110 %.....	193
Figura 183. Cromatograma de la Linealidad de Método al 120 %.....	193
Figura 184. Grafica de Linealidad del método.....	193
Figura 185. Graficas de residuos para la linealidad del Sistema.....	194
Figura 186. Cromatograma del Estándar de Exactitud a la concentración de 80 %.....	197
Figura 187. Cromatograma del Estándar de Exactitud a la concentración de 100 %.....	198
Figura 188. Cromatograma del Estándar de Exactitud a la concentración de 120 %.....	198
Figura 189. Cromatograma de la muestra de Exactitud a la concentración de 80 %.....	198
Figura 190. Cromatograma de la muestra de Exactitud a la concentración de 100 %.....	199
Figura 191. Cromatograma de la muestra de Exactitud a la concentración de 120 %.....	199
Figura 192. Gráfica de caja del % recuperación.....	200
Figura 193. Prueba de Normalidad para los % de recuperación, Exactitud.....	201
Figura 194. Gráfica de caja de % recuperación.....	202
Figura 195. Informe resumen de las áreas e intervalo de confianza para la Repetibilidad del sistema instrumental.....	204
Figura 196. Informe resumen de % de recuperación e intervalo de confianza.....	207

---

Figura 197. Informe de datos estadísticos de Analista “X” .....210  
Figura 198. Informe de datos estadísticos de Analista “Y” .....212  
Figura 199. Gráfica de residuos para el % de recuperación.....214  
Figura 200. Gráfica de efectos principales para el % de Recuperación.....215  
Figura 201. Gráfica de interacción para el % de Recuperación.....216  
Figura 202. Cromatograma de Enalapril Maleato tableta Producto Terminado.....216  
Figura 203. Pureza de pico de Enalapril Maleato tableta Producto Terminado.....217  
Figura 204. Topograma en 3D Enalapril Maleato tableta Producto Terminado.....217

<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Propiedades Fisicoquímicas del Enalapril Maleato.....	24
Tabla 2. Datos Farmacocinéticos del Enalapril Maleato.....	26
Tabla 3. Sistemas cromatográficos de acuerdo al tipo de compuesto.....	32
Tabla 4. Características analíticas típicas utilizadas para la validación de métodos.....	40
Tabla 5. Datos requeridos para la validación.....	40
Tabla 6. Fórmula de la tableta Enalapril 10 mg, Tableta.....	52
Tabla 7. Diseño factorial fraccionada.....	64
Tabla 8. Variables de diseño factorial fraccionando.....	64
Tabla 9. Matriz de diseño factorial fraccionada.....	64
Tabla 10. Estabilidad de la solución estándar, muestra y solución aptitud.....	64
Tabla 11. Temperaturas de Termólisis.....	75
Tabla 12. Linealidad de sistema (principio activo).....	82
Tabla 13. Linealidad de método (principio activo y matriz).....	85
Tabla 14. Matriz de Exactitud.....	88
Tabla 15. Matriz de Repetibilidad del sistema (principio activo).....	92
Tabla 16. Matriz de Repetibilidad del método (principio activo).....	92
Tabla 17. Matriz de Repetibilidad del método (principio activo).....	92
Tabla 18. Matriz de determinación de precisión intermedia .....	93
Tabla 19. Comprobación de la metodología con producto terminado.....	93
Tabla 20. Resultados de Valor Rf del sistema cromatográfico 1 .....	99
Tabla 21. Resultados de Valor Rf del sistema cromatográfico 2.....	101
Tabla 22. Diseño factorial fraccionada.....	109
Tabla 23. Matriz de diseño factorial fraccionada.....	110
Tabla 24. Experimentos de acuerdo al diseño factorial fraccionada.....	110
Tabla 25. Parámetros cromatográficos para Ácido Maleíco para los experimentos según diseño factorial fraccionada.....	113
Tabla 26. Parámetros cromatográficos para Enalaprilat para los experimentos según diseño factorial fraccionada.....	116
Tabla 27. Parámetros cromatográficos para Enalapril para los experimentos según diseño factorial fraccionada.....	119
Tabla 28. Parámetros cromatográficos para Enalapril Dicotopiperazina para los experimentos según diseño factorial fraccinada.....	123
Tabla 29. Resultados de estabilidad de las soluciones estándar.....	127
Tabla 30. Resultados de estabilidad de las soluciones muestra.....	135
Tabla 31. Resultados de estabilidad de la solución aptitud de sistema.....	138

Tabla 32. Resultados aptitud de sistema.....	145
Tabla 33. Resultados de Hidrólisis ácida con reflujo.....	151
Tabla 34. Resultados de Hidrolisis acida sin reflujo.....	153
Tabla 35. Resultados de Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo).....	155
Tabla 36. Resultados de Hidrolisis alcalina con reflujo (principio activo).....	157
Tabla 37. Resultados de Hidrólisis neutra sin reflujo.....	158
Tabla 38. Hidrolisis neutro con reflujo (principio activo).....	160
Tabla 39. Oxidación sin reflujo (principio activo).....	163
Tabla 40. Oxidación con reflujo (principio activo).....	164
Tabla 41. Resultados de la termólisis a 60 °C.....	167
Tabla 42. Cinética de reacción a 60 °C.....	167
Tabla 43. Resultados de la termólisis a 80 °C.....	167
Tabla 44. Cinética de reacción a 80 °C.....	168
Tabla 45. Resultados de Fotolisis (principio activo).....	169
Tabla 46. Resultados de la hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo y matriz).....	170
Tabla 47. Resultados de Hidrolisis acida con reflujo (principio activo + matriz).....	173
Tabla 48. Resultados de Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo + matriz).....	176
Tabla 49. Resultados de Hidrolisis alcalina con reflujo (principio activo + matriz).....	177
Tabla 50. Resultados de Especificidad.....	179
Tabla 51. Resultados de Linealidad de sistema.....	185
Tabla 52. Resultados de Linealidad del método.....	191
Tabla 53. Resultados de Exactitud.....	200
Tabla 54. Resultados de Repetibilidad del sistema instrumental.....	204
Tabla 55. Valor de aceptación para la Repetibilidad del sistema instrumental.....	205
Tabla 56. Resultados de Repetibilidad del método.....	206
Tabla 57. Valor de aceptación para la Repetibilidad del método.....	208
Tabla 58. Resultados de Presión intermedia, analista “X” y “Y”.....	209
Tabla 59. Valor de aceptación para la Precisión intermedia.....	211
Tabla 60. Valor de aceptación para la Precisión intermedia.....	213
Tabla 61. Datos de Valoración de Enalapril Maleato tableta, Producto Terminado.....	218
Tabla 62. Rendimiento de Enalapril Maleato en tableta, Producto Terminado.....	218

## ABREVIACIONES

1. ICH (Conferencia Internacional de Armonización)
2. AGEMED (Agencia Estatal de Medicamentos y Tecnología de medicamentos)
3. OMS (Organización Mundial de la Salud)
4. HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia)
5. SIAM (Método Indicador de Estabilidad)
6. TLC (Cromatografía en Capa Fina)
7. HPTLC (Cromatografía en Capa Fina de Alto Rendimiento)
8. GC (Cromatografía de gases)
9. CE (Electroforesis Capilar)
10. Log P (Logaritmo decimal del coeficiente de partición)
11. LC-MS (Espectrometría de masas de barrido completo)
12. LC-MS-MS (Espectrometría de masas de Tandem)
13. ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina)
14. IECA (Inhibidor de la enzima convertidora de Angiotensina)
15. DKP (Enalapril Dicitopiperazina)
16. CI (Certificación de Instalación)
17. CO (Certificación de operación)
18. CF (Certificación funcional)
19. POE (Procedimiento Operativo Estandarizado)
20. AEFI (Asociación Española de Farmacéuticos)
21. DER (Desviación Estándar Relativa)
22. P (Valor de Probabilidad Estadística)
23.  $H_0$  (Hipótesis Nula)
24.  $H_1$  (Hipótesis Alterna)
25. DAD (Arreglo de Diodos)
26. ANOVA (Análisis de Varianza)



## CAPÍTULO I



---

## INTRODUCCIÓN

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

Desde tiempos lejanos la estabilidad de los fármacos y medicamentos ha sido de preocupación, dado que eran evidentes los cambios organolépticos con el transcurso del tiempo. Posteriormente se detectaron nuevas problemáticas que surgían a partir de incompatibilidades entre los componentes de la formulación. Recién a mediados del siglo XIX comenzaron los estudios de compatibilidad (Ercolano, 2009).

Uno de los primeros estudios estuvo orientado a la incompatibilidad de la aspirina y estearato de magnesio, esta situación se detectaba organolépticamente a partir del olor a ácido acético, aunque aún no se llegaba a efectuar la cuantificación.

Hasta el año 1950 se disponía de métodos cuantitativos colorimétricos, biológicos y microbiológicos, que permiten detectar al principio activo en presencia de sus productos de degradación. Estos métodos fueron aplicados inicialmente para el análisis de la vitamina D, Penicilina y tetraciclinas (Ercolano, 2009).

Con el avance de la tecnología se disponen de nuevos equipos y ya a comienzos del año 1950 se utilizan los métodos espectrofotométricos tales como Ultravioleta, esta técnica solamente es aplicada a un estudio de estabilidad cuando se destruye el cromóforo que se mide y siempre que los productos de degradación no los contenga. Alrededor del año 1960, se empieza a utilizar la cromatografía en placa delgada (TLC), que asociada a la espectroscopía UV permite desarrollar métodos semicuantitativos específicos.

A finales de año 1960, se aplica la cromatografía de alta eficiencia HPLC, un método separativo por excelencia que permite la detección de impurezas, productos de degradación y cuantificar el principio activo de manera específica (Ercolano, 2009).

Actualmente la literatura revela un gran número de métodos reportados como métodos indicadores de estabilidad, sin embargo, la mayoría de los métodos indicados no siguen cumplimiento de los requisitos normativos actuales.

Algunos otros aspectos como la idoneidad de los métodos de la farmacopea para el propósito y la función de evaluación de la estabilidad con métodos analíticos indicadores de

estabilidad de sustancias y productos biológicos / biotecnológicos también son de importancia bibliográfica para el desarrollo de dichos métodos.

Si bien el requisito actual el de someter el fármaco a una variedad de las condiciones de estrés y posterior separación de fármaco a partir de todos los productos de degradación, muchos estudios simplemente han demostrado la separación del fármaco a partir de impurezas de síntesis conocidos y / o productos potenciales de degradación sin someterla a cualquier tipo de estrés.

La finalidad de un método indicador de estabilidad es la de proporcionar un método que permita la separación y cuantificación del principio activo en presencia de posibles productos de degradación e impurezas.

La realización de un estudio de estabilidad con un método indicador de estabilidad permite la obtención de resultados confiables y seguros.

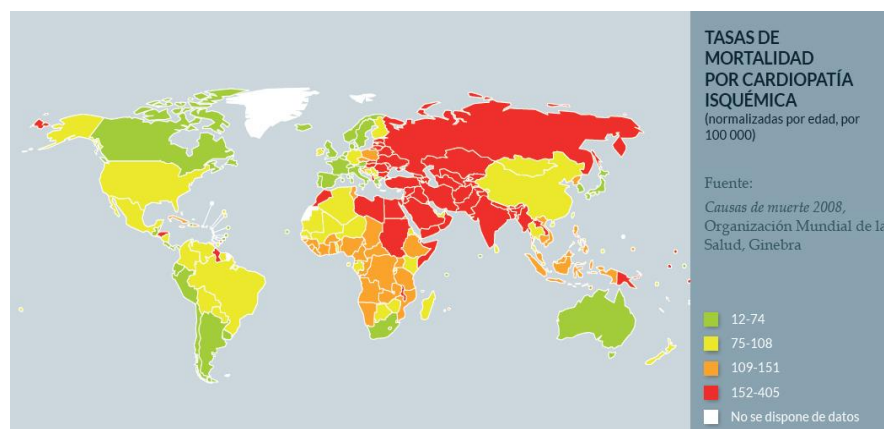
Se han desarrollado varios métodos indicativos de estabilidad para la cuantificación de Enalapril Maleato, en algunos de ellos, los tiempos de análisis son demasiados largos para una aplicación de rutina en el laboratorio, y en otros, donde el método como tal no permite la separación del principio activo de sus productos de degradación. El desarrollo y validación de un método analítico indicador de estabilidad para la cuantificación de Enalapril Maleato tableta por cromatografía líquida de alta eficiencia tomando como referencia lo establecido en la guía ICHQ2(R) permite contar con un método que nos ayuda a monitorizar la degradación cinética del principio activo en función de la temperatura, humedad y tiempo en estudios de estabilidad acelerada o en tiempo real del fármaco.

El Enalapril Maleato tableta es el medicamento de primera elección como agente que actúa directamente en el sistema renina- angiotensina a nivel cardiovascular según el listado esencial de medicamentos esenciales Liname (Agencia Estatal de Medicamentos y Tecnología en Salud (AGEMED), 2018).

La hipertensión es un factor de riesgo clave de las enfermedades cardiovasculares prevalentes que afecta ya a mil millones de personas en el mundo.

En el mundo, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año, casi un tercio del total (Causas de muerte 2008, Ginebra, 2008).

Entre ellas, las complicaciones de la hipertensión causan anualmente 9.4 millones de muertes (Lim SS, 1190 - 2010). La hipertensión es la causa de por lo menos el 45% de las muertes por cardiopatías y el 51% de las muertes por accidente cerebrovascular (la mortalidad total por accidente cerebrovascular (Organización mundial de la Salud, 2010)



En 2008, en el mundo se habían diagnosticado de hipertensión aproximadamente el 40% de los adultos mayores de 25 años; el número de personas afectadas aumentó de 600 millones en 1980 a 1000 millones en 2008. La máxima prevalencia de hipertensión se registra en la Región de África, con un 46% de los adultos mayores de 25 años, mientras que la más baja se observa en la Región de las Américas, con un 35%. En general, la prevalencia de la hipertensión es menor en los países de ingresos elevados (35%) que en los países de otros grupos de ingresos, en los que es del 40% (Organización mundial de la Salud, 2010).

En los países de ingresos bajos y medianos la hipertensión no solo es más prevalente, sino que también hay más personas afectadas por ella porque el número de habitantes de esos países es mayor que el de los países de ingresos elevados. Además, a causa de la debilidad de los sistemas de salud, el número de personas hipertensas sin diagnóstico, tratamiento ni control de la enfermedad también es más elevado en los países de ingresos bajos y medianos que en los países de ingresos elevados (Organización mundial de la Salud, 2010).

Casi el 80% de las muertes por enfermedades cardiovasculares corresponden a países de ingresos bajos y medianos. Estos países son los que están en peores condiciones para hacer frente a las consecuencias sociales y económicas de la mala salud. Las tasas actuales de mortalidad normalizadas por edad en los países de ingresos bajos son más altas que las de los países desarrollados.

Uno de cada tres adultos bolivianos tiene hipertensión arterial y poco más del 30 % desconoce que sufre este mal. Entre jóvenes de 20 a 30 años el índice de riesgo es del 10 % pero se incrementa a 50 % en mayores de 50 años (Organización mundial de la Salud, 2010).

## 1.2 Justificación

El desarrollo, estandarización y validación de un método analítico indicador de estabilidad para Enalapril Maleato Tableta es importante por la necesidad de contar con un método que nos permita detectar, monitorear al principio activo en presencia de posibles productos de degradación que podrían generarse durante la etapa de fabricación y la vida útil del producto terminado dentro de un Estudio de estabilidad.

Si bien en la actualidad se cuentan con métodos analíticos para el análisis de las formas farmacéuticas descritas en las Farmacopeas aplicadas al análisis rutinario de Control de Calidad de Producto Terminado, los métodos descritos no demuestran ser indicadoras de Estabilidad por lo que se requiere validar el método según lo descrito en las Buenas Prácticas de Manufactura.

“Se validarán o verificarán los métodos analíticos y se registrará tanto la exactitud como la precisión (desviaciones estándar) correspondientes. Se escogerán los métodos de valoración que sean indicativos de la estabilidad. Habrá que validar las pruebas para los compuestos afines o productos de descomposición, a fin de demostrar que son específicas en relación con el producto que se examina y que poseen suficiente sensibilidad”

Para el desarrollo de un nuevo producto, tanto en la etapa de selección de formulaciones (respecto a la estabilidad), así como en sistemas envase – cierre, para la determinación del tiempo de conservación y las condiciones de almacenamiento, para la verificación de posibles cambios en la formulación o en el proceso de fabricación, para el seguimiento del

producto durante su vida útil es una necesidad el contar con un método selectivo que cumpla los requerimientos necesarios para la realización de los Estudios de Estabilidad ya sean acelerados o a tiempo real.

No hay una guía que indique las directrices para el desarrollo de un método indicador de estabilidad, sin embargo, las directrices están dirigidas a la realización de estudios de descomposición en condiciones de estrés, para conocer las rutas de descomposición del principio activo con la finalidad de desarrollar un método selectivo y específico para la separación del principio activo de los posibles productos de degradación generados en las rutas de degradación.

### **1.3 Planteamiento del Problema**

En la actualidad los medicamentos comercializados en Bolivia, aún no cuentan con Estudios de Estabilidad seguros y confiables; debido a que las condiciones para su ejecución carecen de requisitos tales como el de contar con un método analítico indicador de Estabilidad.

Un método analítico indicador de estabilidad permite la cuantificación inequívoca de los principios activos frente a posibles productos de degradación e impurezas generados durante el tiempo de vida útil del medicamento, lo que garantiza que los resultados generados durante un estudio de estabilidad ya sea acelerado o a tiempo real sean confiables y seguros, no contar con los mismos implica una barrera en el cumplimiento de requisitos para cuestiones de exportación de los medicamentos fuera del país.

El aseguramiento de la calidad de un producto farmacéutico refiere acciones planificadas, documentadas y sistemáticas, las cuales son necesarias para proveer confianza, que un proceso cumpla los requisitos de calidad establecidos en las Buenas Prácticas de Manufactura. En este marco se encuentran los requerimientos para los métodos analíticos a ser propuestos en un estudio de estabilidad de medicamentos. El contar con un método analítico indicador de estabilidad es un requisito indispensable dentro de un programa de estudios de estabilidad ya que los resultados generados deben permitir la obtención de valores específicos y confiables para el control de calidad de los principios activos y asegurar que todo medicamento de venta en el mercado sea estable, seguro y eficaz.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

- Desarrollar, estandarizar y validar un método analítico indicador de estabilidad para la cuantificación de Enalapril Maleato en Tableta por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), que permita disponer de un estudio de estabilidad seguro y confiable para determinar la vida útil del producto farmacéutico.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar las características Fisicoquímicas del principio activo Enalapril Maleato.
- Conocer los factores ambientales que puedan alterar al principio activo, los mecanismos de degradación y las posibles rutas de descomposición del fármaco.
- Desarrollar un método analítico confiable, sencillo, de rápida ejecución para la cuantificación de Enalapril Maleato en tableta.
- Estandarizar el método analítico desarrollado para cuantificación de Enalapril Maleato en tabletas.
- Validar el método analítico desarrollado cumpliendo los parámetros de selectividad, especificidad, linealidad, exactitud y precisión y robustez.

## 1.5 Hipótesis

El método analítico indicador de estabilidad permite la cuantificación del principio activo Enalapril Maleato sin la interferencia de los excipientes de la tableta y productos de degradación; demostrando que el método es selectivo para la realización de estudios de estabilidad confiables y cumple con los requisitos de validación de un método analítico.

## CAPÍTULO II



---

## MARCO TEÓRICO



---

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Introducción

La validación de los métodos analíticos garantiza la calidad del medicamento, puesto que les confiere fiabilidad a los resultados obtenidos en el análisis, asegurando así, que el medicamento cumpla los parámetros de calidad establecidos. El Enalapril Maleato es un fármaco de amplia demanda en los hospitales, motivo por el cual se produce en grandes cantidades y se hace necesario validar el método de análisis para obtener resultados confiables. Así mismo este trabajo aporta un protocolo de validación, el mismo que proporcionará una base para las futuras validaciones de métodos indicadores de estabilidad

Por otro parte la validación de métodos analíticos indicativos de estabilidad es un requisito para la realización de un estudio de estabilidad según las directrices para las pruebas de estabilidad de productos farmacéuticos que contienen sustancias medicamentosas bien establecidas en formas farmacéuticas corrientes según el informe 43, Anexo 2 de la OMS “Se validarán o verificarán los métodos analíticos y se registrará tanto la exactitud como la precisión (desviaciones estándar) correspondientes. Se escogerán los métodos de valoración que sean indicativos de la estabilidad. Habrá que validar las pruebas para los compuestos afines o productos de descomposición, a fin de demostrar que son específicas en relación con el producto que se examina y que poseen suficiente sensibilidad”

### 2.2 Generalidades

Basado en la Conferencia Internacional de Armonización ICH Q1A (R2), “el propósito de las pruebas de estabilidad es proporcionar evidencia sobre cómo la calidad de una sustancia o producto farmacéutico varía con el tiempo bajo la influencia de una variedad de factores ambientales como la temperatura, la humedad y la luz. Por lo tanto, los estudios de estabilidad proporcionan datos para justificar la condición de almacenamiento y vida útil del medicamento, para los fármacos, tales estudios establecen la fecha de prueba adicional además de las condiciones de almacenamiento de la materia prima. La estabilidad de una sustancia o producto farmacológico durante la síntesis, formulación, y el almacenamiento debe ser verificado. La inestabilidad podría conducir a la degradación química y pérdida

de potencia del fármaco y la posible formación de nuevas especies químicas con posibles efectos secundarios tóxicos. Por lo tanto, la evaluación temprana de una sustancia farmacológica debería incluir la aclaración de la estabilidad en una serie de condiciones ambientales. Para ayudar en la predicción de la estabilidad del fármaco, se realiza degradaciones forzadas o aceleradas para dilucidar posibles productos de degradación, determinar su seguridad y desarrollar procedimientos de análisis para cuantificar estas nuevas especies químicas. Estos estudios de degradaciones forzadas pueden predecir las vías de degradación del fármaco en condiciones normales. De hecho, la información obtenida al estudiar la cinética de la degradación puede usarse para extrapolar las tasas de degradación que podrían aplicarse durante las condiciones de almacenamiento y podrían utilizarse para predecir la estabilidad a largo plazo bajo estas condiciones normales de almacenamiento. El desarrollo de métodos analíticos apropiados entonces ayudará en el desarrollo de esquemas de purificación para eliminar degradantes y permitir el desarrollo de perfiles de impurezas de medicamentos que se utilizarán para establecer especificaciones de pureza y para definir el fármaco que se utilizará en animales preclínicos y luego estudios en humanos (Baertschi, 2005).

La evaluación de los estudios de estabilidad química de productos farmacéuticos de moléculas pequeñas se basa principalmente en la disponibilidad de una separación cromatográfica u otro ensayo de separación capaz de separar y cuantificar las principales impurezas y productos de degradación. Se describe un enfoque por etapas para el desarrollo de métodos de HPLC con indicación de estabilidad, consistente con las pautas regulatorias actuales. Se proporcionan recomendaciones prácticas para desarrollar protocolos de degradación forzada en cada etapa del desarrollo de fármacos y así evitar errores comunes que puedan confundir la interpretación de los datos (Baertschi, 2005).

### **2.3 Métodos analíticos indicadores de estabilidad**

Un método analítico indicador de estabilidad es un método que se emplea para el análisis de muestras de estabilidad en la industria farmacéutica. Con el advenimiento de las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), el establecimiento de un

método analítico indicador de estabilidad (SIAM) se ha convertido claramente un requisito. Las directrices exigen explícitamente la realización de estudios de descomposición forzados bajo una variedad de condiciones, tales como el pH, la luz, la oxidación, calor seco, etc., y la separación del fármaco a partir de productos de degradación.

Se espera que el método pueda permitir el análisis de productos de degradación individuales. (Monika Bakshi, 19 de enero de 2002)

La calidad de los datos analíticos generados en las muestras de estabilidad es esencial para completar con éxito los estudios de estabilidad y para la capacidad de sacar conclusiones apropiadas con respecto a la estabilidad del producto bajo prueba. Dado que el propósito de los estudios de estabilidad es monitorear los posibles cambios a un producto o material a lo largo del tiempo y en diferentes condiciones de almacenamiento, se espera que todos los métodos analíticos aplicados en el estudio sean indicadores de estabilidad y que solo aquellos métodos que sean verdaderamente indicadores de estabilidad deban ser utilizados. Usando esta definición amplia, cualquier método desde un método de difracción de rayos X en polvo (XRPD) usado para monitorear cambios de forma cristalina a un método de disolución usado para evaluar cambios en la velocidad de liberación puede considerarse indicativo de estabilidad si se demuestra que puede detectar de manera confiable un cambio fisicoquímico específico del producto / material en cuestión. Sin embargo, para los productos farmacéuticos tradicionales, se ha vuelto común reservar el término indicador de estabilidad para describir el método (generalmente un método cromatográfico) capaz de detectar la degradación química de una sustancia o producto farmacéutico. La directriz Q5C de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) establece claramente que no solo un método en sí indica la estabilidad, sino que la estabilidad solo puede inferirse mediante una combinación de métodos analíticos que analizan la identidad, la pureza y la potencia (o actividad biológica) del principio activo. Un desafío importante en el desarrollo de un método indicador de estabilidad (SIM) es el acceso a muestras degradadas adecuadas para ayudar en el desarrollo del método. En un mundo ideal, estas muestras degradadas

---

serían muestras de estabilidad en tiempo real que contienen todos los degradantes relevantes y solo aquellos degradantes que se forman en condiciones normales de almacenamiento (Baertschi, 2005).

## **2.4 Situación reglamentaria de los ensayos de estabilidad mediante un método analítico indicador de estabilidad**

Las directrices de la ICH se han incorporado como ley en la Unión Europea, Japón y en los EE. UU, pero en realidad, además de estos, otros países también están usando estas directrices a medida que estas reflejan las tendencias actuales de inspección, que llevan la fuerza de facto de la regulación. La directriz ICH Q1A en las pruebas de estabilidad de nuevas sustancias farmacológicas y productos farmacéuticos hace hincapié en las pruebas de aquellas características que son susceptibles a cambiar durante el almacenamiento y que puedan influir en la calidad, la seguridad y / o eficacia de los mismos. Las pruebas deben ser realizadas por métodos indicadores de estabilidad validados. También se menciona que los estudios de descomposición (stress testing) deben realizarse con el principio activo a temperaturas de 10 °C por encima de las temperaturas de un estudio de estabilidad acelerado, pH extremos y bajo condiciones oxidativas y condiciones fotolíticas con el fin de establecer las características inherentes de estabilidad y degradación de las vías de apoyo a la idoneidad de los procedimientos analíticos propuestos (Monika Bakshi, 19 de enero de 2002).

## **2.5 Estudios de degradación forzada**

Los estudios de degradación forzada son un componente esencial en el desarrollo de un método analítico indicador de estabilidad. Hay muchos aspectos que cubrir y el buen juicio científico y el conocimiento son necesarios para garantizar que las muestras de degradación forzada producidas contengan productos de degradación primaria realistas. Existe una gran probabilidad de que se observen muchos más productos de degradación forzada de los que realmente se forman en los ensayos de estabilidad acelerados o en tiempo real. Si se siguen estos criterios, entonces la metodología analítica tiene el potencial máximo para detectar productos de degradación reales formados en pruebas de estabilidad aceleradas o

en tiempo real. Por lo tanto, la ausencia de productos de degradación observables se puede atribuir a la estabilidad de la sustancia del fármaco en lugar de a las deficiencias en la metodología analítica.

La degradación forzada es una degradación del principio activo o del producto farmacológico en condiciones más severas y aceleradas. Los estudios de degradación forzada muestran el comportamiento químico de la molécula que a su vez ayuda en el desarrollo de la formulación y el sistema envase-cierre. (Blessy Mn, Degradación de fármacos, pruebas de stress, Septiembre 2013).

Los resultados de los estudios de degradación forzada también pueden usarse para investigar el mecanismo de degradación de una sustancia farmacéutica en el almacenamiento. A su vez, esta comprensión puede usarse para definir el empaque apropiado para minimizar o eliminar la degradación de la sustancia farmacéutica.

### **2.5.1 Objetivos de los estudios de degradación forzada**

Se llevan a cabo estudios de degradación forzada para lograr las siguientes aplicaciones:

- Establecer vías de degradación de sustancias farmacológicas y productos farmacológicos
- Diferenciar los productos de degradación que están relacionados con el medicamento de aquellos que se generan a partir de productos no farmacológicos en una formulación
- Para dilucidar la estructura de los productos de degradación.
- Determinar la inestabilidad intrínseca de las sustancias farmacológicas, formulación.
- Para revelar los mecanismos de degradación como la hidrólisis, oxidación, termólisis o fotólisis de sustancias farmacológicas y producto farmacológico.
- Establecer la estabilidad que indica la naturaleza del método desarrollado.
- Comprender las propiedades químicas de los principios activos.
- Para generar formulaciones termoestables.
- El perfil de degradación de la producción es similar al de permanecería en el estudio de la estabilidad formal bajo las condiciones ICH
- Resolver problemas relacionados con la estabilidad.

(Blessy Mn, Degradación de fármacos, pruebas de stress, Septiembre 2013).

Las principales vías de degradación son las siguientes:

### 2.5.2 Degradación Hidrolítica

La hidrólisis es la degradación del fármaco que implica reacción con el agua. La hidrólisis y la oxidación son los dos mecanismos más comunes de degradación de fármacos. Las extensas revisiones de la literatura sobre degradación de fármacos son consistentes con su afirmación. Dado que el agua está presente a niveles significativos en muchos medicamentos (por ejemplo, hidratos), en muchos excipientes, e incluso en condiciones atmosféricas normales, no es sorprendente que la hidrólisis sea un problema de degradación común. La hidrólisis se ve afectada por el pH, las sales tampón, la fuerza iónica, el disolvente y otros aditivos, como los agentes complejantes, los tensioactivos y los excipientes. Las reacciones de hidrólisis son típicamente catalizadas por ácidos o bases. Por lo tanto, se deben emplear condiciones ácidas, neutras y básicas para inducir posibles reacciones hidrolíticas. Esto es especialmente importante cuando el compuesto que se prueba tiene (un) grupo (s) funcional (es) ionizable (s) y puede existir en diferentes estados de ionización en condiciones acuosas relevantes. Es particularmente importante asegurarse de probar la hidrólisis en estados de protonación únicos, a menos que haya una gran cantidad de grupos funcionales ionizables, como suele ser el caso de los péptidos y las proteínas. (Baertschi, 2005).

Los principios activos susceptibles de sufrir procesos de hidrólisis son aquellos que tienen en su estructura un grupo éster, amidas y lactamas. La hidrólisis es un proceso frecuentemente catalizado por hidrogeniones (catálisis ácida) o hidroxilos (catálisis básica), así como otras especies ácidas o básicas presentes en los sistemas reguladores (Jato, 2001).

### 2.5.3 Degradación Térmica.

El aumento de la temperatura acelera prácticamente todos los procesos degradativos.

Las variaciones de temperatura, por si solas o en combinación con otras causas de inestabilidad, constituyen sin duda el factor más activo y más permanente de degradación de los medicamentos. Los métodos de envejecimiento acelerado para el estudio de la estabilidad de un medicamento se basan precisamente en medir el efecto que produce, en corto tiempo, un aumento de la temperatura. La velocidad de la mayoría de las reacciones químicas

aumenta al incrementar la temperatura, aproximadamente la velocidad se duplica por cada 10°C de elevación de la misma (Macian, 1996).

La degradación termolítica generalmente se considera a la degradación causada por la exposición a temperaturas suficientemente altas como para inducir la rotura del enlace, es decir, la pirólisis.

El término termolítico describe reacciones que son impulsadas por el calor o la temperatura. Por lo tanto, cualquier mecanismo de degradación a temperaturas elevadas puede considerarse una "vía termolítica". La guía de estabilidad de la ICH sugiere estudiar " el efecto de las temperaturas en incrementos de 10 °C por encima de la condición de prueba de temperatura acelerada (por ejemplo, 50 °C, 60 °C, etc.) ". No está claro por qué la guía lo sugiere. Los incrementos de 10 °C, pueden estar relacionados con la importancia de comprender si los mecanismos de degradación (en estado sólido) cambian o no como resultado del aumento de la temperatura. Los estudios con tales aumentos de temperatura serían útiles para construir diagramas de Arrhenius para permitir la predicción de la degradación en las tasas de estado sólido a diferentes temperaturas; sin embargo, para muchas sustancias farmacéuticas de moléculas pequeñas, tomaría varios meses de almacenamiento a temperaturas elevadas para inducir una degradación suficiente para proporcionar datos cinéticos significativos. (Baertschi, 2005).

La relación de Arrhenius es probablemente la expresión más utilizada para evaluar la relación entre las velocidades de reacción y la temperatura para un orden de reacción dado (para un tratamiento más completo de la ecuación de Arrhenius, el fármaco obedece a la relación de Arrhenius:

$$k = Ae^{-Ea/RT}$$

Donde:

k = grado de constante de velocidad

A = "factor pre-exponencial" o "factor de frecuencia" (es decir, la frecuencia de colisiones entre reactivos independientemente de la energía).

R = Es la constante de gases

T = Es la temperatura en grados en Kelvin.

Es posible estimar el efecto de la temperatura sobre la tasa de degradación de un compuesto, siempre que se conozca la "energía de activación".

#### 2.5.4 Degradaciones Oxidativas

Las reacciones oxidativas son uno de los dos mecanismos más comunes de degradación del fármaco. Las reacciones de degradación oxidativa del fármaco son típicamente auto oxidativas, es decir, la reacción se inicia radicalmente. Las reacciones iniciadas por radicales comienzan con una fase de iniciación que implica la formación de radicales (este paso limita la velocidad), seguida de una fase de propagación y, finalmente, una fase de terminación. Por lo tanto, la cinética de reacción a menudo seguirá una curva en forma de "S" cuando se traza la degradación frente al tiempo y no seguirá la cinética de Arrhenius. En estado sólido, no está claro si las reacciones de degradación oxidativa tienen fases de propagación significativas. Recientemente se ha sugerido que las reacciones de degradación auto oxidativa en formas de dosificación oral sólida no tienen fases de propagación significativas (presumiblemente debido a la falta de movilidad) y, por lo tanto, las desviaciones observadas de la cinética de Arrhenius pueden deberse a diferentes causas (Baertschi, 2005).

#### 2.5.5 Degradación Fitolítica

La degradación fotolítica (como se aplica a la estabilidad farmacéutica) es la degradación que resulta de la exposición a la luz ultravioleta o visible en el rango de longitud de onda de aproximadamente 300–800 nm. Exposición a la radiación a longitudes de onda <300 nm no son necesarias porque un compuesto farmacéutico no experimentaría tal exposición durante su ciclo de vida. La "primera ley" de estados de la fotoquímica [Grotthus (1817) y Draper (1843)] menciona "solo la radiación que es absorbida por una molécula puede ser efectiva en la producción de cambios químicos en la molécula ". Por lo tanto, para que la degradación fotolítica ocurra, la radiación debe ser absorbida, ya sea por la sustancia far-



---

macológica o por la formulación. Por lo tanto, las tasas de fotodegradación dependen directamente de la cantidad de radiación incidente y de la cantidad de radiación que es absorbido por el compuesto o la formulación. Es importante recordar que un compuesto puede sufrir degradación fotolítica incluso si no absorbe la radiación en el UV o región visible. Esto solo puede suceder si hay algún agente adicional presente en la formulación de manera intencional o accidental, que facilita la absorción.

La exposición mínima recomendada descrita en la guía de la ICH Q1B es de 1.2 millones de luz-horas visibles y 200 Watt-hora/m<sup>2</sup> UV, sin embargo, esta exposición no es la recomendada para estudios de degradación forzada. De hecho, no se mencionan las exposiciones recomendadas para estudios de degradación forzada y el diseño se deja abierto.

Un miembro del grupo de trabajo original de expertos en fotoestabilidad de la ICH recomendó una exposición de tres a cinco veces la exposición confirmatoria mínima de ICH para estudios de degradación forzada. Curiosamente, las primeras versiones de la guía (durante el Paso 1 del proceso ICH) sugirieron que los estudios de degradación forzada deben usar exposiciones en el rango de cinco a 10 veces las exposiciones recomendadas. Una foto exposición en el rango de tres a 10 veces la exposición confirmatoria parece una cantidad razonable de fotostress para estudios de degradación forzada, recordando que la fotodegradación del compuesto estudiado más allá de 20-30% no sería necesario (Baertschi, 2005). Sin embargo, la ICH nos recomienda una degradación entre 10 – 30 % del compuesto estudiado.

### **2.5.6 Humedad**

La humedad aumenta la facilidad de oxidación de algunas sustancias, el oxígeno atmosférico disuelto en el agua de humedad es más activo que en estado gaseoso.

Si se tiene en cuenta que dicho efecto es también potenciado por la temperatura, se comprenderá fácilmente la importancia del envase primario como aislante del medicamento frente a los agentes atmosféricos, para su buena conservación especialmente en países tropicales (Macian, 1996).

## 2.6 Revisión de la literatura sobre Métodos Analíticos Indicadores de Estabilidad

En ausencia de cualquier orientación de las agencias reguladoras sobre los pasos prácticos a seguir para el establecimiento de métodos indicadores de estabilidad, en la literatura se puede encontrar una diversidad de publicaciones sobre el desarrollo de métodos indicadores de estabilidad indicando los ensayos a realizar a los principios activos.

Una revisión de los diversos informes de la literatura muestra que muy pocos métodos que se titulan o pretenden ser métodos indicadores de estabilidad encajan en la definición actual.

También hay informes de que el fármaco ha sido descompuesto por exponerla a uno o más condiciones de estrés entre ácido, neutro o alcalino, fotólisis, hidrólisis, oxidación y estrés térmico. Por lo tanto, muy pocos estudios son realmente métodos indicadores de estabilidad, donde el fármaco ha sido expuesto a todo tipo de condiciones de estrés y se han hecho intentos para separar el fármaco de los productos de degradación y de éstos entre sí. Enfoques diferentes han sido empleados en estos casos, en ausencia de requisitos definidos.

### Los métodos cromatográficos

Debido a la propia naturaleza de requisito de separación de múltiples componentes durante el análisis de las muestras de estabilidad, los métodos cromatográficos han tenido prioridad sobre los métodos de análisis convencionales. Aparte de la separación de múltiples componentes, la ventaja de los métodos cromatográficos es que estos poseen una mayor precisión y sensibilidad, incluso para pequeñas cantidades de productos de degradación producidos.

Varios métodos cromatográficos se han utilizado para el desarrollo de métodos indicadores de estabilidad tales como la cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC), cromatografía de gases (GC), HPLC y más reciente técnica como electroforesis capilar (CE).

La cromatografía en capa fina es una técnica sencilla que se ha utilizado en el pasado para el desarrollo de métodos indicadores de estabilidad. Sus desventajas, como la variabilidad y naturaleza no cuantitativa, limitan su uso como una técnica básica para el desarrollo de

---

métodos indicadores de estabilidad. Sin embargo, se utiliza mucho, especialmente durante la degradación inicial y los estudios de estrés para estudiar el número de productos de degradación formados, para identificar los productos formados a través de búsqueda de los estudios que utilizan estándares, e incluso para el aislamiento de productos de degradación donde TLC preparativa es parte del desarrollo.

Un gran número de publicaciones han aparecido en la última década en el uso de HPTLC para el desarrollo de métodos indicadores de estabilidad. Esta técnica supera las deficiencias de los TLC, y es fiable, rápida y precisa para el análisis cuantitativo de fármacos. Por otra parte, muchas muestras se pueden ejecutar simultáneamente usando una pequeña cantidad de fase móvil, reduciendo así al mínimo el tiempo de análisis y el costo por análisis. Por desgracia, su limitación es que el equipo no está disponible rutinariamente en todos los laboratorios.

La cromatografía de gases es una técnica indicadora de la estabilidad, pero no es muy versátil, ya que el fármaco puede ser volátil o térmicamente inestable. Además, cualquier intento de aumentar la volatilidad del fármaco y de los componentes mediante el aumento de la temperatura puede conducir a la degradación o la racemización. Por lo tanto, hay muy pocos informes sobre el uso de GC para el propósito de establecimiento de SIAMS.

En cambio, la cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC ha sido ampliamente empleado ganando popularidad en los estudios de estabilidad debido a su capacidad de alta resolución, sensibilidad y especificidad. Los compuestos iónicos / no volátiles, térmicamente inestables o polares también se pueden analizar con esta técnica (Monika Bakshi, 19 de enero de 2002).

## **2.7 Desarrollo de métodos indicadores de estabilidad validados**

Aunque los requisitos con respecto a los métodos indicadores se han explicado en los documentos normativos, la información sobre los pasos básicos a seguir para el desarrollo y la validación de los métodos de indicador de la estabilidad no es proporcionada en los lineamientos normativos ni en las Farmacopeas.

### 2.7.1 Pasos a seguir para el desarrollo de métodos indicadores de estabilidad

Paso I.- Estudio de la estructura del principio activo para evaluar las probables rutas de descomposición.

Esté debe ser el primer paso cada vez que se proponga desarrollar un método indicador de estabilidad. Mucha de la información de la estructura del fármaco se puede obtener mediante el estudio de los grupos funcionales y otros componentes clave. Hay categorías definidas de grupos funcionales, como amidas, ésteres, lactamas, lactonas, etc., que se someten a hidrólisis, otros como tioles, tioéteres, etc. se someten a la oxidación y compuestos tales como olefinas, derivados de arilo de halo, arilo acético ácidos, y los que tienen grupos nitro aromáticos, N-óxidos experimentan foto descomposición (Singh, 2002).

Paso II: Recopilación de información sobre las Propiedades Fisicoquímicas del principio activo.

Antes de desarrollar un método indicador de estabilidad es importante conocer diversos parámetros fisicoquímicos tales como pKa, log P (logaritmo decimal del coeficiente de partición), solubilidad, capacidad de absorción y la longitud de onda máxima del fármaco en cuestión. El conocimiento de pKa es importante ya que la mayoría de los cambios relacionados con el pH en la retención ocurren a valores de pH dentro de  $\pm 1.5$  unidades del valor pKa.

El valor de ionización también ayuda en la selección del pH del tampón que se utilizará en la fase móvil. El conocimiento de log P (logaritmo decimal del coeficiente de partición) del medicamento y los productos de degradación identificados proporciona una buena penetración en el comportamiento de separación probable que se obtenga en una fase estacionaria en particular. El pKa y log P (logaritmo decimal del coeficiente de partición) se puede determinar prácticamente o incluso teóricamente calculando mediante un software comercial, tales como Palas (Singh, 2002).

El siguiente paso en el desarrollo de métodos indicadores de estabilidad es la realización de estudios de descomposición forzados para generar productos de degradación del fármaco. Las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH Q1A) sugiere

las siguientes condiciones a emplear: Incrementos de 10 °C por encima de las temperaturas aceleradas (por ejemplo, 50 °C, 60 °C, etc.). La humedad en su caso (por ejemplo, 75% o mayor), la hidrólisis en una amplia gama de valores de pH, la Oxidación y Fotólisis.

Sin embargo, la guía no proporciona detalles sobre cómo deben ser realizados los estudios de degradación hidrolítica, fotolítica y oxidativos. Por otra parte, la información está disponible en la literatura, pero de una manera escalonada, con diferentes enfoques sugeridos mucho de unos a otros. Un documento completo que proporciona orientación sobre la ejecución material y los problemas relacionados con las pruebas de estrés bajo diversas condiciones prescritas es la ICH publicado últimamente. Este informe propone un esquema de clasificación y ofrece árboles de decisión para ayudar en la selección del tipo correcto de la condición de estrés en un mínimo número de intentos (Singh, 2002).

La degradación hidrolítica de un nuevo fármaco en condiciones ácidas y alcalinas puede ser estudiado por calentamiento a reflujo del fármaco en HCl / NaOH 0.1 N por 8 h. Si se observa la degradación razonable, la prueba se puede detener en este punto. Sin embargo, en caso de que no se observa degradación en estas condiciones, el fármaco debe ser sometido a reflujo en medio ácido/alcalino de mayores concentraciones y de mayor duración. Alternativamente, si la degradación total se ve después de someter el medicamento a las condiciones iniciales, la concentración de álcali / ácido se puede disminuir, junto con la disminución de la temperatura de reacción. De una manera similar, la degradación en condiciones neutras se puede iniciar calentando a reflujo el fármaco en agua durante 12 h. El tiempo de reflujo se debe aumentar si no se observa degradación (Singh, 2002).

Para la prueba de oxidación, se sugiere utilizar peróxido de hidrógeno en el intervalo de concentración de 3-30%. Los estudios fotolíticos deben llevarse a cabo por exposición a la luz, utilizando una combinación de lámparas de luces blancas y ultravioleta fluorescentes frías, o uno entre las lámparas de xenón y de haluro de metal. La cantidad de energía de exposición deberá ser como mínimo de 1.2 millones lux de luz fluorescente H y 200 W h / m<sup>2</sup> UV y si la descomposición no se ve, la intensidad debe ser incrementado en cinco veces. En caso de que todavía no hay descomposición se lleva a cabo, el fármaco puede ser declarado fotoestable (Singh, 2002).

---

Paso IV: Estudios de separación preliminares sobre muestras de estrés

Las muestras de estrés obtenidos se someten a análisis preliminares para estudiar el número y tipos de productos de degradación formados en diversas condiciones. Para hacerlo, la forma más sencilla es comenzar con una columna de fase inversa de octadecilo de preferencia una nueva o la que esté en buen estado. Las muestras de estrés así obtenidos se someten a análisis preliminares para estudiar el número y tipos de productos de degradación formados en diversas condiciones de stress (Singh, 2002).

Así picos separados y de buena calidad desde el principio proporcionan una mejor confianza debido a la naturaleza desconocida de los productos de degradación formados durante las pruebas de degradación. Se debe preferir el uso de metanol en agua o agua-Acetonitrilo como fase móvil en las etapas iniciales. El uso de tampones no se sugiere en esta etapa porque, como normalmente se requiere, se puede extender la fase móvil libre de tampón para LC preparativa o estudios de LC-MS. Entre el Metanol y el Acetonitrilo, el metanol debe ser de preferencia debido a su bajo costo. El disolvente se puede cambiar, si se considera la forma o la separación de los picos problemas en función a los resultados obtenidos (Singh, 2002).

Inicialmente, la relación de agua con el modificador orgánico puede fijarse a 50:50 o puede ser modificado de manera adecuada para obtener el factor de capacidad entre 5-10 para el fármaco. Los productos de degradación de los fármacos son generalmente de naturaleza polar (por supuesto con excepciones) donde los tiempos de retención pueden ser de 15 min o algo más en una columna de 25 cm, puede resultar en la separación de incluso varios productos de degradación, cuando se forman. El tiempo de retención puede aumentar o disminuir al cambiar la fase móvil, pero no debe extenderse demasiado ya que esto podría llevar a un aumento general en la resolución, pero disminución de la sensibilidad en la detección de los picos. El volumen de inyección y la velocidad de flujo se pueden ajustar de forma adecuada basándose en la longitud de la columna.

El uso de las condiciones cromatográficas desarrolladas debe seguir los cambios en todas las muestras de estrés, en diferentes períodos de tiempo. Los resultados deben ser comparados críticamente con las soluciones blanco inyectados de una manera similar. Se debe

observar si la disminución del pico del fármaco es seguida cuantitativamente por un aumento correspondiente en los picos de los productos de degradación.

#### Paso V: Desarrollo final del método y Optimización

Después de los estudios preliminares de las condiciones cromatográficas, los tiempos de retención relativos de todos los productos formados, los datos deben ser tabulados para cada condición de estrés. Se presta especial atención a aquellos componentes cuyo tiempo de retención son muy cercanos entre sí. Los espectros de perfil de LC-MS de tales componentes se obtienen y evalúan críticamente para determinar si los productos son iguales o diferentes. Para separar los picos cercanos, se optimiza el método, cambiando la relación de fase móvil, pH, gradiente, tasa, temperatura, tipo de disolvente, y la columna y su tipo de flujo (Singh, 2002).

#### Paso VI: Identificación y caracterización de los productos de degradación.

Antes de pasar a la validación de un método indicador de estabilidad, es necesario identificar los productos de degradación del principio activo. Estos son necesarios para establecer la especificidad / selectividad del método, puede iniciarse una vez que se obtiene una idea de la naturaleza y el número de productos de degradación formados en diferentes condiciones de degradación a partir de estudios de separación preliminares.

Para identificar los productos de degradación resueltos, de una manera convencional es necesario aislar y determinar la estructura a través del análisis espectral (MS, NMR, IR, etc.) y el análisis elemental. Sin embargo, este enfoque es tedioso y consume mucho tiempo cuando se forman múltiples productos de degradación. Frente a ello, el moderno enfoque es utilizar técnicas de LC junto con espectrometría de masas. Esta estrategia se integra en una sola aproximación por instrumentos tales como HPLC, espectrofotómetro UV- VIS espectrometría de masas de barrido completo (LC - MS) y espectrometría de masas en tándem (LC - MS - MS) y proporciona una idea clara sobre la identidad de los componentes a resolver (Singh, 2002).

### **2.8 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

La cromatografía líquida de alta eficiencia es un método de separación de diferentes componentes de una muestra, este método logra la separación de los mismos a través del paso

de una muestra por una fase estacionaria con la ayuda de la fase móvil, cada componente de la muestra tiene propiedades particulares que permitirá su interacción en forma diferente entre la fase estacionaria y móvil, de esta forma cada componente se retrasa en forma particular y si el caudal, las características de la fase estacionaria y móvil y la longitud de la columna son las adecuadas se logrará la separación completa de todos los componentes de la muestra. El principal objetivo de un estudio cromatográfico es lograr la separación de todos los componentes en una muestra, para ello es necesario jugar con una serie de factores cromatográficos, es por ello que es necesario conocer cómo están relacionados los diferentes factores experimentales con las ecuaciones cromatográficas (QUIMICA, 2008).

## 2.9 Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas del Enalapril Maleato

### 2.9.1 Descripción

El Enalapril Maleato se usa solo o en combinación con otros medicamentos para tratar la presión arterial alta, también se usa en combinación con otros medicamentos para tratar la insuficiencia cardíaca y la nefropatía diabética. El Enalapril Maleato pertenece a una clase de medicamentos llamados inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina que actúa disminuyendo determinadas sustancias químicas que contraen los vasos sanguíneos, de modo que la sangre fluye mejor y el corazón puede bombearla con mayor eficiencia (Medline Plus, 2015).

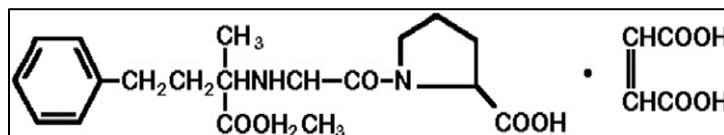
**Tabla 1.- Propiedades Fisicoquímicas del Enalapril Maleato**

Propiedades fisicoquímicas del Enalapril Maleato	
Nombre químico (IUPAC)	L-Proline, 1-[N-[1-(ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-L-alanyl]-, (S)-, (Z)-2-butenedioate (1:1). 1-[N-[(S)-1-Carboxy-3-phenylpropyl]-L-alanyl]-L-proline 1-ethyl ester, maleate (1:1).
Fórmula molecular	$C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O$
Peso molecular	492.52 g/mol

Fuente: (Farmacopea Americana USP 42 NF 37, 2019)



Figura 1. Estructura química del Enalapril Maleato



Fuente: (Farmacopea Americana USP 42 NF 37, 2019)

### 2.9.2 Propiedades generales

**Aspecto:** Polvo cristalino blanquecino. Fácilmente soluble en metanol y en dimetilformamida; soluble en alcohol; moderadamente soluble en agua destilada; poco soluble en disolventes orgánicos semipolares; prácticamente insoluble en disolventes orgánicos no polares (Farmacopea Americana USP 42 NF 37, 2019).

**Enalaprilat:** Polvo cristalino, higroscópico, blanco a casi blanco. Moderadamente soluble en metanol y en dimetilformamida; poco soluble en agua y en alcohol isopropílico; muy poco soluble en acetona, en alcohol y en hexano; prácticamente insoluble en Acetonitrilo y en cloroformo (Farmacopea Americana USP 42 NF 37, 2019).

**Punto de Fusión:** Funde aproximadamente a 144°C.

**Polimorfismo:** El Enalapril Maleato posee 2 modificaciones polimórficas (formas I y II), siendo la forma II la forma más termodinámicamente estable. Ambas formas exhiben solubilidades similares, espectros IR y Raman, y termogramas de calorimetría diferencial de barrido. La formación del derivado de Dicotopiperazina puede minimizarse mediante la simple adición de carbonato de sodio o algún otro estabilizador adecuado a la formulación de la tableta. En consecuencia, la FDA aprobó numerosas aplicaciones nuevas de medicamentos abreviados para tabletas de Maleato de Enalapril que no incorporan una especificación para la forma polimórfica. (Roger K. Verbeeck, 2017)

### Coefficiente de partición

Se ha informado que el log P (logaritmo decimal del coeficiente de partición en octanol / agua) del Enalapril es de 2.45 y el Enalaprilat tiene un log P (logaritmo decimal del coeficiente de partición) igual a 0.161.

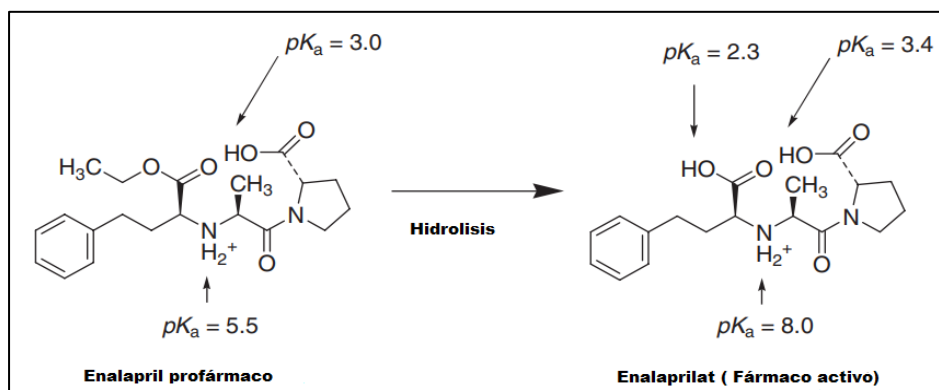
## pKa

El Enalapril Maleato tiene 2 grupos funcionales ionizables con valores de pKa de 3 (grupo de ácido carboxílico) y 5.35 (grupo de amina) a 25°C según se determina mediante valoración potenciométrica acuosa ácida / básica. El Enalaprilat tiene 2 grupos carboxílicos (pKa calculado de 1.60 y 3.10). El valor de pKa del grupo amina en Enalaprilat se calcula en 8.02, que está altamente ionizado a pH 6.5. (Roger K. Verbeeck, 2017).

### 2.9.3 Estabilidad del Enalapril Maleato

El Enalapril Maleato en estado sólido es relativamente estable, pero muestra inestabilidad cuando se encuentra en solución y bajo condiciones de estrés tales como hidrólisis alcalina, ácida y neutra, fotólisis y temperatura, formando productos de degradación secundarios. La condición ácida, afectan en mayor grado y en un tiempo más corto.

**Figura 2. Estructura y propiedades del Enalapril y Enalaprilat**



Fuente: (Brenner, 1987)

**Tabla 2. Datos Farmacocinéticos del Enalapril Maleato**

Parámetro	Unidad	Valor
Disponibilidad oral	%	41 ± 15
Excreción urinaria	%	88 ± 7
Unión en plasma	%	50 -60
Depuración	(ml.min-1. Kg-1)	4.9 ± 1.5
Semivida	Horas	11
Tiempo máximo	Horas	3.0 ± 1.6
Concentraciones máximas	ng/mL	69 ± 37

Fuente: (Gilman, 2007)

#### 2.9.4 Mecanismo de Acción

El Enalapril Maleato es un péptido que contiene grupos dicarboxilo y es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) con actividad antihipertensiva. Como profármaco, el Enalapril se convierte por desesterificación en su forma activa a Enalaprilat, el cual se une y se inhibe competitivamente a la Enzima Convertidora de Angiotensina, bloqueando así la conversión de la angiotensina I a la angiotensina II. Esto evita las potentes acciones vasoconstrictoras de la angiotensina II y da como resultado una vasodilatación. El Enalapril también disminuye la secreción de aldosterona inducida por angiotensina II por la corteza suprarrenal, lo que conduce a un aumento de la excreción de sodio y, posteriormente, aumento de la salida del agua (PubChem, 2005).

Es importante señalar que los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) han sido descritos como fármacos que intervienen en el transporte iónico transmembrana, activando la bomba de  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATP-asa}$ , lo que se traduce en una disminución de sodio intracelular a nivel del sistema nervioso simpático; disminuyendo la transmisión simpática al inhibir los receptores pre y post-sinápticos (Inhibidores o antagonistas); ambas acciones se traducen en una reducción de las resistencias vasculares periféricas y, por ende, en las cifras de tensión arterial. La disminución de la presión arterial no se acompaña de cambios en la frecuencia cardíaca, sensibilidad a la actividad presora de la norepinefrina exógena o sensibilidad de barorreceptores (Dusing R, 1987).

#### 2.9.5 Farmacocinética

El Enalapril Maleato es un derivado de los aminoácidos L-alanina y L-prolina. Después de su administración por vía oral se absorbe rápidamente en el tubo digestivo y es transformado por hidrólisis en Enalaprilat, el cual es un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) altamente específico, de larga duración y no sulfhídrico (Opie, 1992).

Los niveles séricos de Enalapril Maleato ( $C_{\text{max}}$ ) ocurren entre las 0.5 a 1.5 h después de la administración, mientras los niveles séricos de pico de Enalaprilat (la forma activa) ocurre entre las 3 a 4 h y su duración es de 12 - 24 h. En pacientes con función renal normal, las concentraciones plasmáticas del Enalapril alcanzan su estado de equilibrio al 4to o 5to día

---

de la administración de Enalapril Maleato (Opie, 1992).

El Enalaprilat tiene uniones bifásicas de alta y baja afinidad al plasma humano a concentraciones menores de 8 ng/mL, la unión predominante de alta afinidad aparentemente está relacionada con la enzima convertidora de Angiotensina y la unión de baja afinidad a las proteínas del plasma que ocurre con altas concentraciones y es de 60% aproximadamente.

El Enalaprilat es excretado principalmente por vía renal, con una vida media de eliminación de 1.3 h. La vida media de la eliminación de Enalaprilat es de 5.9 a 35 h con una depuración renal de 158 mL/min. Los principales componentes en la orina son Enalaprilat y 40% de la dosis del Enalapril administrado por vía oral (Ulm EH, 1982).

El Ácido Enalaprílico cuando se administra por vía peroral, su absorción es de aproximadamente del 10% y es debido a la presencia de dos grupos carboxílicos en la molécula. La conversión de estos grupos en derivados carboxílicos éster de etilo del mismo, que es más lipófilo, dio lugar a la absorción del 70 % por el organismo. El éster de Enalapril, una vez absorbido, se convierte en el Ácido Enalaprílico (PABA, 2013).

El Enalaprilat está disponible en solución para uso intravenoso, principalmente en casos de urgencias hipertensivas, cuando el tratamiento peroral no es apropiado. Es una molécula de carácter hidrófilo por lo que no atraviesa la barrera hematoencefálica y por lo tanto el Enalaprilat no entra en el cerebro. El Enalapril es un profármaco y como tal debe sufrir hidrólisis por esterasas en el hígado para producir el ácido dicarboxílico. Una vez absorbido, el Enalapril se hidroliza a Enalaprilat, el verdadero inhibidor de la ECA. Las concentraciones máximas de Enalaprilat se alcanzan a las 4 h después de la administración peroral de una dosis de Enalapril (PABA, 2013).

El Enalapril se elimina con la orina (60-78%) y en menor medida con las heces (33%) en unas 24 a 48 h. La mayor parte de la dosis absorbida se elimina en forma de Enalaprilat y se desconoce si la eliminación fecal procede de Enalapril no absorbido, o se excreta a través de la bilis. Sin embargo, al administrar el Enalapril por vía intravenosa, alrededor del 90% de la dosis se elimina como Enalaprilat en orina (PABA, 2013).

## **2.9.6 Perfil Farmacocinético**

### **2.9.6.1 Absorción**

El Enalapril Maleato es bien absorbido después de la administración oral con una biodisponibilidad del 60%. La administración conjunta con alimentos no altera la absorción de Enalapril. El pico de la concentración plasmática se alcanza a la hora después de la administración oral con un efecto farmacológico que puede durar entre 12 a 24 horas.

### **2.9.6.2 Distribución**

El Enalapril Maleato posee una moderada unión a proteínas plasmáticas de entre un 50% a un 60%. Enalaprilat muestra una unión bifásica en el plasma humano, existiendo una gran afinidad por las proteínas, a concentraciones menores a 8 ng/mL, y una menor afinidad a concentraciones mayores a 8 ng/mL. El Enalapril es indetectable en el líquido cerebro-espinal.

### **2.9.6.3 Metabolismo**

El Enalapril Maleato es metabolizado extensamente en el hígado (70% de la dosis), siendo biotransformado a Enalaprilat, esto ocurre dentro de las primeras 4 h después de la administración oral. El metabolismo de primer paso de Enalapril es del orden del 18 %, biotransformándose todo este porcentaje a Enalaprilat.

### **2.9.6.4 Excreción**

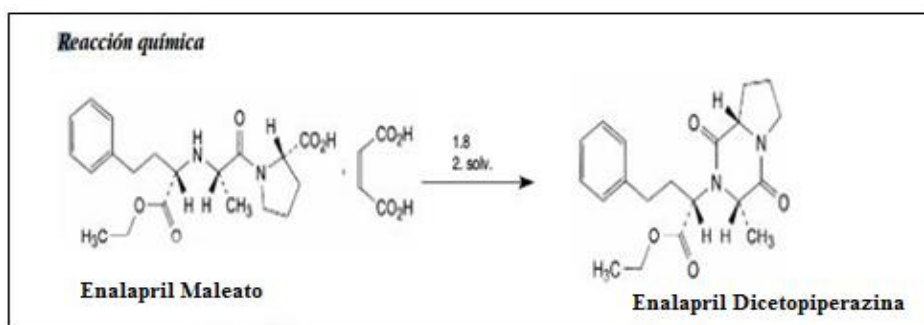
El Enalapril Maleato presenta un clearance renal de 158 mL/min, mostrando un 61 % de excreción renal. Un 18% de Enalaprilat inalterado es recuperado en la orina. La excreción fecal representa el 33 % de eliminación total, siendo un 6% como Enalapril y un 27% como Enalaprilat. El Enalapril presenta una vida media de eliminación de 1.3 horas, y el Enalaprilat de 11 Horas.

## **2.9.7 Estabilidad**

El fármaco en estado sólido es relativamente estable, pero muestra inestabilidad cuando se encuentra en solución y bajo condiciones de estrés tales como hidrólisis alcalina, ácida y

neutra, fotólisis y temperatura, formando productos de degradación o secundarios. La condición ácida, afectan en mayor grado o en un tiempo más corto la generación de productos de degradación, aunque los mismos también se forman en otras condiciones de estrés.

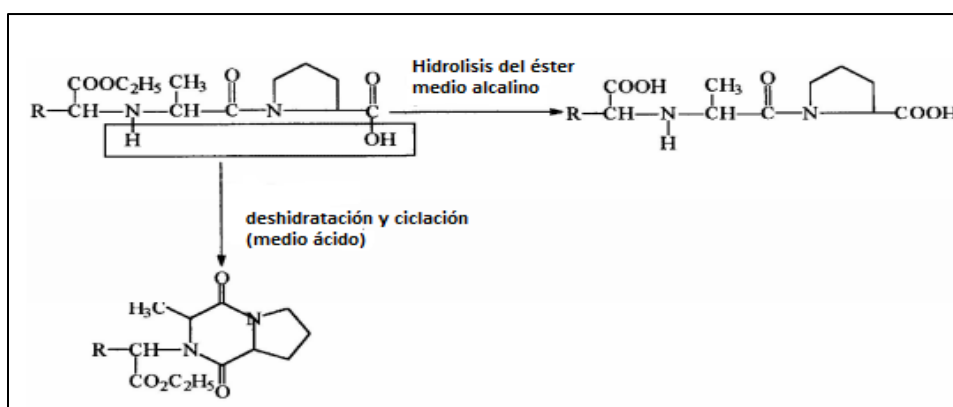
**Figura 3. Obtención de Enalapril Dicotopiperazina a partir de Enalapril Maleato por ciclación térmica**



Fuente: (Tania Marquez, Ilsa Corrales, Manuel Gil, Luis Martinez, 2006)

El Enalapril Dicotopiperazina es un producto de degradación del Enalapril Maleato. Sus propiedades no han sido ampliamente investigadas.

**Figura 4. Degradación de Enalapril Maleato en medio ácido y base.**



Fuente: (M.M. Al-Omari, 2000)

## 2.10 Desarrollo de métodos

Dado que el desarrollo de los métodos analíticos es costoso e insume mucho tiempo, es preferible emplear caminos sistemáticos efectuando los ensayos en una dirección segura o

---

al menos con buenas probabilidades de éxito, evitando ensayos innecesarios y documentando los resultados, no solo para el desarrollo sino para futuras revisiones.

Indudablemente el primer paso es la investigación bibliográfica, sería lamentable invertir semanas de trabajo para llegar a conclusiones que podría obtenerse en minutos de consulta en una base de datos adecuada, dirigidas al principio activo específico a compuestos químicamente relacionados que puedan aportar información útil fácilmente transferibles al problema en estudio. En el desarrollo de métodos analíticos indicadores de estabilidad se debe valorar el número de componentes a separar, los métodos isocráticos son incapaces de dar cabida a más de 10 picos, por lo cual se prefiere trabajar con gradiente en elución.

Con respecto a la muestra es importante o conveniente conocer

- La identidad de los componentes de interés
- Rango de pesos moleculares de los componentes de interés
- Estructura química, pKa, solubilidad, espectros UV
- Concentración de los principios activos de interés.
- Naturaleza de la matriz (tableta, suero, etc.)

Una vez completada esta información puede definirse un sistema preliminar.

El primer punto a evaluar durante la definición del sistema preliminar consiste en determinar los pasos preparativos que puedan necesitarse para mantener el principio activo en solución en la concentración adecuada. En muchos casos la preparación puede ser tan simple como una extracción líquido-líquido o líquido-sólido y en otros puede necesitarse varios pasos de preconcentración previa (Quattrocch, 1992).

El segundo punto es considerar el detector a utilizar. El detector de primera elección y el más empleado es el detector UV por su simplicidad de uso, robustez y confiabilidad. Cuando no es posible su uso por que el principio activo carece de grupos cromóforos o porque su respuesta es baja, es posible utilizar otros detectores como el de índice de refracción, fluorescencia o electroquímicos o bien emplear métodos de derivatización.

Para los principios activos con pesos moleculares menores a 2000, la elección del método cromatográfico dependerá si la muestra no es soluble en agua o mezclas hidroalcohólicas

muy probablemente la única alternativa sea fase normal ya sea en columnas de silicagel no modificada o de fase ligada (Quattrocch, 1992).

El método de mayor difusión es sin duda la fase reversa debida a sus ventajas y versatilidad. Una vez definido el punto de partida está claro, que deberá definirse un sistema, tipo y característica de la columna, fase móvil, caudal, detector, volumen de inyección.

De ser posible la primera inyección debe ser una cantidad considerable de muestra para verificar la elución del principio activo. Así evitamos confundir el pico buscado con otros picos que eluyen en el volumen muerto.

Para la determinación de la proporción de la fase móvil, agua: modificador orgánico (Metanol, Acetonitrilo o Tetrahidrofurano) pueden seguirse 3 caminos.

- Comenzar con una concentración media de modificador y ajustar según los resultados obtenidos.
- Comenzar con una concentración tan alta de modificador (fase móvil muy fuerte) reduciendo luego su proporción en fracciones de 10 a 20 % según los resultados.
- Efectuar un gradiente de elución y calcular la composición adecuada para un solvente isocrático (Quattrocch, 1992).

**Tabla 3.- Sistemas cromatográficos de acuerdo al tipo de compuesto**

Compuestos	Método de elección	Columna	Fase móvil
<b>Neutros No iónicos</b>	Fase reversa	C 18 - C8 Fenil -CN	Agua: Modificador(Metanol, Acetonitrilo o Tetrahidrofurano)
<b>Ácidos débiles</b>	Control de ionización	C 18 - C8 Fenil -CN	Agua: Modificador ácido fosfórico hasta pH 3 - 3.5
<b>Bases débiles</b>	Fase reversa	C 18 - C8 Fenil -CN	Agua: Modificador 30 mM trietilamina
<b>Iónicos e Ionizables</b>	Fase reversa de apareamiento iónico	Preferida C18 Alternativa C8 - CN	Agua: Metanol Alquilsulfonatos pH 3.5 (bases) Tetraalquilamonio pH 7.5 (ácidos)
<b>Enantiómeros isómeros ópticos</b>	Columna quirál o en fase reversa	Quirales C18	Acuosos Componentes quirales
<b>Carbohidratos</b>	Columna amino	NH <sub>2</sub>	Agua -modificador

Fuente: (Quattrocch, 1992)



En base a la estructura química del principio activo se elige el tipo de sistema cromatográfico para el desarrollo del método analítico, en el caso del Enalapril Maleato al ser un isómero óptico el sistema preliminar de partida es en fase reversa con fase móvil acuosa.

### 2.10.1 Bases de la Separación

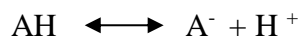
Cuando la muestra y la fase móvil es forzado a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de estos componentes. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrogeno, interacciones dipolares y electrostáticas, son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria.

Así, el comportamiento más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir (es decir en salir de la columna) y el más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes.

La cromatografía en cada rama de la ciencia química, tiene un lenguaje particular. Se hace necesario unificar ese lenguaje y estandarizar los términos empleados (Quattrocch, 1992).

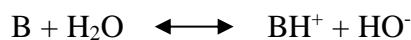
### 2.10.2 Análisis de compuestos disociables

En la cromatografía líquida de alta eficiencia, hay compuestos neutros, no ionizables y probablemente se requieran pocos ajustes finales para completar el método de análisis. Sin embargo, de existir fenómenos mixtos de retención debidos a la presencia de sus formas iónicas y no iónicas en un medio pobremente regulado:



En ausencia de la regulación de pH, los ácidos débiles estarán en sus formas disociadas y no disociadas. En fase reversa las formas disociadas se retienen menos favorablemente que las formas no disociadas. En estos casos el pH de la fase móvil es un verdadero motor del principio activo y variándolo desde 6 hasta 3. En las proximidades del  $pK_a$  el pico puede presentar asimetría debido a la presencia simultánea de ambas formas. Para corregir este efecto puede ajustarse el pH de modo tal de desplazar el equilibrio hacia la izquierda o derecha, según convenga, o agregar sistemas buffer que modifiquen este equilibrio.

Esta modalidad se conoce como control de la ionización o supresión iónica. Con las bases ocurre el mismo fenómeno que con los ácidos, solo que, si se desea desplazarse el equilibrio hacia la forma no iónica, se necesita un pH que es, en general, incompatible con la integridad de la columna.



### 2.10.3 Selección de la Fase Móvil

La selectividad de la fase móvil depende del tipo de interacción de la misma con la muestra. Las interacciones pueden ser de tipo dispersivo, dipolar, por puentes de hidrógeno, interacciones dieléctricas o una combinación de ellas. No solo la polaridad sino la suma de todas las propiedades que define la afinidad de la fase móvil por el fármaco dado, que tendrá a su vez determinadas características dipolares, aceptoras o donadoras de protones.

### 2.10.4 Estandarización de Métodos Analíticos

Una vez que se ha probado exitosamente un sistema (columna – solvente – parámetros instrumentales) de acuerdo a lo indicado, estas formas en presencia de un método preliminar.

Este método preliminar debe optimizarse para mejorar al máximo la separación cromatográfica. El primer paso en el proceso de optimización es el ajuste de los parámetros cromatográficos como la resolución, factor de capacidad, platos teóricos y factor de asimetría.

Para la regulación de la eficiencia o los platos teóricos se puede:

- Disminuir el caudal o flujo de la fase móvil.
- Se puede emplear columnas más largas.
- Se puede usar columnas con menor tamaño de partícula.
- Se puede emplear columnas acopladas y aumentar la temperatura
- Se puede aumentar columnas nuevas o regeneradas
- Optimizando el equipo

La resolución no varía linealmente con la eficiencia sino con su raíz cuadrada, sin embargo,

---

el método más utilizado para aumentar los platos teóricos es reduciendo la velocidad lineal para acercarnos al óptimo. La selectividad depende de la naturaleza de cada uno de los componentes en la fase móvil, columna y muestra, de su afinidad mutua y del modo que interaccionan entre sí.

Habitualmente las modificaciones se consiguen cambiando las propiedades químicas de los solventes de elución. Así como el cambio de la fase orgánica de metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano puede resultar en grandes diferencias de separación.

### 2.10.5 Pureza de pico

En términos de control de calidad y para todos los análisis cuantitativos, la pureza máxima es un parámetro importante que puede abordarse de diferentes maneras. A menudo, solo se tienen en cuenta la forma de pico y los cromatogramas, pero una alternativa y sin la necesidad de usar un detector de espectrometría de masas es la comparación de espectros registrados con un detector de diodos durante el registro de un pico cromatográfico. Debido a las diferencias de estos espectros dentro de un solo pico cromatográfico, su pureza puede ser definida fácilmente (Sthal 2003, Agilent Technologies 2008).

La manera convencional de detectar picos impuros es la evaluación visual de los cromatogramas buscando la presencia de hombros, valles o asimetrías en los picos.

Todas estas situaciones pueden indicar la existencia de un pico solapado. Sin embargo, la ausencia de estos no asegura la pureza del pico del fármaco. Si la resolución cromatográfica es muy baja o si la impureza está en muy baja concentración, la misma no podrá detectarse con una simple inspección visual. Se debe recurrir entonces, a procedimientos de evaluación más confiables, como los que proporciona la quimiometría (Zan, 2011).

Existen distintos métodos quimiométricos para la determinación de la pureza de un pico, los cuales pueden clasificarse básicamente en dos categorías (Zan, 2011).

1. Aquellos que se basan en la comparación de los espectros obtenidos con un espectro de referencia. Los softwares de procesamientos de datos de los instrumentos modernos traen incorporados algunos de estos algoritmos que permiten evaluar de una manera sencilla la

---

pureza de los picos durante el desarrollo del método cromatográfico. Ejemplos de ellos son:

- a. La comparación visual por superposición de espectros y/o cromatogramas normalizados.
- b. La sustracción espectral, en donde la señal resultante de la sustracción de los espectros normalizados a un espectro de referencia, se compara con el ruido instrumental.
- c. La homogeneidad de pico, basado en la comparación de relación de absorbancia de los espectros de un pico a dos longitudes de onda.
- d. El índice de pureza, basado en el cálculo de la desviación estándar de la longitud de onda central de cada espectro registrado en un pico.
- e. SIMPLISMA (del inglés, simple-to-use interactive self-modeling mixture analysis), el cual es un algoritmo interactivo que selecciona el espectro más puro y grafica un cromatograma de pureza. La interacción se repite hasta extraer todos los perfiles puros, es decir el número de componentes de pico.
- f. OPA (del inglés, orthogonal projection approach) que compara los espectros normalizados del pico con el espectro promedio o con un espectro estándar que debe suministrarse al algoritmo.
- g. La correlación espectral, calculando un factor de pureza, llamado también factor de similitud que comparado con el nivel de ruido permite determinar la presencia de impurezas (Sthal 2003, Agilent Technologies 2008).

2. Aquellos que se basan en el análisis de componentes principales que van más allá de la determinación de la pureza de un pico, ya que tienen como objetivo principal la obtención del número de componentes presentes. Si bien son en general muy sensibles, son más complejos de interpretar, ya que no extraen información de perfiles espectrales o cromatográficos. No son empleados habitualmente por los softwares comerciales, ejemplos de ellos son:

- a. EFA (Del inglés, evolving factor analysis).
- b. FSW-EFA (Del inglés, fixed-size moving window evolving factor analysis).
- c. ETA (Del inglés, eigenstructure tracking analysis).
- d. HELP (Del inglés, heuristic evolving latent projections).

e. NS (del inglés, needle search).

Es importante destacar que la sensibilidad de las metodologías analíticas para determinar la pureza de pico o número de componentes es diferente para cada algoritmo y fundamentalmente dependiente del grado de diferencia espectral de la impureza con el fármaco. Las impurezas con alta similitud espectral con el analito serán detectadas sólo si están presentes en concentraciones elevadas. Por lo mencionado, estos métodos son muy útiles para detectar picos impuros, pero no pueden confirmar categóricamente la pureza absoluta de un pico (Zan, 2011).

La determinación de pureza de pico para el presente trabajo se realizó por el método de correlación espectral calculando un factor de pureza.

#### **2.10.5.1 Correlación espectral**

La obtención de un factor de correlación espectral es una forma sencilla y muy útil de calcular la similitud entre dos espectros. Esta correlación puede hacerse, por ejemplo, entre el espectro promedio del pico del fármaco obtenido en la solución muestra y el espectro promedio del mismo pico obtenido en la solución estándar, estrategia que sirve, a la vez, para identificar fehacientemente al fármaco en una muestra desconocida. Cuando la correlación se hace entre espectros de un mismo pico proporciona una medida de la pureza del pico.

En este caso el espectro de referencia puede tomarse como el espectro promedio de todos los espectros del pico, o ir tomando distintos espectros de referencia a distintos tiempos y hacer luego una evaluación global (Zan, 2011).

Para obtener el factor de correlación espectral deben seguirse los siguientes pasos:

1. Determinación de corrección de fondo: Donde la señal causada por la fase móvil o componentes de la matriz debe eliminarse por sustracción de un espectro de referencia apropiado. El espectro de los solventes de la fase móvil puede ser obtenido, para una cromatografía isocrática, en un tiempo inmediatamente posterior al tiempo muerto. Para un sistema de gradientes, donde la contribución espectral de la fase móvil varía en el tiempo, o cuando

se tiene la señal de la matriz, el espectro de referencia deberá elegirse en un tiempo inmediatamente anterior o posterior al pico de interés, siempre y cuando haya buena resolución de la línea de base.

2. La selección del rango espectral debe ser de tal manera que sólo se tengan en cuenta las contribuciones significativas del fármaco, y no aquellas que provean demasiado ruido, como por ejemplo las longitudes de onda cortas.
3. La selección de los espectros para la evaluación de la pureza de pico deberá incluir la información de todas las regiones del pico (frontal, ápice y cola), por tanto, fijar un umbral de absorbancia es una buena medida para eliminar los espectros con demasiado ruido.
4. La normalización de los espectros debe ser realizado con todos los espectros de los picos registrados a los distintos tiempos de retención.
5. La transformación de la señal obtenida, es un paso no obligatorio, pero puede realizarse para mejorar la calidad de la señal al trabajar con diferentes algoritmos.
6. Selección del espectro de referencia (Zan, 2011).

Finalmente, con las señales procesadas se obtiene el factor de correlación ( $F_c$ ) entre los espectros en base a un ajuste de cuadrados mínimos de todas las absorbancias obtenidas a una misma longitud de onda mediante la siguiente fórmula:

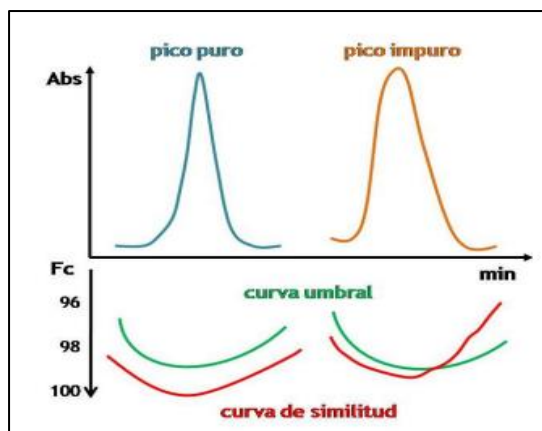
$$F_c = \frac{\left[ \frac{\sum_{i=1}^{i=n} [(A_i - \bar{A}) \times (B_i - \bar{B})]}{\sqrt{\left[ \sum_{i=1}^{i=n} (A_i - \bar{A})^2 \times \sum_{i=1}^{i=n} (B_i - \bar{B})^2 \right]}} \right]^2$$

Donde  $A_i$  y  $B_i$  son las medidas de absorbancia a una misma longitud de onda en el primer y segundo espectro respectivamente y  $n$  es el número de longitudes de onda analizadas.

Generalmente este factor se informa de manera porcentual, por lo que un  $F_c$  igual a cero indica que los espectros son totalmente distintos, mientras que valores cercanos a 100 indican alta correlación espectral.

### 2.10.5.2 Factor de pureza y curva de similitud

El factor de pureza, es un índice muy utilizado en cromatografía, se obtiene como un promedio de todos los factores de correlación obtenidos para los distintos espectros dentro del pico. Los factores de correlación también pueden graficarse en función del tiempo de retención obteniéndose de esta manera una curva de similitud, cuyo perfil ideal es el de una línea recta en 100 %. Sin embargo, lo habitual es que la línea se curve en los extremos debido a la disminución de la relación señal/ruido en la primera y última porción del pico. Para determinar la contribución del ruido a la curva de similitud, es útil obtener una curva umbral que considere el efecto del ruido en la correlación espectral, para lo cual se obtienen los factores de correlación sin realizar la corrección de fondo. Ambas curvas pueden representarse en una misma gráfica obteniéndose una gráfica de pureza de pico. Si la curva de similitud queda por arriba de la curva umbral a lo largo de todo el pico, significa que no se han detectado impurezas y que las variaciones espectrales son sólo atribuibles al ruido instrumental. Si en cambio existe una impureza solapada, la curva de similitud cruza a la curva umbral en algún tramo del pico. (Zan, 2011).



### 2.10.6 Validación de Métodos Analíticos Indicadores de Estabilidad

La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumple los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Las características de desempeño analítico

habituales que deben considerarse en la validación de los tipos de procedimientos se indican en la tabla siguiente.

**Tabla 4. Características analíticas típicas utilizadas para la validación de métodos**

Exactitud
Precisión
Especificidad
Límite de Detección
Límite de Cuantificación
Linealidad
Intervalo
Robustez

La validación de procedimientos Farmacopeicos puede involucrar algunas o todas las características analíticas típicas sugeridas que se usan en la validación de métodos, según se especifican en la Tabla 4 y se categorizan por el tipo de método analítico en la Tabla 5

**Tabla 5. Datos requeridos para la validación**

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de Detección	No	No	Sí	*	No
Límite de Cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

\* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

## 2.10.7 Características de Desempeño Analítico

### 2.10.7.1 Selectividad o Especificidad

Este parámetro se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia del principio activo, libre de interferencias de otros componentes, en la matriz de la muestra. Estos componentes pueden ser excipientes de un fármaco, productos de degradación, subproductos o productos laterales de síntesis de una droga, metabolitos del mismo principio activo en un fluido biológico, etc. (Quattrocch, 1992)



### 2.10.7.1.1 Determinación de la Especificidad

En análisis cualitativos (pruebas de identificación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable. Esta capacidad debería confirmarse mediante la obtención de resultados positivos a partir de muestras que contengan el principio activo (quizás mediante comparación con un material de referencia conocido), junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho principio activo, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada a la del principio activo. En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede hacerse agregando al fármaco o producto farmacéutico una cantidad conocida de excipientes o de impurezas en concentraciones adecuadas, y demostrando que el resultado del análisis no resulta afectado por la presencia de estos materiales extraños.

### 2.10.7.2 Linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta. Este paso de la validación es necesario si se va a trabajar con un solo estándar en las determinaciones de rutina, aunque pueden aceptarse métodos no lineales, si se opera con estándares múltiples a la vez. Además, conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima del principio activo para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva estándar.

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferiores y superior del principio activo (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar al principio activo con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (p.ej., porcentaje, partes por millón) obtenidos mediante el procedimiento analítico (Quattrocch, 1992).

### 2.10.7.2.1 Determinación de la Linealidad

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales en función de la concentración de principio activo del contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (p.ej., mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos). Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se deberían presentar el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales. El intervalo del procedimiento se valida verificando que el procedimiento analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el principio activo en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo.

La ICH recomienda que, para establecer la linealidad, se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones. También recomienda que se consideren los intervalos especificados mínimos que se indican a continuación:

- Valoración de un Fármaco (o de un producto terminado): de 80% a 120% de la concentración de prueba.
- Determinación de una Impureza: de 50% a 120% del criterio de aceptación.
- Para Uniformidad del Contenido: un mínimo de 70% a 130% de la concentración de prueba, a no ser que se justifique un intervalo más amplio o más apropiado, basándose en la naturaleza de la forma farmacéutica (p.ej., inhaladores de dosis fija).
- Para Pruebas de Disolución:  $\pm 20\%$  por encima del intervalo especificado (p.ej., si los criterios de aceptación de un producto de liberación controlada cubren una región de 30%, después de 1 hora, y hasta 90%, después de 24 horas, el intervalo validado sería de 10% a 110% de la cantidad declarada).

---

### 2.10.7.3 Precisión

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar estimada analíticamente por “S” o más comúnmente como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación.

La reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración.

La precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo, en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio.

La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período corto por el mismo analista con el mismo equipo (Quattrocch, 1992).

#### 2.10.7.3.1 Determinación de la Precisión

La precisión de un procedimiento analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Los análisis en este contexto son análisis independientes de muestras a la concentración de prueba determinada.

#### 2.10.7.4 Exactitud

Llevado a cabo mediante el procedimiento analítico completo, desde la preparación de las muestras hasta el resultado final de las pruebas. Los documentos de ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración) o usando un mínimo de seis determinaciones al 100%.

---

La exactitud de un método, también conocida como error sistemático o tendencia corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero.

En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico con respecto a un principio activo de pureza conocida (p.ej., un Estándar de Referencia), o comparando los resultados del procedimiento con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.

En la valoración de un fármaco en un producto formulado, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de principio activo dentro del intervalo del procedimiento. Si no resulta posible obtener muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, se puede aceptar tanto el agregado de cantidades conocidas del principio activo al producto farmacéutico ("spike") como la comparación de los resultados con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud haya sido comprobada o definida.

En el análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse en muestras (del fármaco o del producto farmacéutico) a las que se hayan agregado cantidades conocidas de impurezas. Cuando no sea posible obtener muestras de algunas impurezas o productos de degradación, los resultados deben compararse con los obtenidos mediante un procedimiento independiente.

En ausencia de otra información, puede resultar necesario calcular la cantidad de una impureza basándose en la comparación de su respuesta con la del fármaco, pero el cociente entre las respuestas de cantidades iguales de la impureza y del fármaco (factor de respuesta relativa) debe ser utilizado siempre que se lo conozca (Quattrocch, 1992).

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de principio activo añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

Los documentos de ICH recomiendan que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el

intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración).

La evaluación de la exactitud puede efectuarse de varias maneras, incluyendo la evaluación de la recuperación del principio activo (porcentaje de recuperación) en todo el intervalo de la valoración, o evaluando la linealidad de la relación entre las concentraciones estimadas y las reales. El criterio estadístico de preferencia es que el intervalo de confianza para la pendiente esté comprendido dentro de un intervalo alrededor de 1,0; o alternativamente, que el valor de la pendiente sea cercano a 1,0. En ambos casos, el intervalo o la definición de cercanía deberían especificarse en el protocolo de validación. El criterio de aceptación dependerá de la valoración, de su variabilidad y del producto.

#### **2.10.7.5 Robustez**

La robustez de un método analítico corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo antes cambios de variables comunes. Estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas, de equipos, analistas, laboratorios, fuentes de columna, etc. Es evidente que un método debe ser robusto reproducible frente a cambios de analistas o instrumentos, pero necesariamente debe serlo frente a todos los cambios que se estudien. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico. (Quattrocch, 1992).

#### **2.10.7.6 Límite de detección**

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de principio activo que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad de principio activo se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente como concentración de principio activo (p.ej., porcentaje, partes por billón) en la muestra. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria).

### 2.10.7.7 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, tales como: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de principio activo en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente como concentración de principio activo (p.ej., porcentaje, partes por billón) en la muestra (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria).

### 2.10.8 Datos requeridos para la Validación

Considerando la amplia variedad, de los diferentes procedimientos de prueba la Farmacopea USP 42 indica diferentes esquemas de validación los cuales se indican a continuación. (Farmacopea Americana USP 42 NF 37, 2019).

**Categoría I:** Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

**Categoría II:** Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

**Categoría III:** Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (p.ej. Disolución, liberación de fármacos, etc.).

**Categoría IV:** Pruebas de identificación.



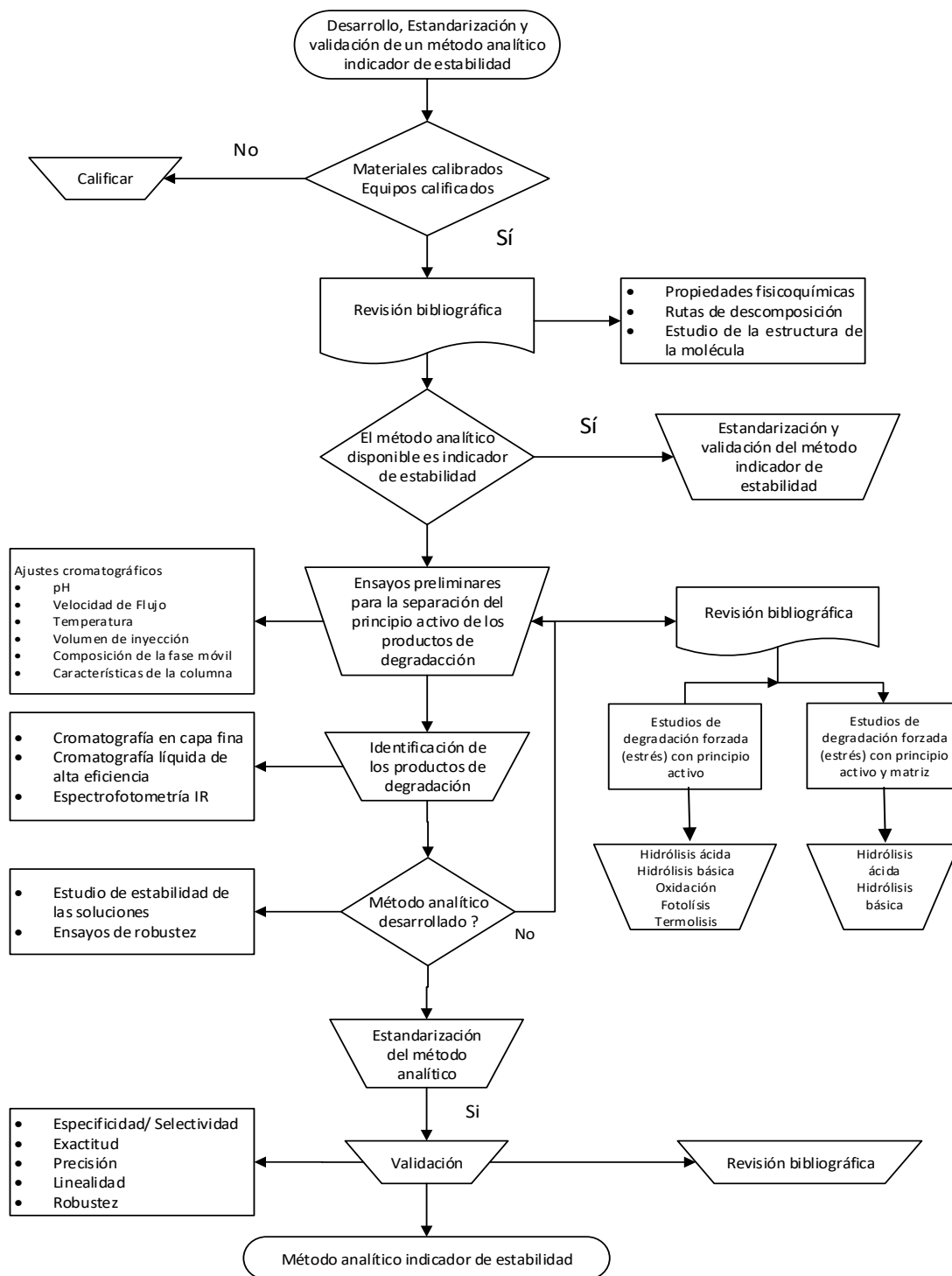
## CAPÍTULO III



---

## DISEÑO METODOLÓGICO

### 3 DISEÑO METODOLÓGICO



Fuente propia



### 3.1 Equipos o Instrumentos

<b>Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (HPLC)</b>	
<b>Descripción del Equipo</b>	<b>Certificaciones del equipo</b>
<b>Modelo:</b> Detector de arreglo de diodos serie 1260 Infinity I <b>Fabricante:</b> Agilent Technologies <b>Modelo:</b> G4212B <b>Bomba:</b> Cuaternaria <b>Muestreador:</b> Automatizado Compartimento de columna termostatzado	Instructivo de manejo Certificación de Instalación(CI) Certificación de Operación(CO) Certificación funcional(CF)
<b>Balanza analítica Sartorius TE214S</b>	
<b>Descripción del Equipo</b>	<b>Certificaciones del equipo</b>
<b>Modelo:</b> TE214S <b>Fabricante:</b> Sartorius <b>Serie:</b> 24608020 <b>Capacidad máxima:</b> 210 g <b>Trazabilidad:</b> IBMETRO	Instructivo de manejo Certificación de Instalación(CI) Certificación de Operación(CO) Certificación funcional(CF)
<b>Estufa de secado Binder</b>	
<b>Descripción del Equipo</b>	<b>Certificaciones del equipo</b>
<b>Modelo:</b> FD53 E2 <b>Fabricante:</b> Binder <b>Serie:</b> 10 01926	Instructivo de manejo Certificación de Instalación(CI) Certificación de Operación(CO) Certificación funcional(CF)
<b>Espectrofotómetro Perkin Elmer – lambda 25</b>	
<b>Descripción del Equipo</b>	<b>Certificaciones del equipo</b>
<b>Marca:</b> Lambda 25 <b>Fabricante:</b> Perkin Elmer <b>Serie:</b> 101N4032906 <b>Dimensiones:</b> 650 x 260 x560 cm <b>Espectrofotómetro:</b> Tipo escaneo de doble haz para rango UV-Visible operado por PC.	Instructivo de manejo Certificación de Instalación(CI) Certificación de Operación(CO) Certificación funcional(CF)

<b>Potenciómetro, modelo Orión 3 Star con electrodo de vidrio para la medición de pH</b>	
<b>Descripción del Equipo</b>	<b>Certificaciones del equipo</b>
<b>Marca:</b> Orión Star <b>Fabricante:</b> Thermo Scientific <b>Electrodo:</b> pHmetro <b>Serie:</b> B07931 <b>Modelo:</b> HI1131 <b>Control del pH metro:</b> Pantalla digital <b>Rango de medida:</b> 2 a 13	Instructivo de manejo Certificación de Instalación(CI) Certificación de Operación(CO) Certificación funcional(CF)
<b>Ultrasonificador</b>	
<b>Descripción del Equipo</b>	<b>Certificaciones del equipo</b>
<b>Modelo:</b> Ultrasonic28 X <b>Fabricante:</b> Ney Cuenta con un controlador de velocidad y temperatura	Instructivo de manejo Certificación de Instalación(CI) Certificación de Operación(CO) Certificación funcional(CF)
<b>Revelador de Lámpara de UV</b>	
<b>Descripción del Equipo</b>	<b>Certificaciones del equipo</b>
<b>Modelo:</b> Universal UV- Lampe <b>Fabricante:</b> Lamag <b>Serie:</b> 29200 <b>Longitud de onda:</b> 254 nm y 366 nm	Instructivo de manejo Certificación de Instalación(CI) Certificación de Operación(CO) Certificación funcional(CF)
<b>Baño maría</b>	
<b>Descripción del Equipo</b>	<b>Certificaciones del equipo</b>
<b>Modelo:</b> 3047 <b>Fabricante:</b> Kottermann <b>Rango de Temperatura:</b> 0 a 85 °C	Instructivo de manejo Certificación de Instalación(CI) Certificación de Operación(CO) Certificación funcional(CF)
<b>Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier</b>	
<b>Descripción del Equipo</b>	<b>Certificaciones del equipo</b>
<b>Modelo:</b> MIRACLE 10 <b>Fabricante:</b> Shimadzu <b>Serie:</b> IR TRACE 100	Instructivo de manejo Certificación de Instalación(CI) Certificación de Operación(CO) Certificación funcional(CF)

### 3.2 Materiales y reactivos

#### Materiales

Matraces aforados calibrados marca Duran ámbar (20 mL, 25 mL, 100 mL, 1,000 mL)

Probeta (1,000 mL, 500 mL, 250 mL)

Filtros de Acetato de celulosa 0.45  $\mu\text{m}$  para la filtración

Pipetas aforados marca Duran calibrados ( 2.5mL, 1mL, 5mL)

Guantes de Nitrilo Talla XS, propipeta

Cubetas de cuarzo de 1 cm para Espectrómetro

Papel filtro de porosidad rápida

Refrigerantes de bolas marca Duran

Termómetros

Tips para siembra para Cromatografía en capa fina, Micropipetas de 250  $\mu\text{L}$

Filtros tipo jeringa Pall calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico 0.2  $\mu\text{m}$ )

Viales de 1.5 mL con tapa rosca color ámbar y septas de goma para HPLC

Mantos de calentamiento

Columna Zorbax Stable Bond C18 250 x 4.6  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  y

Pre columna C18 12.5 x 4.6mm x 5  $\mu\text{m}$

#### Reactivos

Fosfato Monobásico de Potasio marca Merck, Alemania

Hidróxido de sodio, marca Merck, Alemania

Acetonitrilo calidad HPLC, Merck, Alemania

Metanol calidad HPLC, Merck, Alemania

Agua destilada calidad HPLC

Ácido fosfórico 85 % p/p, Merck, Alemania

Ácido clorhídrico 0.1 N Solución valorada

Hidróxido de Sodio 0.1 N Solución valorada

Peróxido de Hidrógeno 30 %

Estándar de trabajo de Enalapril Maleato trazado con el estándar USP NF

Almidón Pre gelatinizado materia prima

Celulosa Microcristalina Tipo 102

---

Dióxido de silicio coloidal  
 Colorante FD & C Amarillo 6 Laca (38 a 42 %)  
 Estearato de Magnesio

---

### Estándares de Referencia

Estándar químico de trabajo de Enalapril Maleato Lote: 1119871  
 Código: 1433000  
 Pureza: 99.871 % (B.S)  
 Estándar químico Primario de Enalapril Maleato USP Lote: K0L429  
 Estándar químico Primario de Enalaprilat USP Lote: R024A0

---

### 3.3 Procedimiento de investigación

#### 3.3.1 Preparación de la Matriz

Por razones de confidencialidad del producto terminado, solo se menciona los componentes de la tableta Enalapril Maleato, no así las cantidades cuantitativas y el proceso productivo.

**Tabla 6. Fórmula de la tableta Enalapril 10 mg, Tableta**

Componentes de la tableta	
1	Enalapril Maleato 10 mg
2	Almidón Pre gelatinizado
3	Celulosa Microcristalina
4	Dióxido de silicio coloidal
5	Colorante FD&C Amarillo 6 Laca (38 al 42 %)
6	Estearato de Magnesio

Peso teórico de cada tableta = 200 mg

Cantidad de principio activo por tableta = 10 mg

Cantidad de matriz a pesar = 200 mg – 10 mg = 190 mg matriz

### 3.3.2 Pruebas preliminares previo al Desarrollo del Método Analítico Indicador de Estabilidad

#### 3.3.2.1 Identificación del principio activo, Enalapril Maleato

##### a) Identificación por Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier

Procedimiento: Colocar una cantidad de principio activo en análisis en contacto cercano con un elemento de reflexión interno (ERI), tal como el germanio u otro material adecuado con un alto índice de refracción. Asegurar un contacto cercano y uniforme entre la sustancia y la superficie completa del cristal del elemento de reflexión interna. Examinar el espectro de reflectancia total atenuada (ATR).

##### b) Identificación por Cromatografía en Capa Fina

Para el desarrollo del ensayo de identificación por cromatografía en capa fina se realizaron eluciones en 2 sistemas con diferentes fases móviles según la bibliografía, a partir del cual se logró una buena separación entre el principio activo y productos de degradación.

#### Sistema 1: Cromatografía en capa fina

##### CONDICIONES DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO 1

Clasificación	Fármaco cardiaco
Forma Farmacéutica	Tableta
	Placa: Silica Gel 60 F 254
	Tiempo de saturación: 10 min
	Detección: Lámpara UV
Condiciones cromatográficas	Técnica de separación: Ascendente
	Volumen de sembrado: 30 µL
	Concentración de la solución: 2 mg/mL
	Diluyente: Metanol
	Fase móvil: Cloroformo: Metanol: Ácido acético glacial (85:15:1 v/v)

Condiciones según bibliografía: (Charegaonkar)

### Sistema 2: Cromatografía en capa fina

#### CONDICIONES DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO 2

Clasificación	Fármaco cardiaco
Forma Farmacéutica	Tableta
Condiciones cromatográficas	Placa: Silica Gel 60 F 254
	Tiempo de saturación: 10 min
	Detección: Lámpara UV
	Técnica de separación: Ascendente
	Volumen de sembrado: 30 µL
	Concentración de la solución: 2 mg/mL
	Diluyente: Metanol
	Fase móvil: Butanol : Agua destilada: Ácido acético ( 3:1:1)

Condiciones según bibliografía: (Departamento de sustancias de referencia . Centro de Investigación y desarrollo de medicamentos, 2007).

#### Preparación de la solución de prueba

Pesar con exactitud 20 mg de Enalapril Maleato estándar de referencia y disolver en 10 mL de metanol p.a. Concentración final: 2 mg/mL Enalapril Maleato

#### Desarrollo de elución en el Sistema Cromatográfico

Sembrar 30 µL de la solución de prueba a la placa de gel de Silica Gel 60 F 254 y secar cuidadosamente los depósitos iniciales. Desarrollar hasta una distancia de 8 cm con la fase móvil indicada para cada sistema cromatográfico. Secar la placa de gel de Silica Gel 60 F 254 en una corriente de aire caliente. Revelar la cromatoplaque con la lámpara UV. Realizar los respectivos cálculos del valor R<sub>f</sub>.

#### **3.3.2.2 Identificación de Enalaprilat, Producto de degradación**

Para la identificación y caracterización del Enalaprilat producto de degradación se realizó los siguientes ensayos:

##### **a) Identificación por Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier**

Procedimiento: Colocar una cantidad de Enalaprilat USP en análisis en contacto cercano con un elemento de reflexión interno (ERI), tal como el germanio u otro material adecuado

con un alto índice de refracción. Asegurar un contacto cercano y uniforme entre la sustancia y la superficie completa del cristal del elemento de reflexión interna. Examinar el espectro de reflectancia total atenuada (ATR).

### b) Identificación por Cromatografía en Capa Fina

Para el desarrollo del ensayo de identificación por cromatografía en capa fina se realizaron eluciones en 2 sistemas con diferentes fases móviles según la bibliografía, a partir del cual se logró una buena separación entre el principio activo y Enalaprilat USP producto de degradación.

#### Sistema 1: Cromatografía en capa fina

##### CONDICIONES DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO 1

Clasificación	Fármaco cardíaco
Forma Farmacéutica	Tableta
Condiciones cromatográficas	Placa: Silica Gel 60 F 254
	Tiempo de saturación: 10 min
	Detección: Lámpara UV
	Técnica de separación: Ascendente
	Volumen de sembrado: 30 µL
	Concentración de la solución: 2 mg/mL
	Diluyente: Metanol
	Fase móvil: Cloroformo: Metanol: Ácido acético glacial ( 85:15:1 v/v)

Condiciones según bibliografía: (Charegaonkar)

#### Sistema 2: Cromatografía en capa fina

##### CONDICIONES DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO 2

Clasificación	Fármaco cardíaco
Forma Farmacéutica	Tableta
Condiciones cromatográficas	Placa: Silica Gel 60 F 254
	Tiempo de saturación: 10 min
	Detección: Lámpara UV
	Técnica de separación: Ascendente
	Volumen de sembrado: 30 µL
	Concentración de la solución: 2 mg/mL
	Diluyente: Metanol
	Fase móvil: Butanol : Agua destilada: Ácido acético ( 3:1:1)

Condiciones según bibliografía: (Departamento de sustancias de referencia . Centro de Investigación y desarrollo de medicamentos, 2007).

---

Preparación de la solución de prueba: Pesar con exactitud 10 mg de Enalaprilat USP producto de degradación y disolver en 5 mL de metanol p.a para obtener una concentración final de 2 mg/mL Enalaprilat.

Desarrollo de elución en el Sistema Cromatográfico

Sembrar 30  $\mu$ L de la solución de prueba a la placa de gel de Silica Gel 60 F 254 y secar cuidadosamente los depósitos iniciales. Desarrollar hasta una distancia de 8 cm con la fase móvil indicada para cada sistema cromatográfico. Secar la placa de gel de Silica Gel 60 F 254 en una corriente de aire caliente. Realizar los respectivos cálculos del valor Rf y revelar la cromatoplaque con la lámpara UV.

**3.3.2.3 Identificación de Enalapril Dicitopiperazina, Producto de Degradación**

Para la identificación y caracterización del Enalapril Dicitopiperazina producto de degradación se realizó los siguientes ensayos:

**a) Identificación por Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier**

Solución de Enalapril Dicitopiperazina

Colocar con cuidado 20 mg de Maleato de Enalapril estándar de referencia en un vaso de precipitados de 100 mL formando un montículo en el fondo del vaso de precipitados. Colocar el vaso de precipitados sobre una placa de calentamiento, aproximadamente a la mitad de la temperatura máxima de la placa. Calentar durante aproximadamente 1 a 5 minutos hasta que el sólido funda. Retirar de inmediato el vaso de precipitados de la placa de calentamiento y dejar que se enfríe. Agregar 50 mL de Acetonitrilo al residuo enfriado en el vaso de precipitados y someter a ultrasonido durante algunos minutos para disolver. La solución típicamente contiene entre 0.2 y 0.4 mg/mL de Enalapril Dicitopiperazina. (NOTA: Evitar el sobrecalentamiento para prevenir la degradación inducida por calor, que podría generar un color marrón) (Farmacopea Americana USP 42 NF 37, 2019).

Procedimiento: Colocar una cantidad de Enalapril Dicitopiperazina obtenido por degradación de Enalapril Maleato en análisis en contacto cercano con un elemento de reflexión interno (ERI), tal como el germanio u otro material adecuado con un alto índice de refracción. Asegurar un contacto cercano y uniforme entre la sustancia y la superficie completa



del cristal del elemento de reflexión interna. Examinar el espectro de reflectancia total atenuada (ATR).

### b) Identificación por Cromatografía en Capa Fina

Para el desarrollo del ensayo de identificación por cromatografía en capa fina se realizaron eluciones en 2 sistemas con diferentes fases móviles según la bibliografía, a partir del cual se logró una buena separación entre el principio activo y Enalapril Dicotopiperazina producto de degradación.

#### Sistema 1: Cromatografía en capa fina

##### CONDICIONES DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO 1

Clasificación	Fármaco cardíaco
Forma Farmacéutica	Tableta Placa: Silica Gel 60 F 254 Tiempo de saturación: 10 min Detección: Lámpara UV
Condiciones cromatográficas	Técnica de separación: Ascendente Volumen de sembrado: 30 µL Concentración de la solución: 2 mg/mL Diluyente: Metanol Fase móvil: Cloroformo: Metanol: Ácido acético glacial ( 85:15:1 v/v)
Condiciones según bibliografía: (Charegaonkar)	

#### Sistema 2: Cromatografía en capa fina

##### CONDICIONES DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO 2

Clasificación	Fármaco cardíaco
Forma Farmacéutica	Tableta Placa: Silica Gel 60 F 254 Tiempo de saturación: 10 min Detección: Lámpara UV
Condiciones cromatográficas	Técnica de separación: Ascendente Volumen de sembrado: 30 µL Concentración de la solución: 2 mg/mL Diluyente: Metanol Fase móvil: Butanol : Agua destilada: Ácido acético ( 3:1:1)
Condiciones según bibliografía: (Departamento de sustancias de referencia . Centro de Investigación y desarrollo de medicamentos, 2007).	

### Preparación de la solución de prueba

Colocar con cuidado 67.5 mg de Enalapril Maleato estándar de referencia en un vaso de precipitados de 100 mL formando un montículo en el fondo del vaso de precipitados. Colocar el vaso de precipitados sobre una placa de calentamiento, aproximadamente a la mitad de la temperatura máxima de la placa. Calentar durante aproximadamente 1 a 5 minutos hasta que el sólido funda. Retirar de inmediato el vaso de precipitados de la placa de calentamiento y dejar que se enfríe.

Agregar 25 mL de acetonitrilo al residuo enfriado en el vaso de precipitados y someter a ultrasonido durante algunos minutos para disolver. La solución contiene una concentración aproximada de 20 mg/mL de Enalapril Dicetopiperazina.

De la anterior solución madre de Enalapril Dicetopiperazina transferir 1 mL a un matraz aforado de 10 mL para obtener una concentración final de 2 mg/mL.

### Desarrollo de Elución en el Sistema Cromatográfico

Sembrar 30  $\mu$ L de la solución de prueba a la placa de gel de Silica Gel 60 F 254 y secar cuidadosamente los depósitos iniciales. Desarrollar hasta una distancia de 8 cm con la fase móvil indicada para cada sistema cromatográfico. Secar la placa de gel de Silica Gel 60 F 254 en una corriente de aire caliente. Realizar los respectivos cálculos del valor R<sub>f</sub> y revelar la cromatoplaque con la lámpara UV.

## **3.4 Desarrollo del método analítico indicador de estabilidad**

### **3.4.1 Barrido Espectral por Espectrofotometría de Absorción UV – Visible**

Se realizó el barrido espectral de las siguientes soluciones que intervienen en el trabajo para verificar la longitud de onda de máxima absorbancia para la cuantificación del principio activo. Para lo cual se realizó la lectura de las siguientes soluciones:

- Solución estándar de Enalapril Maleato
- Solución de Enalaprilat USP
- Solución de Enalapril Dicetopiperazina

**Procedimiento:** Realizar el barrido de las soluciones en el Espectrofotómetro de Absorción UV – Visible en un rango de 200 a 400 nm utilizando como blanco el diluyente del método analítico.

### 3.4.2 Selección de las Condiciones Cromatográficas

En base al método indicado de la Farmacopea USP 42 NF 37 se realizaron pruebas iniciales en las condiciones siguientes:

Condiciones cromatográficas según Farmacopea USP vigente	
Columna	4.6 mm x 25 cm ,relleno L7 de 5 $\mu$ m
Fase móvil	Buffer fosfato de sodio pH 2.2 y Acetonitrilo ( 75 : 25)
Longitud de onda	215 nm
Volumen de inyección	50 $\mu$ L
Temperatura	50 °

Sin embargo, el método indicado no logró la separación del principio activo y los productos de degradación. Se procedió a modificar las proporciones de la fase móvil y la temperatura de las corridas sin embargo no se obtuvieron buenos resultados.

### 3.4.3 Desarrollo del método analítico

En base a las condiciones cromatográficas de la Farmacopea USP 42 NF 37 se realizaron las siguientes modificaciones en el sistema cromatográfico

- Cálculo del pH del Buffer fosfato de Potasio 0.01 M en base a los pka del principio activo y productos de degradación
- Cálculo de la proporción de la fase móvil en función de la fuerza de la elución.
- Selección de la columna cromatográfica

#### 3.4.3.1 Cálculo de las concentraciones en la forma ionizada y forma no ionizada del buffer fosfato de potasio 0.01 M

Para conseguir un pH apropiado que asegure el estado iónico del principio activo es necesario emplear buffers salinos (fosfatos) y un solvente orgánico donde el metanol es el de mayor disolución de sales. La concentración puede variar de 0 a 200 mM para obtener buenas separaciones. (Oscar Alberto Quattrocchi, Introducción al HPLC, 1992).

pKa Enalapril Maleato = 3.0

### Ecuación de Henderson Hasselbalch

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left( \frac{[\text{sal}]}{[\text{ácido}]} \right)$$

Donde:

Csal = Concentración de la sal

Cácido = Concentración del ácido

#### 3.4.3.2 Cálculo de la ionización del Enalapril Maleato

1er paso: A partir de la ecuación de Henderson Hasselbalch calculamos la relación entre la forma disociada y la forma no disociada

Por tanto:

$$\frac{C_{\text{sal}}}{C_{\text{ácido}}} = 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}$$

$$\frac{C_{\text{sal}}}{C_{\text{ácido}}} = 10^{2.2 - 3}$$

$$\frac{C_{\text{sal}}}{C_{\text{ácido}}} = \frac{0.158}{1}$$

Forma Disociada =  $0.158 / 1.158 * 100 = 13.6 \%$  **Forma Ionizada**

Forma no Disociada =  $100 \% - 13.6 \% = 86.4 \%$  **Forma No Ionizada**

Para el desarrollo se mantiene el pH de la solución Buffer a 2.2 ya que a ese valor el Enalapril Maleato se encuentra en un aproximado del 90 % en su forma no ionizada lo cual nos favorece la retención del fármaco en la columna.

### 3.4.3.3 Cálculo de la proporción de la fase móvil en función de la fuerza de elución

El modificador más empleado en el desarrollo de métodos analíticos es el metanol para asegurar el estado iónico del principio activo a un pH adecuado, esta interacción depende de la interacción de la fase móvil con la muestra que puede ser de tipo dispersivo, dipolar, por puentes de hidrógeno o una combinación entre ellas. (Oscar Alberto Quattrocchi, Introducción al HPLC, 1992).

Fuerza de elución del metanol = 2.6

Fuerza de elución del agua = 0

En función a las recomendaciones de desarrollo de métodos analíticos uno de los caminos para determinar la fase móvil es comenzar con una concentración media de modificador orgánico (50 % de Metanol o 50 % de Acetonitrilo en agua grado HPLC) y ajustar las proporciones de acuerdo a la separación obtenida (Oscar Alberto Quattrocchi, Introducción al HPLC, 1992).

#### Cálculo de la fuerza de elución con Acetonitrilo grado HPLC

Proporción de 50 % agua y 50 % ACN

$$Fuerza\ de\ eluci3n\ requerida = \frac{(Fe\ H2O \times \% H2O)}{100} + \frac{(Fe\ ACN \times \% ACN)}{100}$$

Donde:

$Fe$  = Fuerza de elución

Datos:

Fuerza de elución del Agua = 0

Fuerza de elución de Acetonitrilo = 3.2

% Agua = 50 % y % Acetonitrilo = 50 %

$$Fuerza\ de\ eluci3n\ requerida = \frac{(0 \times 50)}{100} + \frac{(3.2 \times 50)}{100}$$

$$Fuerza\ de\ eluci3n\ requerida = 1.6$$

La fuerza de elución requerida con Acetonitrilo es de 1.6 en base a este dato calculamos las proporciones necesarias reemplazando el Acetonitrilo por Metanol para mejorar la selectividad y afinidad del principio activo en la columna (Oscar Alberto Quattrocchi, Introducción al HPLC, 1992).

Cálculo de la proporción de fase móvil con relación a Metanol grado HPLC

$$\% \text{ Solvente orgánico} + \% \text{ Solvente acuoso} = 100 \%$$

A partir de la fórmula de fuerza de elución requerida despejamos la cantidad de solvente orgánico.

$$\text{Fuerza de elución requerida} = \frac{(Fe \text{ H}_2\text{O} \times \% \text{ H}_2\text{O})}{100} + \frac{(Fe \text{ MOH} \times \% \text{ MOH})}{100}$$

Datos:

Fuerza de elución del Agua = 0

Fuerza de elución requerida = 1.6

Fuerza de elución del Metanol = 2.6

Cálculos:

$$\text{Fuerza de elución requerida} = \frac{(Fe \text{ H}_2\text{O} \times \% \text{ H}_2\text{O})}{100} + \frac{(Fe \text{ MOH} \times \% \text{ MOH})}{100}$$

$$1.6 = \frac{(0 \times \% \text{ H}_2\text{O})}{100} + \frac{(2.6 \times \% \text{ MOH})}{100}$$

Despejamos el % de Metanol

$$\% \text{ Solvente orgánico (Metanol)} = 61.5 \%$$

Cálculo del porcentaje de solvente acuoso

$$100 \% - \% \text{ Metanol} = \% \text{ solvente acuoso}$$

$$100 \% - 61.5 \% = \% \text{ solvente acuoso}$$

$$\% \text{ solvente acuoso (Agua) } = 38.5 \%$$

% Solvente orgánico MOH = Aproximadamente 60 %

% Solvente acuoso Agua = Aproximadamente 40 %

En función a estos datos se elige como punto de partida para la fase móvil del sistema preliminar en el desarrollo del método analítico la proporción de 60 % de Metanol y 40 % Fase acuosa en condiciones isocráticas de acuerdo a los cálculos obtenidos. (Oscar Alberto Quattrocchi, Introducción al HPLC, 1992)

#### 3.4.3.4 Selección de la columna

El punto de partida recomendado para el desarrollo de métodos analíticos es el uso de una columna de tipo C18 debido a que el volumen de la fase ligada ofrece un mejor efecto protector contra la disolución de la matriz silica subyacente. El Enalapril Maleato al ser un isómero óptico, la bibliografía nos recomienda un sistema en fase reversa con una columna C18 como punto de partida para el desarrollo del método analítico indicador de estabilidad. Las columnas de grupos funcionales más pequeños son en general menos estables. (Quattrocchi, 1992).

#### 3.4.3.5 Selección de la Longitud de Onda

Un punto importante a considerar es la elección del detector a utilizar. El detector de primera elección es el empleo de un detector UV por su simplicidad, robustez y simplicidad en sistemas de desarrollo de métodos isocráticos.

Para el presente trabajo de investigación la longitud de onda de elección fue en base a lo indicado en la Farmacopea USP 42 vigente para la cuantificación de Enalapril Maleato Tableta (215 nm) (Farmacopea Americana USP 42 NF 37, 2019).

#### 3.4.3.6 Robustez

Durante el desarrollo es importante realizar un estudio de robustez ya que el método desarrollado debe ser reproducible frente a posibles cambios de analistas o instrumentos. Así

es de esperar que la modificación de algún factor no produzca cambios drásticos en la separación. Para el presente estudio se aplica un diseño factorial fraccionado de dos niveles ( $2^{n-1}$ ).

Para la selección de las variables consideradas se tomó el conocimiento adquirido durante la etapa inicial del desarrollo para minimizar el número de ensayos a realizar.

**Tabla 7. Diseño factorial fraccionada**

Variables	Respuesta
pH	Factor de Asimetría
Concentración del Buffer	Platos teóricos
Temperatura	Resolución
Volumen de inyección	

**Tabla 8. Variables de diseño factorial fraccionando**

Factor	Variable	Nivel -	Nivel +
A	pH	2.0	2.2
B	Concentración Buffer	10 mM	20 mM
C	Temperatura	35 °C	40°C
D	Volumen de inyección	20 µL	30 µL

**Tabla 9. Matriz de diseño factorial fraccionada**

Factor o Variable	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>pH</b>	-	+	-	+	+	+	-	-
<b>Concentración Buffer</b>	+	-	-	+	-	+	-	+
<b>Temperatura</b>	-	-	+	-	+	+	-	+
<b>Volumen de inyección</b>	+	+	+	-	-	+	-	-

**Procedimiento:** Valorar las muestras indicadas por HPLC para la solución de aptitud en las condiciones descritas para cada experimento y realizar el cálculo estadístico para definir los factores que tienen efecto significativo o no significativo en los parámetros cromatográficos del método analítico.



### 3.4.3.7 Estabilidad de las soluciones estándar, muestra y solución de aptitud de sistema

Realizar inyecciones de las soluciones estándar, solución muestra y solución aptitud a diferentes intervalos de tiempo.

**Tabla 10. Estabilidad de la solución estándar, muestra y solución aptitud**

Estabilidad de las soluciones	
Solución estándar	0h, 3h ,5h, 8h,12h,18h,24h
Solución muestra	0h, 3h ,5h, 8h,12h,18h,24h
Solución Aptitud	0h, 3h ,5h, 8h,12h,18h

**Procedimiento:** Valorar las muestras con el método desarrollado y realizar el análisis estadístico de los datos.

### 3.4.4 Metodología para la Validación del Método Indicador de Estabilidad

#### 3.4.4.1 Preparación de la Fase Móvil

Mezcla de Buffer Fosfato monobásico de Potasio 10 mM pH 2.2 y Metanol grado HPLC (40: 60)

#### 3.4.4.2 Preparación de la Solución Amortiguadora 10 mM pH 2.2

Disolver 1.3608 g de fosfato monobásico de potasio en un matraz aforado de 1,000 mL con agua destilada grado cromatográfico, aforar a volumen con el mismo disolvente y mezclar. Llevar a pH con ácido fosfórico al 85 % o hidróxido de potasio 1 N. Filtrar por filtro de membrana de acetato de celulosa de 0.45  $\mu$ m.

#### 3.4.4.3 Preparación de las Soluciones de Análisis

##### 3.4.4.3.1 Preparación de la Solución madre de estándar de Enalapril Maleato

Pesar con exactitud 20 mg de Enalapril Maleato estándar de referencia, transferir a un matraz aforado de 25 mL con fase móvil, sonicar por 20 minutos y aforar. De la anterior tomar 5 mL, llevar a un matraz aforado de 20 mL y aforar con fase móvil.

Concentración final: 0.2 mg/ mL Enalapril Maleato

#### **3.4.4.3.2 Preparación de la Solución madre de Enalaprilat**

Pesar con exactitud 10 mg de Enalaprilat estándar USP, transferir a un matraz de 25 mL con agua destilada, sonicar por 20 minutos y aforar con el mismo solvente.

Concentración final: 0.4 mg/mL de Enalaprilat

#### **3.4.4.3.3 Preparación de la Solución madre de Enalapril Dicotopiperazina**

##### Solución de Enalapril Dicotopiperazina

Colocar con cuidado 20 mg de Enalapril Maleato estándar de referencia en un vaso de precipitado de 100 mL formando un montículo en el fondo del vaso de precipitado. Colocar el vaso de precipitado sobre una placa de calentamiento, aproximadamente a la mitad de la temperatura máxima de la placa. Calentar durante aproximadamente 1 a 5 min. hasta que el sólido funda. Retirar de inmediato el vaso de precipitado de la placa de calentamiento y dejar que se enfríe. Agregar 50 mL de Acetonitrilo al residuo enfriado en el vaso de precipitados y someter a ultrasonido durante algunos minutos para disolver. La solución típicamente contiene entre 0.2 y 0.4 mg/mL de Enalapril Dicotopiperazina. (NOTA: Evitar el sobrecalentamiento para prevenir la degradación inducida por calor, que podría generar un color marrón). (Farmacopea Americana USP 42 NF 37, 2019).

#### **3.4.4.3.4 Solución Aptitud de Sistema**

Transferir 5 mL de la solución madre de estándar de Enalapril Maleato, 1 mL de Solución madre de Enalaprilat y 2 mL de solución madre de Enalapril Dicotopiperazina a un matraz aforado de 20 mL con fase móvil y aforar con el mismo solvente.

Concentración de Enalapril Maleato: 0.2 mg/mL

Concentración de Enalaprilat: 0.02 mg/mL

Concentración de Enalapril Dicotopiperazina: 0.03 mg/mL

#### **3.4.4.4 Definición de Condiciones Cromatográficas**

---

**Condiciones cromatográficas**

Columna	Agilent Zorbax Stable Bond C18 (4.6 mm x 25 cm de 5 $\mu$ m )
Guarda columna	Agilent Zorbax C18 (1.2 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m)
Fase móvil	Buffer Fosfato de Potasio pH 2.2 y Metanol ( 60: 40)
Longitud de onda	215 nm
Volumen de inyección	30 $\mu$ L
Temperatura	35 °
Diluyente	Fase móvil
Modo	Isocrático
Detector	Arreglo de Diodos
Flujo	0.5 mL/min

---

#### 3.4.4.5 Pureza de pico y Longitud de onda máxima

La comprobación de la pureza se evalúa para verificar si un pico tiene impurezas. Esta pureza puede evaluarse con un valor numérico que se denomina factor de pureza. Así un factor de pureza dentro del umbral aceptable de 995 indica una diferencia espectral del 0.5 % aceptable (Quattrocch, 1992).

Para ello se analiza los cronogramas del estándar de Enalapril Maleato y Solución aptitud de sistema, realizando los respectivos ajustes en el software del equipo, cabe hacer notar que es indispensable contar un detector de arreglo de diodo, el cual nos proporciona como resultado el gráfico de pureza de pico y la gráfica 3D.

#### 3.4.4.6 Estudios de Estrés (descomposición forzada) con el principio activo

Para los estudios de descomposición forzada se sometió el Enalapril Maleato estándar de referencia a las siguientes condiciones:

##### 3.4.4.6.1 Hidrólisis Ácida (principio activo)

###### Solución madre de Enalapril Maleato

Pesar con exactitud 20 mg de Enalapril Maleato estándar de referencia, transferir a un matraz aforado de 25 mL con fase móvil, sonicar por 20 minutos y aforar con el mismo disolvente.

## 3.4.4.6.1.1 Hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo)

Figura 5. Blanco de Hidrolisis ácida sin reflujo

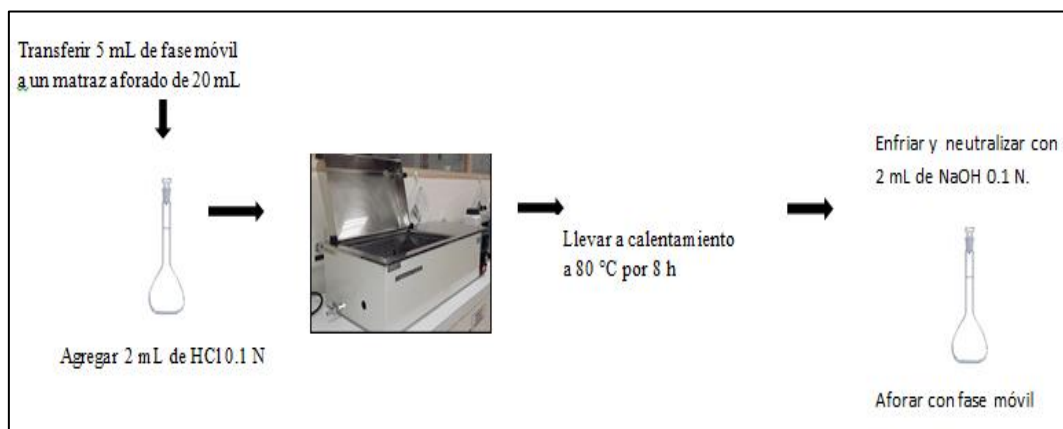
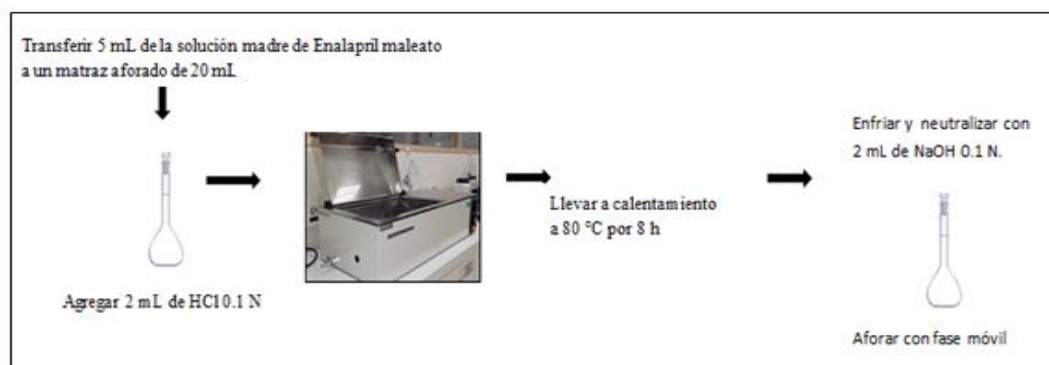


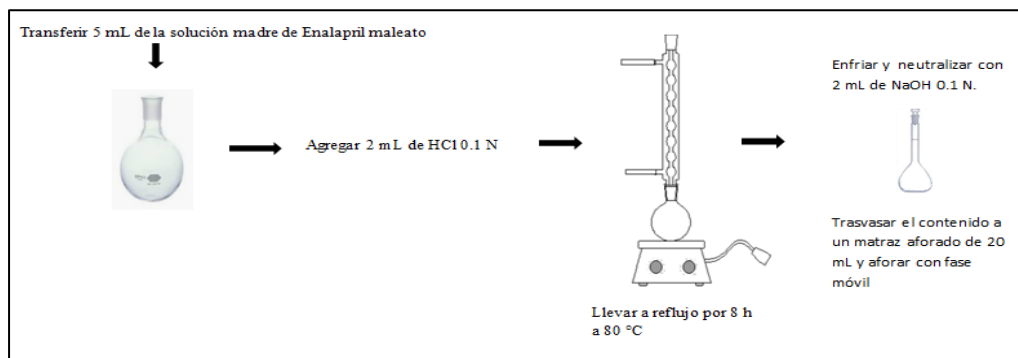
Figura 6. Hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo)



**PROCEDIMIENTO:** Filtrar las soluciones finales por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro e inyectar al cromatógrafo. Valorar las muestras indicadas, frente a un estándar de Enalapril Maleato que no fue sometido a hidrólisis ácida sin reflujo. Realizar 3 inyecciones de solución estándar de Enalapril Maleato y 3 inyecciones de la solución de Enalapril Maleato sometido a estrés.

## 3.4.4.6.1.2 Hidrólisis ácida con reflujo (principio activo)

Figura 7. Hidrólisis ácida con reflujo (principio activo)



**PROCEDIMIENTO:** Filtrar las soluciones finales por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro e inyectar al cromatógrafo. Valorar las muestras indicadas, frente a un estándar de Enalapril Maleato que no fue sometido a hidrólisis ácida con reflujo. Realizar 3 inyecciones de solución estándar de Enalapril Maleato y 3 inyecciones de la solución de Enalapril Maleato sometido a estrés.

#### 3.4.4.6.2 Hidrólisis alcalina (principio activo)

##### Solución madre de Enalapril Maleato

Pesar con exactitud 20 mg de Enalapril Maleato estándar de referencia, transferir a un matraz aforado de 25 mL con fase móvil, sonicar por 20 minutos y aforar con el mismo diluyente.

##### 3.4.4.6.2.1 Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo)

Figura 8. Blanco de hidrólisis alcalina

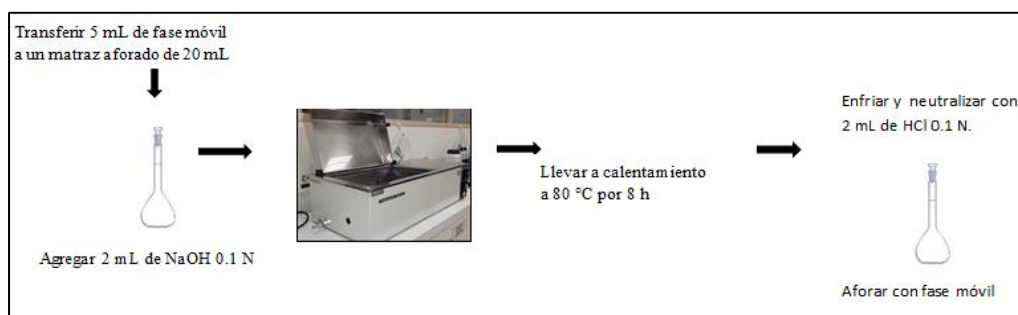


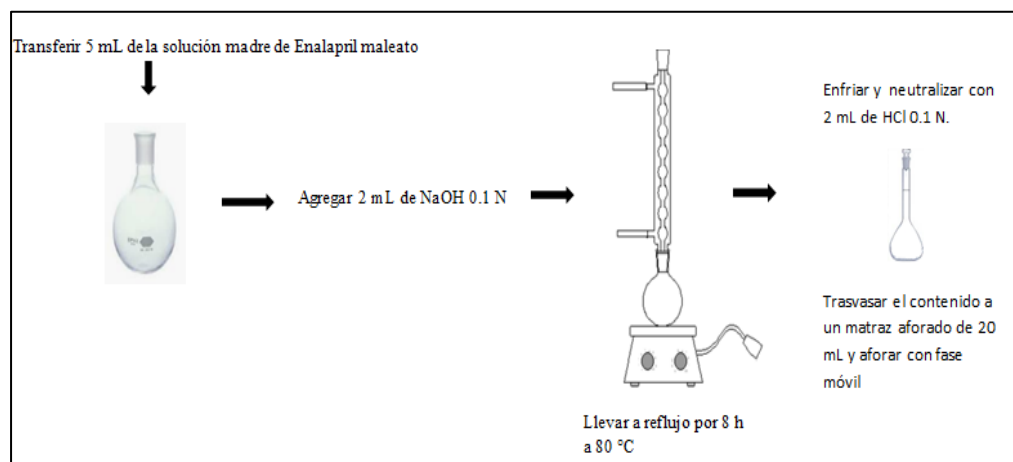
Figura 9. Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo)



**PROCEDIMIENTO:** Filtrar las soluciones finales por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro e inyectar al cromatógrafo. Valorar las muestras indicadas, frente a un estándar de referencia de Enalapril Maleato que no fue sometido a hidrólisis alcalina sin reflujo. Realizar 3 inyecciones de solución estándar de Enalapril Maleato y 3 inyecciones de la solución de Enalapril Maleato sometido a estrés.

#### 3.4.4.6.2 Hidrólisis alcalina con reflujo (principio activo)

Figura 10. Hidrólisis alcalina con reflujo (principio activo)



**PROCEDIMIENTO:** Filtrar las soluciones finales por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro e inyectar al cromatógrafo. Valorar las muestras indicadas, frente a un estándar de referencia de Enalapril Maleato que no fue sometido a hidrólisis alcalina con reflujo. Realizar 3 inyecciones de solución estándar de Enalapril Maleato y 3 inyecciones de la solución de Enalapril Maleato sometido a estrés.

### 3.4.4.6.3 Hidrólisis neutra (principio activo)

#### Solución madre de Enalapril Maleato

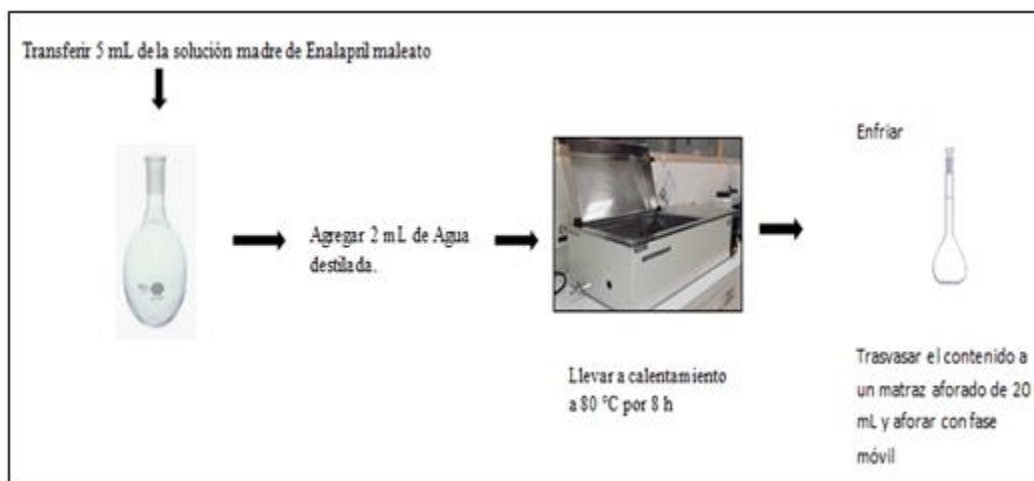
Pesar con exactitud 20 mg de Enalapril Maleato estándar de referencia, transferir a un matraz aforado de 25 mL con fase móvil, sonicar por 20 minutos y aforar.

#### 3.4.4.6.3.1 Hidrólisis neutra sin reflujo (principio activo)

Figura 11. Hidrólisis neutra blanco



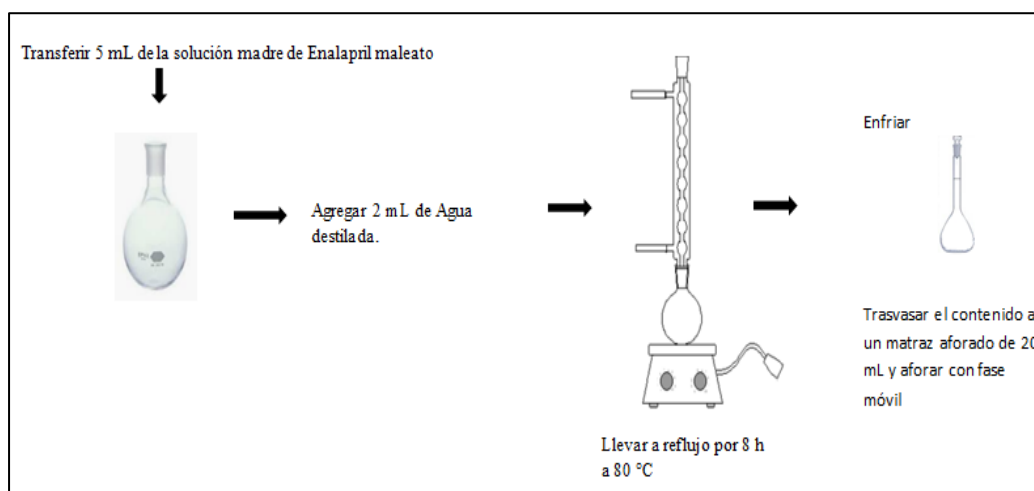
Figura 12. Hidrólisis neutra sin reflujo (principio activo)



**PROCEDIMIENTO:** Filtrar las soluciones finales por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro e inyectar al cromatógrafo. Valorar las muestras indicadas, frente a un estándar de referencia de Enalapril Maleato que no fue sometido a hidrólisis neutra sin reflujo. Realizar 3 inyecciones de solución estándar de Enalapril Maleato y 3 inyecciones de la solución de Enalapril Maleato sometido a estrés.

#### 3.4.4.6.3.2 Hidrólisis neutra con reflujo (principio activo)

Figura 13. Hidrólisis neutra con reflujo (principio activo)





**PROCEDIMIENTO:** Filtrar las soluciones finales por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro e inyectar al cromatógrafo. Valorar las muestras indicadas, frente a un estándar de referencia de Enalapril Maleato que no fue sometido a hidrólisis neutra con reflujo. Realizar 3 inyecciones de solución estándar de Enalapril Maleato y 3 inyecciones de la solución de Enalapril Maleato sometido a estrés.

#### 3.4.4.6.4 Oxidación (principio activo)

##### Solución madre de Enalapril Maleato

Pesar con exactitud 20 mg de Enalapril Maleato estándar de referencia, transferir a un matraz aforado de 25 mL con fase móvil, sonicar por 20 minutos y aforar con el mismo diluyente

##### 3.4.4.6.4.1 Oxidación sin reflujo (principio activo)

Figura 14. Blanco de la oxidación sin reflujo

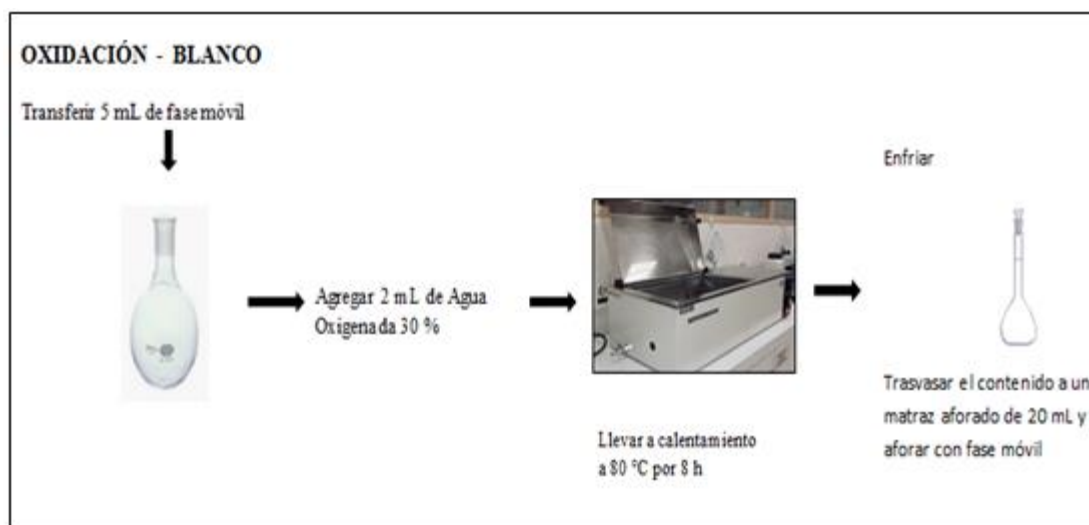
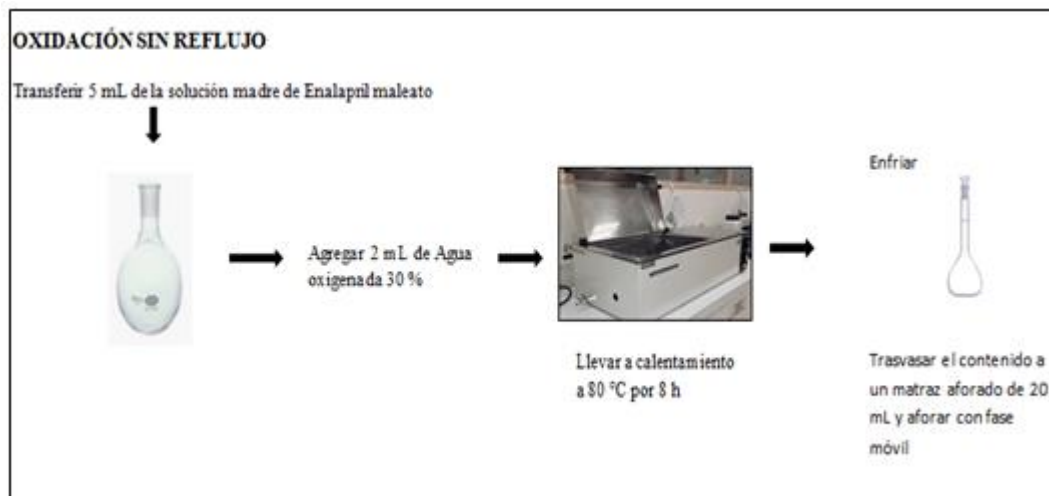


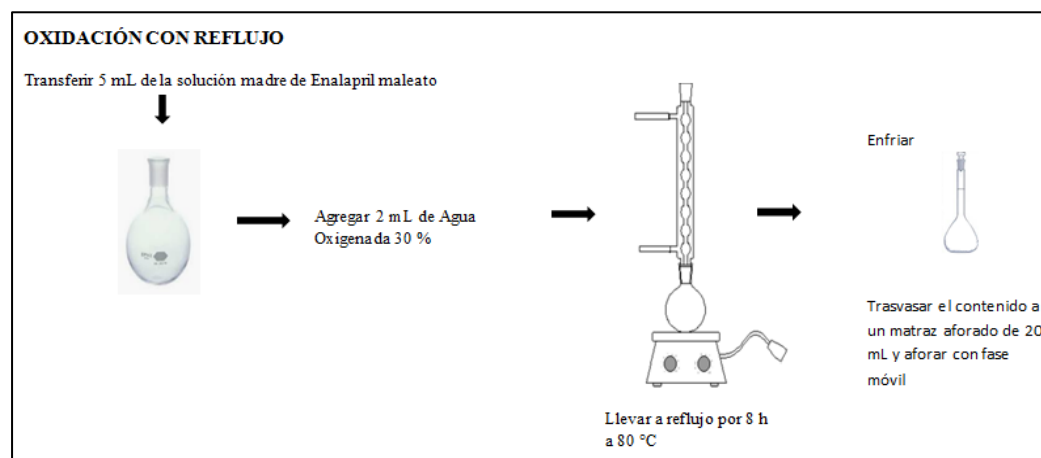
Figura 15. Oxidación sin reflujo (principio activo)



**PROCEDIMIENTO:** Filtrar las soluciones finales por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro e inyectar al cromatógrafo. Valorar las muestras indicadas, frente a un estándar de Enalapril Maleato que no fue sometido a oxidación sin reflujo. Realizar 3 inyecciones de solución estándar de Enalapril Maleato y 3 inyecciones de la solución de Enalapril Maleato sometido a estrés.

#### 3.4.4.6.4.2 Oxidación con reflujo (principio activo)

Figura 16. Oxidación con reflujo (principio activo)



**PROCEDIMIENTO:** Filtrar las soluciones finales por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro e inyectar al cromatógrafo. Valorar las muestras indicadas, frente a un estándar de Enalapril Maleato que no fue sometido a oxidación con reflujo. Realizar 3 inyecciones de solución estándar de Enalapril Maleato y 3 inyecciones de la solución de Enalapril Maleato sometido a estrés.

#### 3.4.4.6.5 Termólisis

Para la realización de la degradación por termólisis se sometió el estándar de referencia Enalapril Maleato a efecto de la temperatura hasta la obtención de un % de degradación. En una estufa Binder se colocaron 2 viales tapados, conteniendo una cantidad suficiente de estándar de trabajo de Enalapril Maleato a las temperaturas y tiempos de exposiciones indicados en tabla 11.

**Tabla 11. Temperaturas de Termólisis**

Temperatura	Tiempo de exposición	Inyecciones
60 °C	1, 2 días	Triplicado
80 °C	1, 2 días	Triplicado

Después de lo especificado se realizó la valoración de las muestras indicadas, frente a un estándar de referencia de Enalapril Maleato que no fue sometido a efecto de la temperatura.

#### 3.4.4.6.6 Fotólisis

##### Solución madre de Enalapril Maleato

Pesar con exactitud 20 mg de Enalapril Maleato estándar de referencia, transferir a un matraz aforado de 25 mL con fase móvil, sonicar por 20 minutos y aforar con el mismo diluyente.

**Procedimiento:** Para esta prueba se sigue las recomendaciones de la guía de la ICH Q1B disponiendo una cantidad necesaria de principio activo en una caja Petri destapada y expuestas a una lámpara de luz de 1.2 millones de lux-horas visibles y 200 Watt-hora / m<sup>2</sup> UV por el lapso de 10 días para definir si el Enalapril Maleato es o no sensible a la luz.

#### 3.4.4.7 Estudios de Estrés (descomposición forzada) con el principio activo + matriz

Para los estudios de descomposición forzada se sometió el Enalapril Maleato estándar de referencia + matriz de la tableta a la ruta de degradación más susceptible de descomposición hidrolítica.

##### 3.4.4.7.1 Hidrólisis Ácida (principio activo + matriz)

###### Solución madre de Enalapril Maleato + matriz de la tableta

Pesar con exactitud 20 mg de Enalapril Maleato estándar de referencia más 380 mg de matriz de la tableta, transferir a un matraz aforado de 25 mL con fase móvil, sonicar por 20 minutos y aforar con el mismo disolvente. Filtrar la solución a través de filtro Sartorius tipo 1288, material celulosa  $\alpha$  al 95 % de 12 – 15  $\mu$ m de tamaño de poro (Porosidad gruesa estructura suelta y filtración rápida).

##### 3.4.4.7.1.1 Hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo + matriz)

Figura 17. Blanco de Hidrolisis ácida



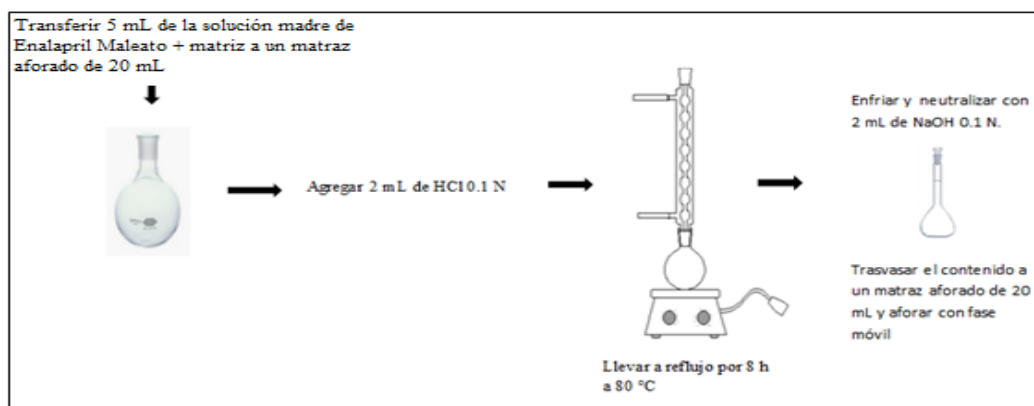
Figura 18. Hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo + matriz)



**PROCEDIMIENTO:** Filtrar las soluciones finales por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro e inyectar al cromatógrafo. Valorar las muestras indicadas, frente a un estándar de referencia de Enalapril Maleato que no fue sometido a hidrólisis ácida sin reflujo. Realizar 3 inyecciones de solución estándar de Enalapril Maleato y 3 inyecciones de la solución de Enalapril Maleato + matriz sometido a estrés.

#### 3.4.4.7.1.2 Hidrólisis ácida con reflujo

Figura 19. Hidrólisis ácida con reflujo (principio activo + matriz)



**PROCEDIMIENTO:** Filtrar las soluciones finales por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu\text{m}$

de poro e inyectar al cromatógrafo. Valorar las muestras indicadas, frente a un estándar de referencia de Enalapril Maleato que no fue sometido a hidrólisis ácida con reflujo. Realizar 3 inyecciones de solución estándar de Enalapril Maleato y 3 inyecciones de la solución de Enalapril Maleato + matriz sometido a estrés.

### 3.4.4.7.2 Hidrólisis Alcalina (principio activo + matriz)

#### 3.4.4.7.2.1 Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo + matriz)

Figura 20. Blanco de hidrólisis alcalina sin reflujo



Figura 21. Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo + matriz)

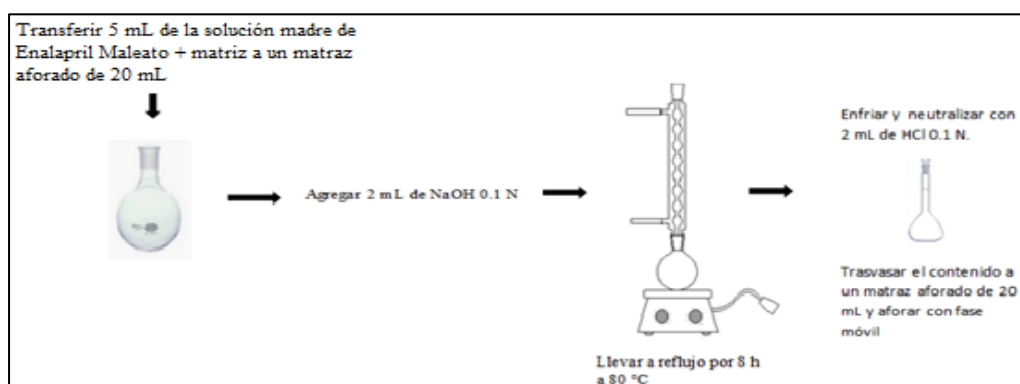


**PROCEDIMIENTO:** Filtrar las soluciones finales por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu$ m

de poro e inyectar al cromatógrafo. Valorar las muestras indicadas, frente a un estándar de referencia de Enalapril Maleato que no fue sometido a hidrólisis alcalina sin reflujo. Realizar 3 inyecciones de solución estándar de Enalapril Maleato y 3 inyecciones de la solución de Enalapril Maleato + matriz sometido a estrés.

#### 3.4.4.7.2 Hidrólisis alcalina con reflujo (principio activo + matriz)

Figura 22. Hidrólisis alcalina con reflujo (principio activo + matriz)



**PROCEDIMIENTO:** Filtrar las soluciones finales por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu\text{m}$  de poro e inyectar al cromatógrafo. Valorar las muestras indicadas, frente a un estándar de referencia de Enalapril Maleato que no fue sometido a hidrólisis alcalina con reflujo. Realizar 3 inyecciones de solución estándar de Enalapril Maleato y 3 inyecciones de la solución de Enalapril Maleato + matriz sometido a estrés.

#### 3.4.4.8 Validación del Método Analítico Indicador de Estabilidad

Según ICH Q2B” Validación de procedimientos analíticos”

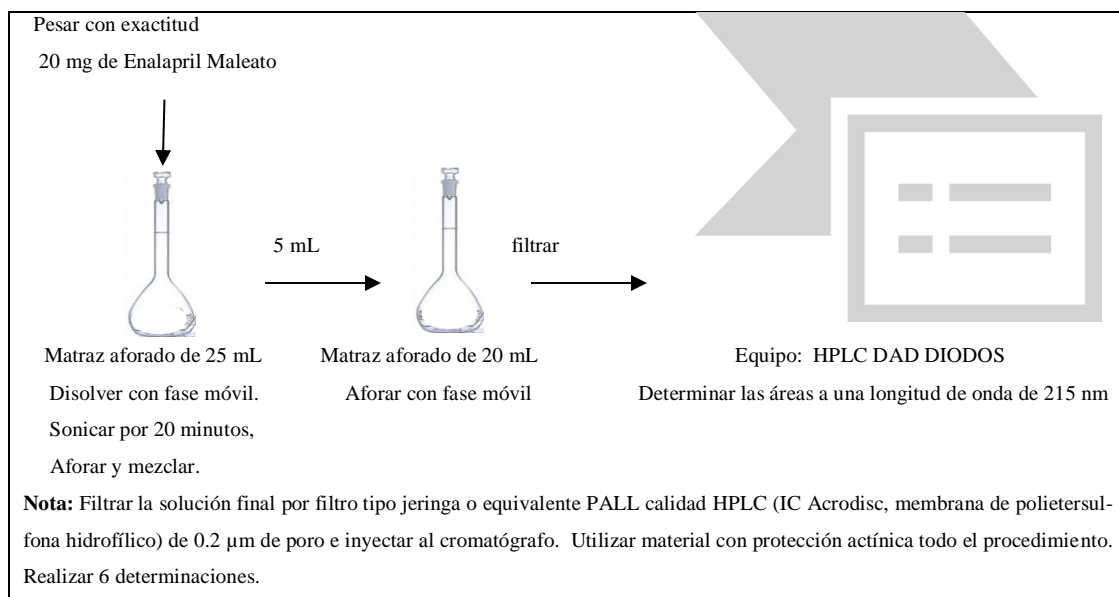
##### 3.4.4.8.1 Determinación de la Especificidad

Para la determinación de la Selectividad, Especificidad se procedió a la preparación de las siguientes soluciones.

- Solución estándar de Enalapril Maleato
- Solución estándar de Enalapril Maleato + matriz de la tableta

- Solución de matriz de la tableta
- Solución Blanco y fase móvil

**Figura 23. Preparación de la solución estándar de Enalapril Maleato**



**Figura 24. Preparación de la solución estándar de Enalapril Maleato + matriz**

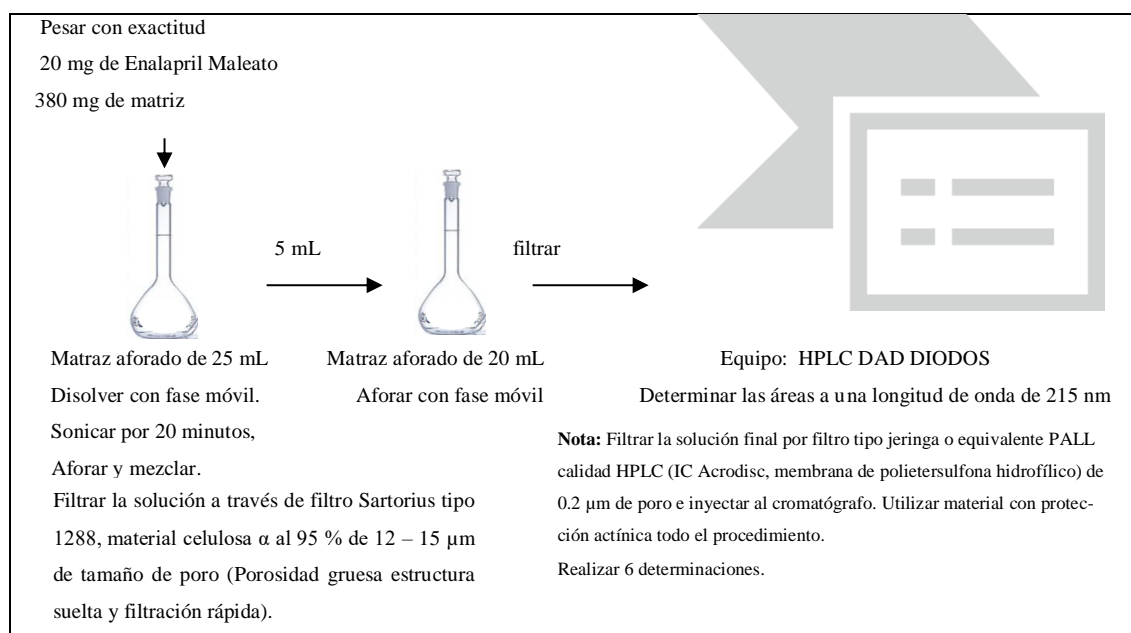




Figura 25. Preparación de la matriz de Especificidad

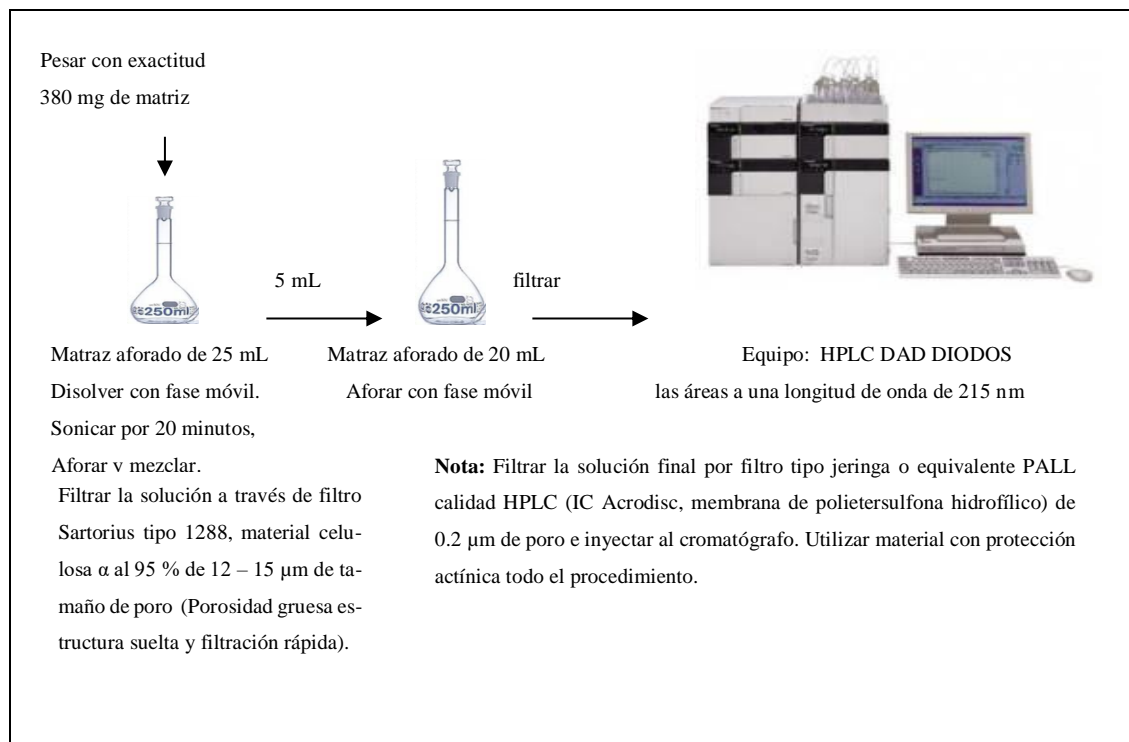


Figura 26. Preparación del blanco de Especificidad

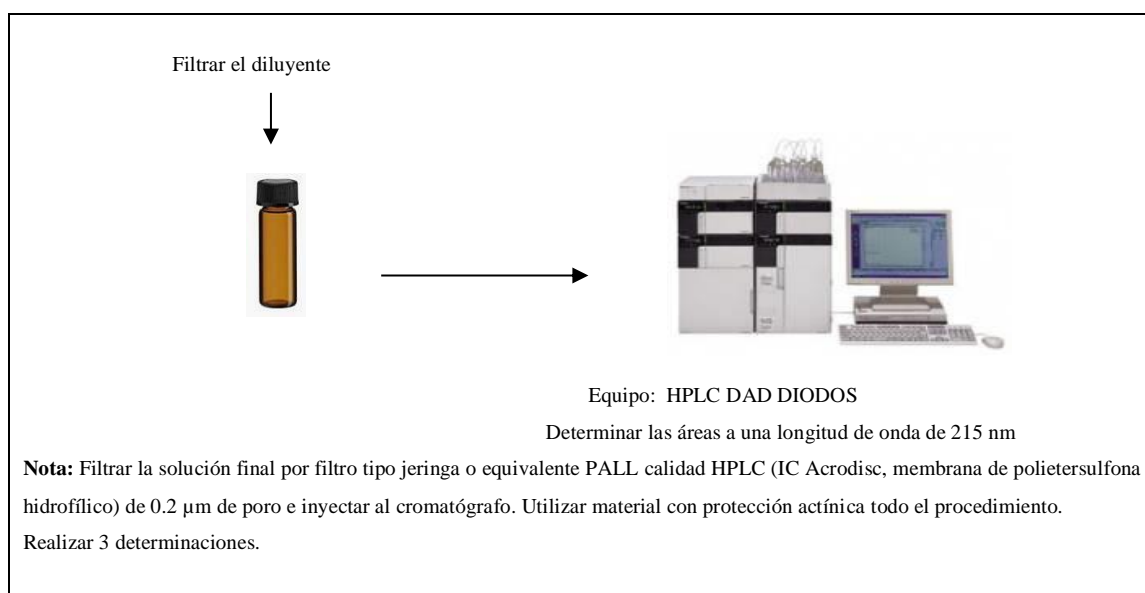
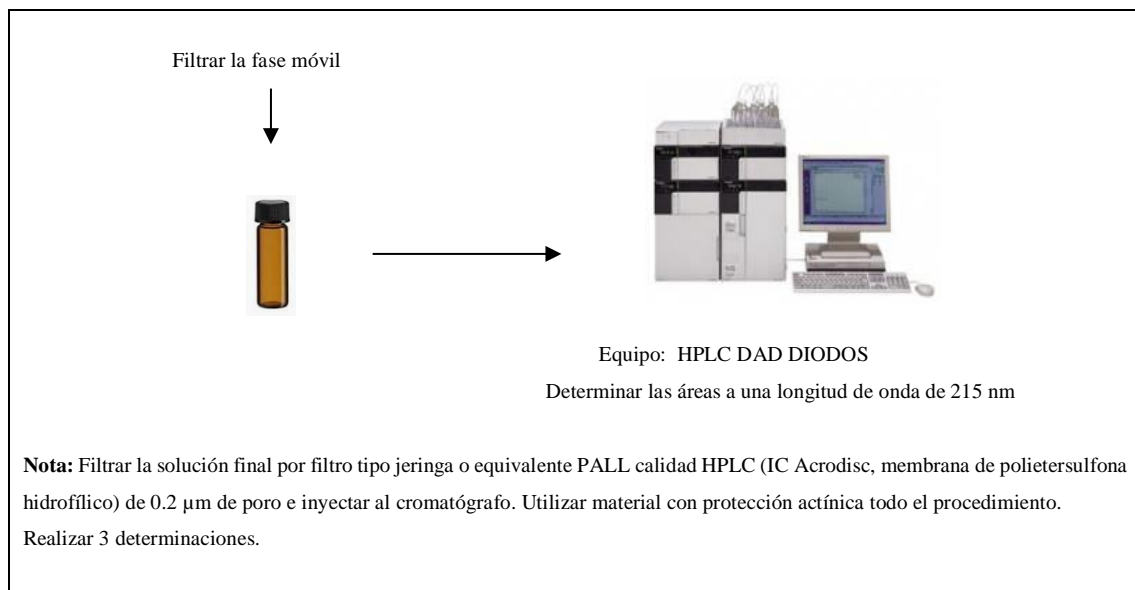


Figura 27. Preparación de la Fase Móvil de Especificidad



### 3.4.4.8.2 Determinación de la Linealidad e Intervalo

Los criterios de aceptación para la valoración del Enalapril Maleato como producto terminado están establecidos entre 90 % al 110 %, por tanto, el rango de trabajo debe ser más amplio de 80 a 120 % de la concentración de ensayo.

Se procedió a realizar la: Linealidad del método (principio activo + excipientes) y Linealidad del sistema (principio activo).

#### 3.4.4.8.2.1 Linealidad del Sistema (principio activo)

Tabla 12. Linealidad de sistema (principio activo)

Número de niveles de concentración	5
Intervalo de concentraciones	80%, 90 %, 100 %, 110 % y 120 %
Número de réplicas por cada nivel	3

Figura 28. Linealidad del sistema nivel 80 %

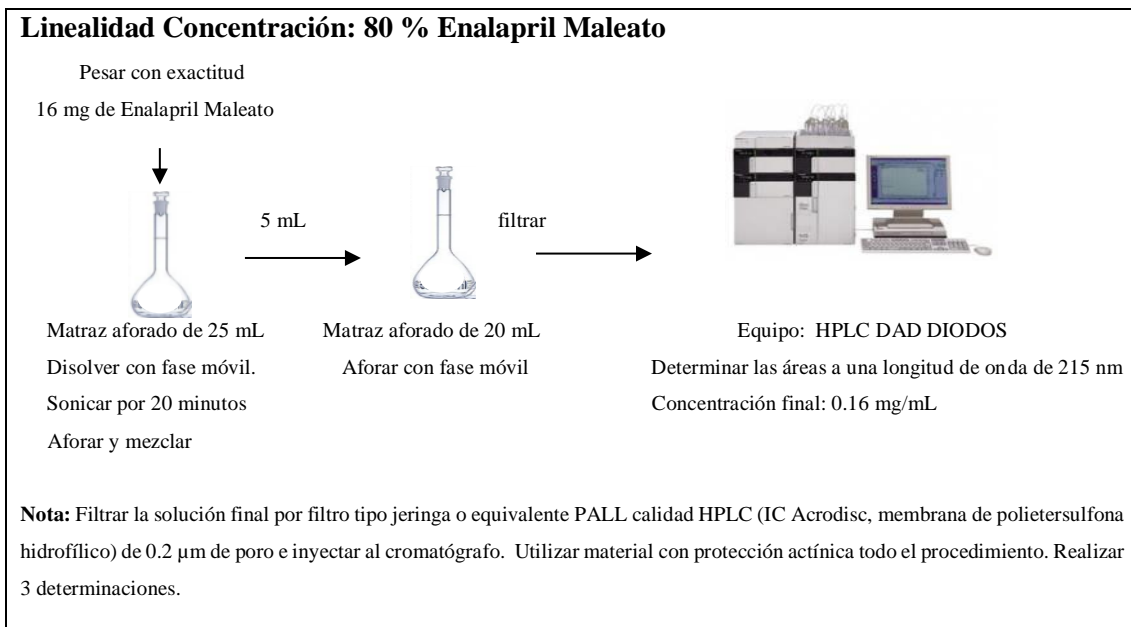


Figura 29. Linealidad del sistema nivel 90 %

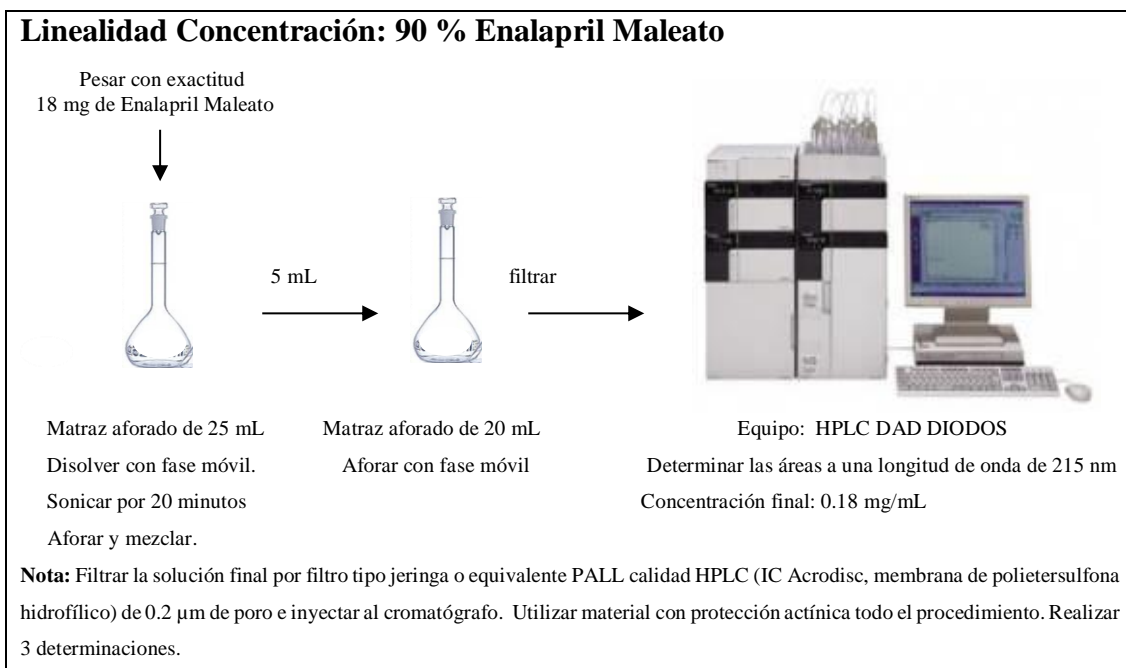


Figura 30. Linealidad del sistema nivel 100 %

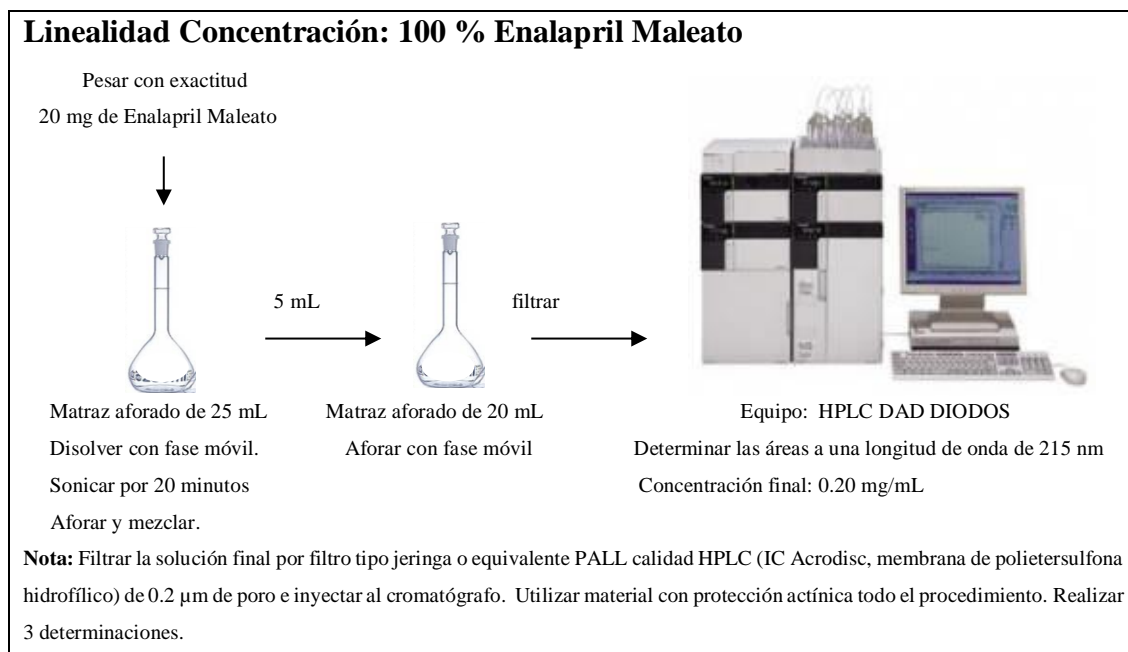


Figura 31. Linealidad del sistema nivel 110 %

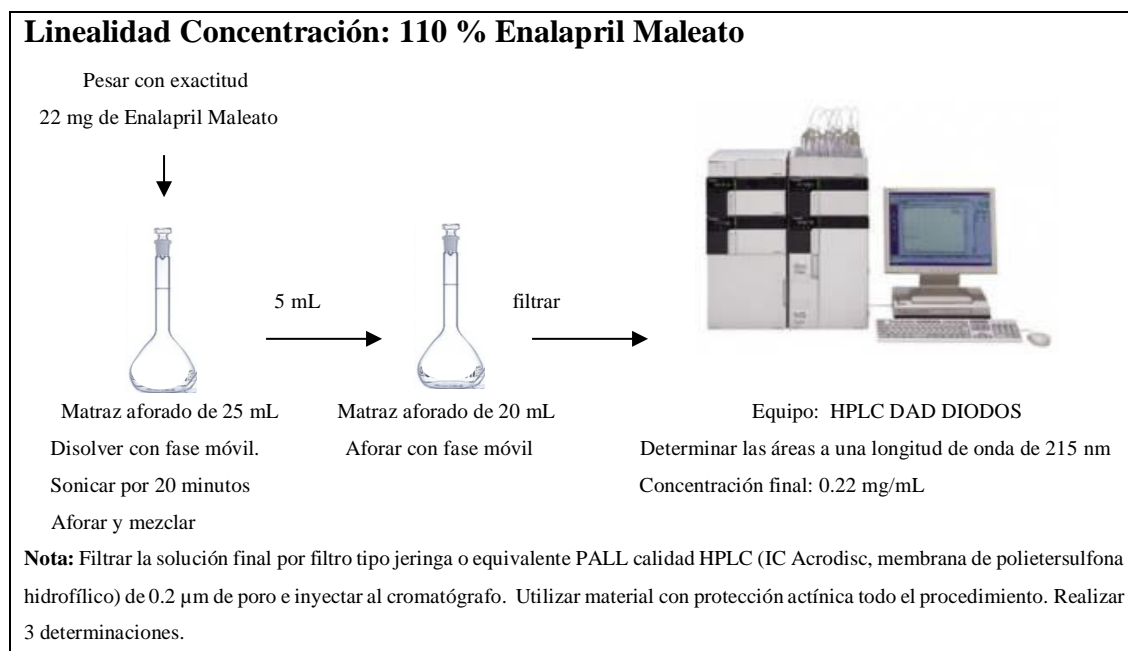
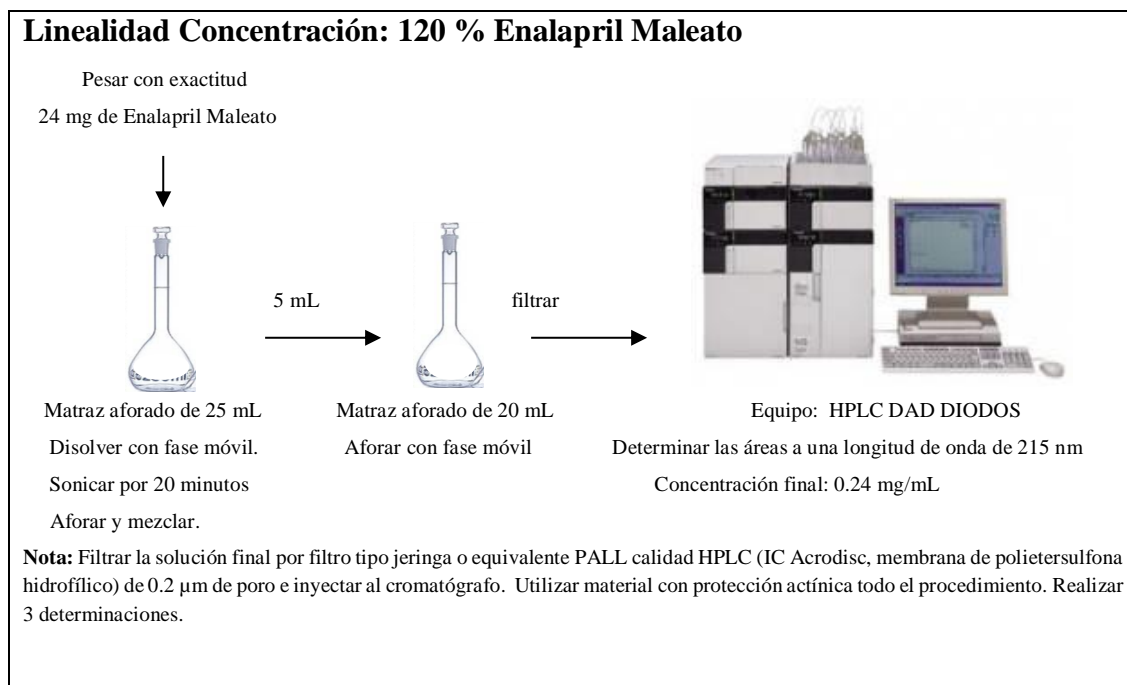


Figura 32. Linealidad del sistema nivel 120 %



### 3.4.4.8.2 Linealidad del Método (principio activo y matriz)

Tabla 13. Linealidad de método (principio activo y matriz)

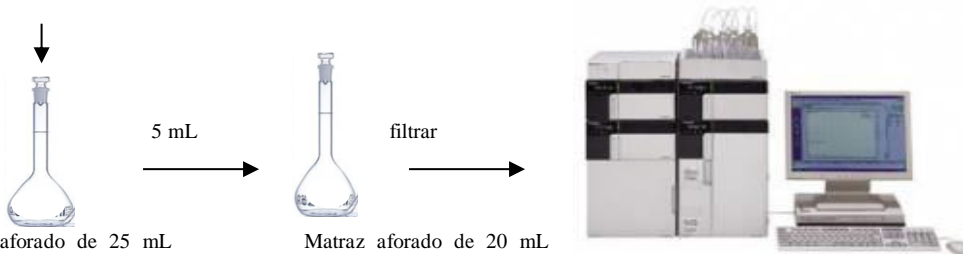
Número de niveles de concentración	5
Intervalo de concentraciones	80%, 90 %, 100 %, 110 % y 120 %
Número de réplicas por cada nivel	3

Cantidad de Enalapril Maleato + matriz	Porcentaje de Enalapril Maleato	Concentración final en mg/mL
16 mg + 304 mg	80 %	0.16 mg/mL
18 mg + 342 mg	90 %	0.18 mg/mL
20 mg + 380 mg	100 %	0.20 mg/mL
22 mg + 418 mg	110 %	0.22 mg/mL
24 mg + 456 mg	120%	0.24 mg/mL

Figura 33. Linealidad del método nivel 80 %

**Linealidad Concentración: 80 % Enalapril Maleato + matriz**

Pesar con exactitud  
16 mg de Enalapril Maleato + 304 mg matriz



Matraz aforado de 25 mL      5 mL      Matraz aforado de 20 mL      filtrar      Equipo: HPLC DAD DIODOS

Disolver con fase móvil.      Aforar con fase móvil      Determinar las áreas a una longitud de onda de 215 nm  
Sonicar por 20 minutos           Concentración final: 0.16 mg/mL  
Aforar y mezclar.

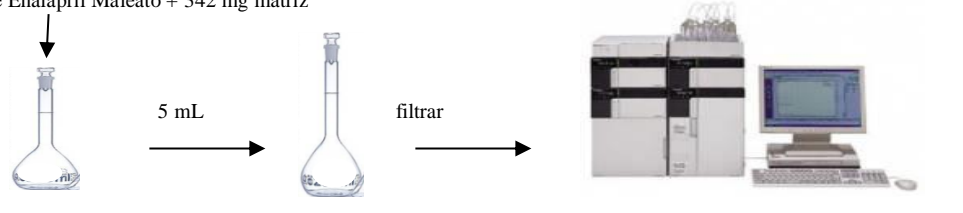
Filtrar la solución a través de filtro Sartorius tipo 1288, material celulosa  $\alpha$  al 95 % de 12 – 15  $\mu$ m de tamaño de poro (Porosidad gruesa estructura suelta y filtración rápida).

**Nota:** Filtrar la solución final por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu$ m de poro e inyectar al cromatógrafo. Utilizar material con protección actínica todo el procedimiento.

Figura 34. Linealidad del método nivel 90 %

**Linealidad Concentración: 90 % Enalapril Maleato + matriz**

Pesar con exactitud  
18 mg de Enalapril Maleato + 342 mg matriz



Matraz aforado de 25 mL      5 mL      Matraz aforado de 20 mL      filtrar      Equipo: HPLC DAD DIODOS

Disolver con fase móvil.      Aforar con fase móvil      Determinar las áreas a una longitud de onda de 215 nm  
Sonicar por 20 minutos           Concentración final: 0.18 mg/mL  
Aforar y mezclar.

Filtrar la solución a través de filtro Sartorius tipo 1288, material celulosa  $\alpha$  al 95 % de 12 – 15  $\mu$ m de tamaño de poro (Porosidad gruesa estructura suelta y filtración rápida).

**Nota:** Filtrar la solución final por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2  $\mu$ m de poro e inyectar al cromatógrafo. Utilizar material con protección actínica todo el procedimiento.

Figura 35. Linealidad del método nivel 100 %

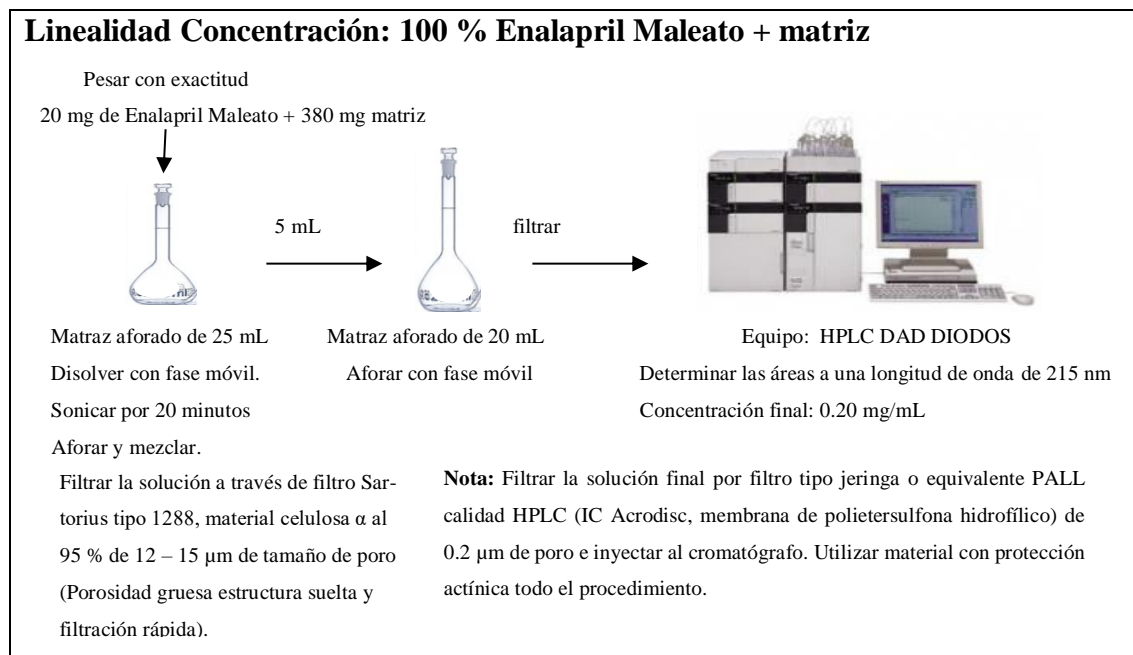


Figura 36. Linealidad del método nivel 110 %

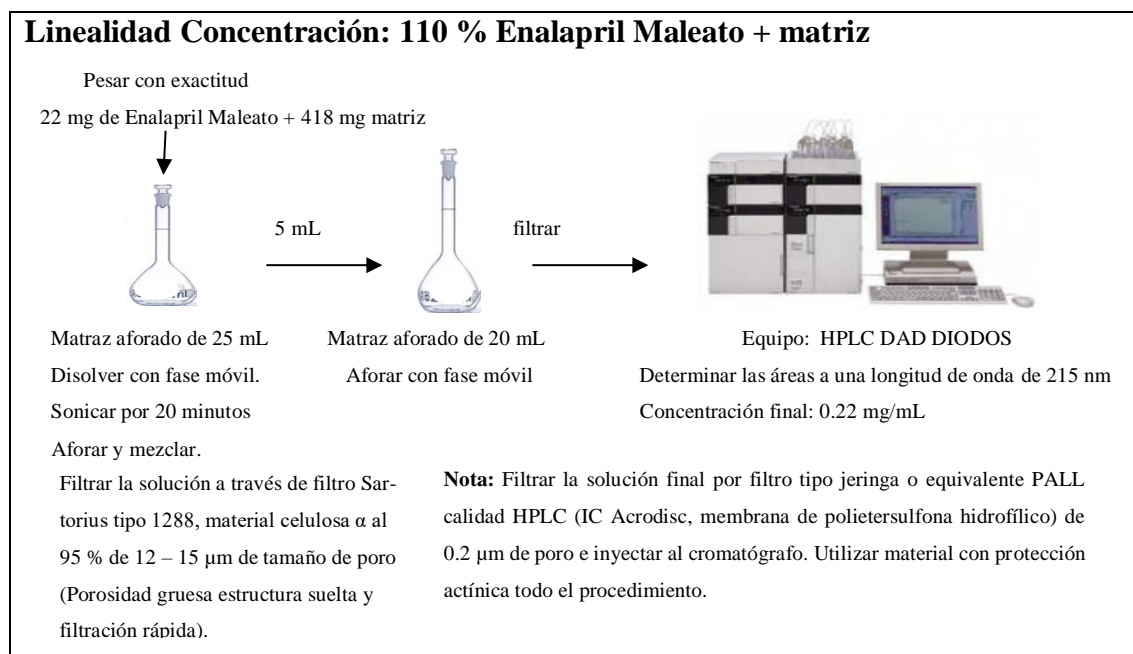
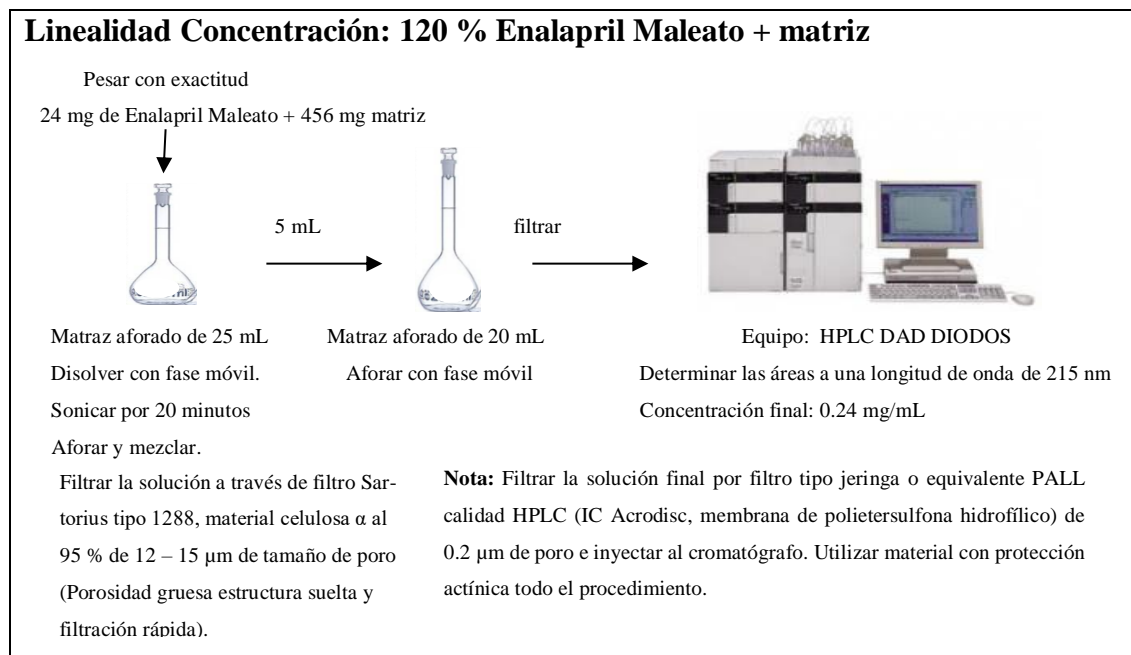


Figura 37. Linealidad del método nivel 120 %



### 3.4.4.8.3 Determinación de la Exactitud

Para la determinación de exactitud se preparó las siguientes soluciones:

- Estándar de Enalapril Maleato a la concentración de 80%, 100% y 120%
- Estándar de Enalapril Maleato + matriz a la concentración de 80%, 100% y 120%

Calcular los porcentajes de recuperación bajo la siguiente matriz

Tabla 14. Matriz de Exactitud

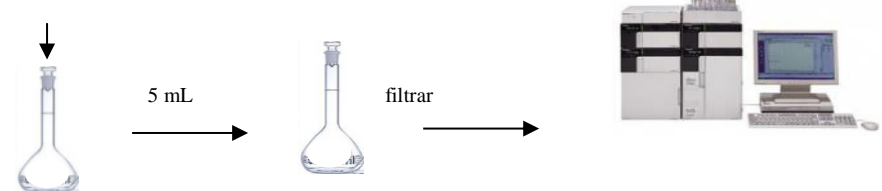
<b>Número de niveles de concentración</b>	3
<b>Intervalo de concentraciones</b>	80%, 100 % y 120 %
<b>Número de réplicas por cada nivel</b>	3



Figura 38. Exactitud (principio activo a la concentración de 80 %)

**Exactitud Concentración: 80 % Enalapril Maleato**

Pesar con exactitud  
16 mg de Enalapril Maleato



Matraz aforado de 25 mL      Matraz aforado de 20 mL      Equipo: HPLC DAD DIODOS

Disolver con fase móvil.      Aforar con fase móvil      Determinar las áreas a una longitud de onda de 215 nm

Sonicar por 20 minutos      Concentración final: 0.16 mg/mL

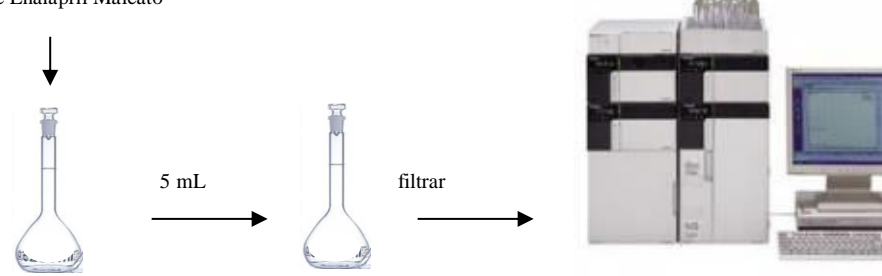
Aforar y mezclar

**Nota:** Filtrar la solución final por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2 µm de poro e inyectar al cromatógrafo. Utilizar material con protección actínica todo el procedimiento. Realizar 3 determinaciones.

Figura 39. Exactitud (principio activo a la concentración de 100 %)

**Exactitud Concentración: 100 % Enalapril Maleato**

Pesar con exactitud  
20 mg de Enalapril Maleato



Matraz aforado de 25 mL      Matraz aforado de 20 mL      Equipo: HPLC DAD DIODOS

Disolver con fase móvil.      Aforar con fase móvil      Determinar las áreas a una longitud de onda de 215 nm

Sonicar por 20 minutos      Concentración final: 0.20 mg/mL

Aforar y mezclar.

**Nota:** Filtrar la solución final por filtro tipo jeringa o equivalente PALL calidad HPLC (IC Acrodisc, membrana de polietersulfona hidrofílico) de 0.2 µm de poro e inyectar al cromatógrafo. Utilizar material con protección actínica todo el procedimiento. Realizar 3 determinaciones.

Figura 40. Exactitud (principio activo a la concentración de 120 %)

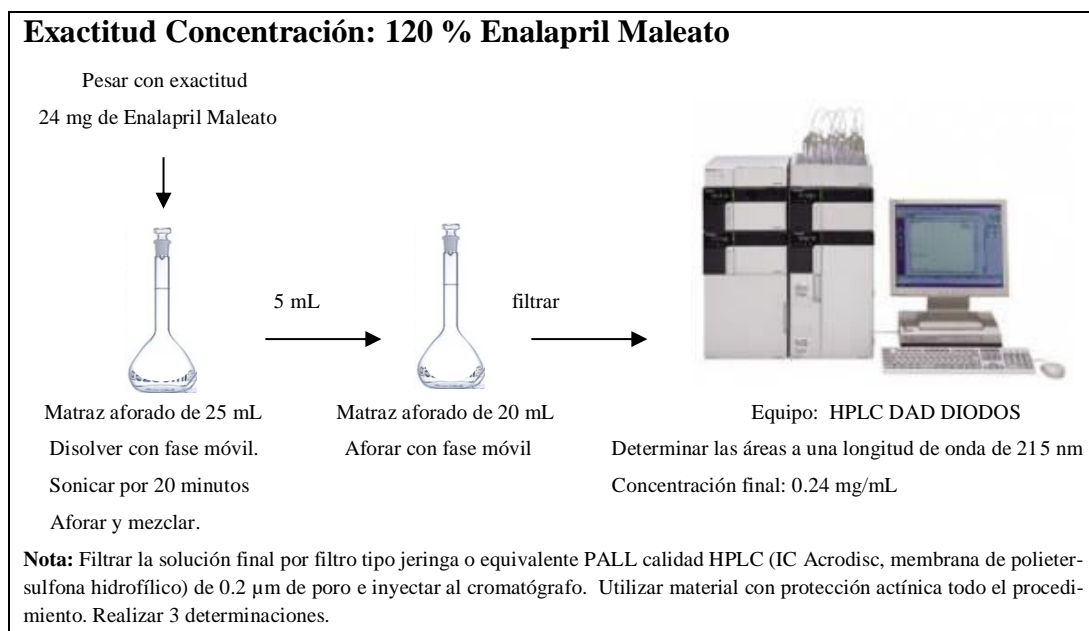


Figura 41. Exactitud (principio activo + matriz a la concentración de 80 %)

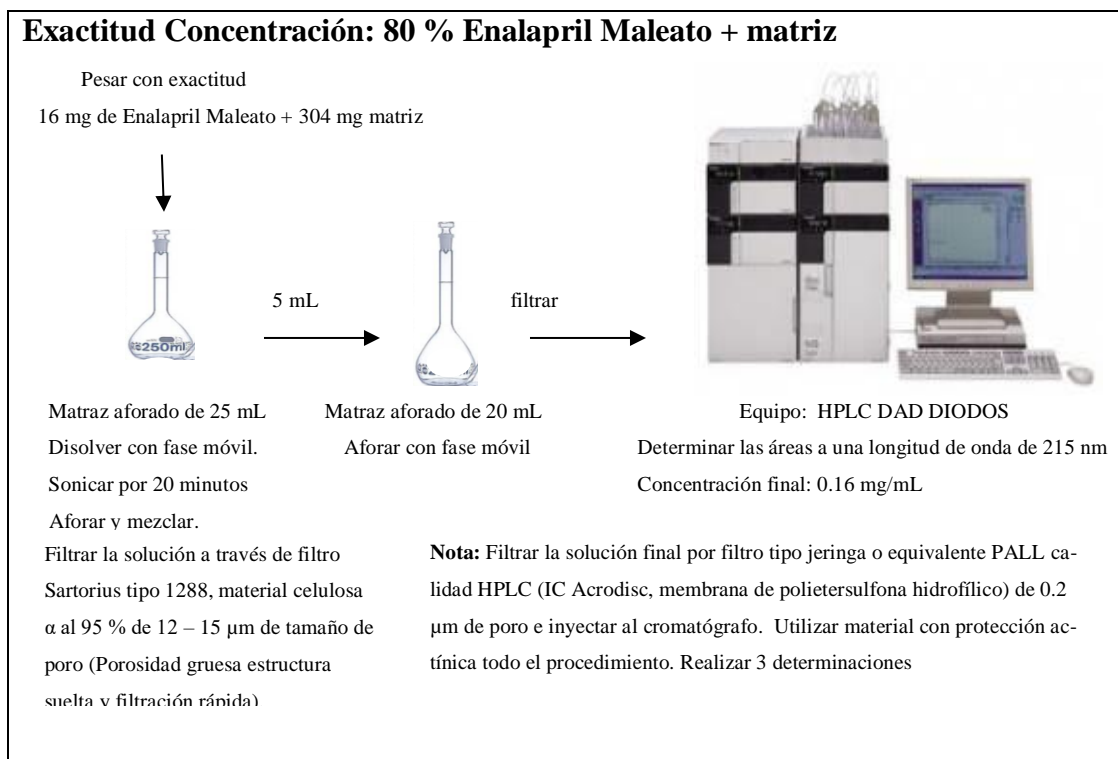


Figura 42. Exactitud (principio activo + matriz a la concentración de 100 %)

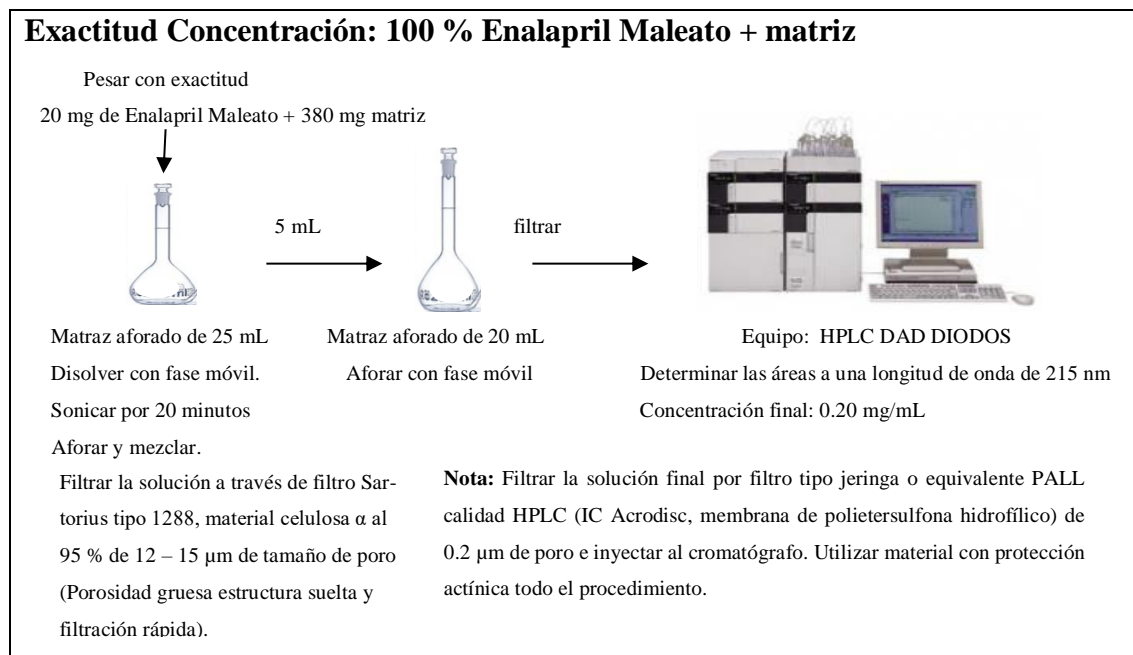
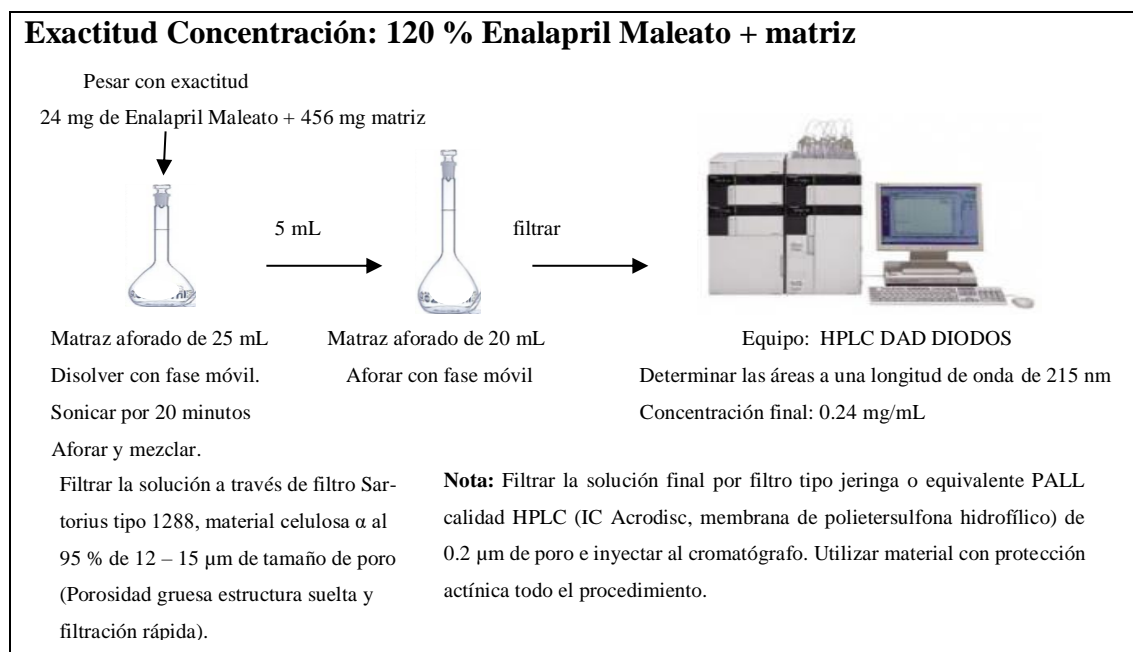


Figura 43. Exactitud (principio activo + matriz a la concentración de 120 %)



#### 3.4.4.8.4 Determinación de la Precisión

Para la determinación de la Precisión se determinó

##### 3.4.4.8.4.1 Repetibilidad del sistema (principio activo)

Para la determinación de la Repetibilidad de sistema se preparó la solución de Enalapril Maleato bajo la siguiente matriz:

**Tabla 15. Matriz de Repetibilidad del sistema (principio activo)**

<b>Número de niveles de concentración</b>	1
<b>Concentración</b>	100 %
<b>Número de réplicas por cada nivel</b>	10

##### 3.4.4.8.4.2 Repetibilidad del Método

Para la determinación de la Repetibilidad del método se preparó las siguientes muestras según la siguiente matriz de determinaciones.

###### a) Repetibilidad del Método (principio activo)

**Tabla 16. Matriz de Repetibilidad del método (principio activo)**

<b>Número de niveles de concentración</b>	3
<b>Intervalo de concentraciones con principio activo</b>	80%, 100 % y 120 %
<b>Número de réplicas por cada nivel</b>	3

###### b) Repetibilidad del Método (principio activo + matriz)

**Tabla 17. Matriz de Repetibilidad del método (principio activo + matriz)**

<b>Número de niveles de concentración</b>	3
<b>Intervalo de concentraciones con principio activo + matriz</b>	80%, 100 % y 120 %
<b>Número de réplicas por cada nivel</b>	3

##### 3.4.4.8.4.3 Precisión intermedia

Para la determinación de la precisión intermedia se preparó las siguientes muestras a la concentración nominal (100 %) según la siguiente matriz de determinaciones.

Tabla 18. Matriz de determinación de precisión intermedia

Instrumento	Analista	Día 1	Día 2
HPLC	Analista X	Análisis 1	Análisis 1
		Análisis 2	Análisis 2
		Análisis 3	Análisis 3
	Analista Y	Análisis 1	Análisis 1
		Análisis 2	Análisis 2
		Análisis 3	Análisis 3

### 3.4.4.8.5 Comprobación de la metodología con Producto terminado

Se realiza la valoración de 2 lotes industriales de Enalapril Maleato Tableta para la comprobación del método indicador de estabilidad validado.

Tabla 19. Comprobación de la metodología con producto terminado

Instrumento	Estándar	Lote 1	Lote 2
HPLC	Replica 1	Replica 1	Replica 1
	Replica 2	Replica 2	Replica 2
	Replica 3	Replica 3	Replica 3
	Replica 4		
	Replica 5		

Calcular el % de Rendimiento de Enalapril Maleato por tableta con la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{\text{Área promedio de la muestra}}{\text{Área promedio del estándar}} \times 100 \%$$

$$\text{mg Enalapril Maleato/Tab} = \frac{\text{Área promedio de la muestra}}{\text{Área promedio del estándar}} \times 10$$

**Criterio de aceptación:** Entre 9.0 mg/tableta – 11.0 mg/tableta de Enalapril Maleato (90 % - 110 %).



## CAPÍTULO IV



---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

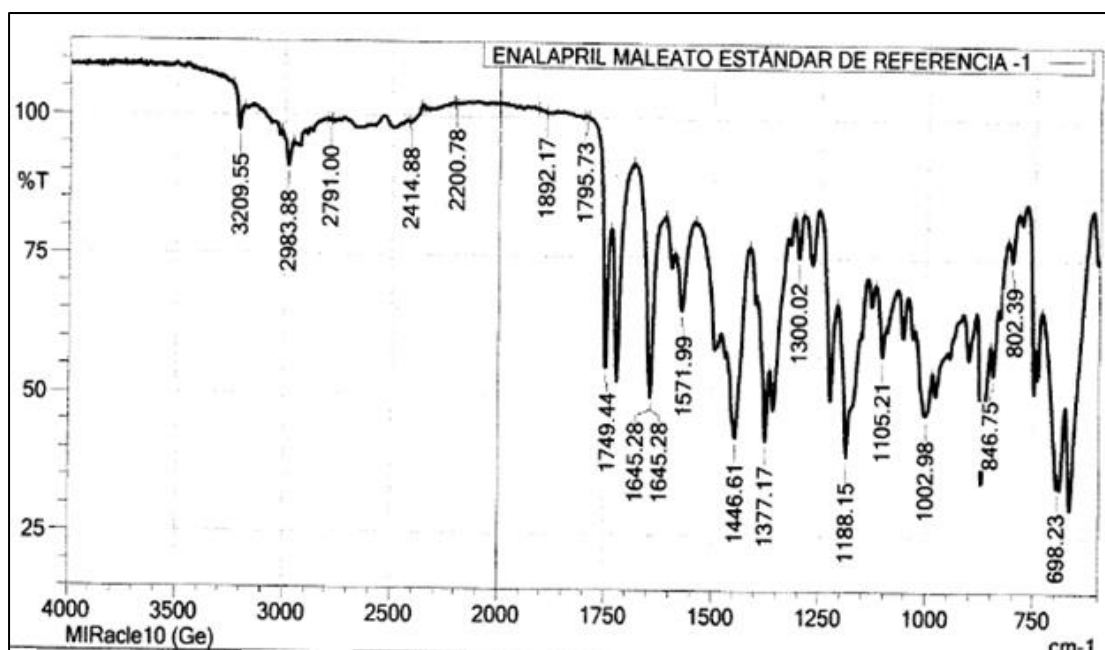
## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 4.1 Identificación del Principio Activo y Productos de Degradación

#### 4.1.1 Resultados de la identificación por espectrofotometría de absorción IR

##### 4.1.1.1 Reporte de espectro de Infrarrojo de Enalapril Maleato

Figura 44. Espectro de IR Enalapril Maleato



De acuerdo al reporte obtenido de Infrarrojo para el Enalapril Maleato, las bandas características obtenidas y comparadas con la bibliografía (Brenner, 1987) son las siguientes:

1749.44  $\text{cm}^{-1}$  que representa al grupo carbonilo de la estructura del Enalapril Maleato.

1645.28  $\text{cm}^{-1}$  que representa al grupo amida carbonilo de la estructura del Enalapril Maleato.

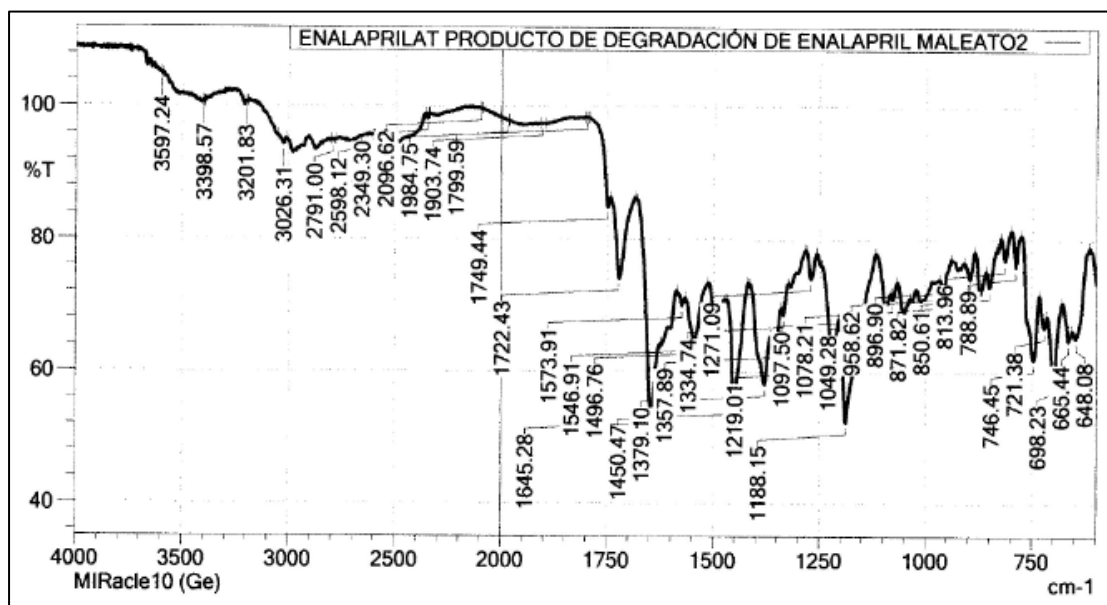
1571.99  $\text{cm}^{-1}$  que representa al grupo Maleato de carboxilo de la estructura del Enalapril Maleato.

1377.17  $\text{cm}^{-1}$  que representa a los grupos metilos simétricos de la estructura del Enalapril Maleato.

1188.15  $\text{cm}^{-1}$  que representa al grupo éster de la estructura del Enalapril Maleato.

## 4.1.1.2 Reporte de espectro de Infrarrojo de Enalaprilat

Figura 45. Espectro de IR Enalaprilat



De acuerdo al reporte obtenido la identidad del Enalaprilat USP comprobada por espectroscopia Infrarrojo, las bandas características obtenidas son las siguientes:

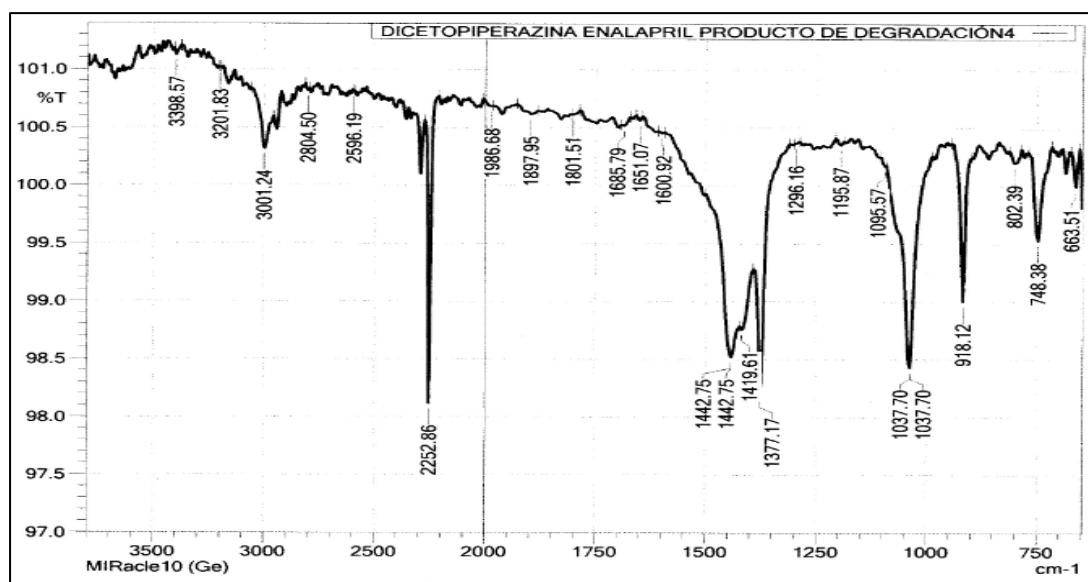
No.	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	648.08	65.09	4.05	657.73	615.29	1249.904	87.373
2	665.44	64.76	3.05	678.94	657.73	698.336	27.668
3	698.23	58.68	10.75	715.59	678.94	1289.611	171.336
4	721.38	66.71	2.80	732.95	715.59	550.751	30.736
5	746.45	61.87	7.66	759.95	732.95	929.541	106.671
6	788.89	75.93	5.20	798.53	775.38	481.875	43.639
7	813.96	76.88	3.87	823.60	798.53	520.446	41.100
8	850.61	72.88	3.39	858.32	835.18	574.967	37.860
9	871.82	71.85	4.85	885.33	858.32	690.860	61.662
10	896.90	73.96	3.45	910.40	885.33	608.316	40.355
11	958.62	72.76	2.22	968.27	939.33	737.365	28.145
12	1049.28	69.12	2.99	1066.64	1037.70	849.789	49.627
13	1078.21	70.95	1.33	1082.07	1066.64	430.668	9.308
14	1097.50	69.63	4.76	1118.71	1082.07	980.194	58.933
15	1188.15	52.25	17.64	1205.51	1118.71	2982.203	628.378
16	1219.01	61.78	8.84	1246.02	1205.51	1299.028	164.273
17	1271.09	74.00	4.22	1282.66	1257.59	601.682	55.228
18	1334.74	68.54	2.30	1340.53	1323.17	511.271	15.958
19	1357.89	63.98	2.72	1365.60	1340.53	857.766	43.080
20	1379.10	58.06	9.49	1415.75	1365.60	1788.414	251.946
21	1450.47	55.38	16.41	1467.83	1419.61	1707.338	363.906
22	1496.76	64.61	7.85	1512.19	1473.62	1185.752	113.771
23	1546.91	64.92	7.07	1566.20	1512.19	1671.582	175.940
24	1573.91	69.94	1.65	1585.49	1566.20	557.533	11.538



25	1645.28	53.92	18.58	1680.00	1624.06	1807.162	416.240
26	1722.43	74.01	12.35	1743.65	1685.79	1086.277	296.290
27	1749.44	84.86	2.89	1793.80	1743.65	298.722	-83.778
28	1799.59	98.32	0.04	1801.51	1797.66	6.397	0.082
29	1903.74	97.37	0.09	1909.53	1897.95	29.862	0.465
30	1984.75	97.87	0.08	2002.11	1982.82	36.762	0.726
31	2096.62	99.65	0.07	2102.41	2092.77	2.877	0.318
32	2349.30	98.12	0.74	2357.01	2339.65	24.398	4.541
33	2598.12	95.59	0.03	2601.97	2596.19	25.361	0.081
34	2791.00	94.74	0.23	2800.64	2783.28	88.950	1.740
35	3026.31	94.25	1.00	3053.32	3014.74	196.299	16.908
36	3201.83	100.44	0.12	3203.76	3194.12	-5.439	0.586
37	3398.57	100.57	0.13	3404.36	3394.72	-6.218	0.642
38	3597.24	104.82	0.23	3601.10	3591.46	-47.305	1.291

#### 4.1.1.3 Reporte de espectro de Infrarrojo de Enalapril Dicotopiperazina

Figura 46. Espectro de IR Enalapril Dicotopiperazina



De acuerdo al reporte obtenido la identidad del Enalapril Dicotopiperazina fue comprobada por espectroscopia Infrarrojo, las bandas características obtenidas y comparadas con la bibliografía son las siguientes: 3001.24 cm<sup>-1</sup>, 1651.07 cm<sup>-1</sup>, 1419.61 cm<sup>-1</sup> (Tania Marquez, Ilsa Corrales, Manuel Gil, Luis Martinez, 2006).

#### 4.1.2 Resultados de la Identificación por Cromatografía en Capa Fina

##### SISTEMA 1. Cromatografía en Capa Fina

Fase móvil: Cloroformo: Metanol: Ácido acético glacial (85:15:1 v/v)

Figura 47. Cromatoplaaca de Enalapril Maleato y Enalaprilat obtenido con sistema cromatográfico 1

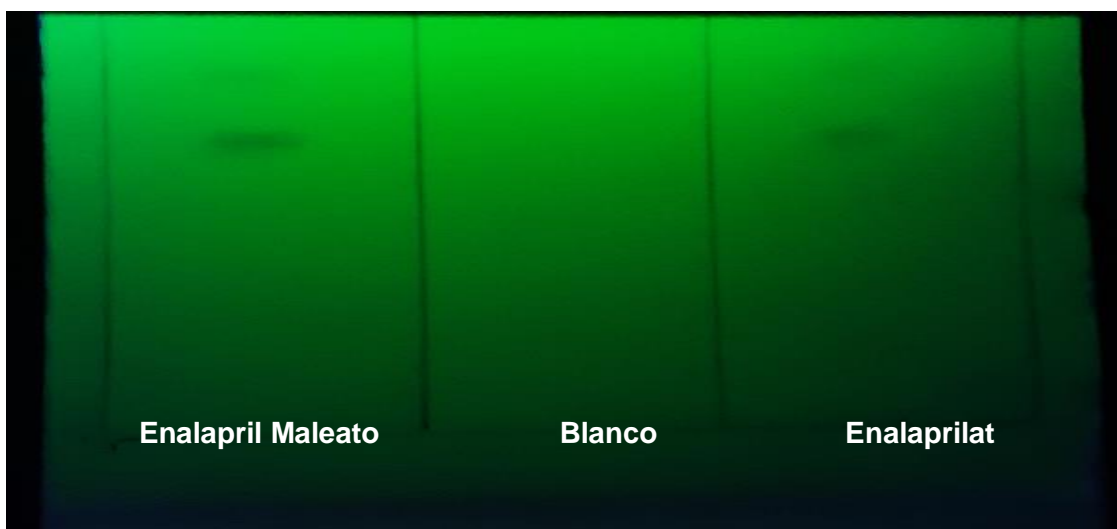


Figura 48. Cromatoplaaca de Enalapril Maleato y Enalapril Dicetopiperazina obtenido con sistema cromatográfico 1

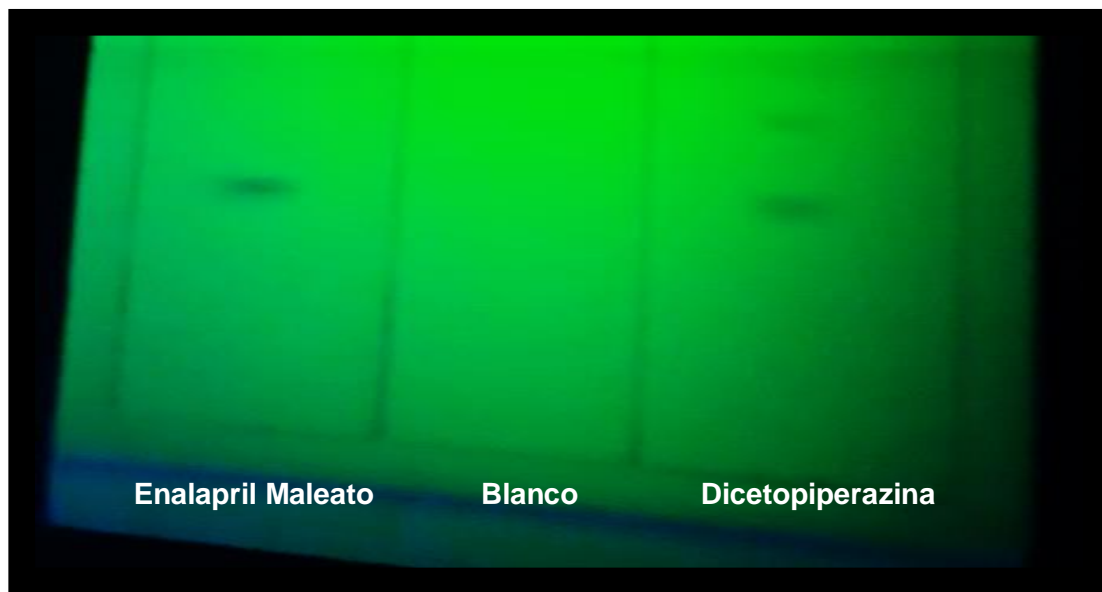


Tabla 20. Resultados de Valor Rf del sistema cromatográfico 1

Placas		Enalapril Maleato	Blanco	Enalaprilat	Dicetopiperazina
1	Valor Rf	0.59	0	-	0.59
2	Valor Rf	0.53	0	-	0.91
3	Valor Rf	0.61	0	0.61	-
4	Valor Rf	0.50	0	0.50	-
Promedio		0.56	0	0.555	0.75
DS		0.051	0	0.078	0.226

En la tabla 20 se observa que con el sistema cromatográfico 1 no se obtuvo una buena separación para el Enalapril Maleato y Enalaprilat, ya que ambos eluyen a la misma altura lo que no permite su identificación, sin embargo, si se observa una buena separación entre Enalapril Dicetopiperazina con relación al Enalapril Maleato. El sistema no logró por completo una buena separación del principio activo con relación a los productos de degradación.

#### SISTEMA 2. Cromatografía en Capa Fina

Fase móvil: Butanol: Agua destilada: Ácido acético (3:1:1)

**Figura 49. Cromatoplaqueta de Enalapril Maleato, Enalaprilat y Enalapril Dicetopiperazina en sistema cromatográfico 2**

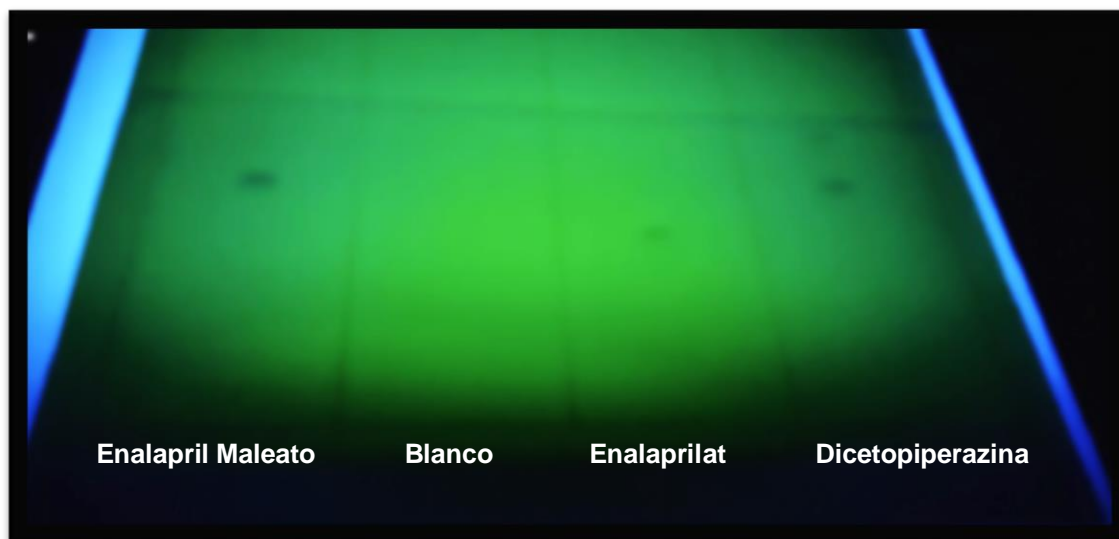


Figura 50. Cromatoplaqa de Enalapril Maleato y Enalapril Dicotopiperazina en sistema cromatográfico 2

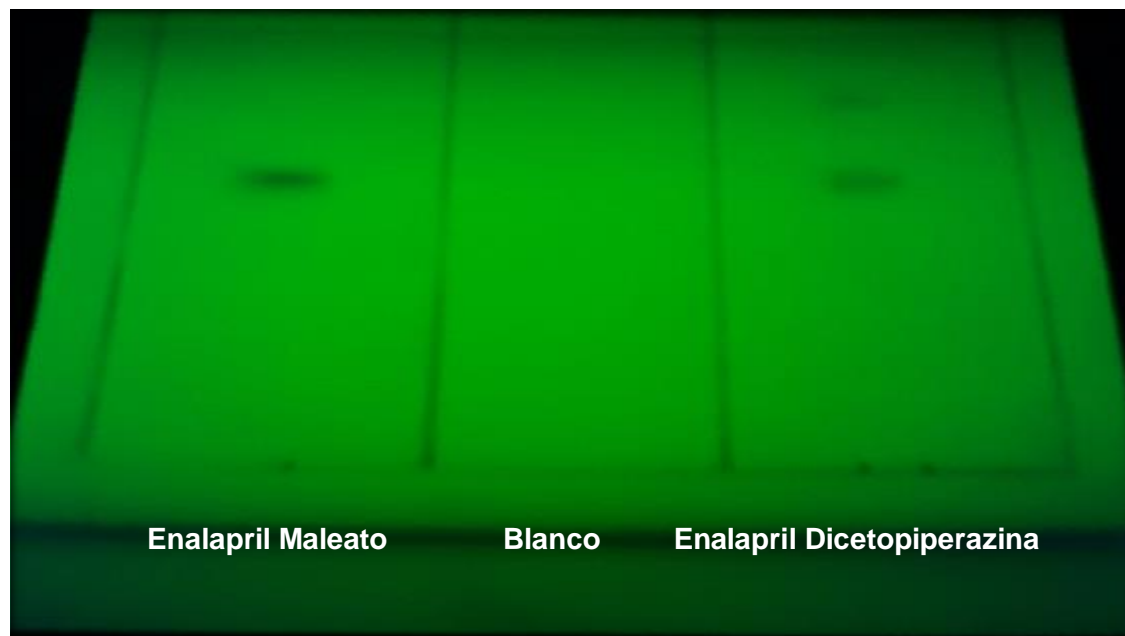


Figura 51. Cromatoplaqa de Enalapril Maleato y Enalaprilat en sistema cromatográfico 2



Tabla 21. Resultados de Valor Rf del sistema cromatográfico 2

Placas		Enalapril Maleato	Blanco	Enalaprilat	Dicetopiperazina
1	Valor Rf	0.51	0	-	0.70
2	Valor Rf	0.54	0	-	0.70
3	Valor Rf	0.62	0	0.48	-
4	Valor Rf	0.69	0	0.45	-
Promedio		0.59	0	0.465	0.700
DS		0.08	0	0.021	0

En la tabla 21 se observa que con el sistema cromatográfico 2 se obtuvo una buena separación para el Enalapril Maleato y Productos de degradación, ya que se observa distintos tiempos de retención para Enalaprilat y Enalapril Dicetopiperazina con relación al Enalapril Maleato. El sistema logró una buena separación del principio activo con relación a los productos de degradación.

## 4.2 Desarrollo del Método Analítico Indicador de Estabilidad

### 4.2.1 Selección de la longitud de Onda

LONGITUD DE ONDA: 215 nm

Figura 52. Barrido espectral de absorción de las soluciones de Enalapril Maleato y Productos de degradación.

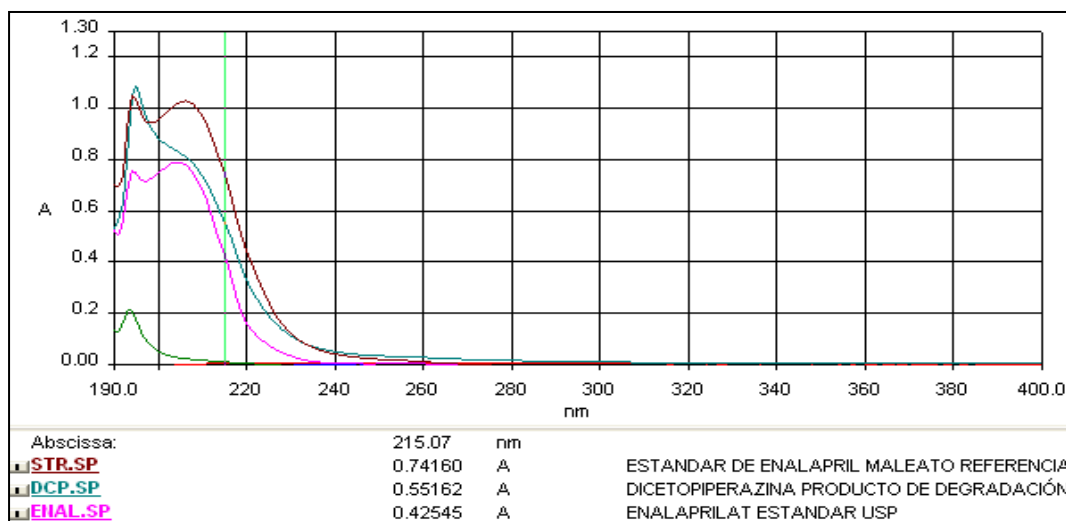


Figura 53. Barrido espectral de Enalapril Maleato

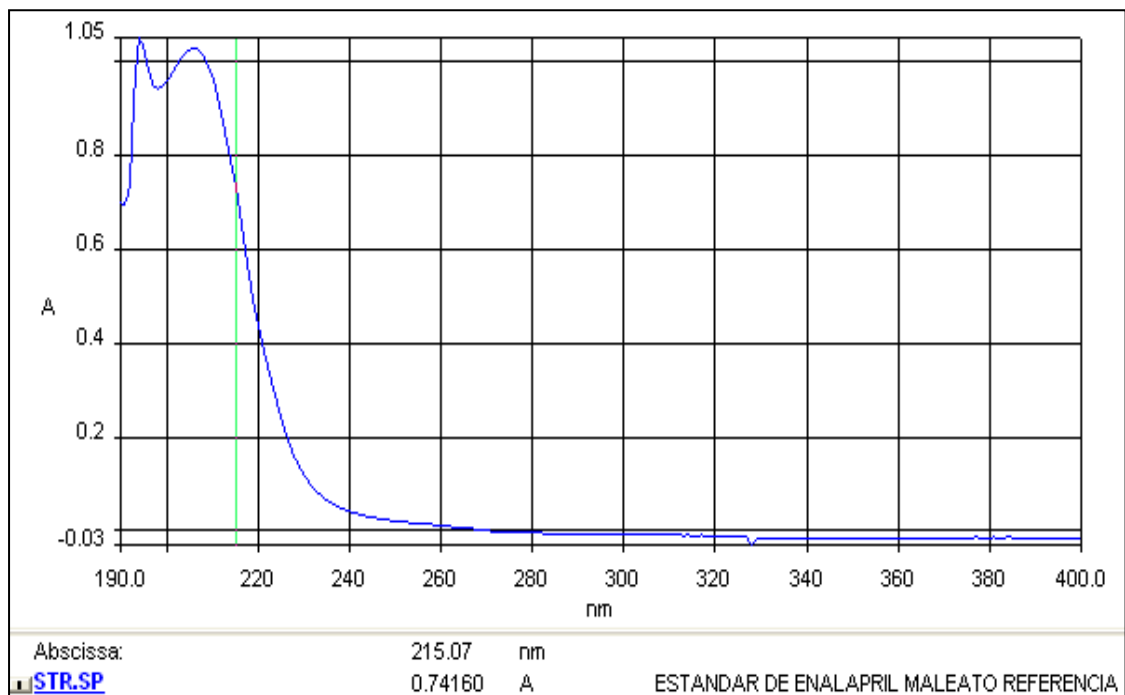


Figura 54. Barrido espectral de Producto de degradación Enalaprilat

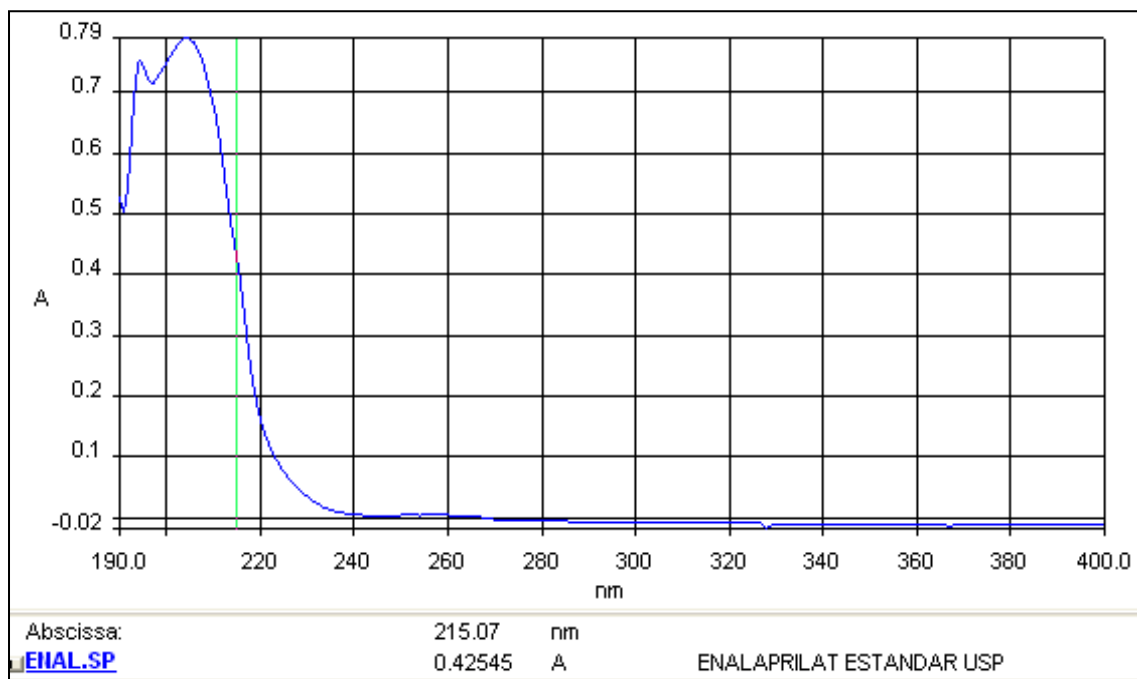
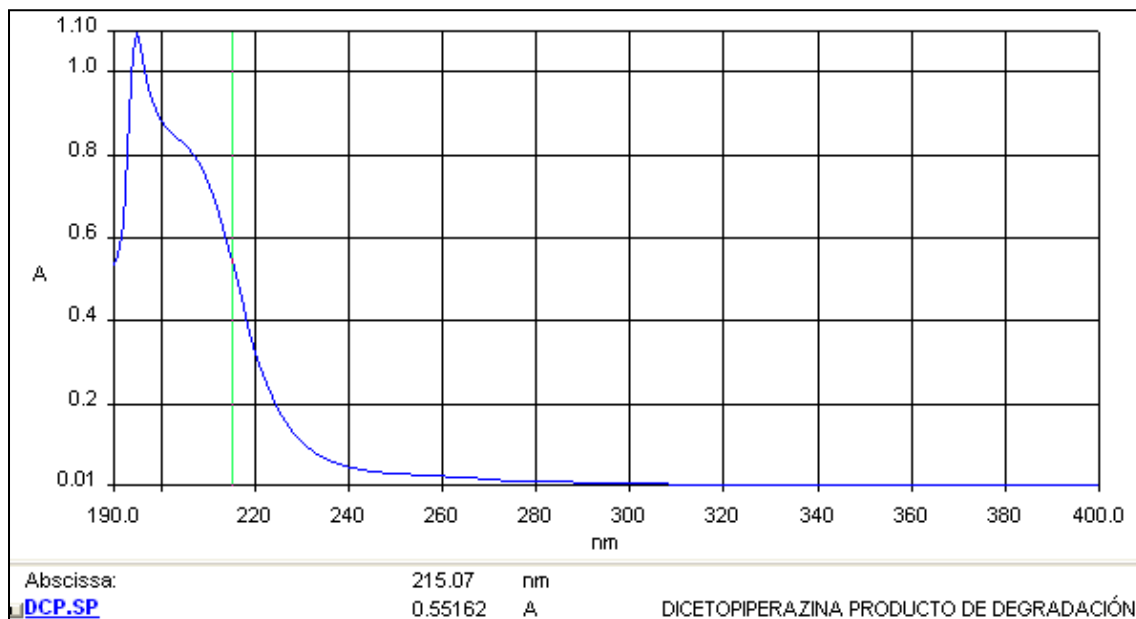


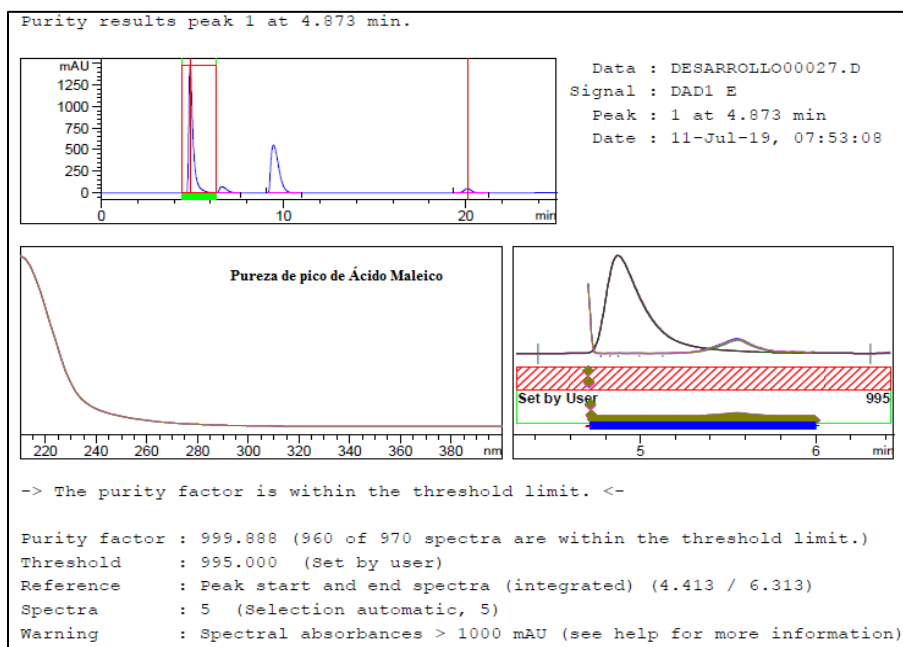
Figura 55. Barrido espectral de Enalapril Dicotopiperazina



#### 4.2.2 Identificación del principio activo por cromatografía líquida de alta eficiencia, pureza de pico de principio activo y productos de degradación

##### a) Identificación de Ácido Maleico

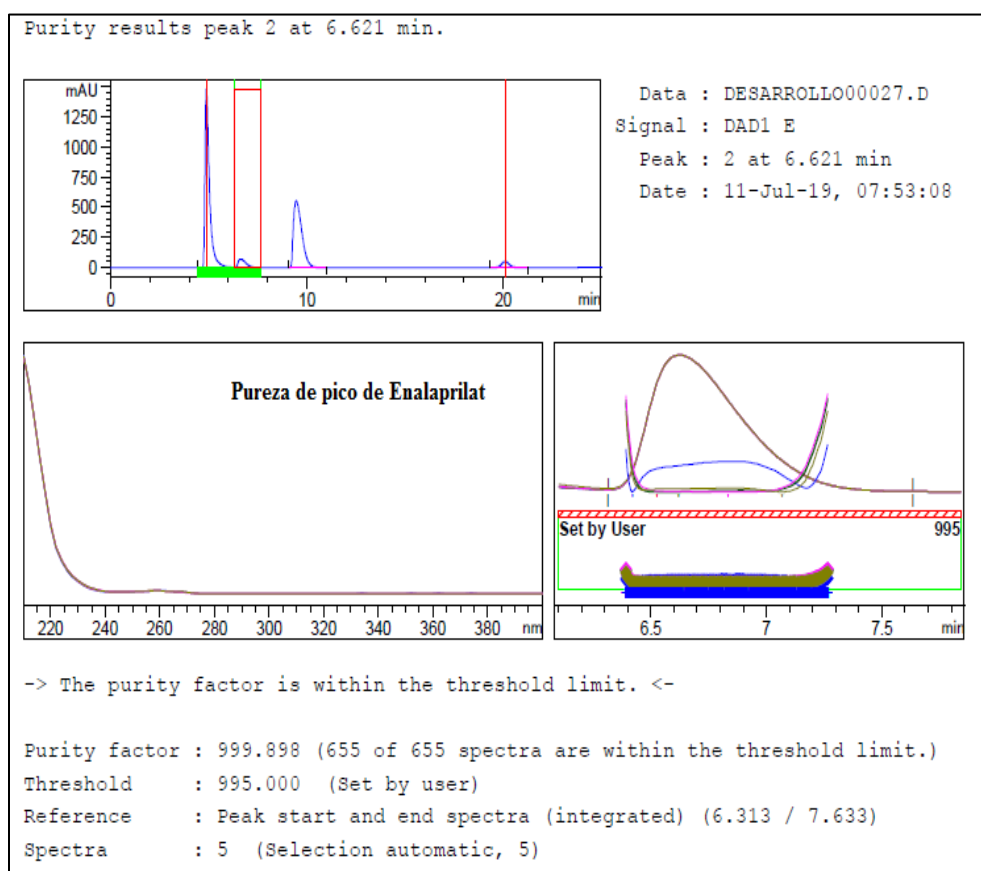
Figura 56. Pureza de pico de Ácido Maleico



En la Figura 56, se observa que la pureza de pico obtenido para Ácido Maleico con el método desarrollado, con un tiempo de retención aproximado de 4.8 min se encuentra dentro del límite de umbral de 995 lo que nos indica una diferencia espectral aceptable de 0.5 %.

b) Identificación de producto de degradación Enalaprilat

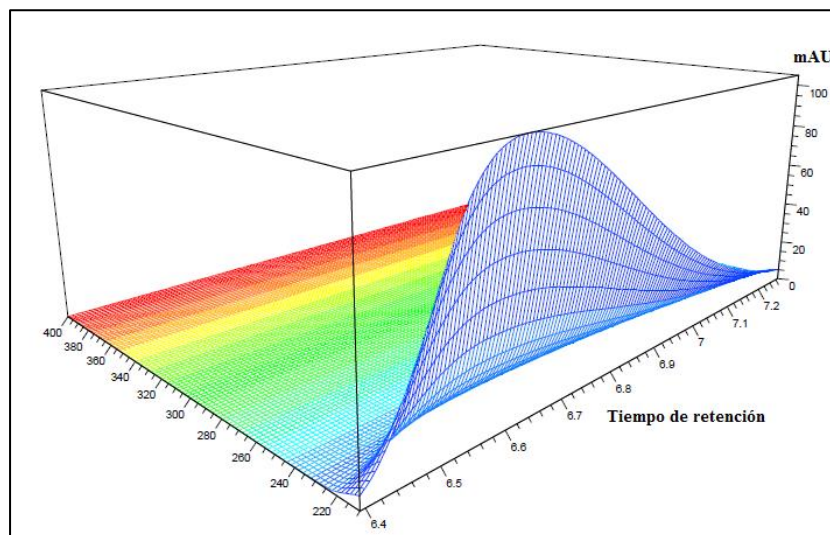
**Figura 57. Pureza de pico de Enalaprilat USP, producto de degradación**



En la Figura 57, se observa que la pureza de pico obtenido para Enalaprilat con el método desarrollado, con un tiempo de retención aproximado de 6.6 min se encuentra dentro del límite de umbral de 995 lo que nos indica una diferencia espectral aceptable de 0.5 %.

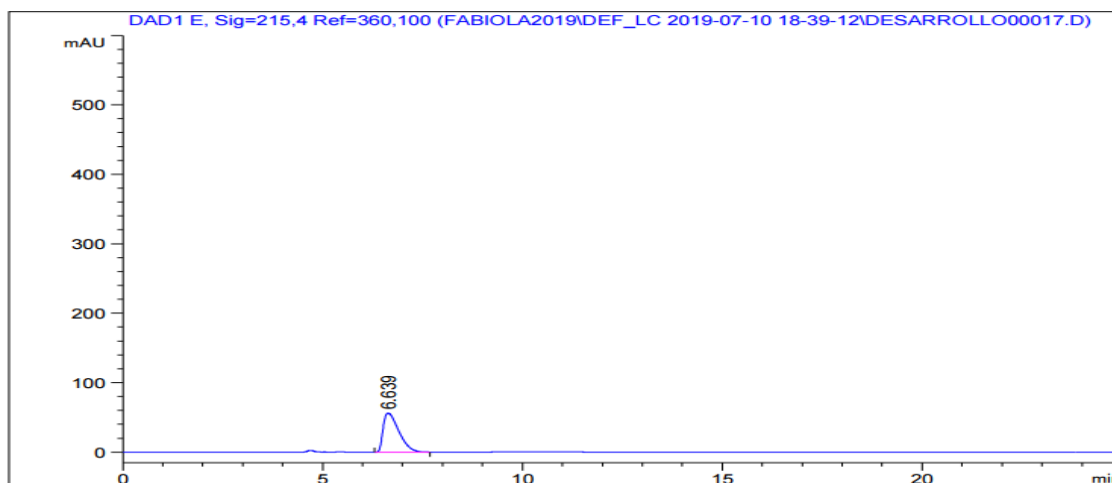


Figura 58. Topograma en 3D de Enalaprilat producto de degradación



Como se puede observar en Figura 58, el pico de Enalaprilat en 3D no presenta interferencia con relación a otras impurezas y posibles productos de degradación.

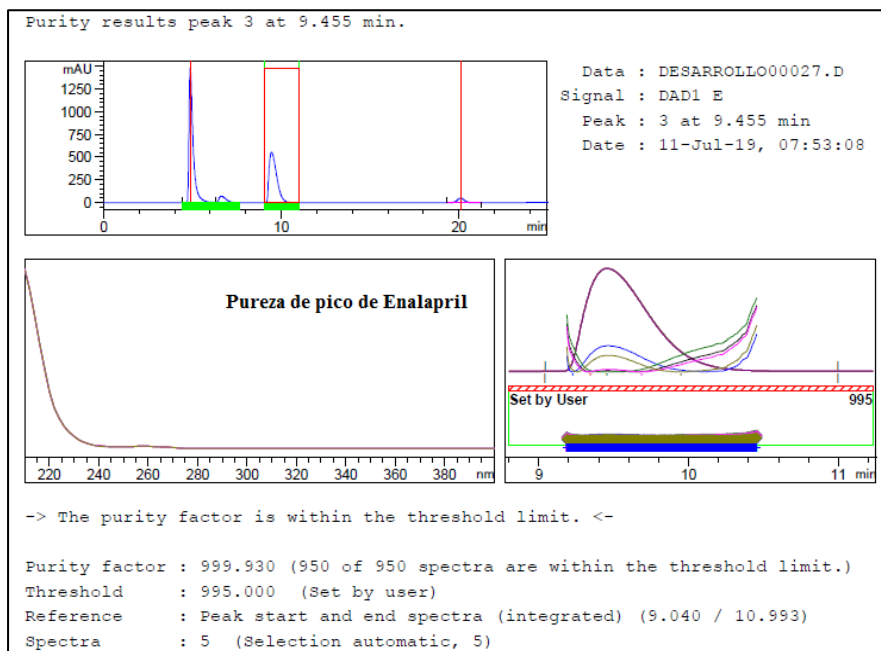
Figura 59. Cromatograma de Identificación por Cromatografía Líquida de Alta Performance de Enalaprilat producto de degradación



En figura 59, se observa al pico de Enalaprilat con una simetría adecuada

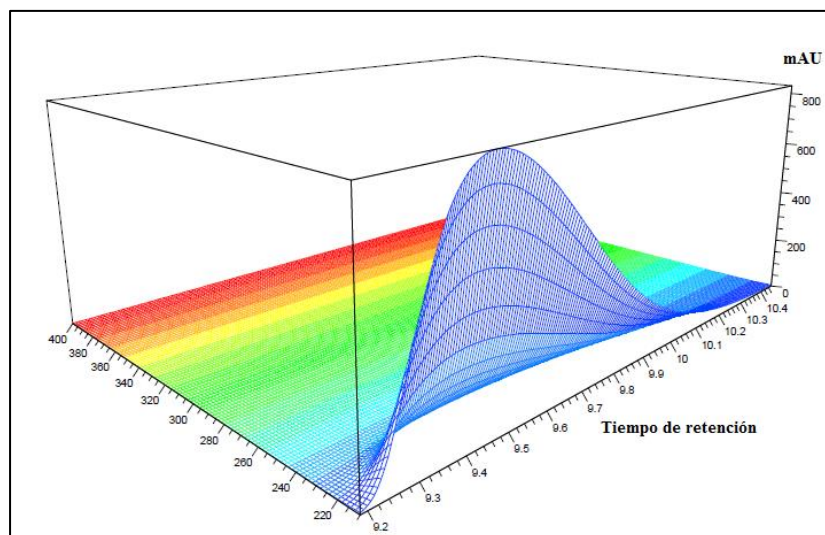
c) Identificación de Enalapril principio activo

Figura 60. Pureza de pico de Enalapril, principio activo



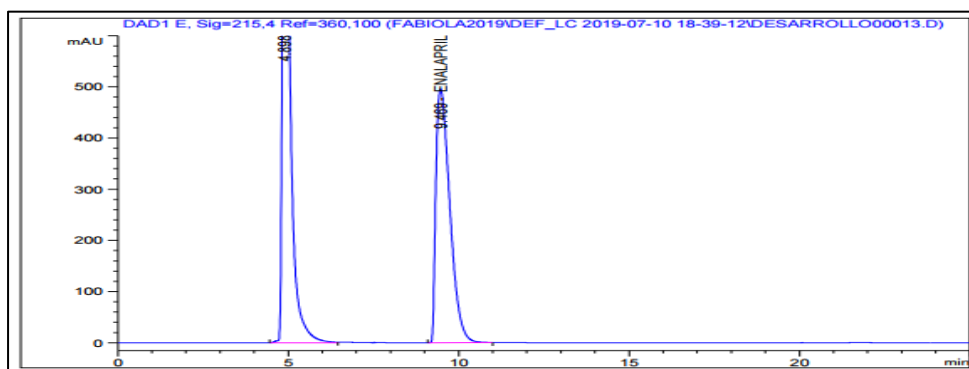
En la Figura 60, se observa que la pureza de pico obtenido para Enalapril con el método desarrollado, con un tiempo de retención aproximado de 9.5 minutos se encuentra dentro del límite de umbral de 995 lo que nos indica una diferencia espectral aceptable del 0.5 %.

Figura 61. Topograma en 3D de Enalapril principio activo



Como se puede observar en Figura 61, el pico de Enalapril principio no presenta interferencia con relación a otras impurezas o posibles productos de degradación.

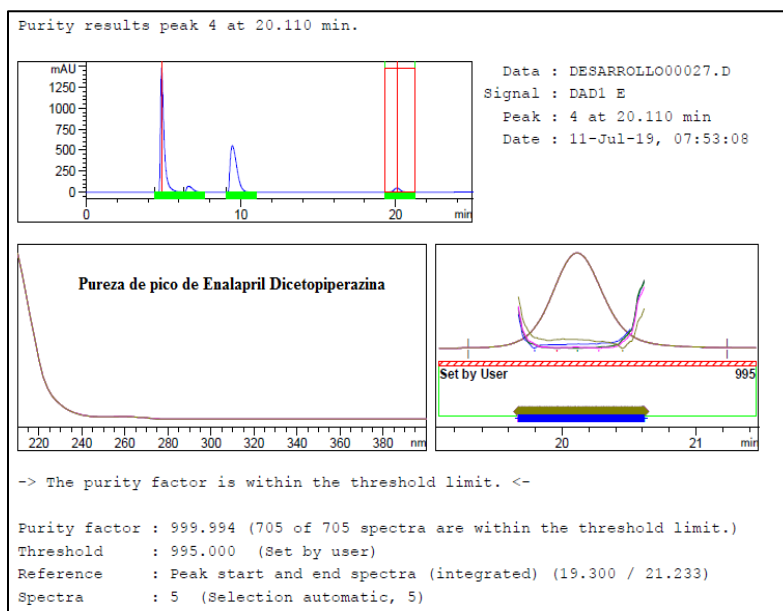
**Figura 62. Cromatograma de Identificación por Cromatografía Líquida de Alta Performance de Enalapril principio activo**



Como se observa en Figura 62, el pico de Enalapril con un tiempo de retención de aproximadamente 9.4 min tiene una simetría adecuada en cumplimiento con los requisitos de aptitud de sistema analítico.

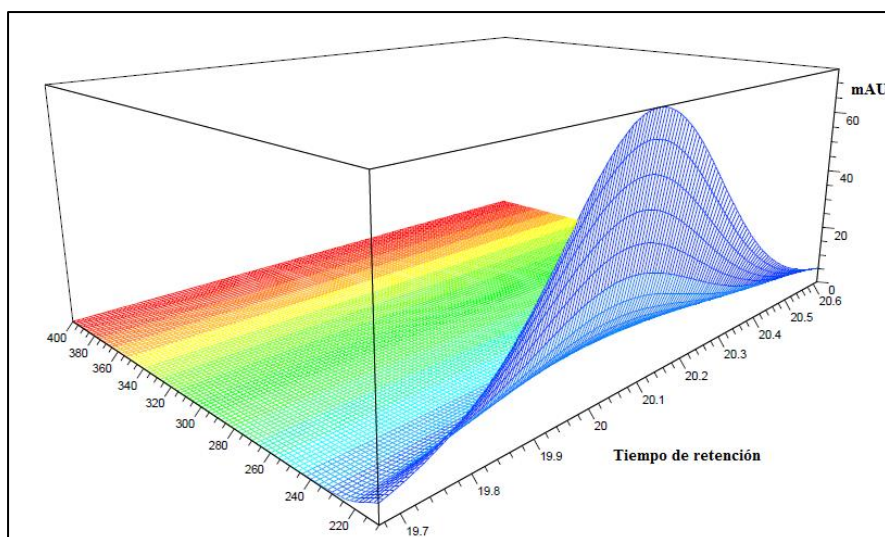
#### d) Identificación de Enalapril Dicotopiperazina

**Figura 63. Pureza de pico de Enalapril Dicotopiperazina producto de degradación.**



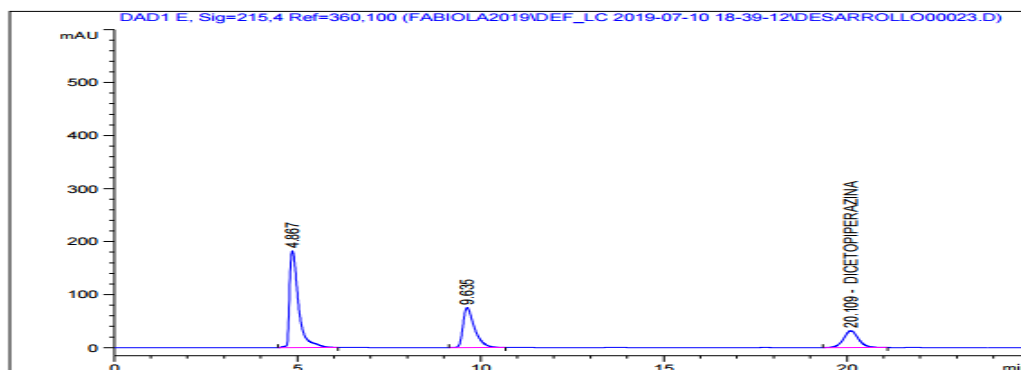
En la Figura 63 se observa que la pureza de pico obtenida para Enalapril Dicotopiperazina con el método desarrollado, con un tiempo de retención aproximado de 20 minutos se encuentra dentro del límite umbral de 995 lo que nos indica una diferencia espectral aceptable de 0.5 %.

**Figura 64. Topograma en 3D de Enalapril Dicotopiperazina producto de degradación**



Como se puede observar en Figura 64, el pico de Enalapril Dicotopiperazina producto de degradación no presenta interferencia con relación a otras impurezas con el método desarrollado.

**Figura 65. Cromatograma de Identificación por Cromatografía Líquida de Alta Performance de Enalapril Dicotopiperazina**



Como se observa en figura 65 el Enalapril Dicetopiperazina presenta una buena resolución con relación al pico de Enalapril, existe una buena separación con relación al principio activo y otros posibles productos de degradación.

La simetría de pico es adecuada en cumplimiento de los requisitos de aptitud de sistema.

#### 4.2.3 Ensayo de robustez

Un método indicador de estabilidad destinado al análisis de un principio activo por cromatografía líquida de alta performance, requiere evaluar el efecto sobre las condiciones cromatográficas.

La robustez nos demuestra la capacidad del método para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto a las condiciones del método, susceptible de producirse durante su utilización.

Para el tratamiento estadístico se aplica un diseño factorial fraccionado de dos niveles ( $2^{n-1}$ )

Se realiza los experimentos según la siguiente matriz del diseño experimental.

#### Diseño factorial fraccionado

Resumen del diseño

Factores = 4

Corridas = 8

Bloques = 1

Replicas = 1

**Tabla 22. Diseño factorial fraccionado**

Factor	Nombre	Nivel -	Nivel +
A	pH	2.0	2.2
B	Concentración Buffer	10 mM	20 mM
C	Temperatura	35 °C	40°C
D	Volumen de inyección	20 µL	30 µL

Tabla 23. Matriz de diseño factorial fraccionado

Factor	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	-	+	-	+	+	+	-	-
Concentración Buffer	+	-	-	+	-	+	-	+
Temperatura	-	-	+	-	+	+	-	+
Volumen de inyección	+	+	+	-	-	+	-	-

Tabla 24. Experimentos de acuerdo al diseño factorial fraccionado

Factor	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	2.0	2.2	2.0	2.2	2.2	2.2	2.0	2.0
Concentración Buffer	20 mM	10 mM	10 mM	20 mM	10 mM	20 mM	10 mM	20 mM
Temperatura	35 °C	35 °C	40°C	35 °C	40°C	40°C	35 °C	40°C
Volumen de inyección	30 µL	30 µL	30 µL	20 µL	20 µL	30 µL	20 µL	20 uL

#### 4.2.3.1.1 Resultados de Robustez

Figura 66. Experimento 1 (Diseño factorial fraccionado)

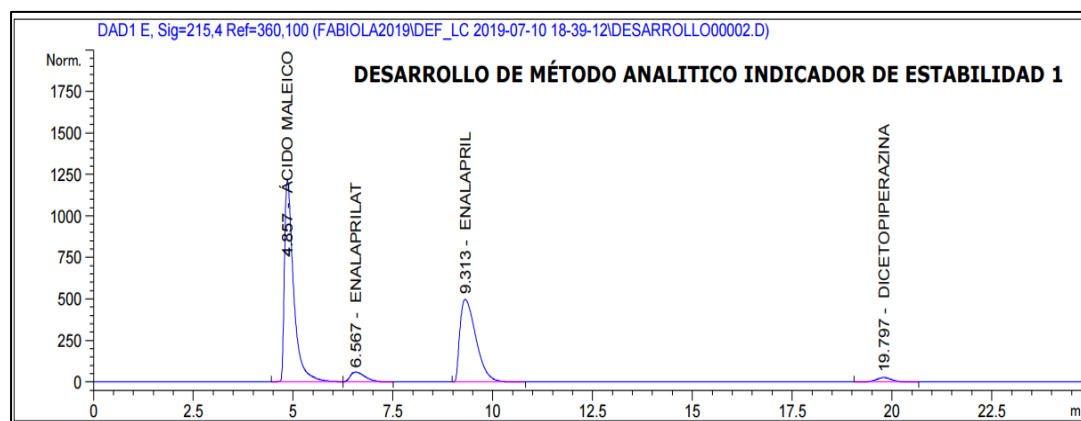


Figura 67. Experimento 2 (Diseño factorial fraccionado)

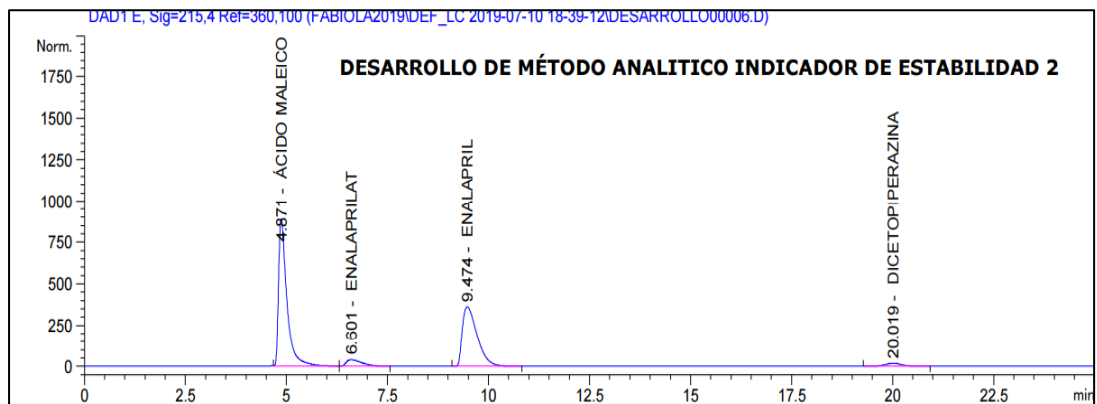


Figura 68. Experimento 3 (Diseño factorial fraccionado)

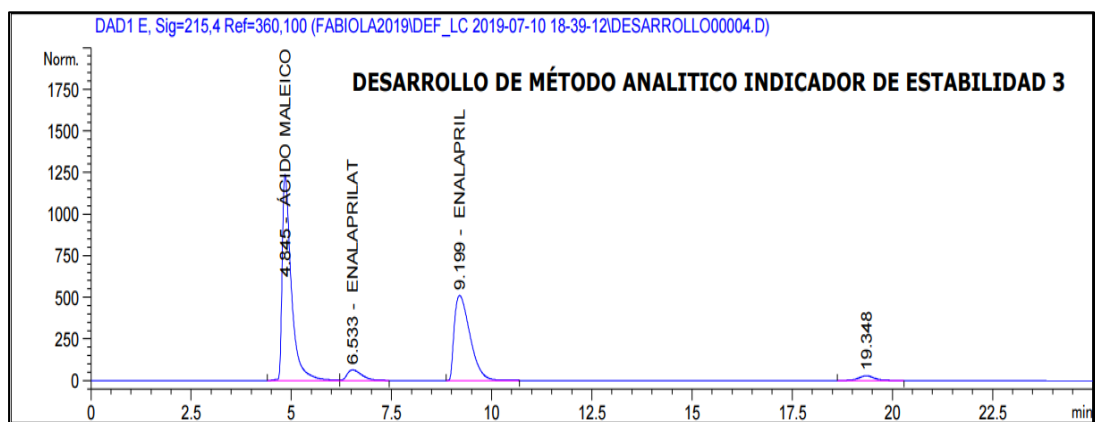
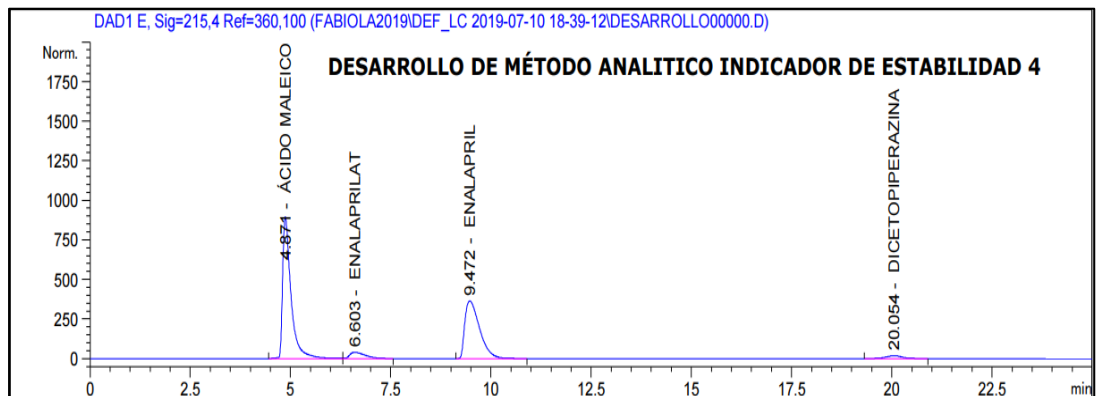
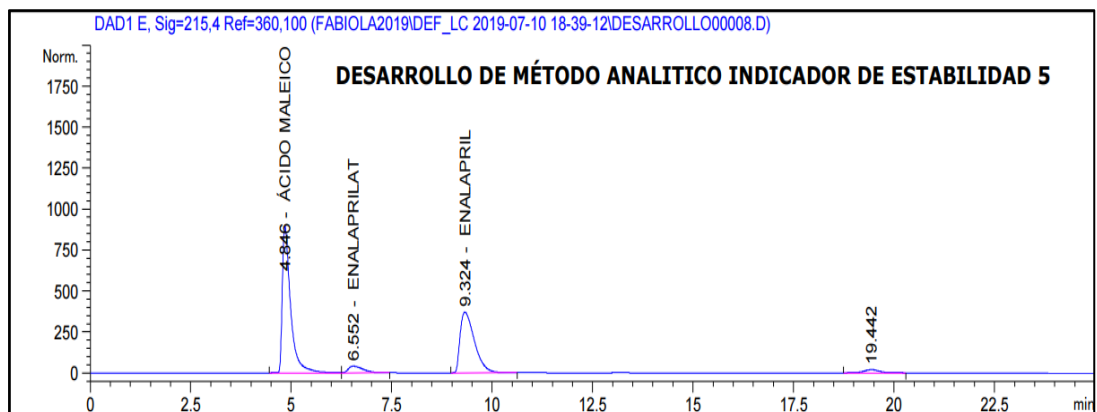


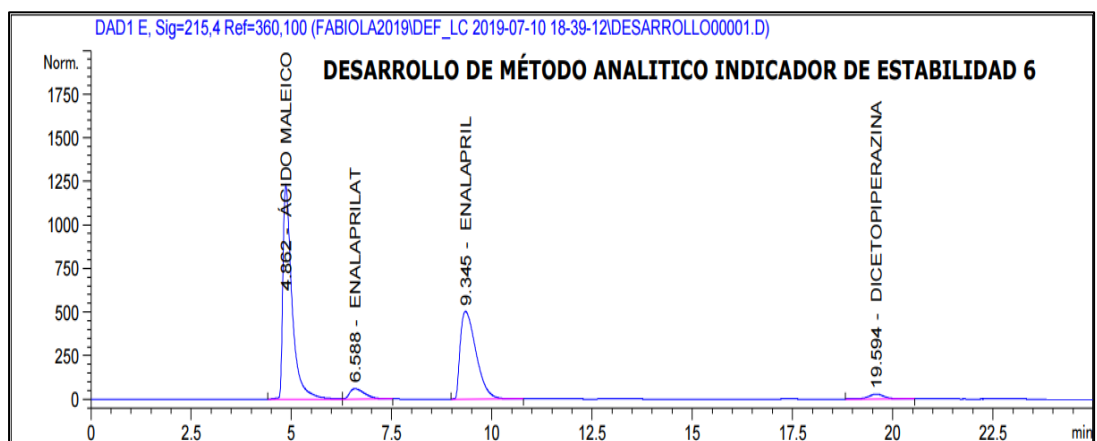
Figura 69. Experimento 4 (Diseño factorial fraccionado)



**Figura 70. Experimento 5 (Diseño factorial fraccionado)**



**Figura 71. Experimento 6 (Diseño factorial fraccionado)**



**Figura 72. Experimento 7 (Diseño factorial fraccionado)**

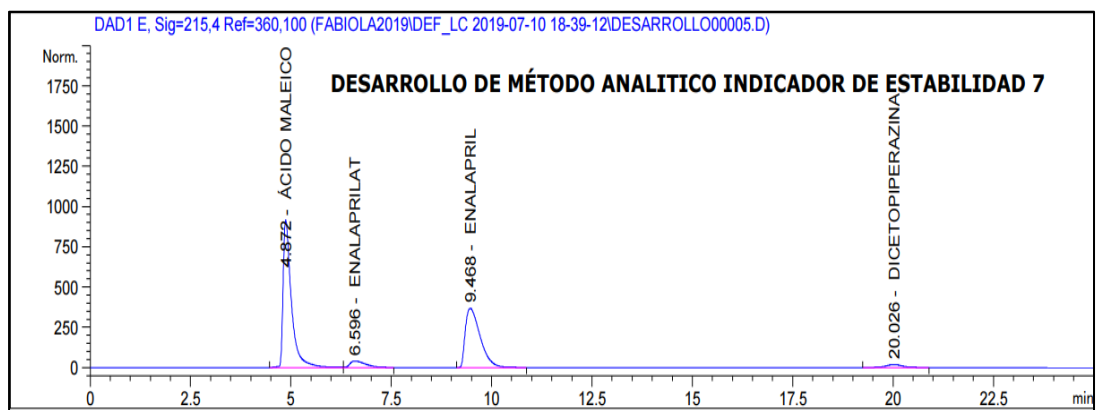
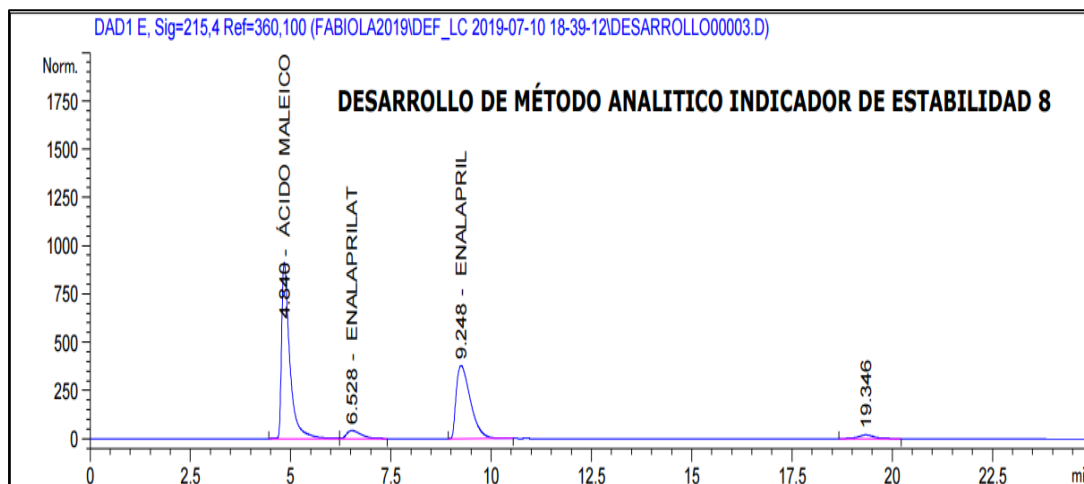




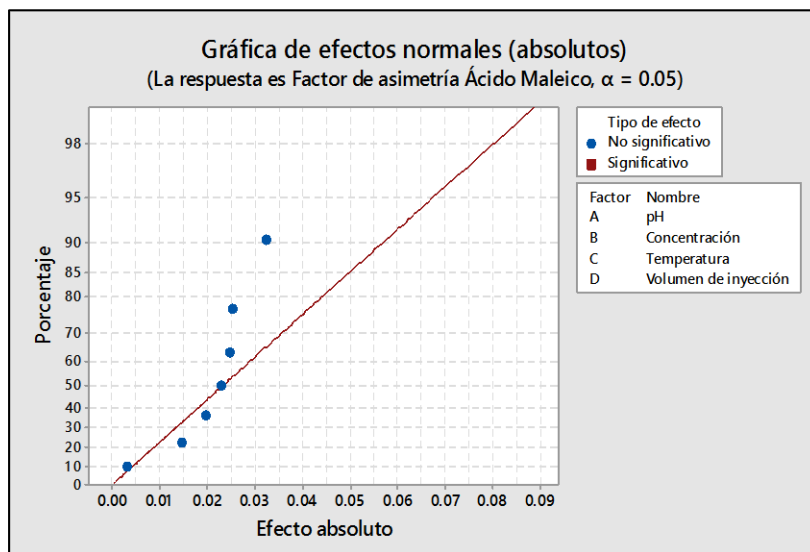
Figura 73. Experimento 8 (Diseño factorial fraccionado)



**Tabla 25. Parámetros cromatográficos para Ácido Maleico para los experimentos según diseño factorial fraccionado**

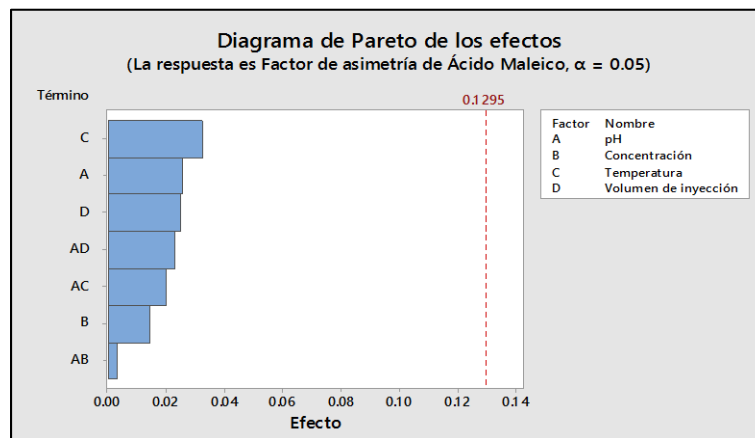
Experimento	Ácido Maleico	
	Factor de Asimetría	Platos teóricos
1	2.17925	2593
2	2.16184	3263
3	2.18879	2633
4	2.16452	3239
5	2.19199	3261
6	2.26193	2647
7	2.17789	3351
8	2.19648	3324

Figura 74 Gráfica normal de efectos para el Factor de asimetría de Ácido Maleíco



En figura 74, se puede observar que el Factor de Asimetría para Ácido Maleíco en los 8 experimentos no sufre un efecto significativo con un nivel de confianza del 95 %.

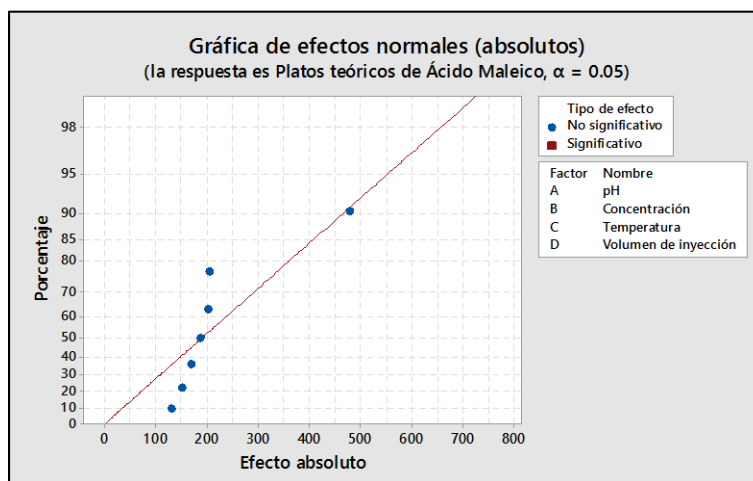
Figura 75. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta del Factor de Asimetría de Ácido Maleíco



La figura 75 nos da información acerca de la magnitud e importancia de los efectos de los factores A, B, C, D (pH, concentración del buffer, temperatura y volumen de inyección) sobre el factor de asimetría del pico de Ácido Maleíco, se observa que ninguna de las barras

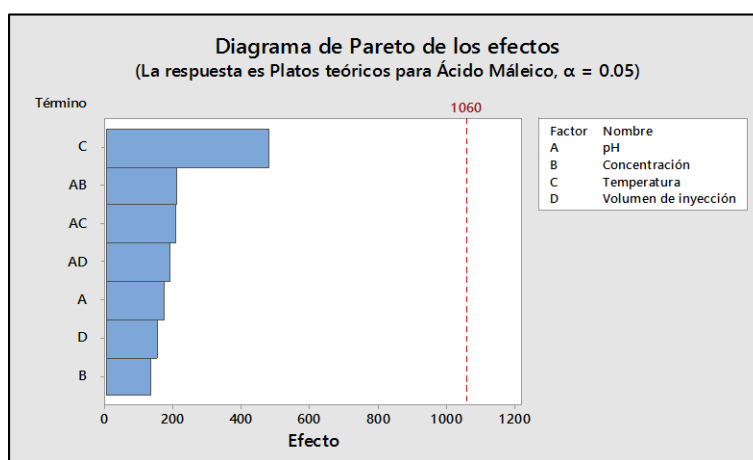
cruza la línea de referencia con un valor igual a 0.1295. Estos factores no son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95 %.

**Figura 76. Gráfica de efectos normales para los platos teóricos de Ácido Maleíco**



En figura 76, se puede observar que los platos teóricos para Ácido Maleíco en los 8 experimentos no sufre un efecto significativo con un nivel de confianza del 95 %.

**Figura 77. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de los platos teóricos de Ácido Maleíco**



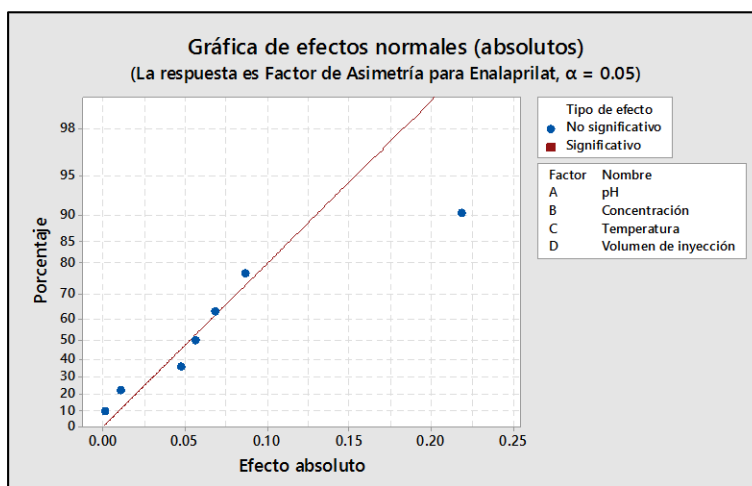
La figura 77 nos da información acerca de la magnitud e importancia de los efectos de los factores A,B,C,D (pH, concentración del buffer, temperatura y volumen de inyección) sobre los platos teóricos del pico del Ácido Maleíco, se observa que ninguna de las barras

cruzan la línea de referencia con un valor igual a 1060. Estos factores no son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95 %.

**Tabla 26. Parámetros cromatográficos para Enalaprilat para los experimentos según diseño factorial fraccionado.**

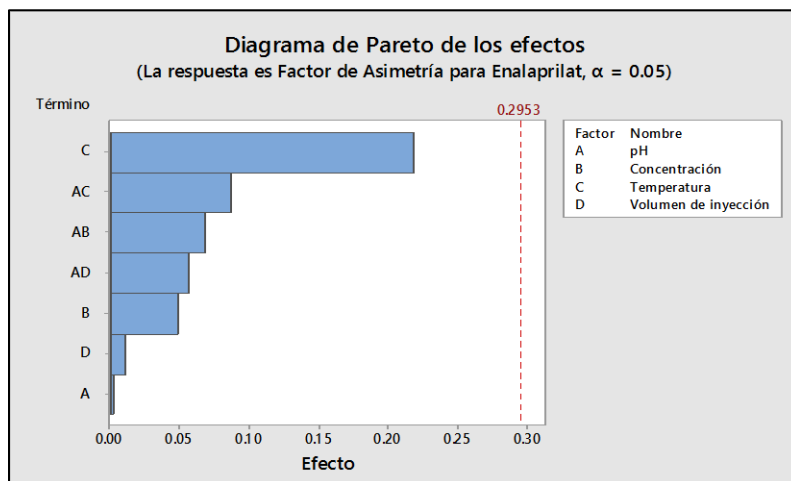
Experimento	Enalaprilat		
	Factor de Asimetría	Platos teóricos	Resolución
1	1.63047	1442	3.18
2	1.90604	1422	3.32
3	1.56410	1528	3.22
4	1.88971	1424	3.32
5	1.72222	1470	3.33
6	1.70667	1386	3.18
7	1.91509	1429	3.33
8	1.65753	1578	3.40

**Figura 78. Gráfica normal de efectos para el factor de asimetría de Enalaprilat**



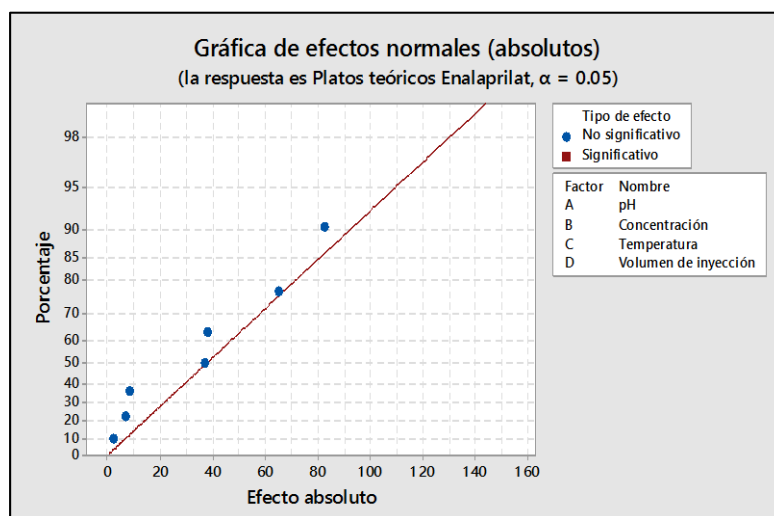
En figura 78, se observa que el Factor de Asimetría para Enalaprilat no sufre un efecto significativo para 8 experimentos con un nivel de confianza del 95 %.

Figura 79. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta el Factor de asimetría de Enalaprilat

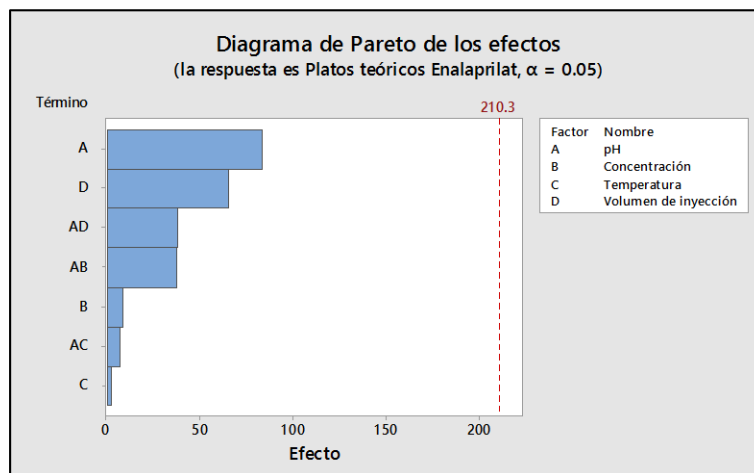


La figura 79 nos da información acerca de la magnitud e importancia de los efectos de los factores A,B,C,D (pH, concentración del buffer, temperatura y volumen de inyección) en el factor de asimetría del Enalaprilat, se observa que ninguna de las barras cruzan la línea de referencia con un valor igual a 0.2953. Estos factores no son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95 %.

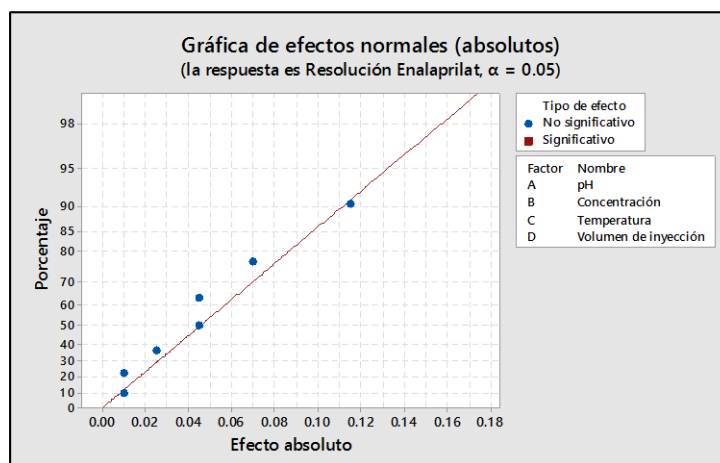
Figura 80. Gráfica de los efectos normales para la respuesta de platos teóricos Enalaprilat



En figura 80, se observa que los platos teóricos para Enalaprilat no sufre un efecto significativo para los 8 experimentos con un nivel de confianza del 95 %.

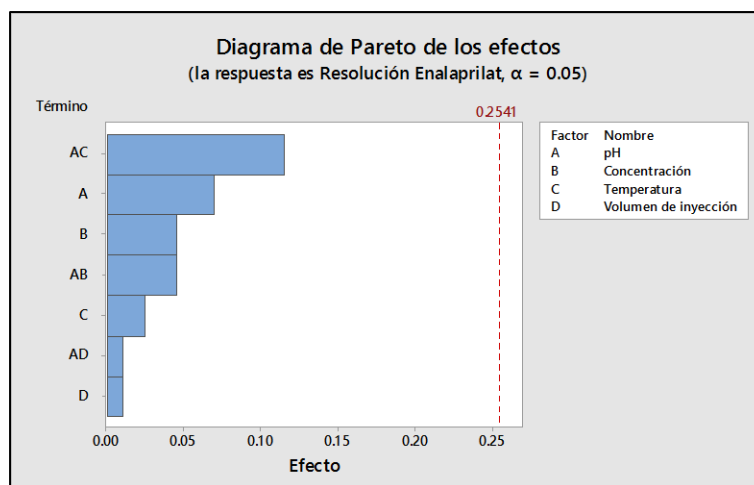
**Figura 81. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de platos teóricos de Enalaprilat**


La figura 81 nos da información acerca de la magnitud e importancia de los efectos de los factores A,B,C,D (pH, concentración del buffer, temperatura y volumen de inyección) sobre los platos teóricos del pico del Enalaprilat, se observa que ninguna de las barras cruzan la línea de referencia con un valor igual 210.3 . Estos factores no son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95 %.

**Figura 82. Gráfica de efectos normales para la respuesta de resolución de Enalaprilat**


En figura 82, se observa que la resolución para Enalaprilat no sufre un efecto significativo para los 8 experimentos con un nivel de confianza del 95 %.

Figura 83. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de la Resolución de Enalaprilat

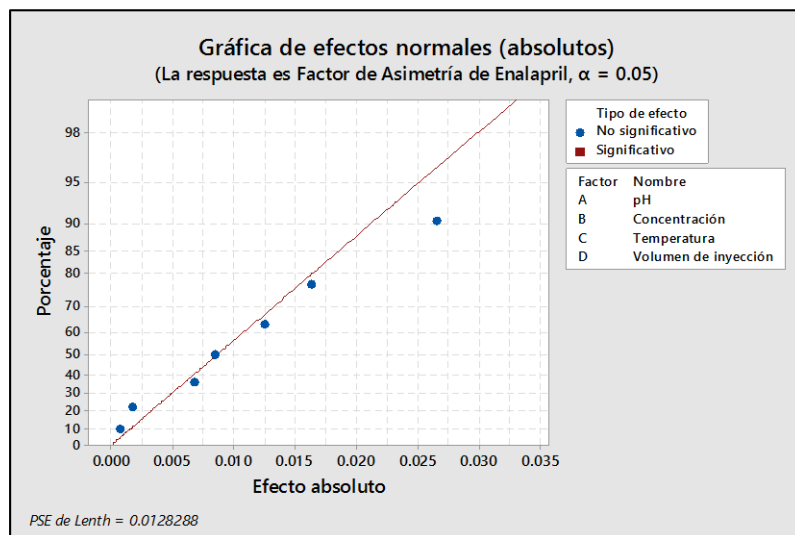


La figura 83 nos da información acerca de la magnitud e importancia de los efectos de los factores A,B,C,D (pH, concentración del buffer, temperatura y volumen de inyección) en la resolución de pico del Enalaprilat, se observa que ninguna de las barras cruzan la línea de referencia con un valor igual a 0.2541. Estos factores no son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95 %.

**Tabla 27. Parámetros cromatográficos para Enalapril para los experimentos según diseño factorial fraccionado.**

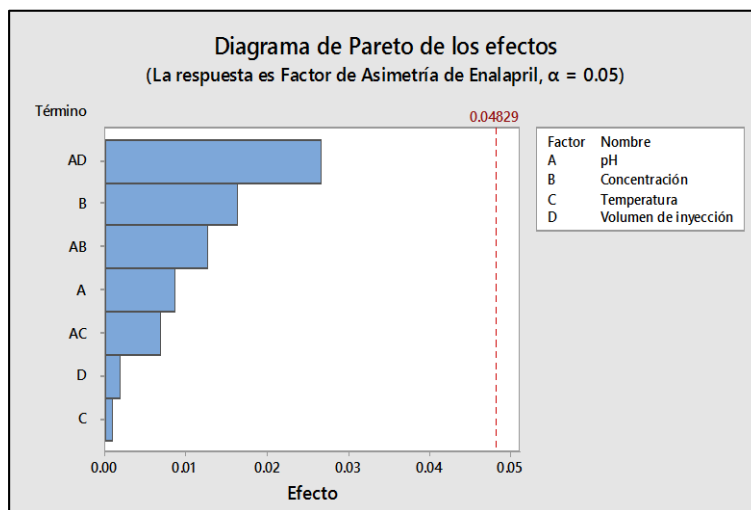
Experimento	Enalapril		
	Factor de Asimetría	Platos teóricos	Resolución
1	1.92509	2506	3.82
2	1.93536	3182	4.18
3	1.90402	2564	3.82
4	1.90779	3185	4.18
5	1.87820	3247	4.14
6	1.91304	2600	3.82
7	1.93643	3130	4.17
8	1.91252	3257	4.16

**Figura 84. Gráfica de efectos normales para la respuesta de resolución de Enalapril**



En figura 84, se observa que el Factor de Asimetría para Enalapril no sufre un efecto significativo para los 8 experimentos con un nivel de confianza del 95 %.

**Figura 85. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta del Factor de Asimetría de Enalapril**

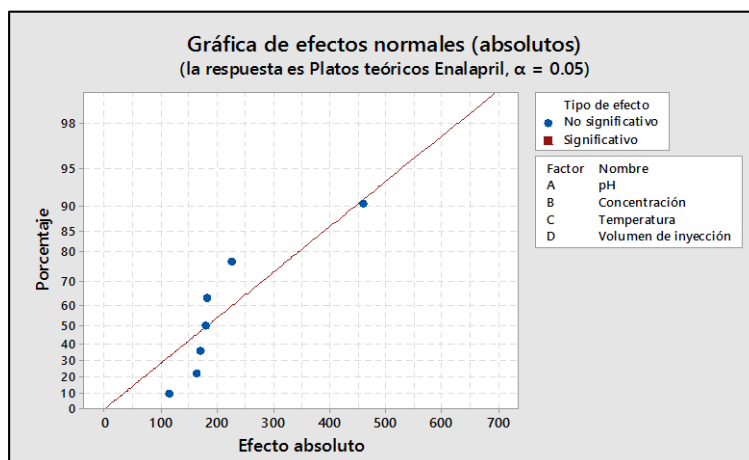


La figura 85 nos da información acerca de la magnitud e importancia de los efectos de los factores A, B, C, D (pH, concentración del buffer, temperatura y volumen de inyección) sobre el factor de asimetría del Enalapril, se observa que ninguna de las barras cruza la



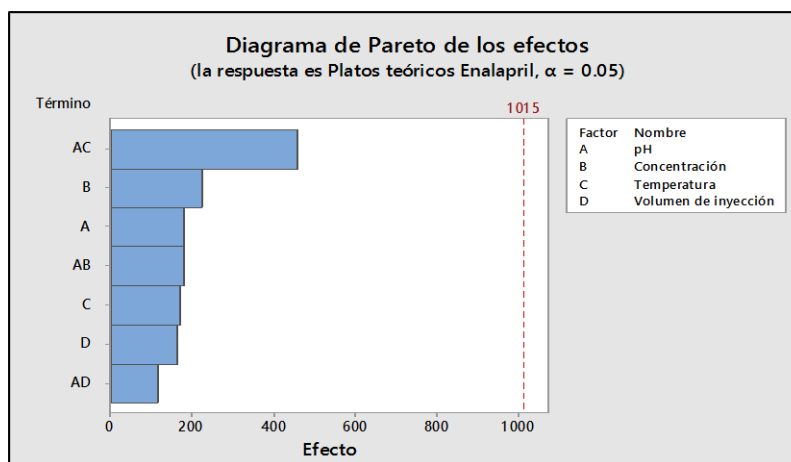
línea de referencia con un valor igual a 0.04829. Estos factores no son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95 %.

**Figura 86. Gráfica de efectos normales para la respuesta de platos teóricos de Enalapril**



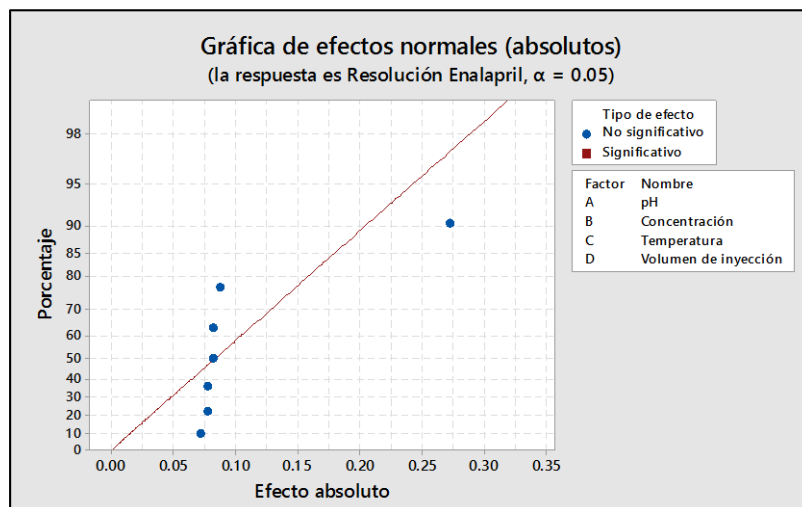
En figura 86, se observa que los platos teóricos para Enalapril no sufre un efecto significativo para los 8 experimentos con un nivel de confianza del 95 %.

**Figura 87. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de platos teóricos de Enalapril**



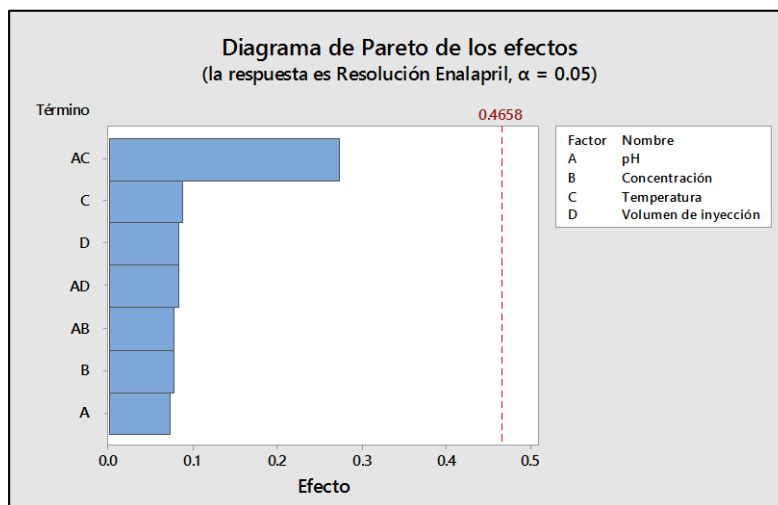
La figura 87 nos da información acerca de la magnitud e importancia de los efectos de los factores A, B, C, D (pH, concentración del buffer, temperatura y volumen de inyección) para los platos teóricos del Enalapril, se observa que ninguna de las barras cruza la línea de referencia con un valor igual a 1015. Estos factores no son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95 %.

Figura 88. Gráfica de efectos normales para la respuesta de resolución de Enalapril.



En figura 88, se observa que la resolución para Enalapril no sufre un efecto significativo para los 8 experimentos con un nivel de confianza del 95 %.

Figura 89. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de resolución de Enalapril

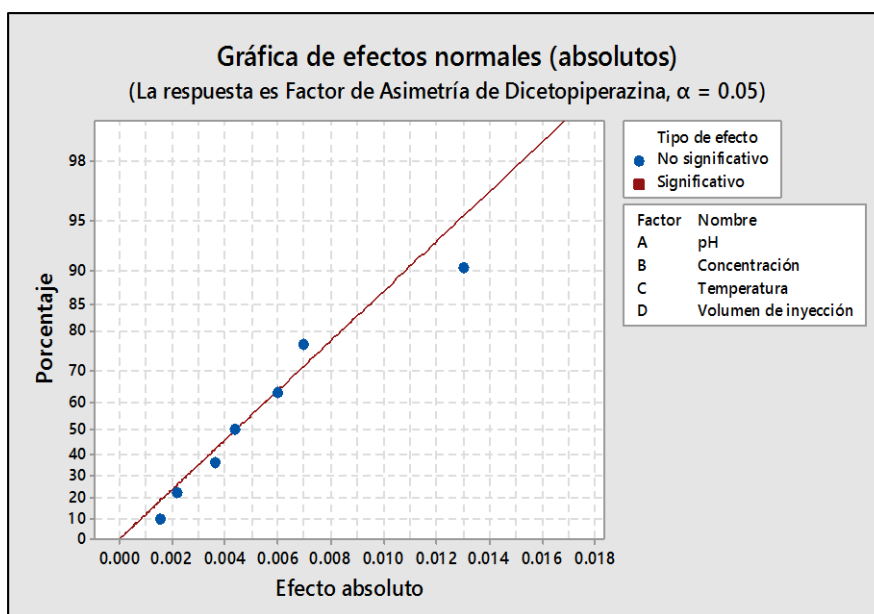


La figura 89 nos da información acerca de la magnitud e importancia de los efectos de los factores A,B,C,D (pH, concentración del buffer, temperatura y volumen de inyección) en la resolución de pico del Enalapril, se observa que ninguna de las barras cruza la línea de referencia con un valor igual a 0.4658. Estos factores no son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 28. Parámetros cromatográficos para Enalapril Dicetopiperazina para los experimentos según diseño factorial fraccionado.

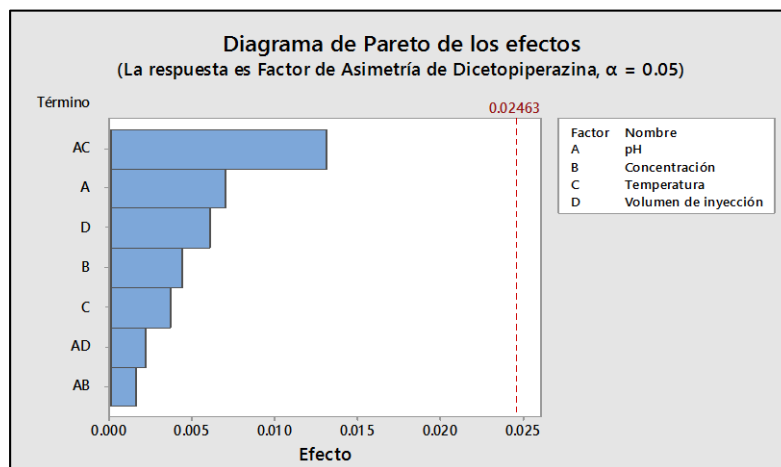
Experimento	Enalapril Dicetopiperazina		
	Factor de Asimetría	Platos teóricos	Resolución
1	1.06884	12704	14.47
2	1.05634	13197	15.38
3	1.06985	12747	14.35
4	1.04225	13253	15.44
5	1.05597	13533	15.27
6	1.05755	12860	14.37
7	1.04930	13435	15.41
8	1.05985	13827	15.44

Figura 90. Gráfica de efectos normales para la respuesta de Factor de Asimetría de Enalapril Dicetopiperazina



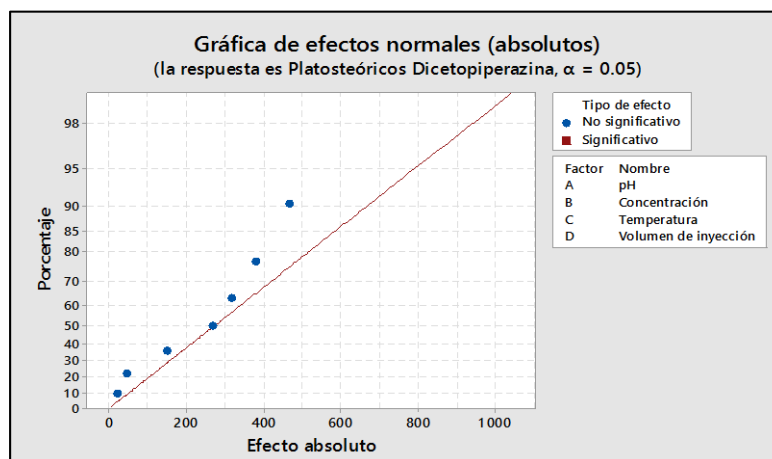
En figura 90, se observa que el factor de asimetría para Enalapril Dicetopiperazina no sufre un efecto significativo para los 8 experimentos con un nivel de confianza del 95 %

**Figura 91. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de Factor de Asimetría de Enalapril Dicetopiperazina**



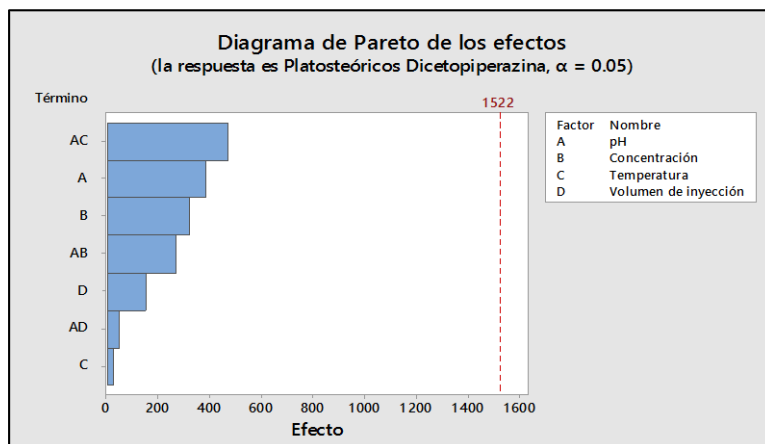
La figura 91 nos da información acerca de la magnitud e importancia de los efectos de los factores A, B, C, D (pH, concentración del buffer, temperatura y volumen de inyección) sobre el factor de asimetría de los picos de Enalapril Dicetopiperazina, se observa que ninguna de las barras cruza la línea de referencia con un valor igual a 0.02463. Estos factores no son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95 %.

**Figura 92. Gráfica de efectos normales para la respuesta de platos teóricos de Enalapril Dicetopiperazina**



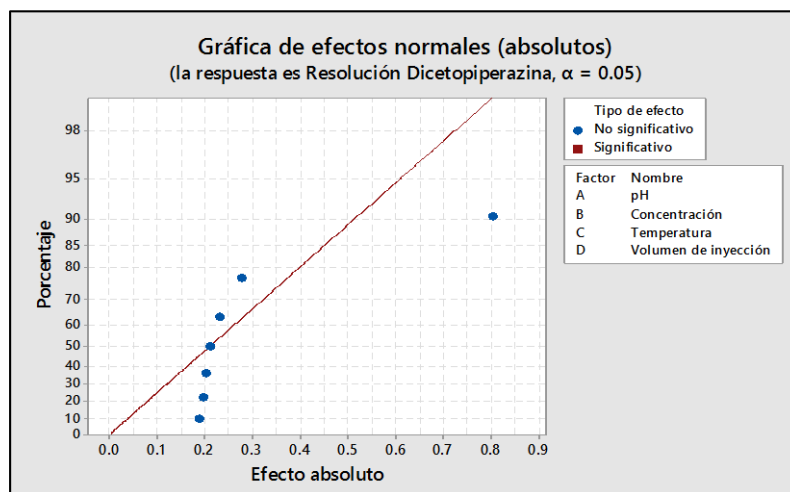
En figura 92, se observa que los platos teóricos para Enalapril Dicetopiperazina no sufre un efecto significativo para los 8 experimentos con un nivel de confianza del 95 %.

**Figura 93. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de platos teóricos de Enalapril Dicetopiperazina.**



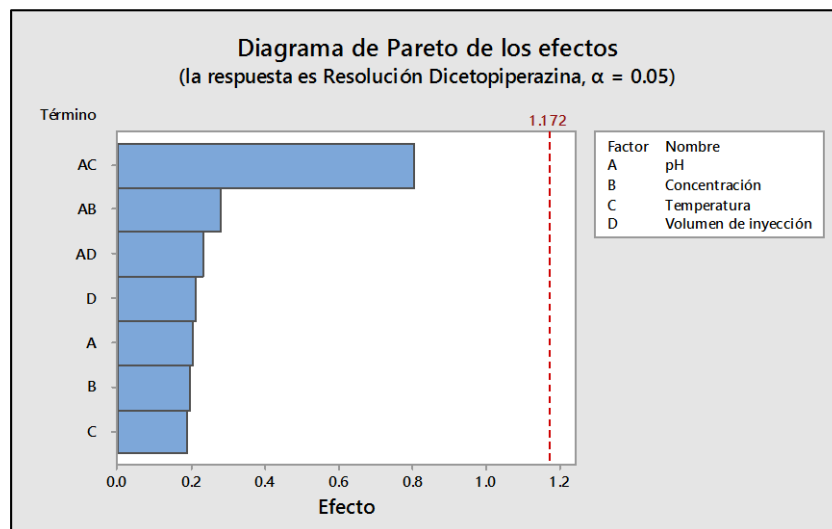
La figura 93 nos da información acerca de la magnitud e importancia de los efectos de los factores A, B, C, D (pH, concentración del buffer, temperatura y volumen de inyección) en los platos teóricos del Enalapril Dicetopiperazina, se observa que ninguna de las barras cruza la línea de referencia con un valor igual a 1522. Estos factores no son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95 %.

**Figura 94. Gráfica de efectos normales para la respuesta de resolución de Enalapril Dicetopiperazina**



En figura 94, se observa que la resolución para Enalapril Dicetopiperazina no sufre un efecto significativo para los 8 experimentos con un nivel de confianza del 95 %.

**Figura 95. Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta de la resolución de Enalapril Dicetopiperazina**



La figura 95 nos da información acerca de la magnitud e importancia de los efectos de los factores A,B,C,D (pH, concentración del buffer, temperatura y volumen de inyección) en la resolución de pico del Enalapril Dicetopiperazina, se observa que ninguna de las barras cruza la línea de referencia con un valor igual a 1.172. Estos factores no son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95 %.

De acuerdo al análisis estadístico de los datos de robustez, las variables de consideradas de pH, Concentración del Buffer, Temperatura y volumen de inyección no afecta a los parámetros cromatográficos del método desarrollado, el método es robusto.

#### 4.2.4 Estabilidad de las soluciones

##### 4.2.4.1 Estabilidad de la Solución estándar

###### 4.2.4.1.1 Resultados obtenidos de estabilidad de la solución estándar

Tabla 29. Resultados de estabilidad de las soluciones estándar

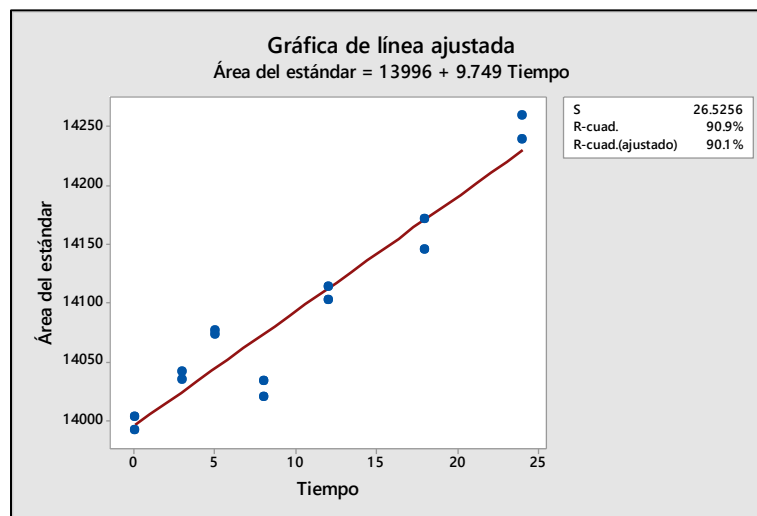
Tiempo	Concentración	Área del estándar
0	0.2 mg/mL	13992.0
		14003.6
3	0.2 mg/mL	14041.4
		14034.5
5	0.2 mg/mL	14076.2
		14072.9
8	0.2 mg/mL	14034.1
		14019.9
12	0.2 mg/mL	14113.8
		14102.3
18	0.2 mg/mL	14146.1
		14171.7
24	0.2 mg/mL	14239.3
		14259.6

Para evaluar el tiempo de estabilidad de la solución estándar se recurre al análisis estadístico de correlación lineal de los datos tomando en cuenta las siguientes variables:

- Variable independiente (x): El tiempo de almacenamiento
- Variable dependiente (y): El área del estándar analizado en los diferentes tiempos.

#### 4.2.4.1.1.1 Análisis de regresión lineal hasta las 24 horas

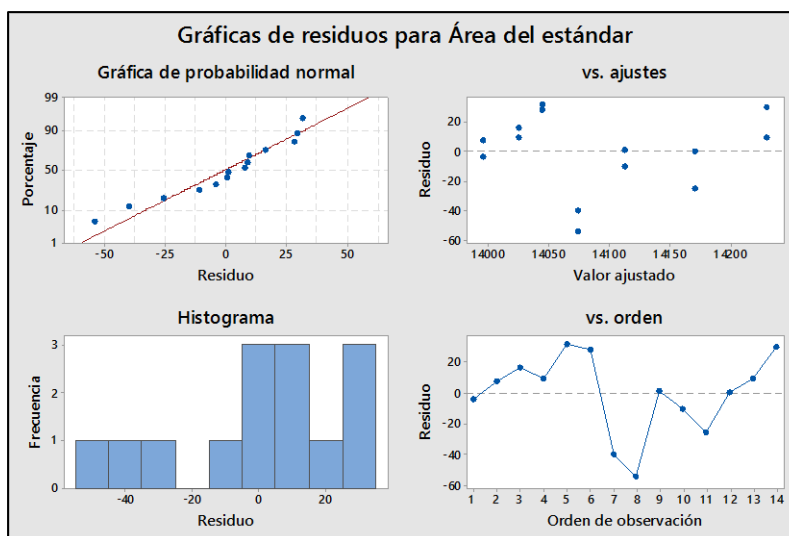
Figura 96. Gráfica de regresión lineal de estabilidad de la solución estándar (24h)



La ecuación de regresión es

<b>Ecuación de la recta</b>	<b>Área del estándar = 13996 + 9.749 Tiempo</b>
<b>Datos estadísticos</b>	S = 26.5256 R-cuad. = 90.9 % R-cuad.(ajustado) = 90.1%

Figura 97: Gráfica de residuos de estabilidad de la solución estándar (24h)



Los gráficos de la figura 97 muestra que los residuos tienen una distribución normal por lo tanto los datos pueden ser evaluados por el método de mínimos cuadrados.

### Método de ajuste de mínimos cuadrados

La relación de las concentraciones (x) variable independiente y la respuesta área (y) variable dependiente se expresa matemáticamente como una recta de regresión obtenida por el método de ajuste de mínimos cuadrados.

### Análisis de correlación

#### a) Planteamiento de la Hipótesis

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0 : r = 0$ No hay correlación entre variables ( Es estable la solución)
<b>Hipótesis Alternativa</b>	$H_1 : r \neq 0$ Hay correlación entre variables ( No es estable la solución)



## b) Regla de decisión

Nivel de confianza %	95 %	Valor de P = 0.05
Se acepta la Hipótesis Nula	Si	P > 0.05
Se acepta la Hipótesis Alternativa	Si	P < 0.05

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	84023.6	84023.6	119.42	0.000
Error	12	8443.3	703.6		
Total	13	92466.8			

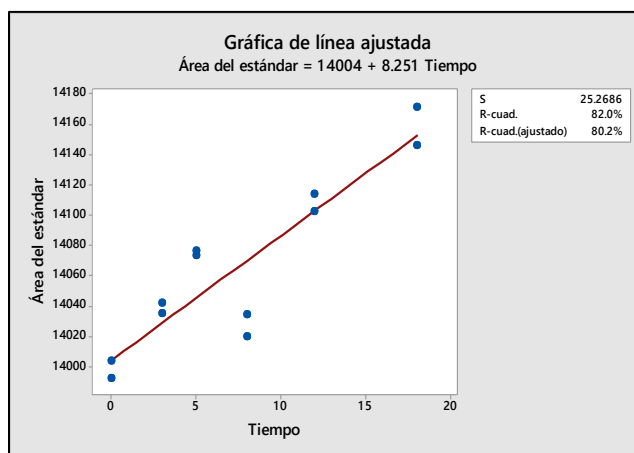
## c) Resultados de correlación entre variables

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
		<b>0.000 &lt; 0.05</b>
<b>0.05</b>	<b>0.000</b>	Se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto hay correlación entre variables

El análisis estadístico de los datos nos da como resultado que existe una correlación significativa que indica que la variable (tiempo) influye en la variable respuesta (área), lo que demostraría una inestabilidad de la solución debida al tiempo de almacenamiento hasta las 24 h con un nivel de confianza del 95 %.

## 4.2.4.1.1.2 Análisis de regresión lineal hasta las 18 horas

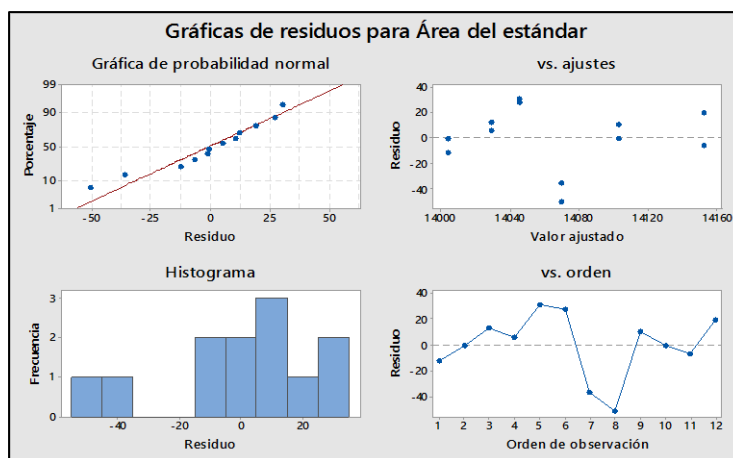
Figura 98. Gráfica de regresión lineal de estabilidad de la solución estándar (18h)



La ecuación de regresión es

Ecuación de la recta	Área del estándar = 14004 + 8.251 Tiempo
Datos estadísticos	S = 25.2686 R-cuad. = 82.0 % R-cuad.(ajustado) = 80.2%

Figura 99: Gráfica de residuos de estabilidad de la solución estándar (18h)



Los gráficos de la figura 99 muestra que los residuos tienen una distribución normal por lo tanto los datos pueden ser evaluados por el método de mínimos cuadrados.

### Método de ajuste de mínimos cuadrados

La relación de las concentraciones (x) variable independiente y la respuesta área (y) variable dependiente se expresa matemáticamente como una recta de regresión obtenida por el método de ajuste de mínimos cuadrados.

### Análisis de correlación

#### a) Planteamiento de la Hipótesis

Hipótesis Nula	$H_0 : r = 0$ No hay correlación entre variables ( Es estable la solución)
Hipótesis Alternativa	$H_1 : r \neq 0$ Hay correlación entre variables ( No es estable la solución)

#### b) Regla de decisión

Nivel de confianza %	95 % Valor de P = 0.05
Se acepta la Hipótesis Nula	Si $P > 0.05$
Se acepta la Hipótesis Alternativa	Si $P < 0.05$

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	29045.0	29045.0	45.49	0.000
Error	10	6385.0	638.5		
Total	11	35430.0			

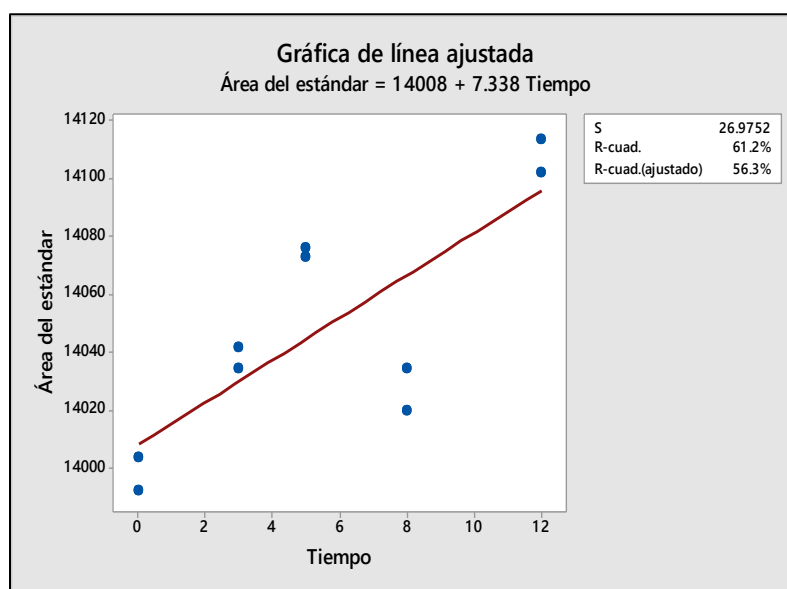
### c) Resultados de correlación entre variables

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
		<b>0.000 &lt; 0.05</b>
<b>0.05</b>	<b>0.00</b>	Se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto hay correlación entre variables

El análisis estadístico de los datos nos da como resultado que existe una correlación significativa que indica que la variable (tiempo) influye en la variable respuesta (área), lo que demostraría una inestabilidad de la solución debida al tiempo de almacenamiento hasta las 18 h con un nivel de confianza del 95 %.

#### 4.2.4.1.1.3 Análisis de regresión lineal hasta las 12 horas

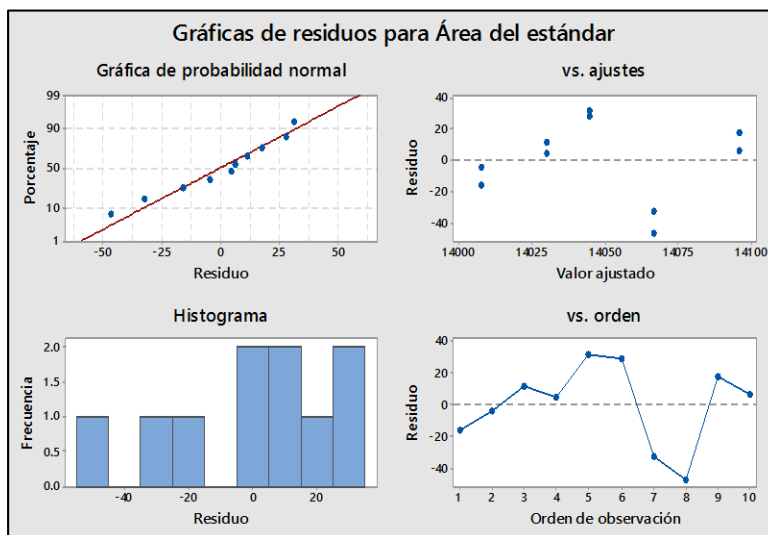
Figura 100. Gráfica de regresión lineal de estabilidad de la solución estándar (12h)



La ecuación de regresión es

<b>Ecuación de la recta</b>	<b>Área del estándar = 14008 + 7.338 Tiempo</b>
<b>Datos estadísticos</b>	S = 26.9752 R-cuad. = 61.2 % R-cuad.(ajustado) = 56.3%

Figura 101. Gráfica de residuos de estabilidad de la solución estándar (12h)



Los gráficos de la figura 101 muestra que los residuos tienen una distribución normal por lo tanto los datos pueden ser evaluados por el método de mínimos cuadrados.

**Método de ajuste de mínimos cuadrados**

La relación de las concentraciones (x) variable independiente y la respuesta área (y) variable dependiente se expresa matemáticamente como una recta de regresión obtenida por el método de ajuste de mínimos cuadrados.

**Análisis de correlación**

**a) Planteamiento de la Hipótesis**

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0: r = 0$ No hay correlación entre variables ( Es estable la solución)
<b>Hipótesis Alterna</b>	$H_0: r \neq 0$ Hay correlación entre variables ( No es estable la solución)

## b) Regla de decisión

Nivel de confianza %	95 %	Valor de P = 0.05
Se acepta la Hipótesis Nula	Si	P > 0.05
Se acepta la Hipótesis Alterna	Si	P < 0.05

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	9176.6	9176.64	12.61	0.007
Error	8	5821.3	727.66		
Total	9	14997.9			

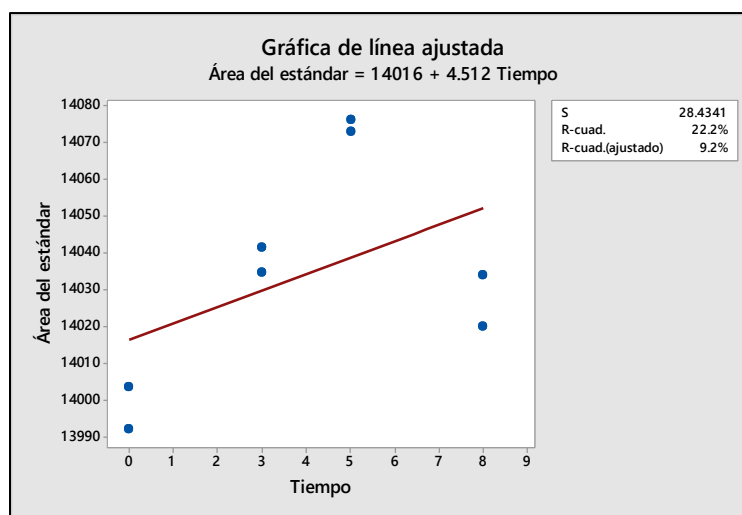
## c) Resultados de correlación entre variables

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.00	<b>0.007 &lt; 0.05</b> Se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto hay correlación entre variables

El análisis estadístico de los datos nos da como resultado que existe una correlación significativa que indica que la variable (tiempo) influye en la variable respuesta (área), lo que demostraría una inestabilidad de la solución debida al tiempo de almacenamiento hasta las 12 h con un nivel de confianza del 95 %.

## 4.2.4.1.1.4 Análisis de regresión lineal hasta las 8 h

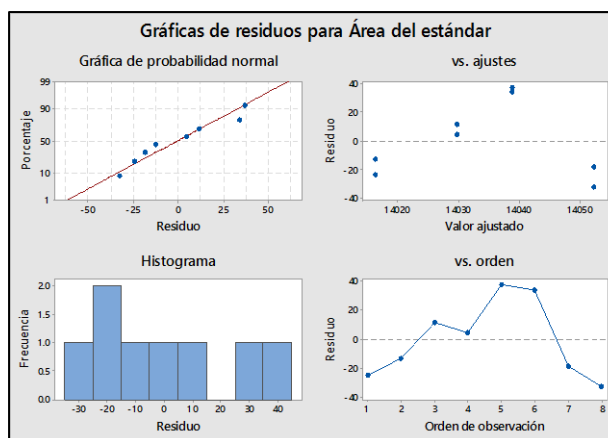
Figura 102. Gráfica de regresión lineal de estabilidad de la solución estándar (8h)



La ecuación de regresión es

<b>Ecuación de la recta</b>	<b>Área del estándar = 14016 + 4.512 Tiempo</b>
<b>Datos estadísticos</b>	S = 28.4341 R-cuad. = 22.2 % R-cuad.(ajustado) = 9.2 %

**Figura 103. Gráfica de residuos de estabilidad de la solución estándar (8h)**



Los gráficos de la figura 103 muestra que los residuos tienen una distribución normal por lo tanto los datos pueden ser evaluados por el método de mínimos cuadrados.

**Método de ajuste de mínimos cuadrados**

La relación de las concentraciones (x) variable independiente y la respuesta área (y) variable dependiente se expresa matemáticamente como una recta de regresión obtenida por el método de ajuste de mínimos cuadrados.

**Análisis de correlación**

**a) Planteamiento de la Hipótesis**

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0: r = 0$ No hay correlación entre variables ( Es estable la solución)
<b>Hipótesis Alternativa</b>	$H_0: r \neq 0$ Hay correlación entre variables ( No es estable la solución)

**b) Regla de decisión**

<b>Nivel de confianza %</b>	95 % Valor de P = 0.05
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si $P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Alternativa</b>	Si $P < 0.05$

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	1384.21	1384.21	1.71	0.239
Error	6	4850.99	808.50		
Total	7	6235.20			

### c) Resultados de correlación entre variables

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.239	0.239 > 0.05

El análisis estadístico de los datos nos da como resultado que no existe una correlación significativa, por tanto, la pendiente es igual a cero, lo cual demostraría que el tiempo de almacenamiento de la solución no influye en la variable respuesta (área), lo que demostraría que la solución es estable hasta 8 h de almacenamiento, con un nivel de confianza del 95 %.

#### 4.2.4.2 Estabilidad de la Solución muestra

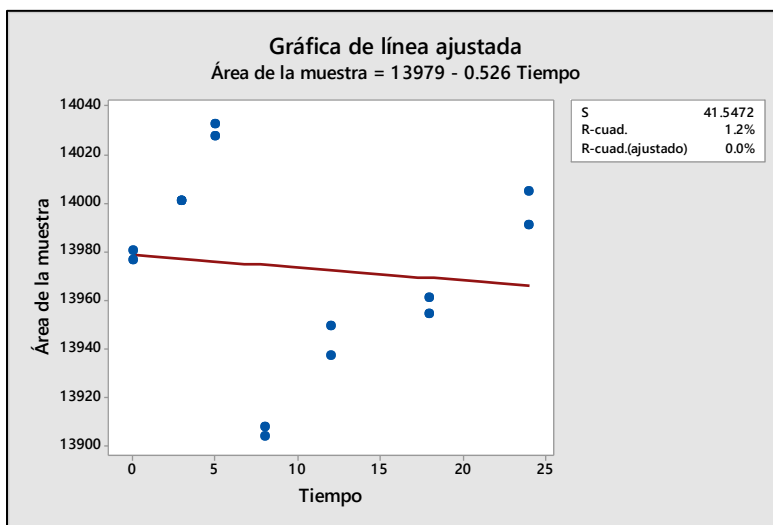
##### 4.2.4.2.1 Resultados obtenidos de estabilidad de la solución muestra

Tabla 30. Resultados de estabilidad de las soluciones muestra

Tiempo	Concentración	Área de la muestra
0	0.2 mg/mL	13980.1
		13976.5
3	0.2 mg/mL	14000.8
		14000.8
5	0.2 mg/mL	14032.7
		14027.7
8	0.2 mg/mL	13907.7
		13903.7
12	0.2 mg/mL	13949.0
		13936.8
18	0.2 mg/mL	13961.2
		13954.0
24	0.2 mg/mL	14004.8
		13991.2

4.2.4.2.1.1 Análisis de regresión lineal hasta las 24 horas

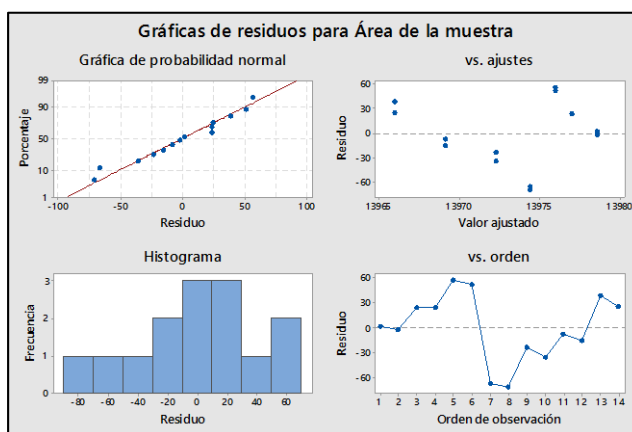
Figura 104. Gráfica de línea ajustada estabilidad de la muestra (24 h)



La ecuación de regresión es

Ecuación de la recta	Área de la muestra = 13979 – 0.526 Tiempo
Datos estadísticos	S = 41.5472 R-cuad. = 1.2 % R-cuad.(ajustado) = 0.0 %

Figura 105. Gráfica de residuos para la estabilidad de la muestra (24 h)



Los gráficos de la figura 105 muestra que los residuos tienen una distribución normal por lo tanto los datos pueden ser evaluados por el método de mínimos cuadrados.



### Método de ajuste de mínimos cuadrados

La relación de las concentraciones (x) variable independiente y la respuesta área (y) variable dependiente se expresa matemáticamente como una recta de regresión obtenida por el método de ajuste de mínimos cuadrados.

### Análisis de correlación

#### a) Planteamiento de la Hipótesis

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0: r = 0$ No hay correlación entre variables ( Es estable la solución)
<b>Hipótesis Alternativa</b>	$H_0: r \neq 0$ Hay correlación entre variables ( No es estable la solución)

#### b) Regla de decisión

<b>Nivel de confianza %</b>	95 %	Valor de P = 0.05
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si	$P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Alternativa</b>	Si	$P < 0.05$

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	244.4	244.39	0.14	0.713
Error	12	20714.1	1726.17		
Total	13	20958.5			

#### c) Resultados de correlación entre variables

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
<b>0.05</b>	<b>0.713</b>	<b>0.713 &gt; 0.05</b> Se acepta la hipótesis nula, por lo tanto no hay correlación entre variables

El análisis estadístico de los datos nos da como resultado que no existe una correlación significativa, por tanto, la pendiente es igual a cero, lo que significa que el tiempo de almacenamiento de la solución no influye en la variable respuesta (área), lo que demostraría que la solución es estable hasta 24 h de almacenamiento, con un nivel de confianza del 95 %.

#### 4.2.4.3 Estabilidad de la Solución Aptitud de Sistema

##### 4.2.4.3.1 Resultados obtenidos de estabilidad de la solución estándar

Tabla 31. Resultados de estabilidad de la solución aptitud de sistema

Tiempo de Es- tabilidad	Áreas Enalaprilat	Área de Enalapril	Área de Enalapril Dicotopiperazina
0h	1965.9	16496.4	1457.2
3h	1966.9	16512.6	1457.8
5h	1962.4	16533.3	1464.4
8h	1959.1	16545.1	1461.2
12h	1957.4	16547.1	1464.8
18h	1954.6	16547.7	1465.3

#### Análisis de correlación

##### a) Planteamiento de la Hipótesis

Hipótesis Nula	$H_0: r = 0$ No hay correlación entre variables ( Es estable la solución)
Hipótesis Alterna	$H_1: r \neq 0$ Hay correlación entre variables ( No es estable la solución)

##### b) Regla de decisión

Nivel de confianza %	95 %	Valor de P = 0.05
Se acepta la Hipótesis Nula	Si	$P > 0.05$
Se acepta la Hipótesis Alterna	Si	$P < 0.05$

##### c) Análisis estadístico

#### Regresión lineal para las 18 h, 12 h y 8 h (Enalapril)

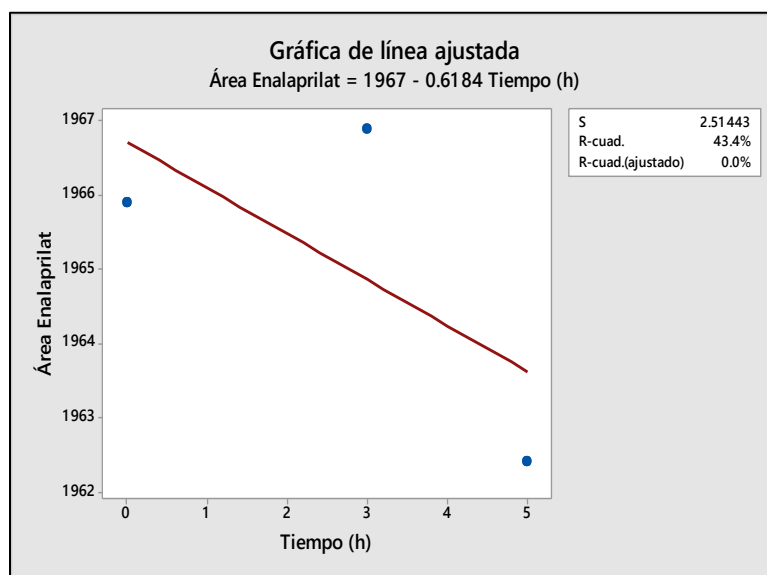
Tiempo de Estabilidad	$r^2$	Valor P regresión	Valor P referencia	
18 h	65.3 %	0.032	0.05	Existe correlación
12 h	82.9 %	0.020	0.05	Existe correlación
8 h	95.8 %	0.014	0.05	Existe correlación
5 h	93.2 %	0.118	0.05	No existe correlación

De acuerdo al análisis estadístico de los datos se demuestra que existe una correlación significativa, que la pendiente es diferente cero para los tiempos de almacenamiento de 8 h, 12 h y 18 h lo que significa que hay una influencia en la variable respuesta (área) con un nivel de confianza del 95 %.

El análisis estadístico de los datos para la solución hasta las 5 h de almacenamiento nos demuestra que no existe una correlación entre las variables tiempo de almacenamiento y respuesta (área), en base a estos resultados se procede a realizar la correlación para el principio activo y productos de degradación.

#### 4.2.4.3.1.1 Análisis de regresión para la Estabilidad de Enalaprilat a las 5 h

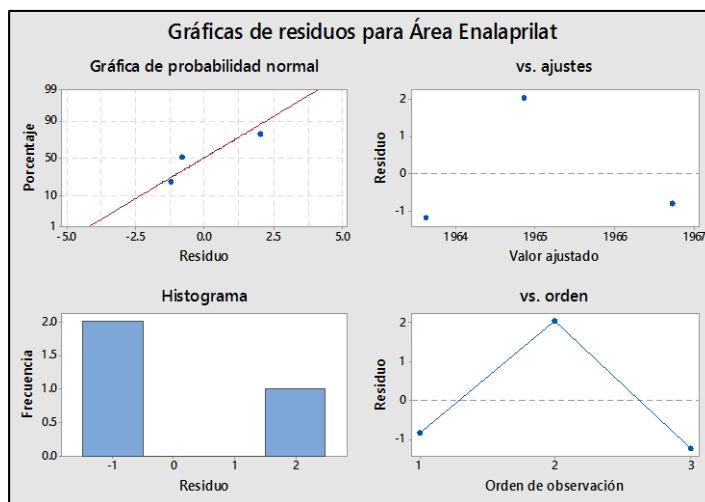
Figura 106. Gráfica de línea ajustada de la solución aptitud de sistema (Enalaprilat)



La ecuación de regresión es

<b>Ecuación de la recta</b>	<b>Área de Enalaprilat = 1967 – 0.6184 Tiempo</b>
<b>Datos estadísticos</b>	S = 2.51443 R-cuad. = 43.4 % R-cuad.(ajustado) = 0.0 %

Figura 107. Gráfica de residuos para Enalaprilat de la solución aptitud de sistema



Los gráficos de la figura 107 muestra que los residuos tienen una distribución normal por lo tanto los datos pueden ser evaluados por el método de mínimos cuadrados.

### Método de ajuste de mínimos cuadrados

La relación de las concentraciones (x) variable independiente y la respuesta área (y) variable dependiente se expresa matemáticamente como una recta de regresión obtenida por el método de ajuste de mínimos cuadrados.

### Análisis de correlación

#### a) Planteamiento de la Hipótesis

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0: r = 0$ No hay correlación entre variables ( Es estable la solución)
<b>Hipótesis Alterna</b>	$H_0: r \neq 0$ Hay correlación entre variables ( No es estable la solución)

#### b) Regla de decisión

<b>Nivel de confianza %</b>	95 % Valor de P = 0.05
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si $P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Alterna</b>	Si $P < 0.05$

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	4.8443	4.84430	0.77	0.542
Error	1	6.3224	6.32237		
Total	2	11.1667			

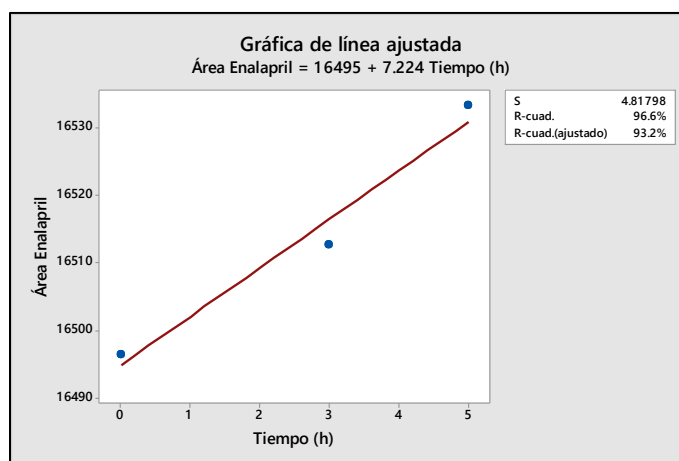
## c) Resultados de correlación entre variables

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.542	0.542 > 0.05 Se acepta la hipótesis nula, por lo tanto no hay correlación entre variables

El análisis estadístico de los datos nos da como resultado que no existe una correlación significativa, por tanto, la pendiente es igual a cero, el tiempo de almacenamiento de la solución no influye en la variable respuesta (área del Enalaprilat), lo que demostraría que la solución es estable hasta 5 h de almacenamiento, con un nivel de confianza del 95 %.

## 4.2.4.3.1.2 Análisis de regresión para la Estabilidad de Enalapril a las 5 h

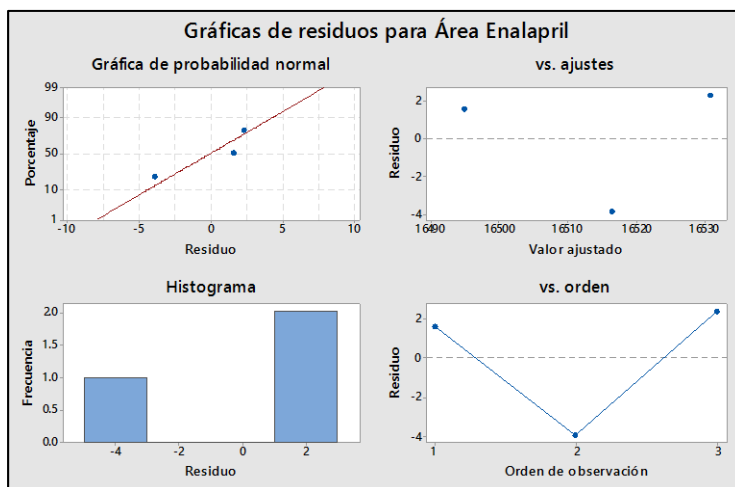
Figura 108. Gráfica de línea ajustada de la solución aptitud de sistema (Enalapril)



La ecuación de regresión es

Ecuación de la recta	Área del Enalapril = 16495 + 7.224 Tiempo
Datos estadísticos	S = 4.81798 R-cuad. = 96.6 % R-cuad.(ajustado) = 93.2 %

Figura 109. Gráfica de residuos para Enalapril de la solución aptitud de sistema



Los gráficos de la figura 109 muestra que los residuos tienen una distribución normal por lo tanto los datos pueden ser evaluados por el método de mínimos cuadrados.

**Método de ajuste de mínimos cuadrados**

La relación de las concentraciones (x) variable independiente y la respuesta área (y) variable dependiente se expresa matemáticamente como una recta de regresión obtenida por el método de ajuste de mínimos cuadrados.

**Análisis de correlación**

**a) Planteamiento de la Hipótesis**

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0 : r = 0$ No hay correlación entre variables ( Es estable la solución)
<b>Hipótesis Alternativa</b>	$H_1 : r \neq 0$ Hay correlación entre variables ( No es estable la solución)

**b) Regla de decisión**

<b>Nivel de confianza %</b>	95 % Valor de P = 0.05
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si $P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Alternativa</b>	Si $P < 0.05$

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	660.967	660.967	28.47	0.118
Error	1	23.213	23.213		
Total	2	684.180			

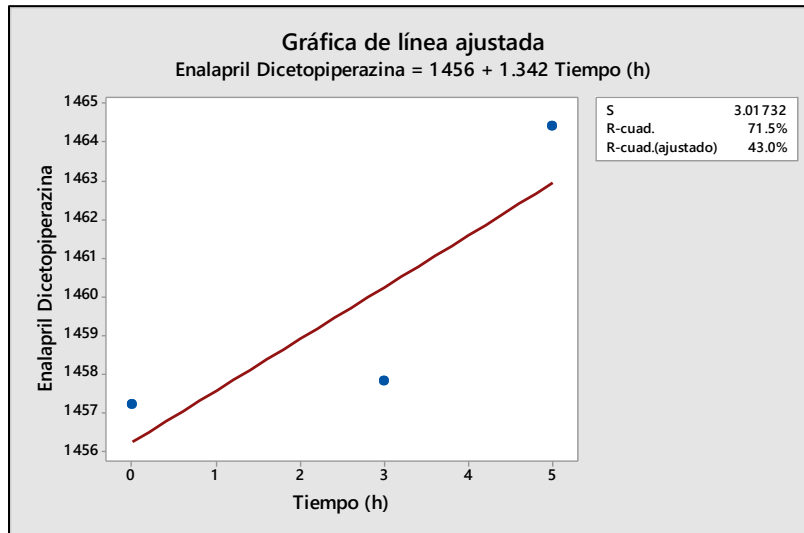
## c) Resultados de correlación entre variables

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.118	<b>0.118 &gt; 0.05</b> Se acepta la hipótesis nula, por lo tanto no hay correlación entre variables

El análisis estadístico de los datos nos da como resultado que no existe una correlación significativa, por tanto, la pendiente es igual a cero, el tiempo de almacenamiento de la solución no influye en la variable respuesta (área de Enalapril), lo que demostraría que la solución es estable hasta 5 h de almacenamiento, con un nivel de confianza del 95 %.

#### 4.2.4.3.1.3 Análisis de regresión para la Estabilidad de Enalapril Dicotopiperazina a las 5 h

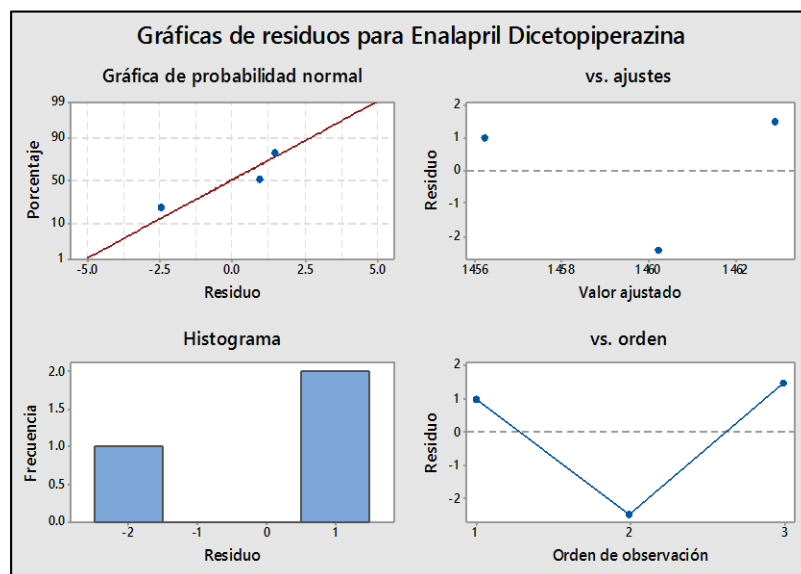
Figura 110. Gráfica de línea ajustada de la solución aptitud de sistema (Enalapril Dicotopiperazina)



La ecuación de regresión es

Ecuación de la recta	Área del Enalapril Dicotopiperazina = 1456 + 1.342 Tiempo
Datos estadísticos	S = 3.01732 R-cuad. = 71.5 % R-cuad.(ajustado) = 43 %

Figura 111. Gráfica de residuos de la solución aptitud de sistema (Enalapril Dicotopiperazina)



Los gráficos de la figura 111 muestra que los residuos tienen una distribución normal por lo tanto los datos pueden ser evaluados por el método de mínimos cuadrados.

### Método de ajuste de mínimos cuadrados

La relación de las concentraciones (x) variable independiente y la respuesta área (y) variable dependiente se expresa matemáticamente como una recta de regresión obtenida por el método de ajuste de mínimos cuadrados.

### Análisis de correlación

#### a) Planteamiento de la Hipótesis

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0: r = 0$ No hay correlación entre variables ( Es estable la solución)
<b>Hipótesis Alternativa</b>	$H_0: r \neq 0$ Hay correlación entre variables ( No es estable la solución)

#### b) Regla de decisión

<b>Nivel de confianza %</b>	95 % Valor de P = 0.05
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si $P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Alternativa</b>	Si $P < 0.05$



Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	22.8158	22.8158	2.51	0.359
Error	1	9.1042	9.1042		
Total	2	31.9200			

### c) Resultados de correlación entre variables

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
<b>0.05</b>	<b>0.359</b>	<b>0.359 &gt; 0.05</b> Se acepta la hipótesis nula, por lo tanto no hay correlación entre variables

El análisis estadístico de datos nos da como resultado que no existe una correlación significativa, que la pendiente es igual cero, lo cual demostraría que el tiempo de almacenamiento de la solución no influye en la variable respuesta (área de Enalapril Dicotopiperazina) y esta última se mantiene constante hasta las 5 h de estabilidad de la solución aptitud de sistema con un nivel de confianza del 95 %.

### 4.2.5 Resultados de Aptitud de Sistema

Tabla 32. Resultados aptitud de sistema

N°	Ácido Maleíco		Enalaprilat		
	Factor de Asimetría	Platos teóricos	Factor de Asimetría	Platos teóricos	Resolución
1	2.33	2695	1.82	1287	3.14
2	2.38	2697	1.82	1289	3.13
3	2.33	2702	1.80	1290	3.13
4	2.30	2708	1.84	1296	3.14
5	2.40	2689	1.83	1281	3.13
<b>PROMEDIO</b>	2.35	2706.4	1.82	1290.8	3.13
<b>DS</b>	0.04	17.95	0.01	6.69	0.01
<b>CV</b>	1.89	0.66	0.81	0.52	0.17
<b>CRITERIO</b>	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

N°	Enalapril			Dicetopiperazina		
	Factor de Asimetría	Platos teóricos	Resolución	Factor de Asimetría	Platos teóricos	Resolución
1	1.95	2218	3.67	1.07	12576	14.00
2	1.94	2232	3.67	1.08	12423	13.98
3	1.93	2224	3.68	1.08	12605	14.02
4	1.96	2216	3.68	1.09	12584	13.99
5	1.93	2196	3.67	1.09	12616	13.98
<b>PROMEDIO</b>	1.94	2223.2	3.67	1.08	12563.4	14
<b>DS</b>	0.01	19.27	0.01	0.01	79.51	0.03
<b>CV</b>	0.71	0.87	0.15	0.60	0.63	0.19
<b>CRITERIO</b>	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

Figura 112. Reporte de Aptitud de Sistema de Ácido Maleíco

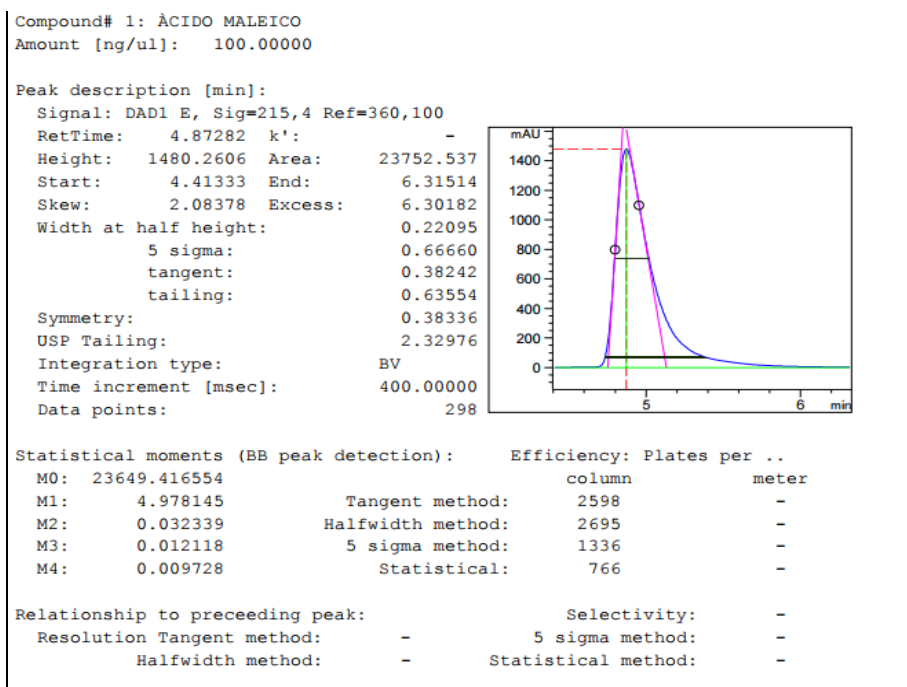


Figura 113. Reporte de Aptitud de Sistema de Enalaprilat

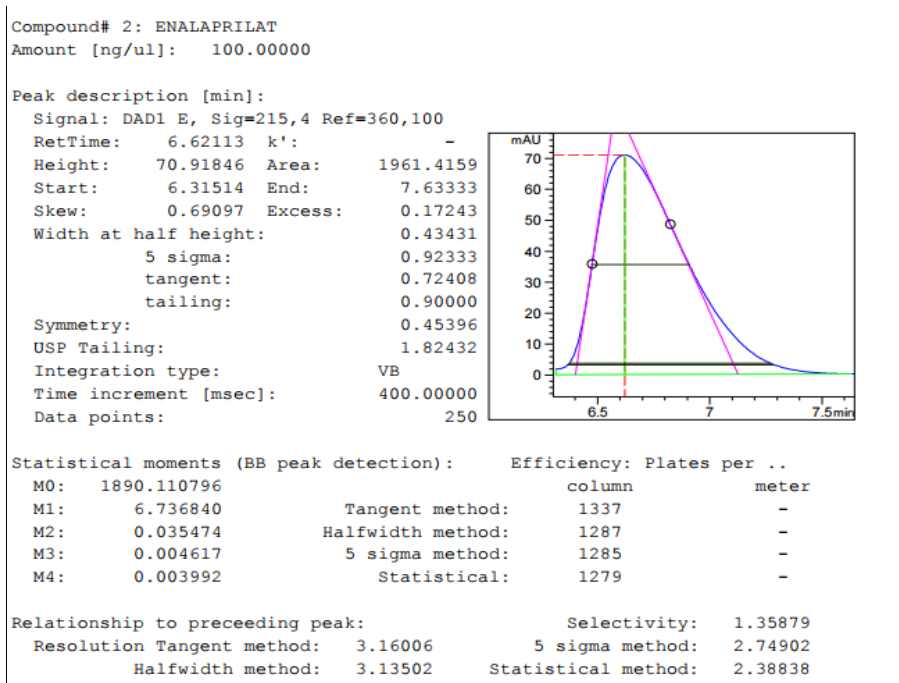


Figura 114. Reporte de Aptitud de Sistema de Enalapril

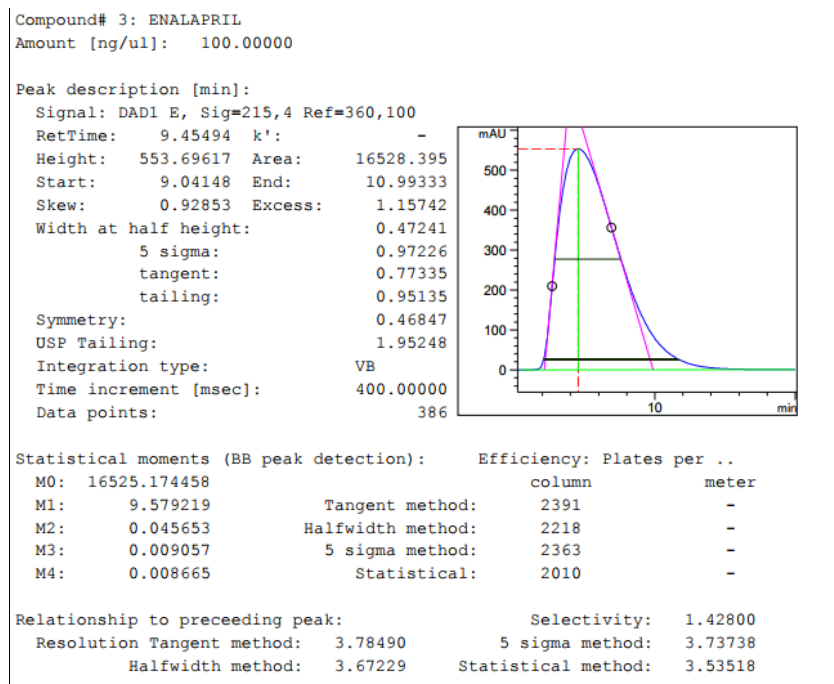
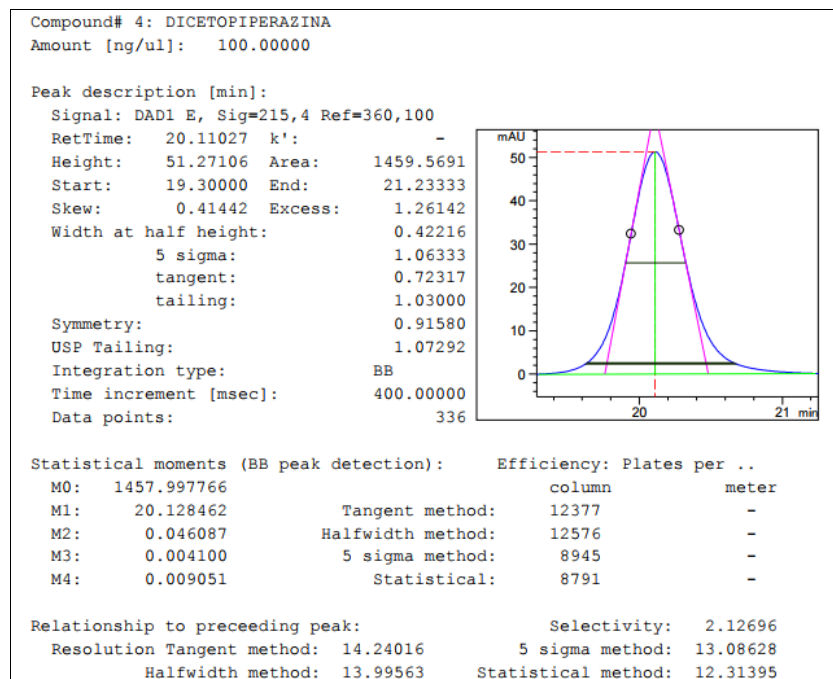


Figura 115. Reporte de Aptitud de Sistema de Dicetopiperazina



### Requisitos de aptitud según Farmacopea USP vigente

#### Resolución:

- No menos de 2 entre Ácido Maleico y Enalaprilat
- No menos de 2 entre Enalaprilat y Enalapril
- No menos de 2 entre Enalapril y Enalapril Dicetopiperazina,

#### Eficiencia de la columna:

- No menos de 1000 platos teóricos para Enalaprilat
- No menos de 300 platos teóricos para Enalapril
- No menos de 2500 platos teóricos para Enalapril Dicetopiperazina

#### Factor de Asimetría: No más de 2 para Enalapril

El método desarrollado y validado cumple con los requisitos de aptitud de sistema, el número de platos teóricos es una medida de la eficacia del sistema cromatográfico, que expresa el número de picos que pueden aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo,

a mayor número de platos teóricos disponibles dentro de la columna, mayor equilibrio y mejor calidad de separación.

El factor de asimetría, en el mundo ideal todos los picos deberían ser simétricos, pero debido a distintas circunstancias como el volumen muerto de la columna, efectos adsorptivos de la fase estacionaria y la calidad de la columna la simetría de pico puede verse afectada.

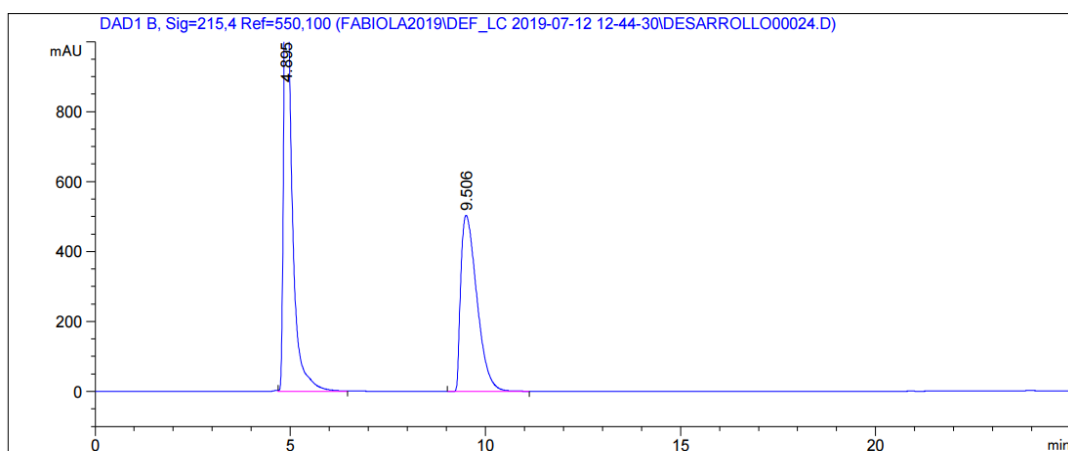
#### 4.2.6 Estudios de Stress (descomposición forzada) con el principio activo

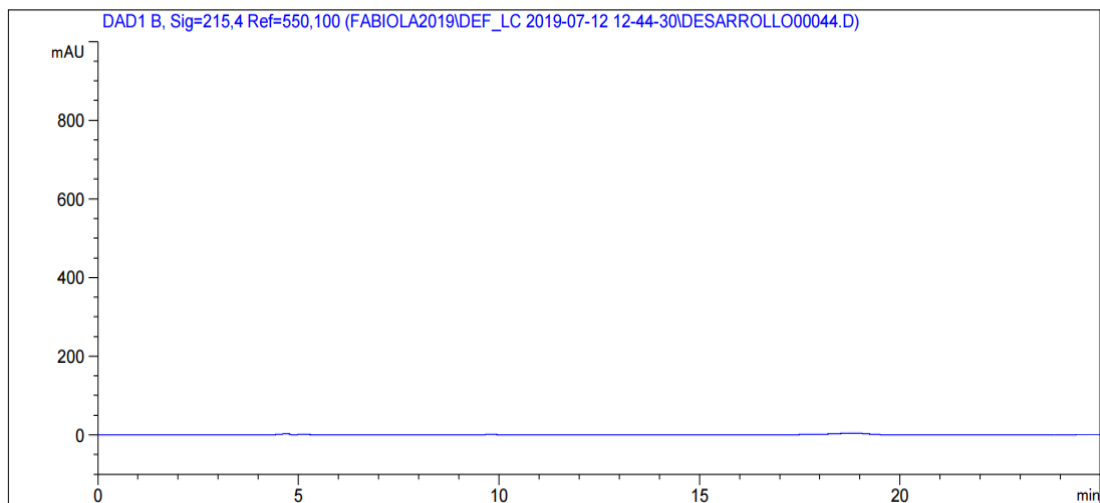
En base a un análisis de la estructura química del Enalapril Maleato se pudo obtener información acerca de las posibles rutas de degradación del principio activo. El Enalapril Maleato es susceptible principalmente a la hidrólisis ácida y alcalina según la bibliografía. A continuación, se presentan los resultados de las pruebas de estrés realizadas para la obtención de productos de degradación en las diferentes rutas con reflujo y sin reflujo con sus respectivos controles de blanco.

##### 4.2.6.1 Hidrólisis Ácida (principio activo)

##### 4.2.6.1.1 Hidrólisis ácida con reflujo (principio activo)

Figura 116. Estándar de Enalapril Maleato sin stress



**Figura 117. Blanco de Hidrólisis ácida con reflujo**

En la figura 117 del blanco para la hidrólisis ácida con reflujo, no se observa picos eluidos en el cromatograma bajo las mismas condiciones de estrés del ensayo. El método desarrollado no se ve afectado en las condiciones de hidrólisis ácida.

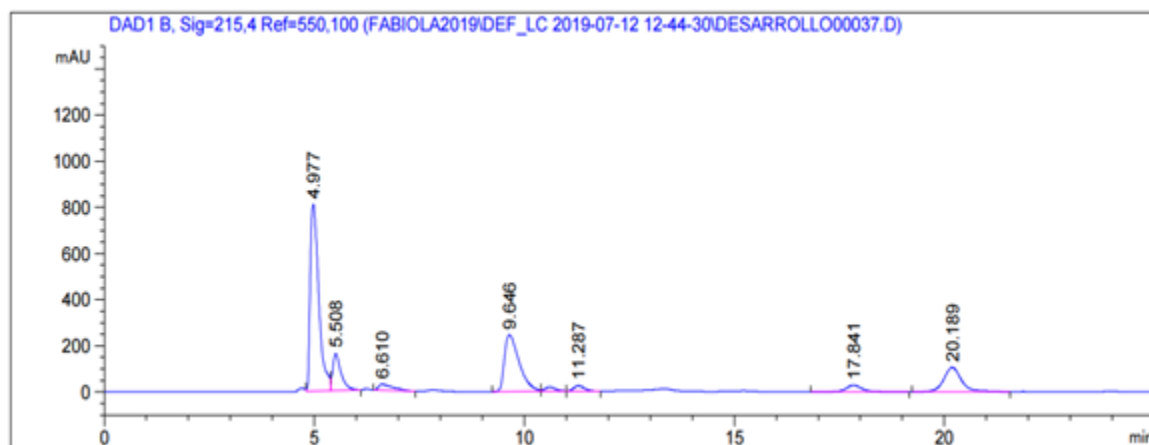
**Figura 118. Hidrólisis ácida con reflujo (principio activo)**

Tabla 33. Resultados de Hidrólisis ácida con reflujo

Replicas	t <sub>retención</sub>	Estándar	t <sub>retención</sub>	Producto de degradación A	t <sub>retención</sub>	Enalaprilat	t <sub>retención</sub>	Enalapril Maleato
1	9.506	14407.7	5.508	2226.76123	6.610	674.96899	9.646	5976.04102
2	9.506	14398.0	5.513	2219.07300	6.615	672.12170	9.650	5976.96143
3	9.506	14423.7	5.510	2231.17847	6.612	691.63159	9.645	5985.18848
<b>PROMEDIO</b>	9.506	14409.800	5.510	2225.671	6.612	679.574	9.647	5979.397
<b>DS</b>	0.000	12.978	0.003	6.126	0.003	10.539	0.003	5.037
<b>CV</b>	0.000	0.090	0.046	0.275	0.038	1.551	0.027	0.084
<b>% RENDIMIENTO</b>				15.446		4.716		41.495
<b>% DEGRADACIÓN</b>								58.505

Replicas	t <sub>retención</sub>	Producto de degradación B	t <sub>retención</sub>	Producto de degradación C	t <sub>retención</sub>	Dicetopiperazina
1	11.287	414.97971	17.841	730.50702	20.189	3045.35156
2	11.296	414.46973	17.848	729.11548	20.199	3046.71582
3	11.287	416.07278	17.835	731.93402	20.187	3048.84692
<b>PROMEDIO</b>	11.290	415.174	17.841	730.519	20.192	3046.971
<b>DS</b>	0.005	0.819	0.007	1.409	0.006	1.762
<b>CV</b>	0.046	0.197	0.036	0.193	0.032	0.058
<b>% RENDIMIENTO</b>		2.881		5.070		21.145

En la tabla 33 de resultados de la ruta de degradación por hidrólisis ácida con reflujo se observa, una degradación del 58.5 % de Enalapril Maleato a 4.7 % de Enalaprilat por el mecanismo de desesterificación y un 21.1 % a Enalapril Dicetopiperazina por un mecanismo de descomposición hidrolítica y ciclización térmica. Además, que se observa la aparición de otros productos de degradación A, B, C con un 15 %, 2.9 % y 5 % respectivamente. El método desarrollado permite una buena separación de picos tanto del principio activo (Enalapril Maleato) con relación de sus principales productos de degradación (Enalaprilat y Enalapril Dicetopiperazina).

#### 4.2.6.1.2 Hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo)

Figura 119. Estándar de Enalapril Maleato sin stress

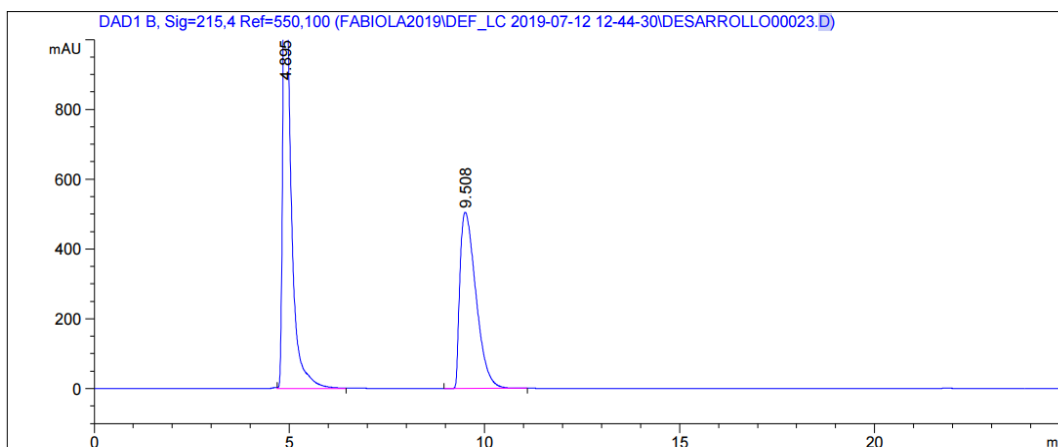
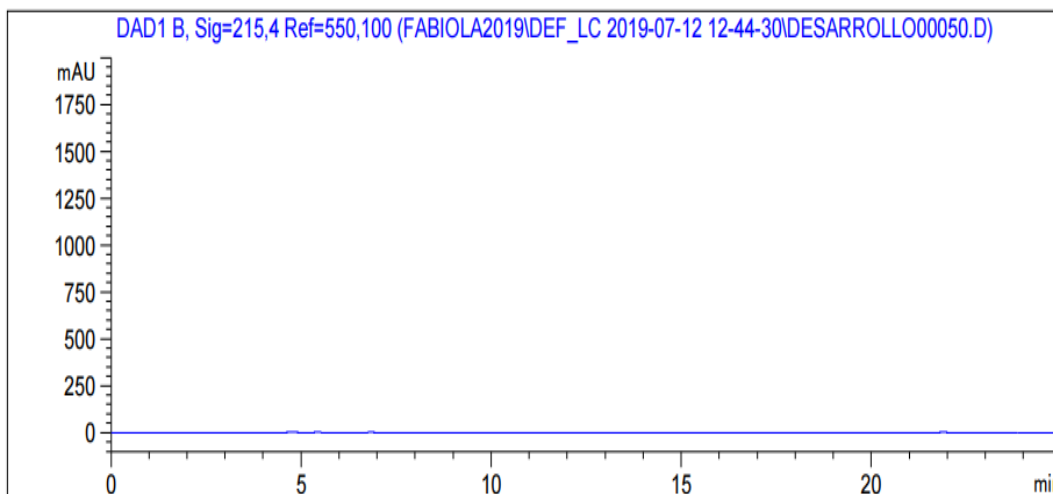


Figura 120. Blanco de Hidrolisis ácida sin reflujo



En la figura 120 del blanco para la hidrólisis ácida sin reflujo, no se observa picos eluidos en el cromatograma bajo las mismas condiciones de estrés del ensayo. El método desarrollado no se ve afectado en las condiciones de hidrolisis ácida.



Figura 121. Cromatograma de Hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo)

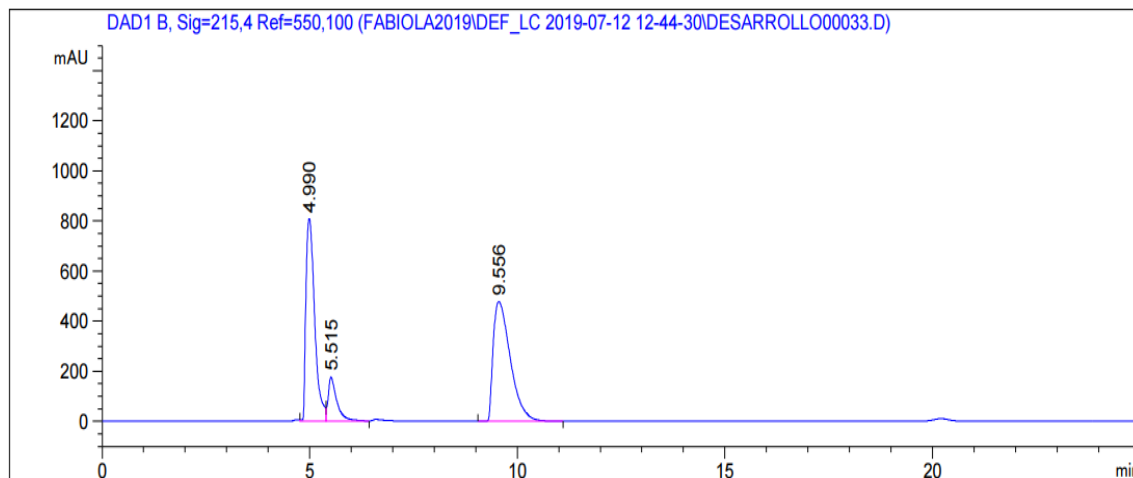


Tabla 34. Resultados de Hidrólisis ácida sin reflujo

Replicas	t <sub>retención</sub>	Estándar	t <sub>retención</sub>	Producto de degradación A	t <sub>retención</sub>	Enalapril Maleato
1	9.506	14407.7	5.510	2533.93066	9.952	13686.100
2	9.506	14398.0	5.515	2553.71216	9.556	13693.400
3	9.506	14423.7	5.510	2557.61230	9.553	13694.500
<b>PROMEDIO</b>	9.506	14409.800	5.512	2548.418	9.687	13691.333
<b>DS</b>	0.000	12.978	0.003	12.697	0.230	4.565
<b>CV</b>	0.000	0.090	0.052	0.498	2.369	0.033
<b>% RENDIMIENTO</b>				17.685		95.014
<b>% DEGRADACIÓN</b>						4.986

En la tabla 34 de resultados para la ruta de degradación de hidrólisis ácida sin reflujo se observa, una degradación aproximada del 5 % de Enalapril Maleato a producto de degradación A en un porcentaje de 17.7 % el mismo no está descrito como producto de degradación principal en la bibliografía. El método desarrollado permite una buena separación de picos tanto del principio activo (Enalapril Maleato) como de sus principales productos de degradación (Enalaprilat y Enalapril Dicotopiperazina) para esta ruta.

#### 4.2.6.2 Hidrólisis Alcalina (principio activo)

##### 4.2.6.2.1 Hidrólisis Alcalina sin reflujo (principio activo)

Figura 122. Estándar de Enalapril Maleato sin stress

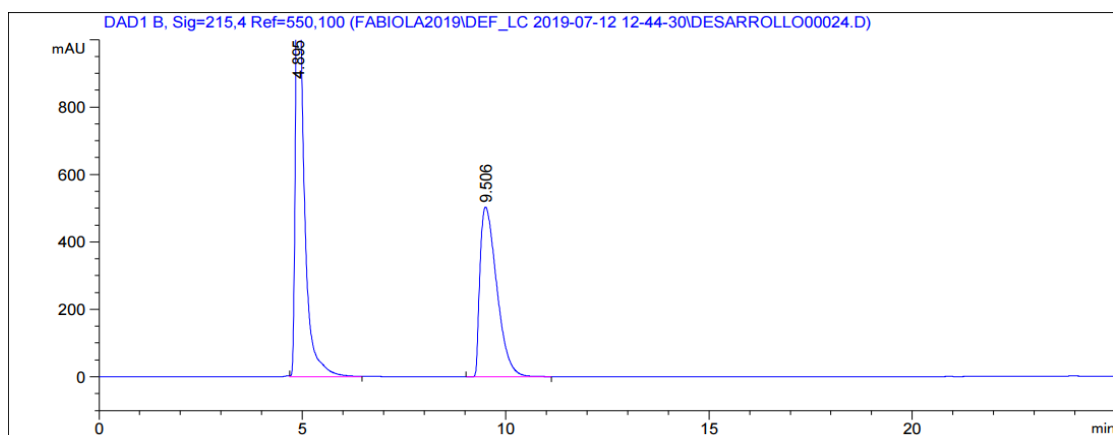
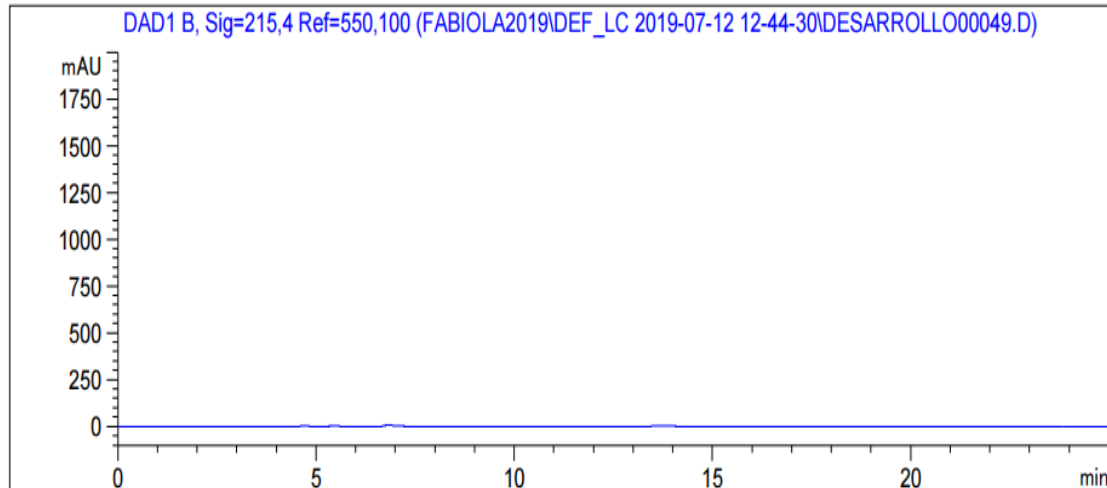


Figura 123. Blanco de hidrólisis alcalina sin reflujo



En la figura 123 del blanco para la hidrólisis alcalina sin reflujo, no se observa picos eluidos en el cromatograma bajo las mismas condiciones de estrés del ensayo. El método desarrollado no se ve afectado en las condiciones de hidrólisis alcalina

Figura 124. Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo)

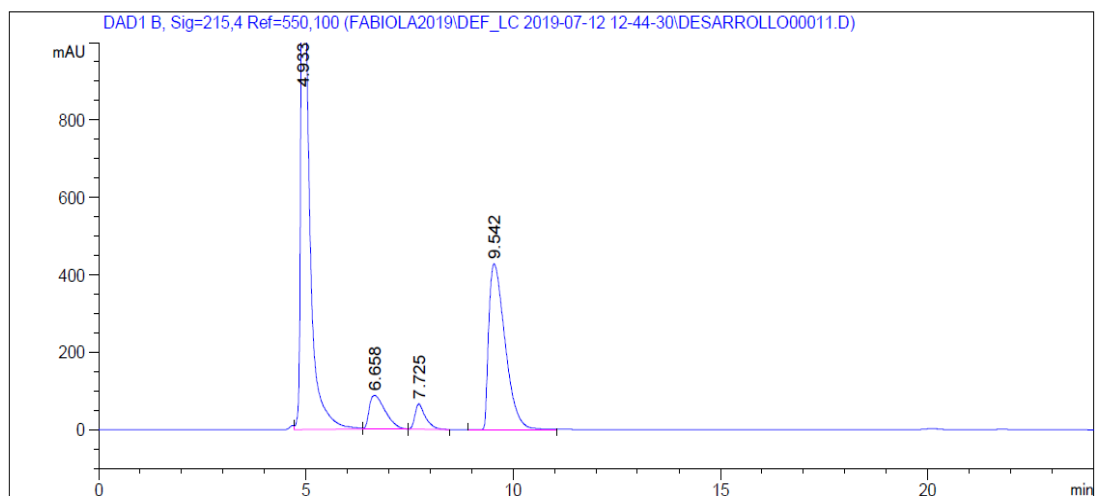
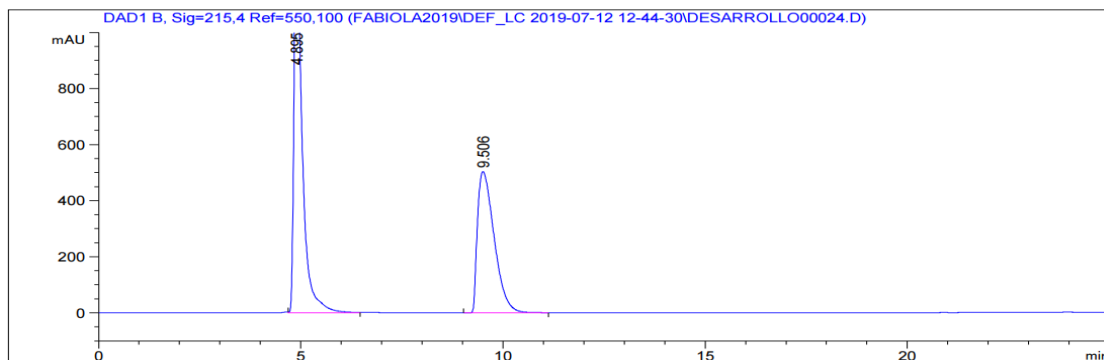
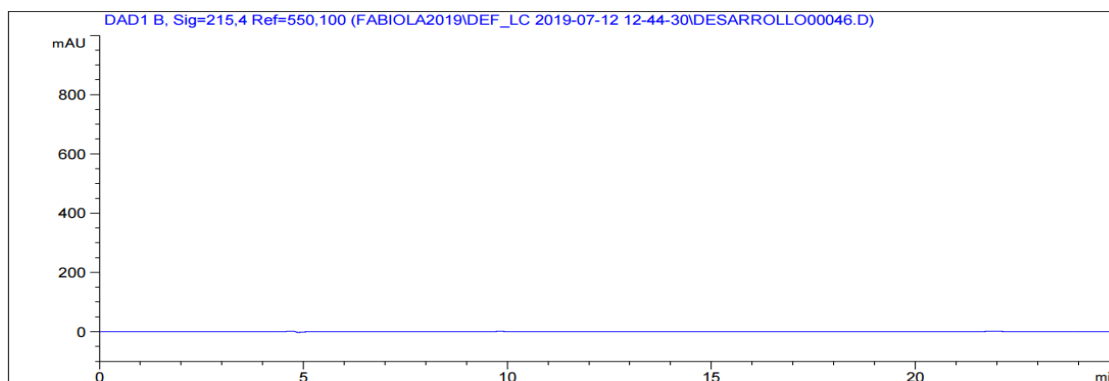


Tabla 35. Resultados de Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo)

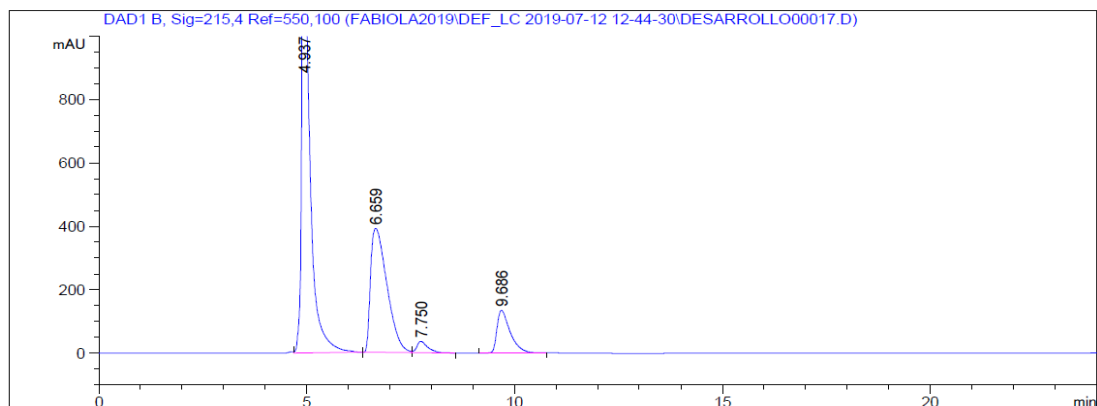
Replicas	t <sub>retención</sub>	Estándar	t <sub>retención</sub>	Enalaprilat	t <sub>retención</sub>	Enalapril Maleato
1	9.506	14407.7	6.660	2319.3	9.554	11680.800
2	9.508	14398.0	6.654	2318.9	9.534	11679.800
3	9.503	14423.7	6.652	2318.5	9.542	11674.800
PROMEDIO	9.506	14409.800	6.655	2318.908	9.543	11678.467
DS	0.003	12.978	0.004	0.376	0.010	3.215
CV	0.026	0.090	0.063	0.016	0.105	0.028
% RENDIMIENTO				16.093		81.045
% DEGRADACIÓN						18.955

En la Tabla 35 de resultados para la ruta de degradación de hidrólisis alcalina sin reflujo se observa, una degradación aproximada del 19 % de Enalapril Maleato a un 16 % de Enalaprilat como principal producto de degradación de esta ruta, por la inestabilidad de la molécula en medios alcalinos mediante una reacción de desesterificación. El método desarrollado permite una buena separación de picos tanto del principio activo (Enalapril Maleato) con relación a su principal producto de degradación (Enalaprilat) para esta ruta.

#### 4.2.6.2.2 Hidrólisis Alcalina con reflujo

**Figura 125. Estándar de Enalapril Maleato sin stress****Figura 126. Blanco de hidrolisis alcalina con reflujo**

En la figura 126 del blanco para la hidrólisis alcalino con reflujo, no se observa picos eluidos en el cromatograma bajo las mismas condiciones de estrés del ensayo. El método desarrollado no se ve afectado en las condiciones de hidrólisis alcalina.

**Figura 127. Hidrólisis alcalina con reflujo (principio activo)**

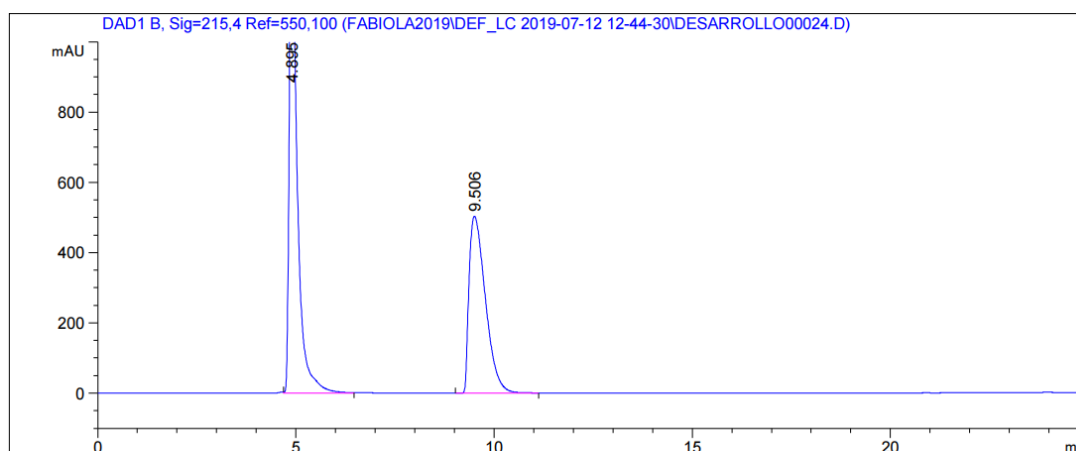
**Tabla 36. Resultados de Hidrólisis alcalina con reflujo (principio activo)**

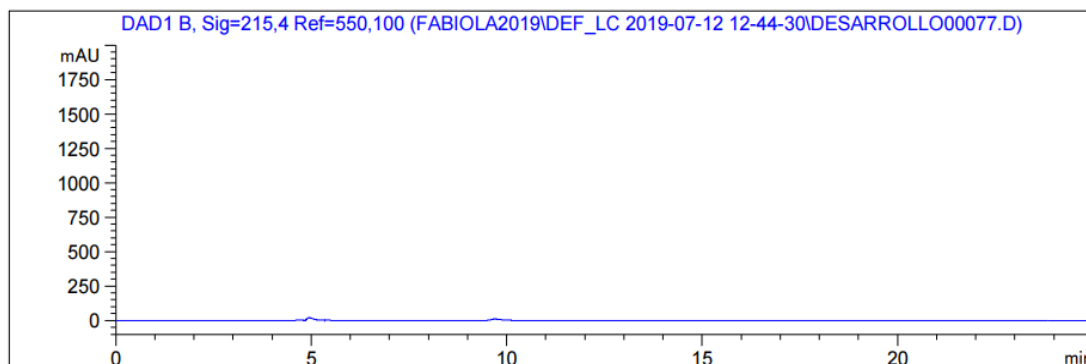
Replicas	$t_{\text{retención}}$	Estándar	$t_{\text{retención}}$	Enalaprilat	$t_{\text{retención}}$	Enalapril Maleato
1	9.506	14407.7	6.659	10725.500	9.686	2941.290
2	9.508	14398.0	6.636	10694.600	9.682	2938.226
3	9.503	14423.7	6.661	10718.200	9.694	2954.671
PROMEDIO	9.506	14409.800	6.652	10712.767	9.687	2944.729
DS	0.003	12.978	0.014	16.151	0.006	8.745
CV	0.026	0.090	0.209	0.151	0.063	0.297
% RENDIMIENTO				74.344		20.436
% DEGRADACIÓN						79.564

En la tabla 36 de resultados de hidrólisis alcalina con reflujo se observa, una degradación aproximada del 80 % de Enalapril Maleato a un 74 % de Enalaprilat producto principal producto de degradación para esta ruta mediante el mecanismo de desesterificación hidrolítica. El método desarrollado permite una buena separación de picos tanto del principio activo (Enalapril Maleato) como de su principal producto de degradación (Enalaprilat) para esta ruta

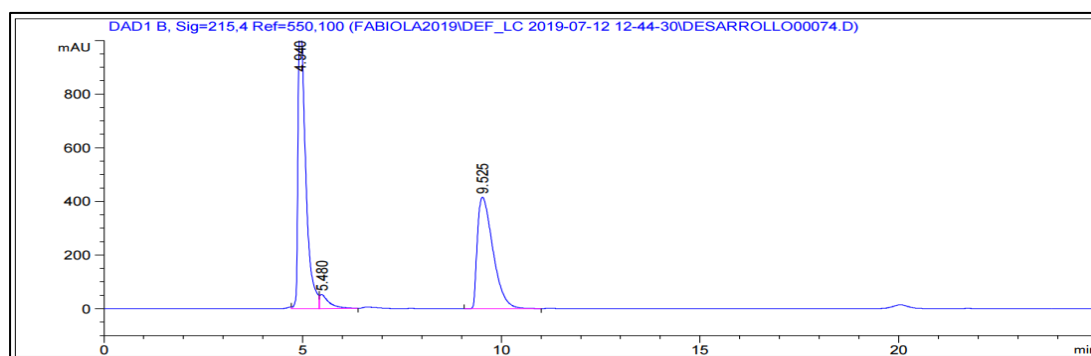
#### 4.2.6.3 Hidrólisis Neutra

##### 4.2.6.3.1 Hidrólisis neutra sin reflujo

**Figura 128. Estándar de Enalapril Maleato sin stress**


**Figura 129. Blanco Hidrólisis neutra sin reflujo**

En la figura 129 del blanco para la hidrólisis neutra sin reflujo, no se observa picos eluidos en el cromatograma bajo las mismas condiciones de estrés del ensayo, el método desarrollado no se ve afectado en las condiciones de hidrolisis neutra.

**Figura 130. Hidrólisis neutra sin reflujo (principio activo)****Tabla 37. Resultados de Hidrólisis neutra sin reflujo**

Replicas	t <sub>retención</sub>	Estándar	t <sub>retención</sub>	Producto de degradación A	t <sub>retención</sub>	Enalapril Maleato
1	9.506	14407.7	5.480	845.501	9.525	11321.800
2	9.508	14398.0	4.477	841.066	9.519	11322.200
3	9.503	14423.7	5.474	1005.705	9.501	13509.100
<b>PROMEDIO</b>	9.506	14409.800	5.144	897.424	9.515	12051.033
<b>DS</b>	0.003	12.978	0.577	93.800	0.012	1262.723
<b>CV</b>	0.026	0.090	11.225	10.452	0.131	10.478
<b>% RENDIMIENTO</b>				6.228		83.631
<b>% DEGRADACIÓN</b>						16.369

En la tabla 37 de resultados para la ruta de degradación de hidrólisis neutra se observa, una degradación aproximada del 16 % de Enalapril Maleato a un 6 % de Producto de degradación A como principal producto de degradación secundario de esta ruta, el mismo no es mencionado en la bibliografía.

#### 4.2.6.3.2 Hidrólisis neutra con reflujo

Figura 131. Estándar de Enalapril Maleato sin stress

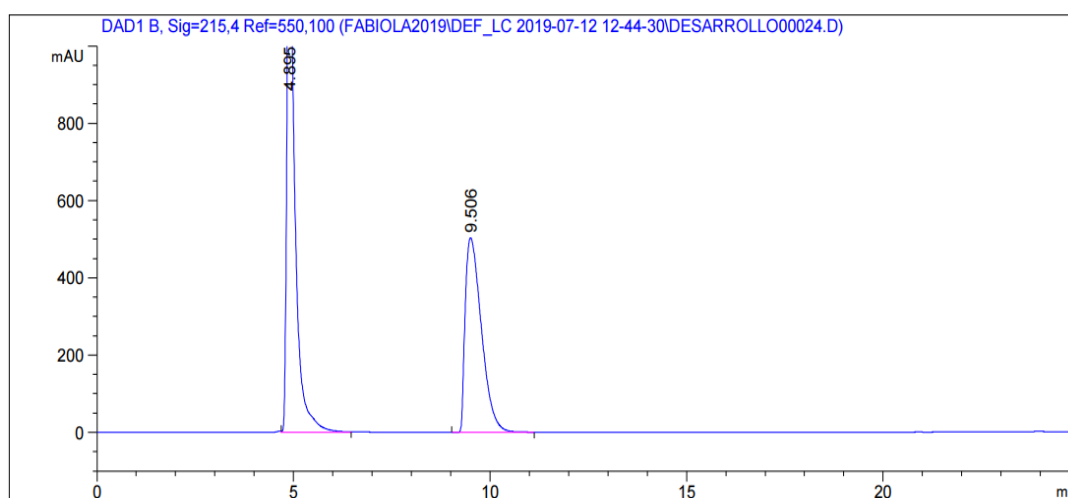
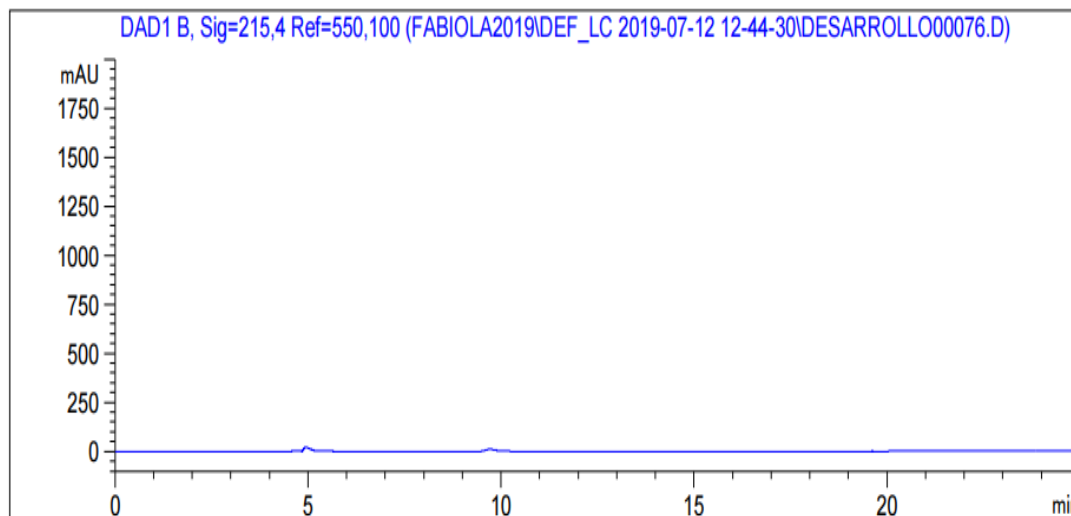
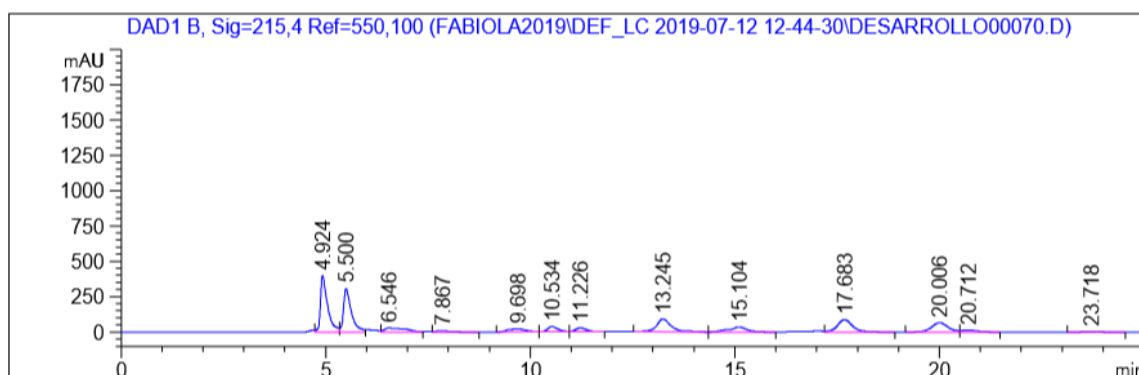


Figura 132. Blanco de Hidrólisis neutra con reflujo



En la figura 132 del blanco para la hidrólisis neutra con reflujo, no se observa picos eluidos en el cromatograma bajo las mismas condiciones de estrés del ensayo, el método desarrollado no se ve afectado en las condiciones de hidrolisis neutra.

**Figura 133. Hidrólisis neutra con reflujo (principio activo)**



**Tabla 38. Hidrólisis neutro con reflujo (principio activo)**

Replicas	$t_{\text{retención}}$	Estándar	$t_{\text{retención}}$	Producto de degradación A	$t_{\text{retención}}$	Enalaprilat
1	9.506	14407.7	5.500	4122.93945	6.546	1007.24164
2	9.508	14398.0	5.500	4126.19434	6.535	423.67630
3	9.503	14423.7				
<b>PROMEDIO</b>	9.506	14409.800	5.500	4124.567	6.541	715.459
<b>DS</b>	0.003	12.978	0.000	2.302	0.008	412.643
<b>CV</b>	0.026	0.090	0.000	0.056	0.119	57.675
<b>% RENDIMIENTO</b>				28.623		4.965

Replicas	$t_{\text{retención}}$	Producto de degradación B	$t_{\text{retención}}$	Enalapril Maleato	$t_{\text{retención}}$	Producto de degradación C
1	7.867	168.32983	9.698	630.79486	10.534	667.91687
2	7.874	162.66409	9.705	641.19977	10.541	665.48773
<b>PROMEDIO</b>	7.871	165.497	9.702	635.997	10.538	666.702
<b>DS</b>	0.005	4.006	0.005	7.357	0.005	1.718
<b>CV</b>	0.063	2.421	0.051	1.157	0.047	0.258
<b>% RENDIMIENTO</b>		1.149		4.414		4.627
<b>% DEGRADACIÓN</b>				95.586		



Replicas	$t_{\text{retención}}$	Producto de degradación D	$t_{\text{retención}}$	Producto de degradación E	$t_{\text{retención}}$	Producto de degradación F
1	11.226	516.92712	13.245	2228.37207	15.104	1025.10059
2	11.236	515.33362	13.253	2287.92090	15.112	1028.42688
<b>PROMEDIO</b>	11.231	516.130	13.249	2258.146	15.108	1026.764
<b>DS</b>	0.007	1.127	0.006	42.107	0.006	2.352
<b>CV</b>	0.063	0.218	0.043	1.865	0.037	0.229
<b>% RENDIMIENTO</b>		3.582		15.671		7.125

Replicas	$t_{\text{retención}}$	Producto de degradación G	$t_{\text{retención}}$	Dicetopiperazina
1	17.683	2220.15620	20.006	1814.58032
2	17.695	2219.02417	20.015	1810.75256
<b>PROMEDIO</b>	17.689	2219.590	20.011	1812.666
<b>DS</b>	0.008	0.800	0.006	2.707
<b>CV</b>	0.048	0.036	0.032	0.149
<b>% RENDIMIENTO</b>		15.403		12.579

Replicas	$t_{\text{retención}}$	Producto de degradación H	$t_{\text{retención}}$	Producto de degradación I
1	20.712	306.94107	23.718	86.88609
2	20.722	303.81631	23.739	83.41843
<b>PROMEDIO</b>	20.717	305.379	23.729	85.152
<b>DS</b>	0.007	2.210	0.015	2.452
<b>CV</b>	0.034	0.724	0.063	2.880
<b>% RENDIMIENTO</b>		2.119		0.591

En la tabla 38 de resultados de la ruta de degradación de hidrólisis neutra con reflujo se observa, una degradación aproximada del 96 % de Enalapril Maleato a un 5 % de Enalaprilat producto de degradación y un 12.6 % de Enalapril Dicetopiperazina como principal producto de degradación por el mecanismo de reacción química de desesterificación y ciclización térmica respectivamente.

#### 4.2.6.4 Oxidación (principio activo)

##### 4.2.6.4.1 Oxidación sin reflujo (principio activo)

Figura 134. Estándar de Enalapril Maleato sin stress

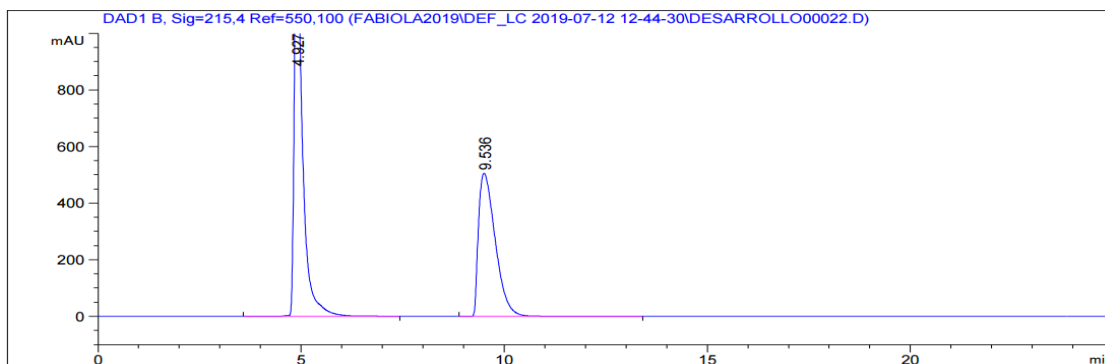


Figura 135. Blanco de Oxidación sin reflujo

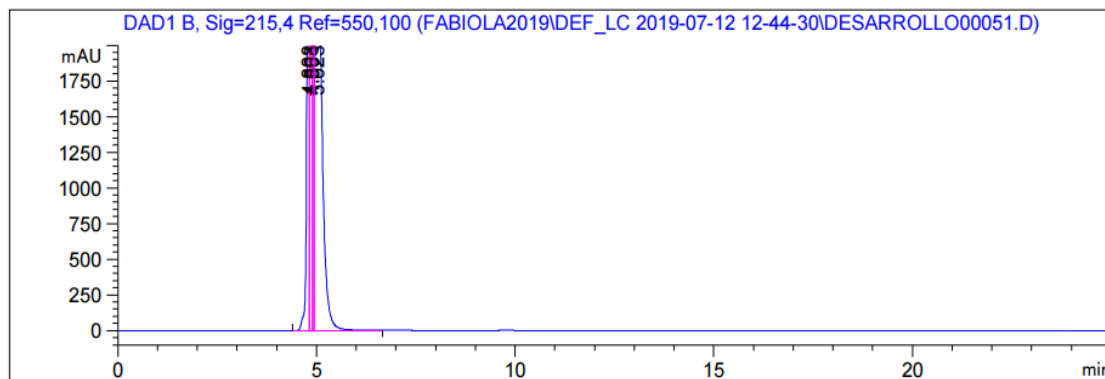


Figura 136. Oxidación sin reflujo

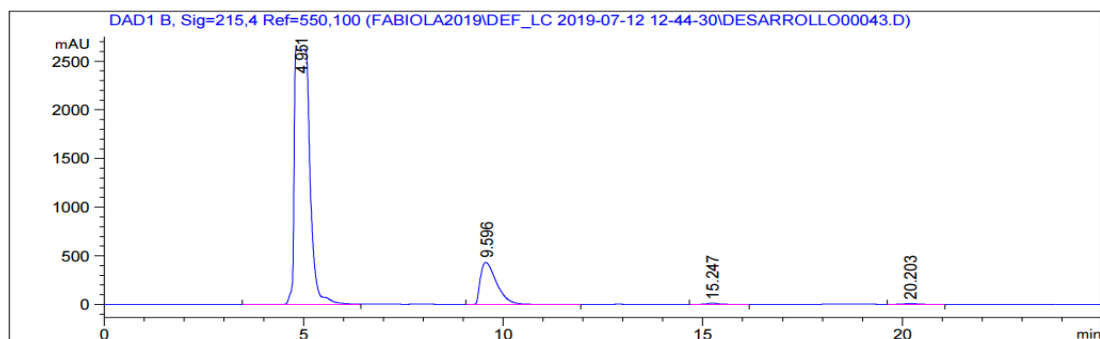




Tabla 39. Oxidación sin reflujo (principio activo)

Replicas	$t_{\text{retención}}$	Estándar	$t_{\text{retención}}$	Enalapril Maleato	$t_{\text{retención}}$	Producto de degradación D	$t_{\text{retención}}$	Dicetopiperazina
1	9.538	14449.4	9.591	12165.3	15.232	280.05206	20.194	219.49980
2	9.540	14442.9	9.592	12104.3	15.239	283.10675	20.191	232.08818
3	9.536	14474.0	9.596	12112.1	15.247	283.06296	20.203	230.47285
<b>PROMEDIO</b>	9.538	14455.433	9.593	12127.233	15.239	282.074	20.196	227.354
<b>DS</b>	0.002	16.404	0.003	33.197	0.008	1.751	0.006	6.849
<b>CV</b>	0.021	0.113	0.028	0.274	0.049	0.621	0.031	3.013
<b>% RENDIMIENTO</b>				83.894		1.951		1.573
<b>% DEGRADACIÓN</b>				16.106				

En la tabla 39 de resultados para la ruta de degradación de oxidación sin reflujo se observa una degradación aproximada del 16 % de Enalapril Maleato a un 1.6 % de Enalapril Dicetopiperazina como principal producto de degradación por el mecanismo de reacción química de ciclización térmica en sinergia con el peróxido de hidrógeno. El método desarrollado permite una buena separación de picos tanto del principio activo (Enalapril Maleato) como de su principal producto de degradación (Enalapril Dicetopiperazina) para esta ruta.

#### 4.2.6.4.2 Oxidación con reflujo (principio activo)

Figura 137. Estándar de Enalapril Maleato sin stress

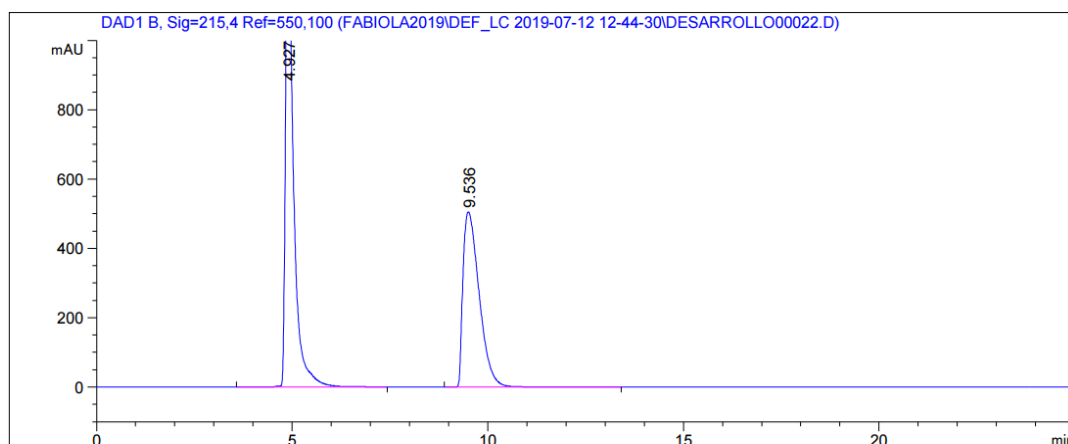


Figura 138. Blanco de Oxidación con reflujo

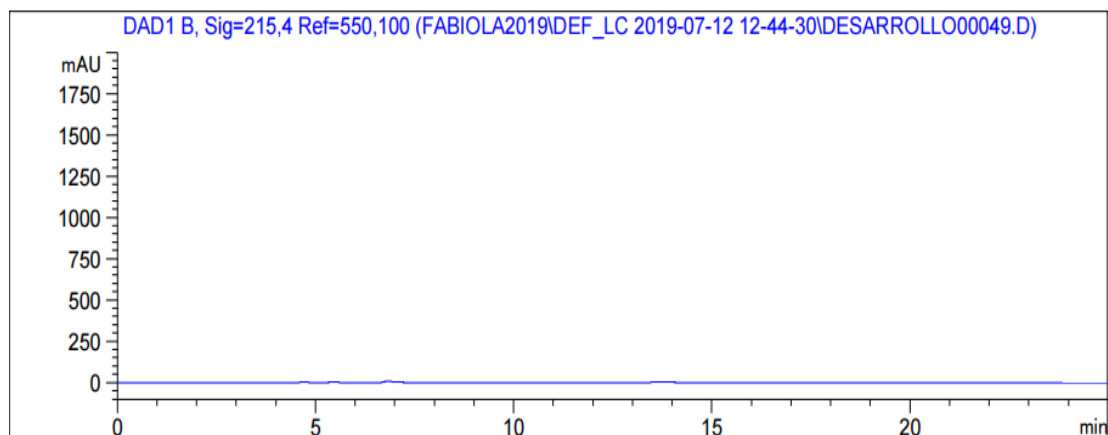


Figura 139. Oxidación con reflujo (principio activo)

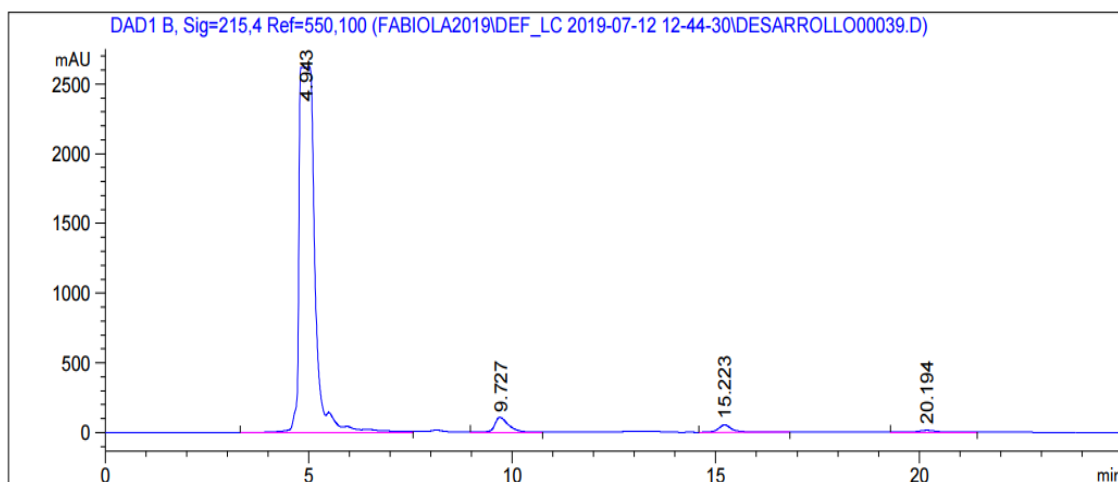


Tabla 40. Oxidación con reflujo (principio activo)

Replicas	t <sub>retención</sub>	Estándar	t <sub>retención</sub>	Enalapril Maleato	t <sub>retención</sub>	Producto de degradación D	t <sub>retención</sub>	Dicetopiperazina
1	9.538	14449.4	9.722	2619.9585	15.220	1242.4	20.138	571.33923
2	9.540	14442.9	9.727	2623.7	15.223	1255.9	20.194	599.27124
3	9.536	14474.0	9.720	2622.8	15.226	1262.9	20.196	392.91428
<b>PROMEDIO</b>	9.538	14455.433	9.723	2622.156	15.223	1253.748	20.176	521.175
<b>DS</b>	0.002	16.404	0.004	1.963	0.003	10.393	0.033	111.952
<b>CV</b>	0.021	0.113	0.037	0.075	0.020	0.829	0.163	21.481
<b>%RENDIMIENTO</b>				18.140		8.673		3.605
<b>%DEGRADACIÓN</b>				81.860				

En la tabla 40 de resultados para la ruta de degradación de oxidación con reflujo se observa una degradación aproximada del 82 % de Enalapril Maleato a un 3.6 % de Enalapril Dicotopiperazina como principal producto de degradación por el mecanismo de reacción química de ciclización térmica. El método desarrollado permite una buena separación de picos tanto del principio activo (Enalapril Maleato) como de su principal producto de degradación (Enalapril Dicotopiperazina) para esta ruta.

#### 4.2.6.5 Termólisis (principio activo)

##### 4.2.6.5.1 Termólisis por 24 horas

Figura 140. Estándar de Enalapril Maleato sin stress

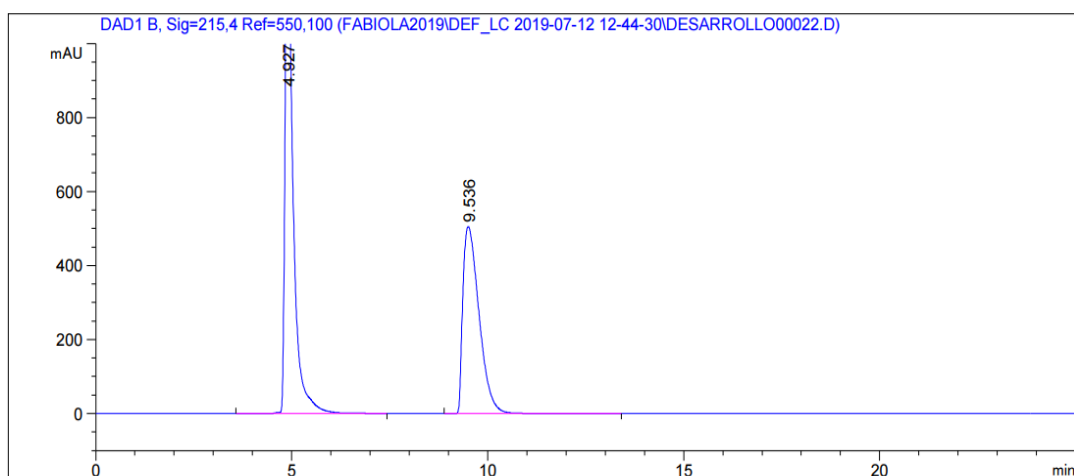


Figura 141. Termólisis a la temperatura de 60 °C por 24 horas

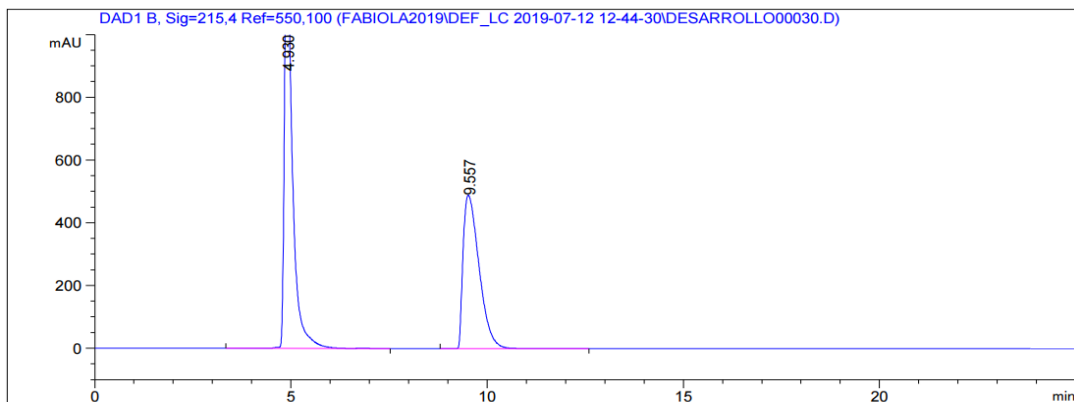
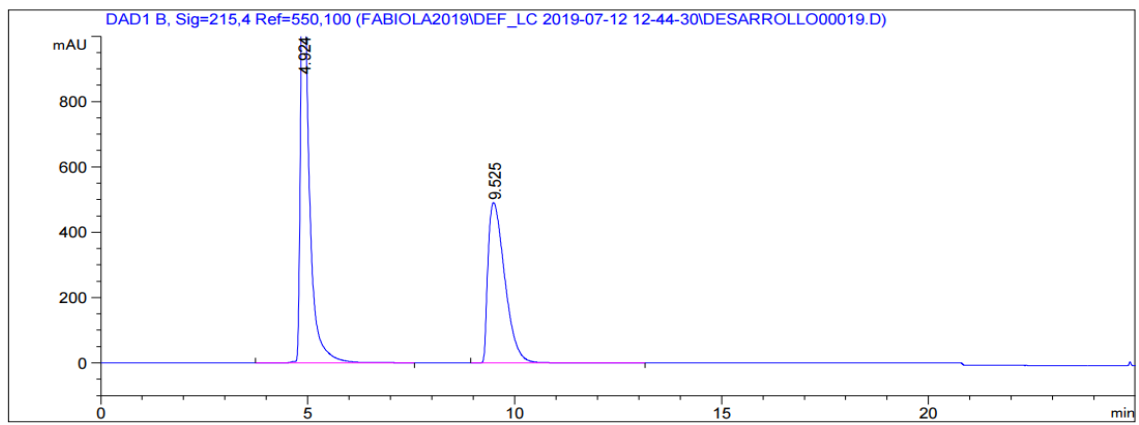


Figura 142. Termólisis a la temperatura de 80 °C por 24 horas



#### 4.2.6.5.2 Termólisis por 48 horas

Figura 143. Estándar de Enalapril Maleato sin stress

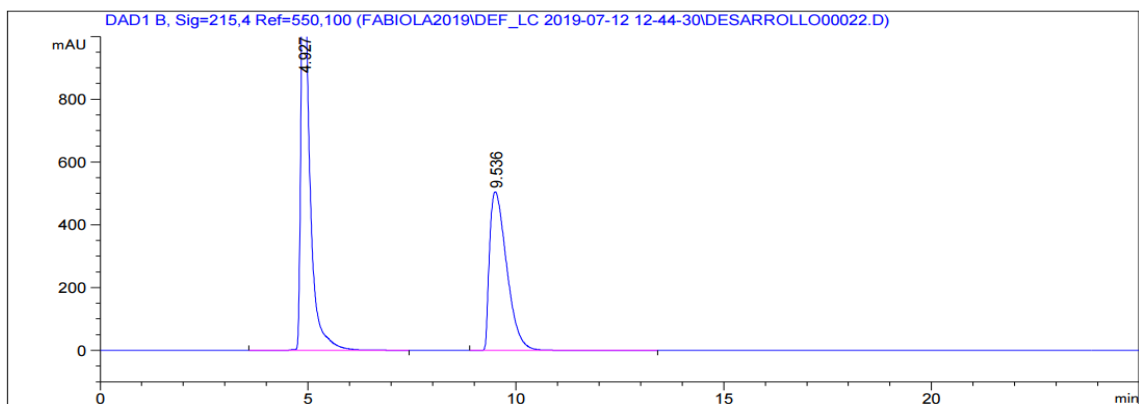


Figura 144. Termólisis a la temperatura de 60 °C por 48 horas

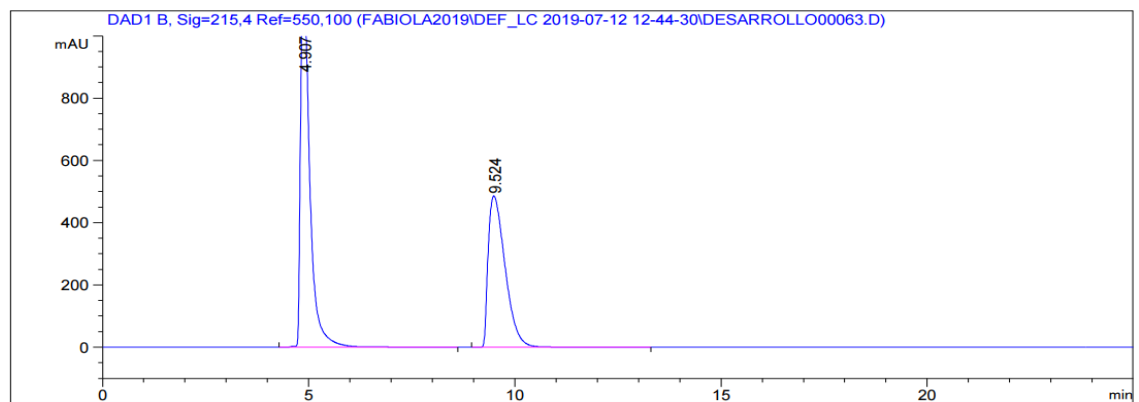
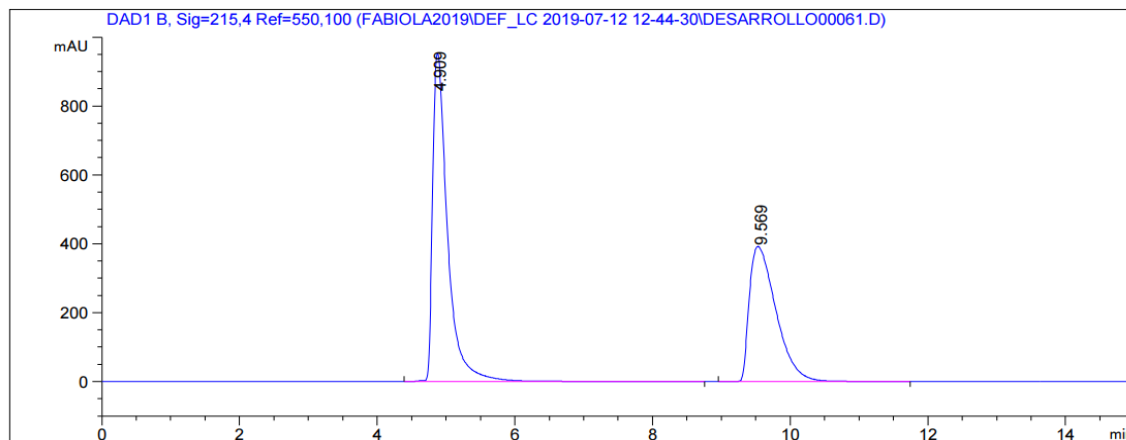


Figura 145. Termólisis a la temperatura de 80 °C por 48 horas



#### 4.2.6.5.3 Resultados de la degradación del principio activo 60 °C

Tabla 41. Resultados de la termólisis a 60 °C

Tiempo	Concentración %	Ln (Concentración %)
0	100.000	4.6052
24	95.8897	4.5632
48	95.6385	4.5606

Tabla 42. Cinética de reacción a 60 °C

Determinación de la reacción de descomposición	ORDEN UNO	
A	99.385	
B	-0.0009	0.0009 Horas <sup>-1</sup>
R	-0.8910	

#### 4.2.6.5.4 Resultados de la degradación del principio activo a 80 °C

Tabla 43. Resultados de la termólisis a 80 °C

Tiempo	Concentración	Ln (Concentración %)
0	100.000	4.6052
24	95.71902606	4.5614
48	95.13424018	4.5553

Tabla 44. Cinética de reacción a 80 °C

Determinación de la reacción de descomposición		ORDEN UNO
A	99.375	
B	-0.001	0.001 Horas <sup>-1</sup>
R	-0.9169	

En base a los resultados obtenidos en Tabla 43 y 44, se observa que el Enalapril Maleato sigue una cinética de degradación de primer orden cuando es sometido a situaciones de termólisis. La velocidad de degradación de acuerdo a los resultados obtenidos muestra una proporcionalidad con relación al tiempo de exposición a la temperatura de estrés.

#### 4.2.6.6 Fotolisis

Figura 146. Estándar de Enalapril Maleato sin stress

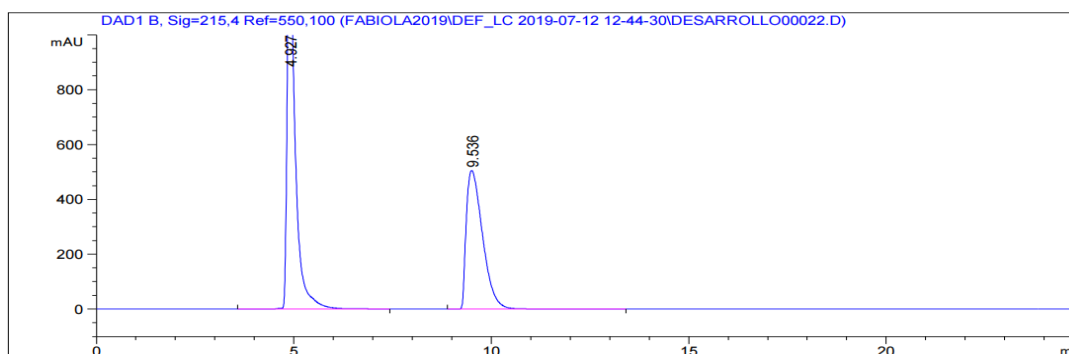


Figura 147. Resultados de degradación por Fotolisis

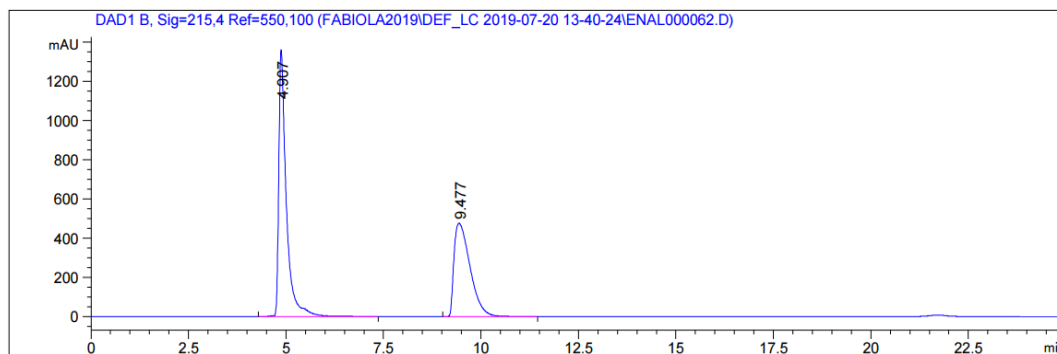




Tabla 45. Resultados de Fotólisis (principio activo)

Replicas	$t_{\text{retención}}$	Estándar	$t_{\text{retención}}$	Enalapril Maleato
1	9.382	14024.5	9.477	13573.300
2	9.379	14019.9	9.492	13627.200
3	9.388	14034.1	9.481	13610.900
<b>PROMEDIO</b>	9.383	14026.167	9.483	13603.800
<b>DS</b>	0.005	7.245	0.008	27.643
<b>CV</b>	0.049	0.052	0.082	0.203
<b>% RENDIMIENTO</b>				96.989
<b>% DEGRADACIÓN</b>				3.011

En los resultados de la tabla 45 para la ruta de degradación por Fotólisis se observa una degradación aproximada del 3 % de Enalapril Maleato lo que indica que es estable a la degradación por efecto de la luz.

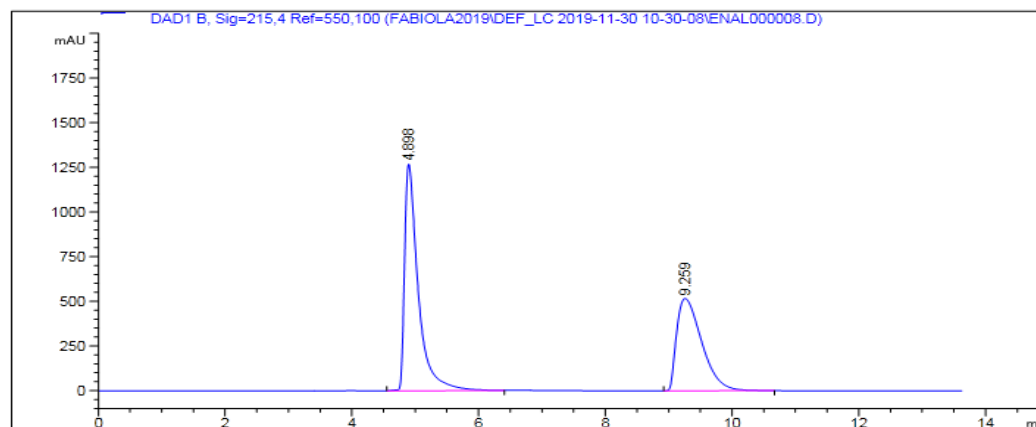
#### 4.2.7 Estudios de Stress (descomposición forzada) con el principio activo y matriz

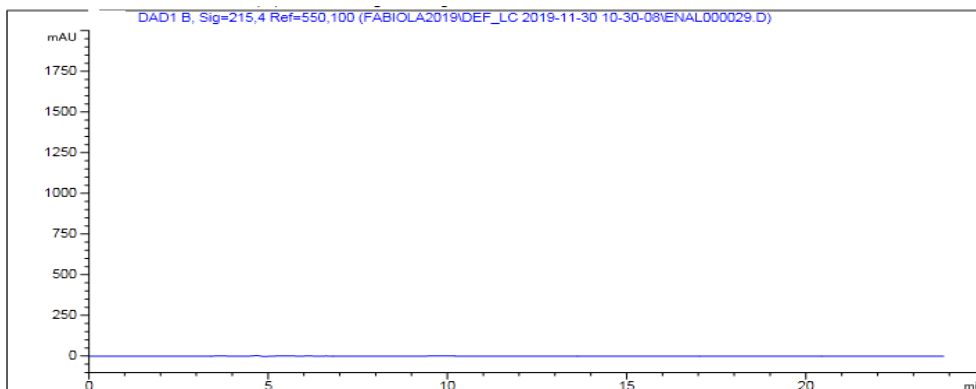
A continuación, se presentan los resultados de las pruebas de estrés realizadas al principio activo con matriz para la obtención de productos de degradación en las rutas de degradación de hidrólisis ácida/ básica con reflujo y sin reflujo.

##### 4.2.7.1 Hidrólisis Ácida (principio activo y matriz)

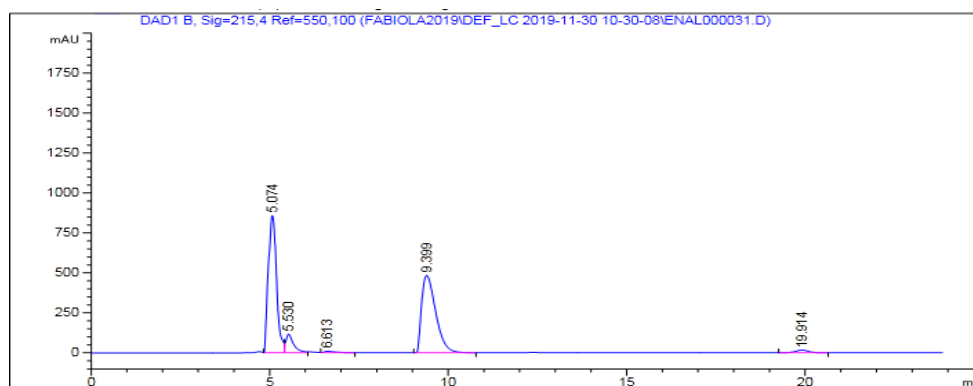
##### 4.2.7.1.1 Hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo y matriz)

Figura 148. Estándar de Enalapril Maleato sin stress



**Figura 149. Blanco de Hidrólisis ácida sin reflujo**

En la figura 149 del blanco para la hidrólisis ácida sin reflujo, no se observa picos eluidos en el cromatograma bajo las mismas condiciones de estrés del ensayo. El método desarrollado no se ve afectado en las condiciones de hidrolisis ácida.

**Figura 150. Hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo + matriz de la tableta)****Tabla 46. Resultados de la hidrólisis ácida sin reflujo (principio activo y matriz)**

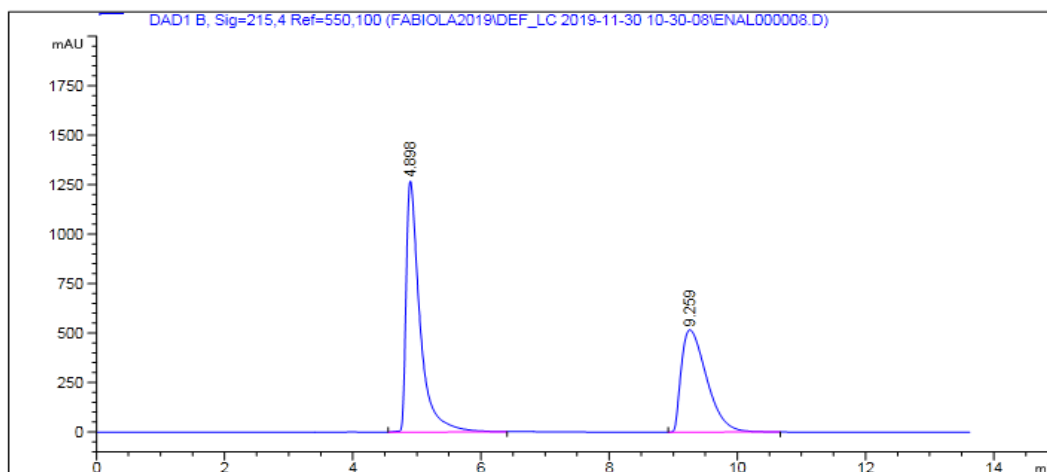
Replica	$t_{\text{retención}}$	Estándar
1	9.240	14189.900
2	9.244	14194.400
3	9.272	14164.200
PROMEDIO	9.252	14182.833
DS	0.017	16.293
CV	0.188	0.115

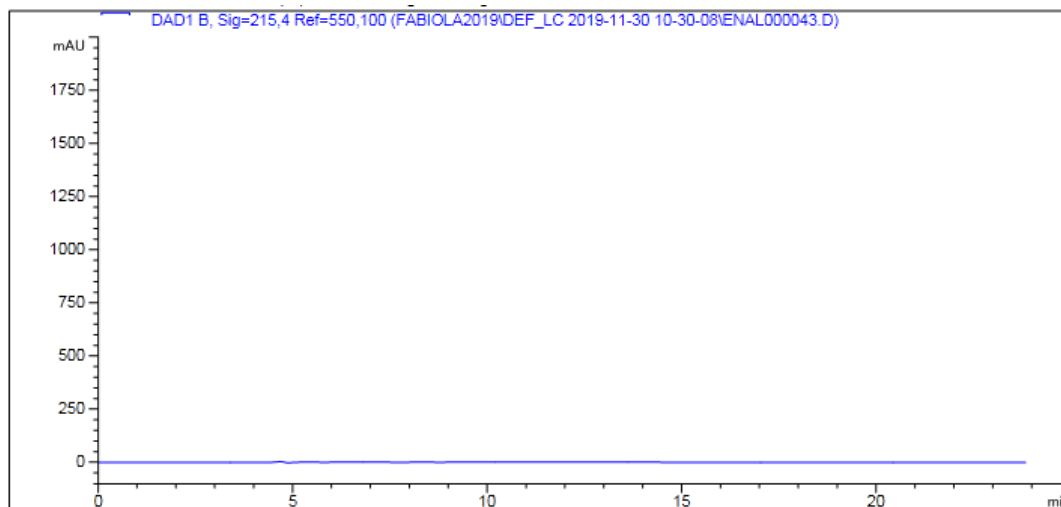
Replicas	t <sub>retención</sub>	A	t <sub>retención</sub>	Enalaprilat	t <sub>retención</sub>	Enalapril Maleato	t <sub>retención</sub>	B
1	5.528	1763.500	6.609	215.700	9.384	13317.300	19.877	443.000
2	5.530	1781.700	6.613	223.800	9.399	13276.400	19.914	441.900
3	5.519	1793.800	6.594	221.600	9.352	13278.400	19.818	445.800
PROMEDIO	5.526	1779.667	6.605	220.367	9.378	13290.700	19.870	443.567
DS	0.006	15.252	0.010	4.188	0.024	23.058	0.048	2.011
CV	0.106	0.857	0.152	1.901	0.256	0.173	0.244	0.453
% RENDIMIENTO		12.548		1.554		93.710		3.127
%DEGRADACIÓN						6.290		

En la tabla 46 de resultados de la ruta de degradación por hidrólisis ácida sin reflujo se observa, una degradación del 6.29 % de Enalapril Maleato a Enalaprilat en un porcentaje de 1.554 % por un mecanismo de reacción de desesterificación por hidrólisis ácida. Además, se observa la aparición de otros productos de degradación A, B con un 12.5 %, 3.13 % respectivamente. El método desarrollado permite una buena separación de picos tanto del principio activo (Enalapril Maleato) con matriz con relación de sus principales productos de degradación (Enalaprilat y Enalapril Dicotopiperazina).

#### 4.2.7.1.2 Hidrólisis ácida con reflujo

Figura 151. Estándar de Enalapril Maleato sin stress



**Figura 152. Blanco de Hidrólisis ácida con reflujo**

En la figura 152 del blanco para la hidrólisis ácida con reflujo, no se observa picos eluidos en el cromatograma bajo las mismas condiciones de estrés del ensayo. El método desarrollado no se ve afectado en las condiciones de hidrolisis ácida.

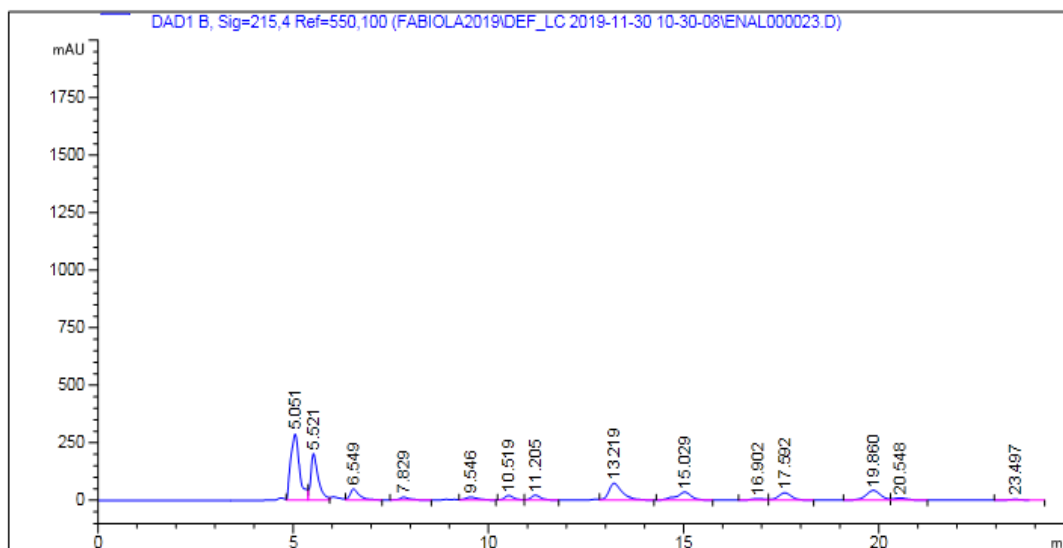
**Figura 153. Cromatograma de Hidrolisis ácida con reflujo (principio activo + matriz)**

Tabla 47. Resultados de Hidrólisis acida con reflujo (principio activo + matriz)

Replica	t <sub>retención</sub>	Estándar
1	9.240	14189.900
2	9.244	14194.400
3	9.272	14164.200
PROMEDIO	9.252	14182.833
DS	0.017	16.293
CV	0.188	0.115

Replica	t <sub>retención</sub>	A	t <sub>retención</sub>	Enalaprilat	t <sub>retención</sub>	B	t <sub>retención</sub>	Enalapril Maleato
1	5.520	2685.5	6.543	778	7.8	216.9	9.5	267.7
2	5.516	2687.2	6.539	777	7.8	215.6	9.5	267.9
3	5.521	2682.4	6.549	781.9	7.8	214.8	9.5	264.5
PROMEDIO	5.519	2685.0	6.544	778.97	7.8	215.8	9.5	266.7
DS	0.003	2.434	0.005	2.589	0.015	1.060	0.02	1.908
CV	0.048	0.091	0.077	0.332	0.189	0.491	0.180	0.715
% RENDIMIENTO		18.932		5.492		1.521		1.880
%DEGRADACIÓN								98.12

Replica	t <sub>retención</sub>	C	t <sub>retención</sub>	D	t <sub>retención</sub>	E	t <sub>retención</sub>	F
1	10.500	295.9	11.181	349.7	13.201	1748.7	15.000	954.3
2	10.483	296.6	11.160	351.1	13.180	1747.8	14.977	958.9
3	10.519	298.7	11.205	352.6	13.219	1756.4	15.029	952.3
PROMEDIO	10.501	297.067	11.182	351.133	13.200	1750.967	15.002	955.167
DS	0.018	1.457	0.023	1.450	0.020	4.727	0.026	3.384
CV	0.172	0.491	0.201	0.413	0.148	0.270	0.174	0.354
% RENDIMIENTO		2.095		2.476		12.346		6.735

Replica	t <sub>retención</sub>	G	t <sub>retención</sub>	H	t <sub>retención</sub>	I	t <sub>retención</sub>	DKP
1	16.866	160.8	17.563	766.3	19.826	1137.5	20.513	238.6
2	16.840	158.2	17.543	763.2	19.813	1140.0	20.502	238.6
3	16.902	161.0	17.592	766.5	19.860	1140.6	20.548	239.9
PROMEDIO	16.869	160.000	17.566	765.333	19.833	1139.367	20.521	239.033
DS	0.031	1.562	0.025	1.850	0.024	1.644	0.024	0.751
CV	0.185	0.976	0.140	0.242	0.122	0.144	0.117	0.314
% RENDIMIENTO		1.128		5.396		8.033		1.685

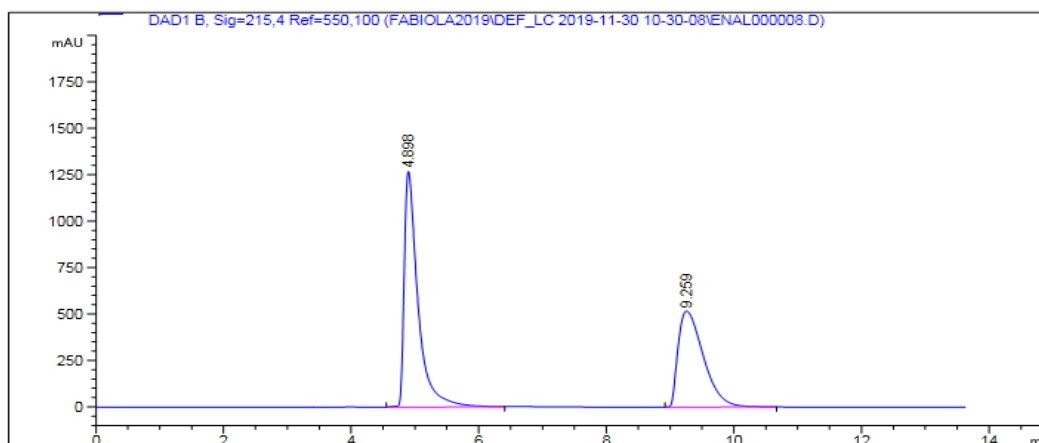
Replica	t <sub>retención</sub>	J
1	23.467	91.5
2	23.493	88.6
3	23.497	90.1
PROMEDIO	23.486	90.067
DS	0.016	1.450
CV	0.069	1.610
% RENDIMIENTO		0.635

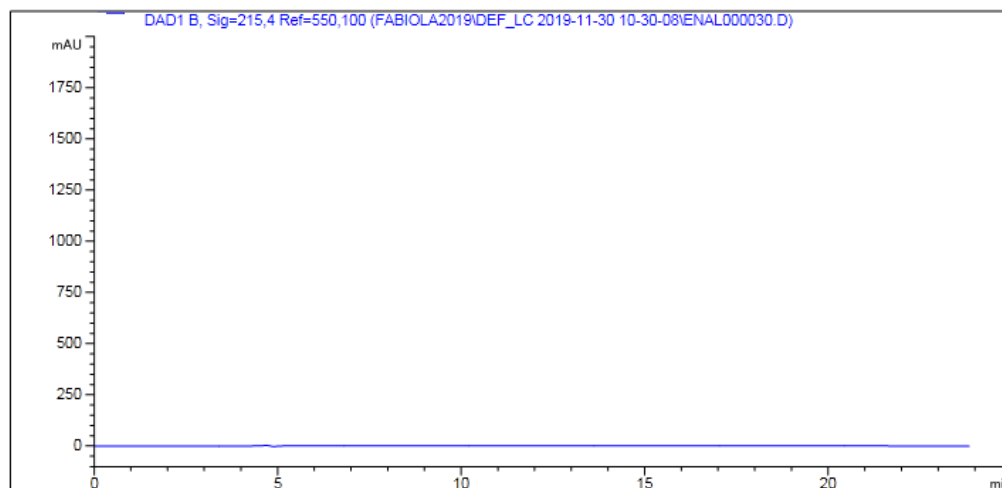
En la tabla 47 de resultados para la ruta de degradación de hidrólisis ácida con reflujo se observa, una degradación aproximada del 98 % de Enalapril Maleato a Enalaprilat en un porcentaje de 5.5 % y 1.7 % de Enalapril Dicotopiperazina por el mecanismo de reacción química de desesterificación hidrolítica ácida y ciclización respectivamente. Además, se observa la aparición de otros productos de degradación secundarios. El método desarrollado permite una buena separación de picos tanto del principio activo (Enalapril Maleato) con matriz respecto a sus principales productos de degradación (Enalaprilat y Enalapril Dicotopiperazina) para esta ruta.

#### 4.2.7.2 Hidrólisis Alcalina

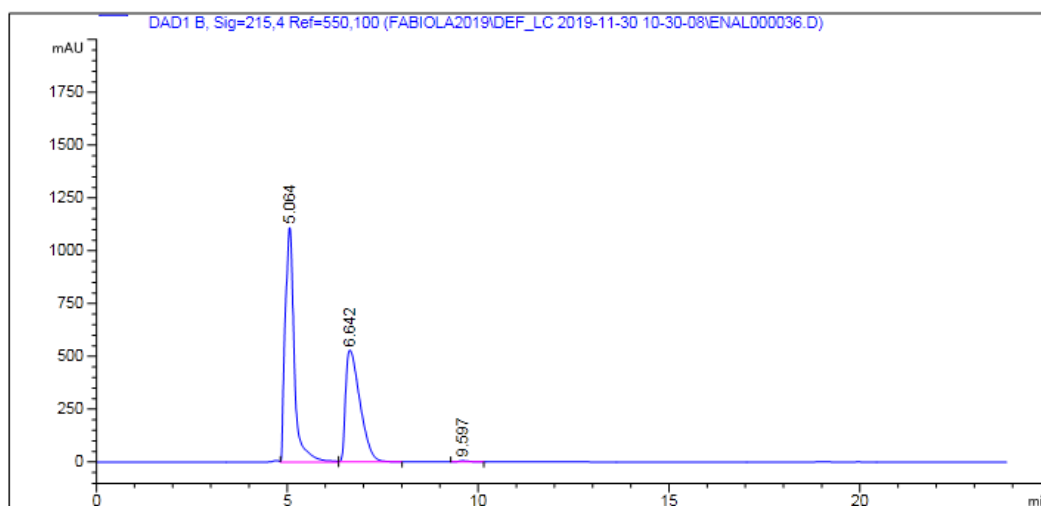
##### 4.2.7.2.1 Hidrólisis Alcalina sin reflujo (principio activo + matriz)

Figura 154. Estándar de Enalapril Maleato sin stress



**Figura 155. Blanco de hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo + matriz)**

En la figura 155 del blanco para la hidrólisis alcalina sin reflujo, no se observa picos eluidos en el cromatograma bajo las mismas condiciones de estrés del ensayo. El método desarrollado no se ve afectado en las condiciones de hidrolisis alcalina

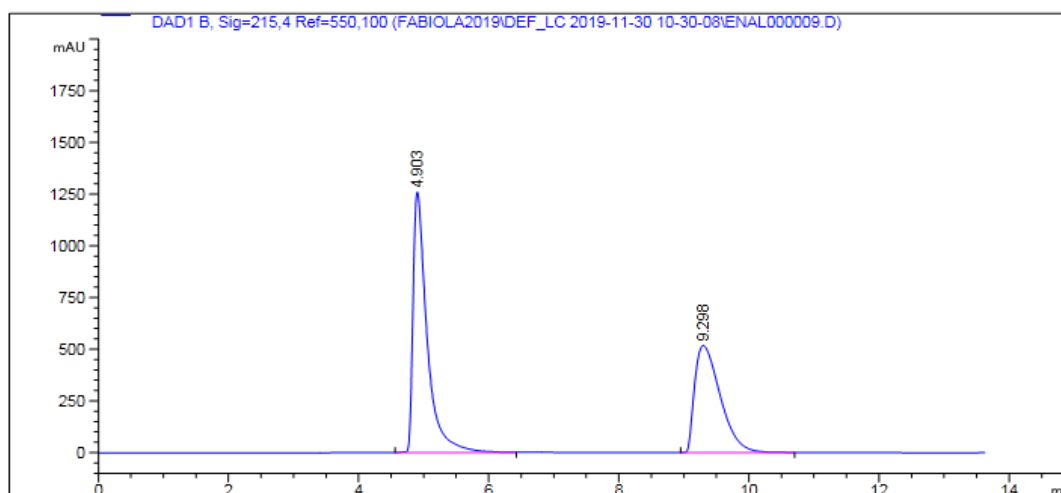
**Figura 156. Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo + matriz)**

**Tabla 48. Resultados de Hidrólisis alcalina sin reflujo (principio activo + matriz)**

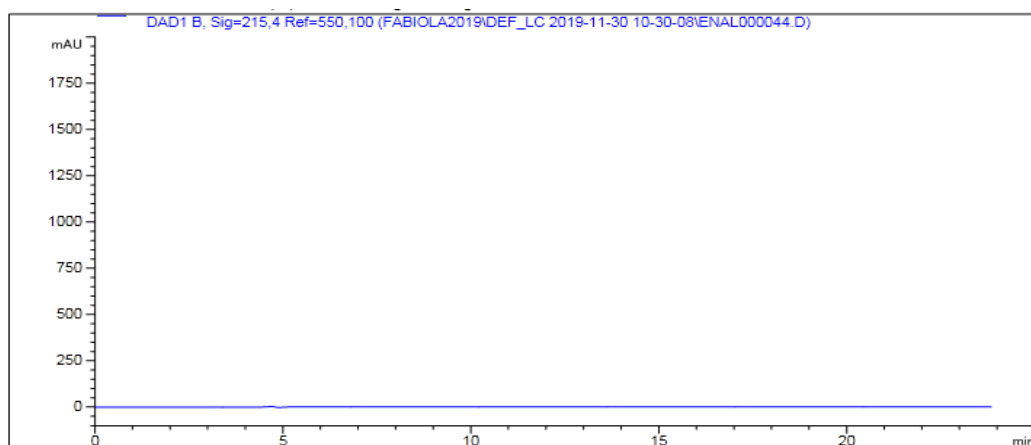
Replica	t <sub>retención</sub>	Estándar	t <sub>retención</sub>	Enalaprilat	t <sub>retención</sub>	Enalapril Maleato
1	9.240	14189.9	6.642	13905.600	9.597	110.600
2	9.244	14194.4	6.643	13901.100	9.602	111.200
3	9.272	14164.2	6.643	13912.700	9.591	110.500
PROMEDIO	9.252	14182.833	6.643	13906.467	9.597	110.767
DS	0.017	16.293	0.001	5.848	0.006	0.379
CV	0.188	0.115	0.009	0.042	0.057	0.342
% RENDIMIENTO				98.051		0.781
% DEGRADACIÓN						99.219

En la Tabla 48 de resultados para la ruta de degradación de hidrólisis alcalina sin reflujo se observa, una degradación aproximada del 99 % de Enalapril Maleato a un 98 % de Enalaprilat como principal producto de degradación de esta ruta por la inestabilidad de la molécula en medios alcalinos.

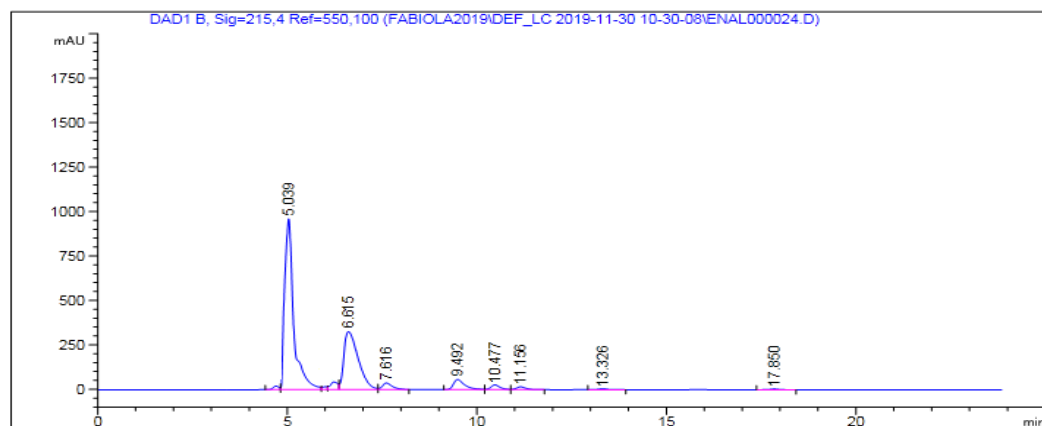
#### 4.2.7.2.2 Hidrólisis Alcalina con reflujo (principio activo + matriz)

**Figura 157. Estándar de Enalapril Maleato sin stress**



**Figura 158. Blanco de hidrólisis alcalina con reflujo**

En la figura 158 del blanco para la hidrólisis alcalina con reflujo, no se observa picos eluidos en el cromatograma bajo las mismas condiciones de estrés del ensayo. El método desarrollado no se ve afectado en las condiciones de hidrólisis alcalina.

**Figura 159. Hidrólisis alcalina con reflujo (principio activo + matriz)****Tabla 49. Resultados de Hidrólisis alcalina con reflujo (principio activo + matriz)**

Replica	$t_{\text{retención}}$	Estándar
1	9.240	14189.900
2	9.244	14194.400
3	9.272	14164.200
PROMEDIO	9.252	14182.833
DS	0.017	16.293
CV	0.188	0.115

Replica	t <sub>retención</sub>	Enalaprilat	t <sub>retención</sub>	B	t <sub>retención</sub>	Enalapril Maleato	t <sub>retención</sub>	C
1	6.615	8563.8	7.616	653.7	9.492	1192.9	10.477	457.9
2	6.629	8575.5	7.648	654.3	9.554	1189.4	10.535	456.8
3	6.623	8578.9	7.641	654.9	9.541	1190.2	10.518	458.6
PROMEDIO	6.622	8572.733	7.635	654.3	9.529	1190.833	10.510	457.767
DS	0.007	7.921	0.017	0.600	0.033	1.834	0.030	0.907
CV	0.106	0.092	0.220	0.092	0.343	0.154	0.284	0.198
% RENDIMIENTO		60.444		4.613		8.396		3.228
% DEGRADACIÓN						91.604		

Replica	t <sub>retención</sub>	D	t <sub>retención</sub>	E	t <sub>retención</sub>	H
1	11.156	285.500	13.326	95.500	17.850	87.500
2	11.234	281.100	13.413	88.400	17.939	88.200
3	11.209	282.100	13.382	87.800	17.890	85.600
PROMEDIO	11.200	282.900	13.374	90.567	17.893	87.100
DS	0.040	2.307	0.044	4.283	0.045	1.345
CV	0.356	0.815	0.330	4.729	0.249	1.545
% RENDIMIENTO		1.995		0.639		0.614

En la tabla 49 de resultados de hidrólisis alcalina con reflujo se observa, una degradación aproximada del 91.6 % de Enalapril Maleato a un 60.44 % de Enalaprilat uno de los productos principales de degradación para esta ruta. El método desarrollado permite una buena separación de picos tanto del principio activo (Enalapril Maleato) como de su principal producto de degradación (Enalaprilat) para esta ruta

#### 4.2.8 Validación del Método Analítico Indicador de Estabilidad

Luego del desarrollo del método analítico se procedió al proceso de validación, realización de los cálculos estadísticos correspondientes para confirmar que el método cumple los requisitos de especificidad, linealidad, precisión, exactitud según Farmacopea USP 42 NF 37 y ICH Q2B.

### 4.2.8.1 Resultados de Especificidad

Tabla 50. Resultados de Especificidad

N°	Concentración (mg/mL)	Área estándar	Área estándar + matriz
1	0.2 mg/mL	13164.8	13187.7
2	0.2 mg/mL	13311.0	13238.0
3	0.2 mg/mL	13275.9	13264.2
4	0.2 mg/mL	13257.0	13160.9
5	0.2 mg/mL	13253.0	13191.7
6	0.2 mg/mL	13240.6	13279.9

#### 4.2.8.1.1 Cromatogramas de Solución estándar y solución estándar +matriz

Figura 160. Solución estándar (sin interferencia)

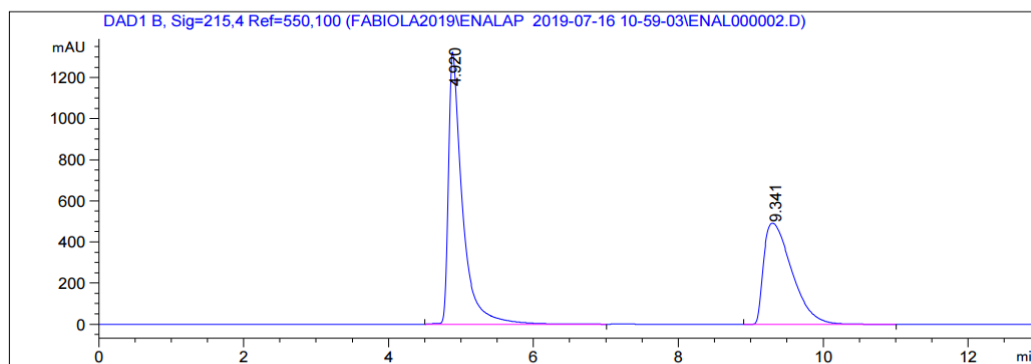


Figura 161. Solución estándar + matriz (con interferencia)

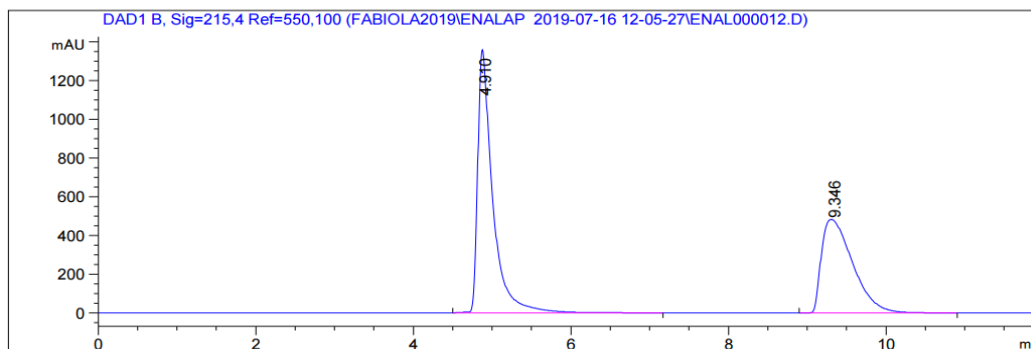


Figura 162. Cromatograma de la matriz de la Enalapril Maleato

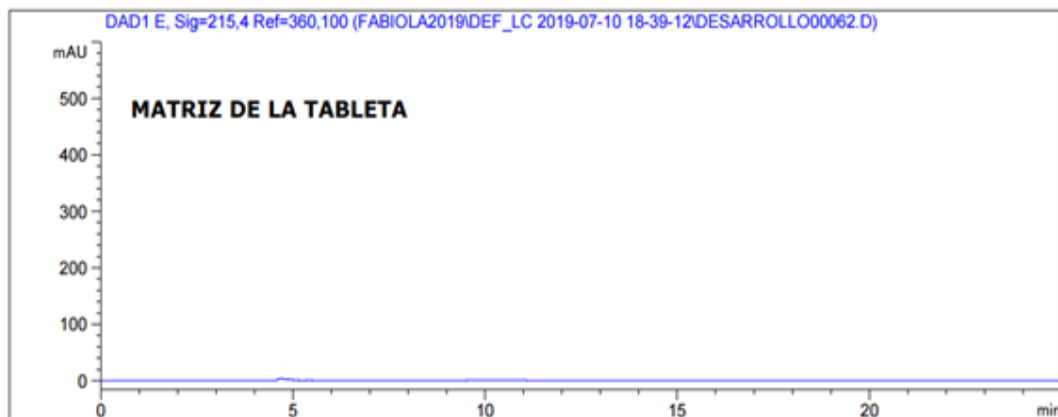


Figura 163. Cromatograma de la fase móvil

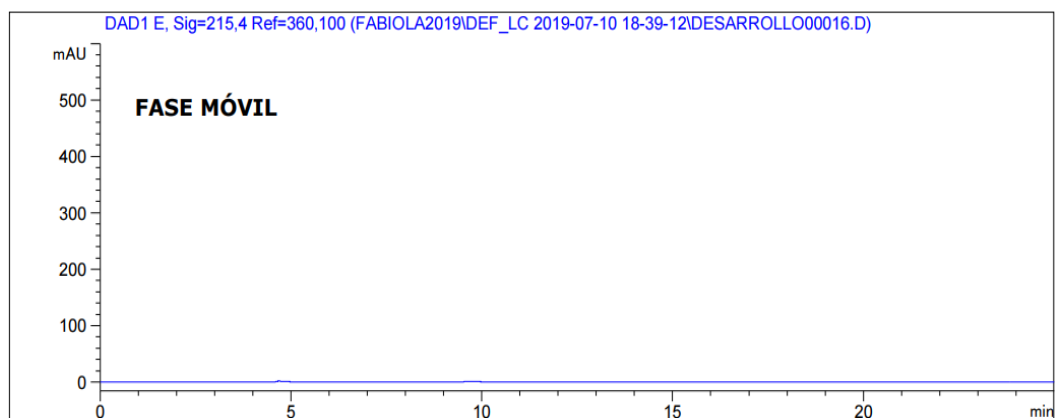
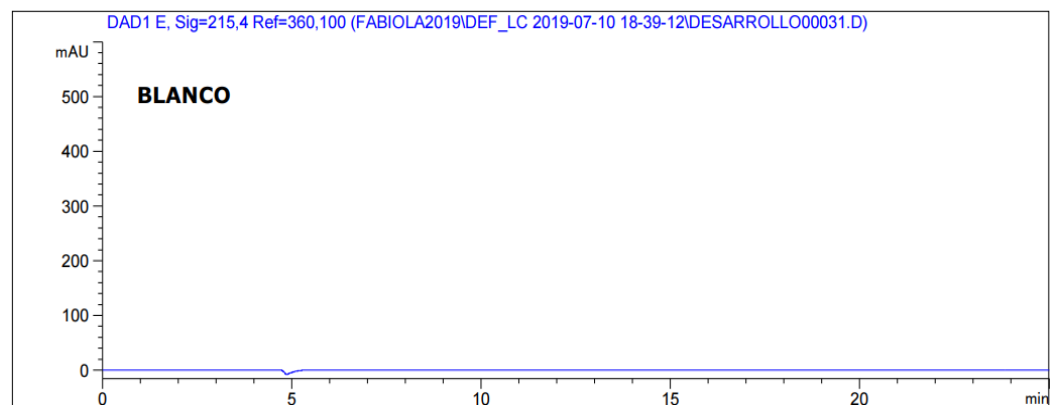


Figura 164. Cromatograma del blanco



### 4.2.8.1.2 Exploración inicial de los Datos

Figura 165. Gráfica de caja para las áreas del Estándar en Especificidad

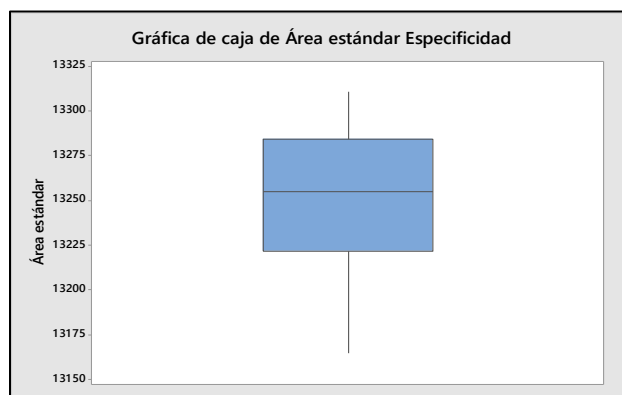
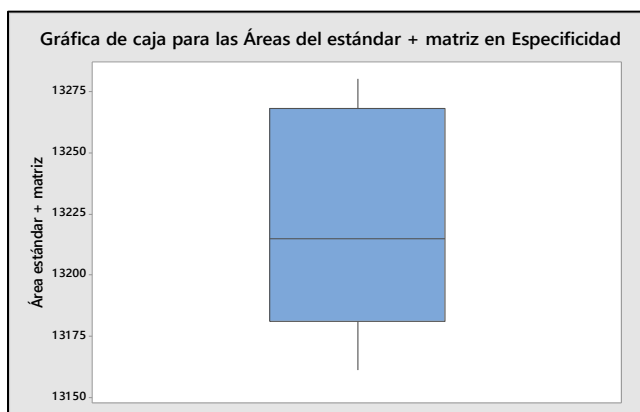


Figura 166. Gráfica de caja para las Áreas del estándar + matriz en Especificidad



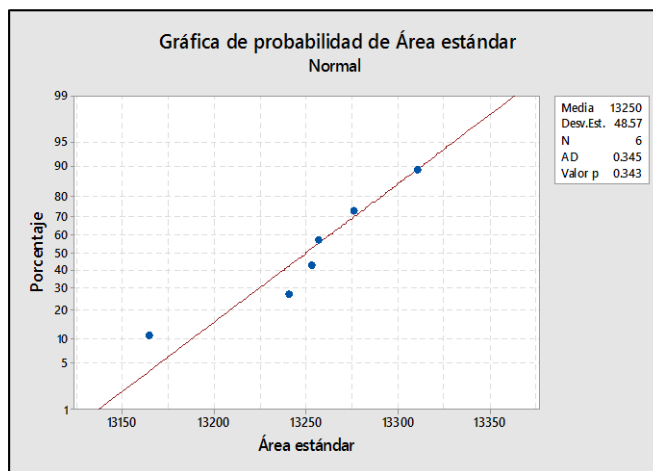
### 4.2.8.1.3 Prueba de Normalidad

#### a) Planteamiento de la Hipótesis

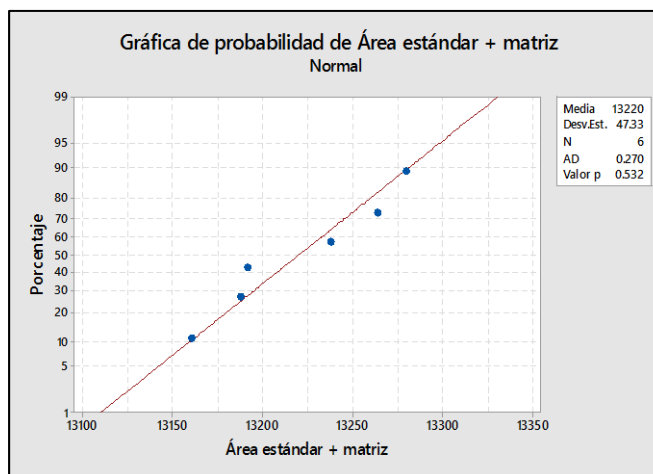
Hipótesis Nula	$H_0$ : Los datos siguen una distribución normal
Hipótesis Alternativa	$H_1$ : Los datos no siguen una distribución normal

#### b) Regla de decisión

Nivel de confianza %	95 % Valor de P = 0.05
Se acepta la Hipótesis Nula	Si $P > 0.05$
Se acepta la Hipótesis Alternativa	Si $P < 0.05$

**Figura 167. Grafica de Probabilidad de Área del Estándar, Especificidad**


En la figura 167 se observa que los datos obtenidos para las áreas del estándar de Enalapril Maleato siguen una distribución normal para la característica de desempeño de especificidad con una probabilidad del 95 % de confianza en los resultados obtenidos.

**Figura 168. Grafica de Probabilidad de Área del Estándar + matriz, Especificidad**


En la figura 168 se observa que los datos obtenidos para las áreas del estándar de Enalapril Maleato con matriz siguen una distribución normal para la característica de desempeño de especificidad con una probabilidad del 95 % de confianza en los resultados obtenidos.

#### 4.2.8.1.4 Prueba de Igualdad de Varianzas

##### Hipótesis para la prueba de Fisher

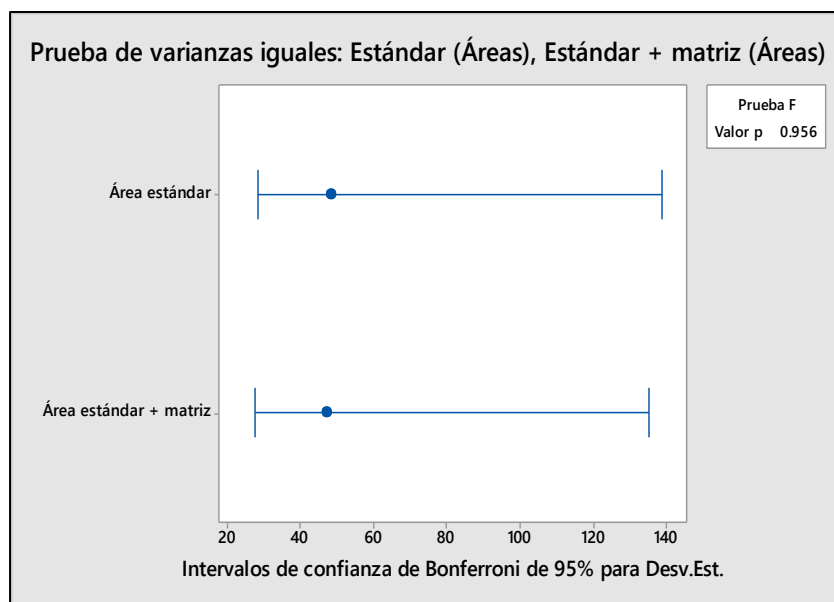
##### a) Planteamiento de la Hipótesis

Hipótesis Nula	$H_0$ : Existe homogeneidad de varianzas
Hipótesis Alternativa	$H_1$ : No existe homogeneidad de varianzas

##### b) Regla de decisión

Nivel de confianza %	95 %	Valor de P = 0.05
Se acepta la Hipótesis Nula	Si	$P > 0.05$
Se acepta la Hipótesis Alternativa	Si	$P < 0.05$

Figura 169. Prueba de varianzas iguales: Estándar (Áreas), Estándar + matriz (Áreas)



En figura 169 se observa de acuerdo al análisis estadístico que las varianzas son iguales para los datos del estándar (Áreas) y Estándar+ matriz (Áreas), en base al valor de P obtenido igual a 0.956 que es mayor al valor de referencia, por tanto, existe homogeneidad de varianzas.

#### 4.2.8.1.5 Prueba de t de Student

#### Prueba T e IC de dos muestras: Área estándar, Área estándar + matriz

T de dos muestras para Área estándar vs. Área estándar + matriz

	N	Error estándar de la media	Desviación Estándar
Área estándar	6	13250.4	48.6
Área estándar + matriz	6	13220.4	47.3

Cálculos:

$$\text{Diferencia} = \mu (\text{Área estándar}) - \mu (\text{Área estándar} + \text{matriz})$$

- Estimación de la diferencia: 30.0
- IC de 95% para la diferencia: (-31.7, 91.7)
- Prueba T de diferencia = 0 (vs.  $\neq$ ): Valor T = 1.08 Valor p = 0.304 GL = 10
- Ambos utilizan Desviación Estándar. agrupada = 47.9562

Comprobada la homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos para el estándar y estándar + matriz, se aplica la prueba de t de Student con un nivel de confianza del 95 %, el valor de P calculado (0.304) es mayor al valor de referencia (0.05) por tanto no existe diferencias significativas en la determinación de Enalapril Maleato cuando se trabaja en presencia o ausencia de la matriz y/o posibles productos de degradación.

El método es específico para la cuantificación de Enalapril Maleato.

#### 4.2.8.2 Resultados de Linealidad

##### 4.2.8.2.1 Linealidad del Sistema



Tabla 51. Resultados de Linealidad de sistema

N°	Nivel	mg/mL	Áreas
Nivel 1	80%	0.16	11308.8
		0.16	11302.0
		0.16	11294.5
Nivel 2	90%	0.18	12714.9
		0.18	12721.8
		0.18	12713.0
Nivel 3	100%	0.20	14099.8
		0.20	14110.4
		0.20	14107.6
Nivel 4	110%	0.22	15385.9
		0.22	15382.4
		0.24	16931.3
Nivel 5	120%	0.24	16913.2
		0.24	16927.3

Figura 170. Cromatogramas de la Linealidad de Sistema

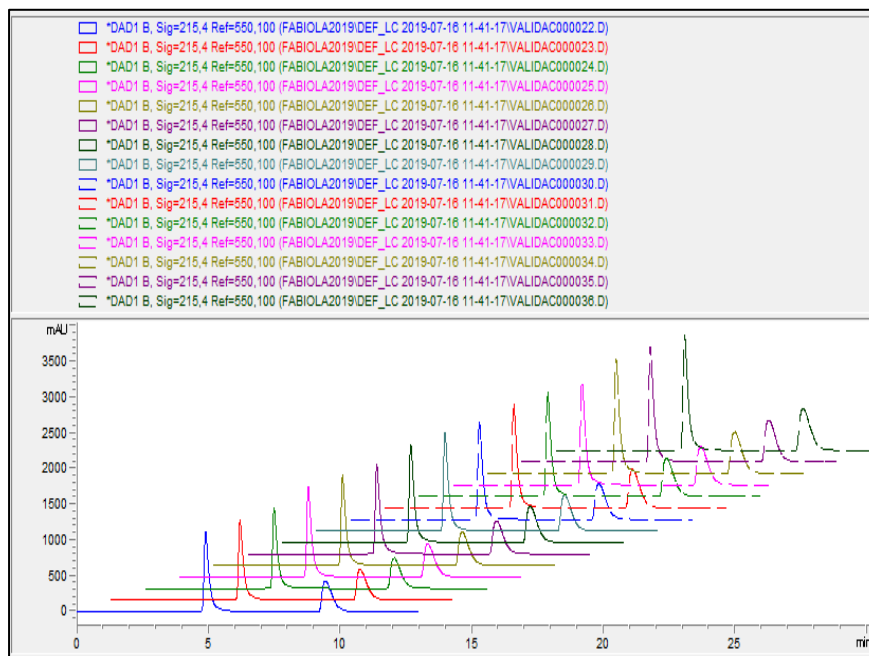


Figura 171. Cromatograma de la Linealidad de Sistema al 80 %

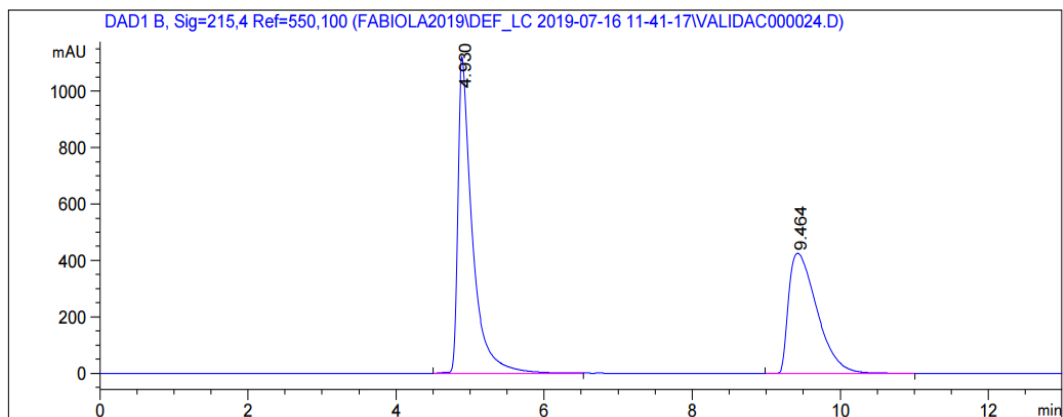


Figura 172. Cromatograma de la Linealidad de Sistema al 90 %

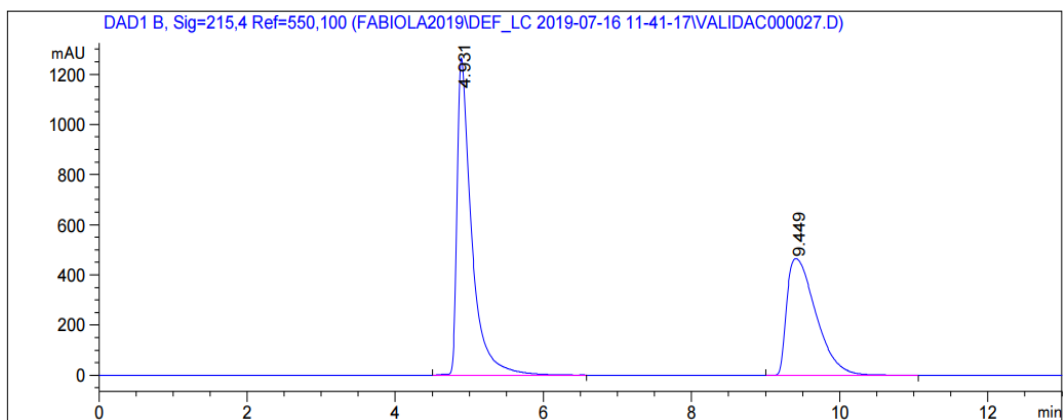
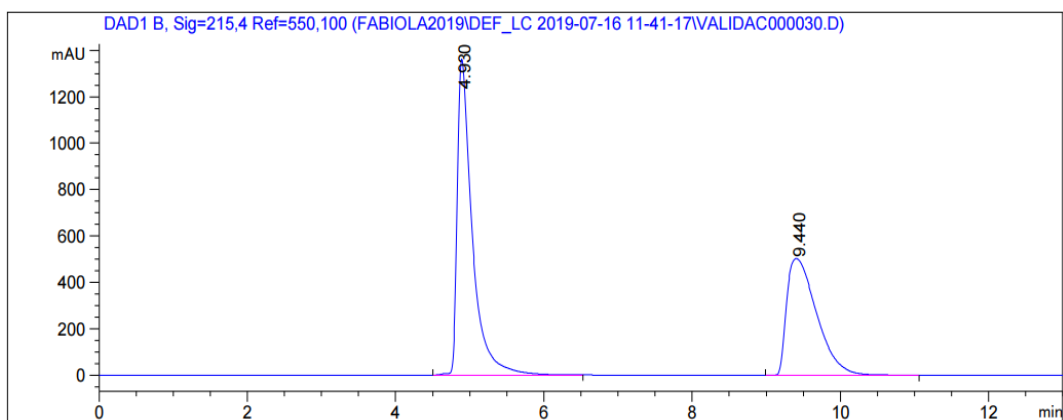
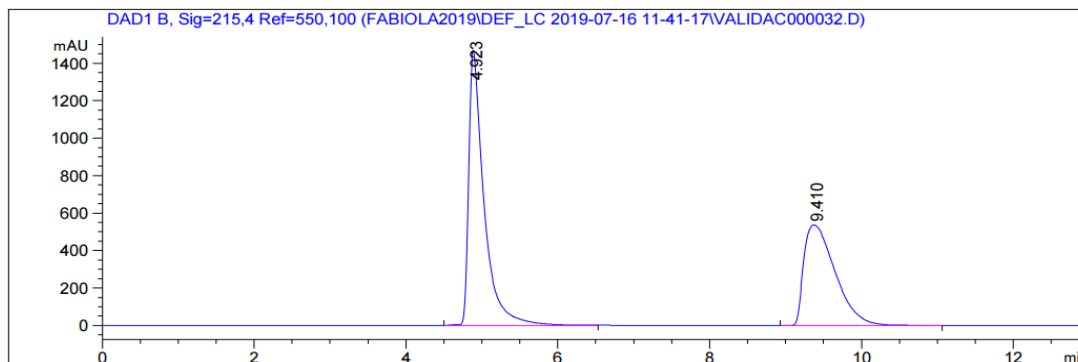


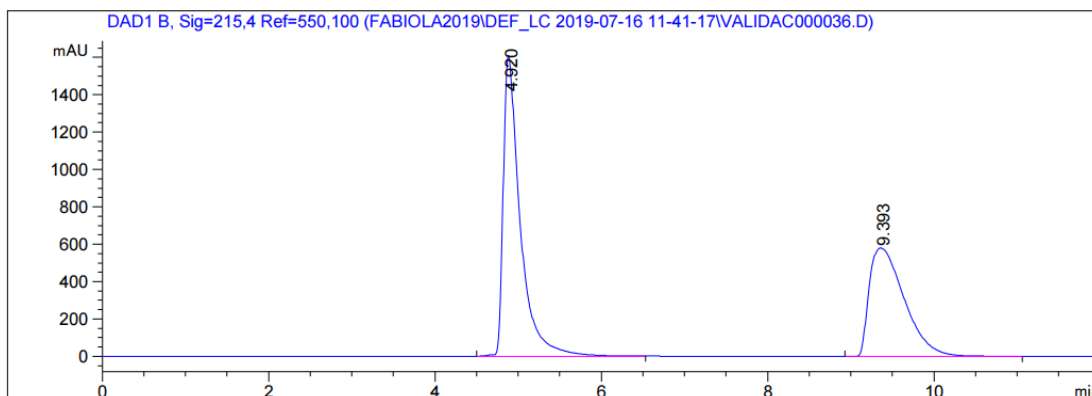
Figura 173. Cromatograma de la Linealidad de Sistema al 100 %



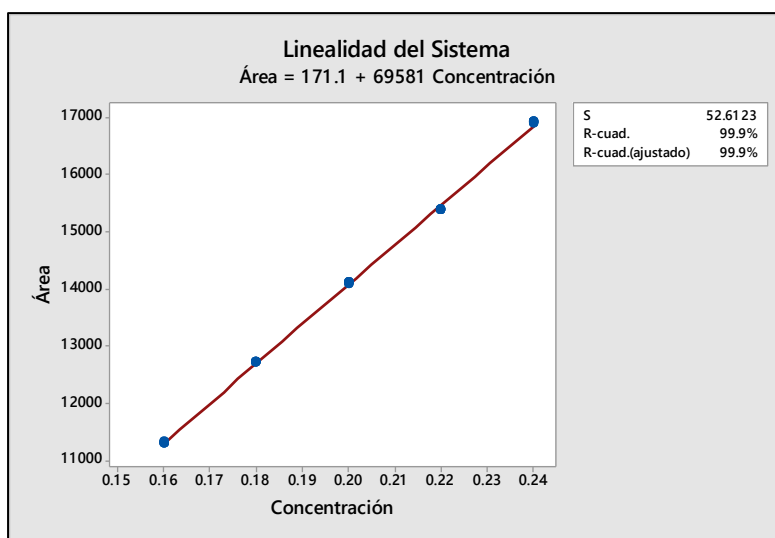
**Figura 174. Cromatograma de la Linealidad de Sistema al 110 %**



**Figura 175. Cromatograma de la Linealidad de Sistema al 120 %**



**Figura 176. Grafica de Linealidad de Sistema**



#### 4.2.8.2.1.1 Análisis de Regresión Lineal

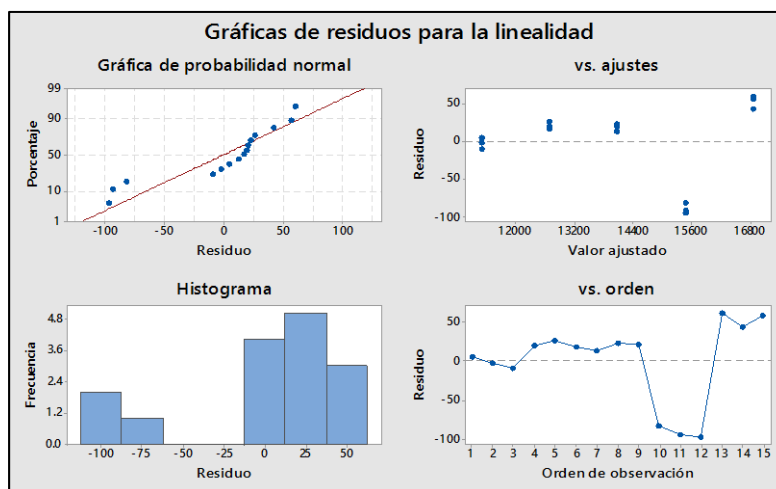
**Área vs. Concentración:** La ecuación de regresión es:

Ecuación de la recta	$\text{Área} = 171.1 + 69581 \text{ Concentración}$
Datos estadísticos	$S = 52.6123$ R-cuad. = 99.9% R-cuad.(ajustado) = 99.9%

En el modelo de la línea recta de regresión, existe una relación directa entre  $r$  y  $r^2$ , el valor calculado es de  $r^2$  igual a 99.9 % que nos indica que los datos tienen un ajuste satisfactorio y que por lo tanto, la relación entre las variables X y variable Y es descrita adecuadamente por la línea recta.

#### 4.2.8.2.1.2 Exploración Inicial de Datos

Figura 177. Gráficas de residuos para la linealidad del Sistema



Los gráficos de la figura 177 muestra que los residuos tienen una distribución normal por lo tanto los datos pueden ser evaluados por el método de mínimos cuadrados.

#### 4.2.8.2.1.3 Análisis Estadístico

La relación de las concentraciones (x) variable independiente y la respuesta área (y) variable dependiente se expresa matemáticamente como una recta de regresión obtenida por el método de ajuste de mínimos cuadrados.

### Análisis de correlación

#### a) Planteamiento de la Hipótesis

Hipótesis Nula	$H_0: r = 0$ No hay correlación entre variables
Hipótesis Alternativa	$H_0: r \neq 0$ Hay correlación entre variables

#### b) Regla de decisión

Nivel de confianza %	95 % Valor de P = 0.05
Se acepta la Hipótesis Nula	Si $P > 0.05$
Se acepta la Hipótesis Alternativa	Si $P < 0.05$

Correlación de Pearson de Área y Concentración = 1.000

Valor P = 0.000

#### c) Resultados de correlación entre variables

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.00	<b>0.00 &lt; 0.05</b> Se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto hay correlación entre variables

El coeficiente de correlación de Pearson (r), nos indica el grado de correlación entre las variables (x) y variable (y), existiendo una correlación igual a 1 con una probabilidad del 95 %

#### Correlaciones: Concentración, Área

Término	Coficiente	EE del coeficiente	Valor T	Valor p
Constante	171.1	97.0	1.76	0.101 (a)
Concentración	69581	480	144.88	0.000 (b)

Ecuación de regresión:  $\text{Área} = 171.1 + 69581 \text{ Concentración}$

#### a) Prueba de Hipótesis para la pendiente (b)

Hipótesis Nula	$H_0: b = 0$ No hay regresión en la población
Hipótesis Alternativa	$H_0: b \neq 0$ Hay regresión en la población

**b) Regla de decisión**

<b>Nivel de confianza %</b>	95 %	Valor de P = 0.05
Se acepta la Hipótesis Nula	Si	$P > 0.05$
Se acepta la Hipótesis Alternativa	Si	$P < 0.05$

**c) Resultados de análisis estadístico**

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
<b>0.05</b>	<b>0.00</b>	<b><math>0.00 &lt; 0.05</math></b> Se rechaza la hipótesis nula, hay regresión en la población la pendiente es diferente a 0

El valor de la pendiente (b) está relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad, el valor de P obtenido es menor al valor de P (0.05), lo que indica que la pendiente es diferente a cero por tanto existe regresión en la población con un nivel de confianza del 95 %.

**a) Prueba de Hipótesis para la ordenada al origen (a)**

Hipótesis Nula	$H_0: a = 0$ La recta pasa por el origen
Hipótesis Alternativa	$H_0: a \neq 0$ La recta no pasa por el origen

**b) Regla de decisión**

<b>Nivel de confianza %</b>	95 %	Valor de P = 0.05
Se acepta la Hipótesis Nula	Si	$P > 0.05$
Se acepta la Hipótesis Alternativa	Si	$P < 0.05$

**c) Análisis Estadístico**

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
<b>0.05</b>	<b>0.101</b>	<b><math>0.101 &gt; 0.05</math></b> Se acepta la hipótesis nula, la recta pasa por el origen

El valor obtenido de valor de P (0.101) es mayor al valor de referencia de 0.05, lo que indica que el intercepto es igual a cero y la recta pasa por el origen con un nivel de confianza del 95 %. De acuerdo al análisis estadístico se concluye que el método cumple con la linealidad del sistema.

4.2.8.2.2 Linealidad del Método

Tabla 52. Resultados de Linealidad del método

N°	Nivel	mg/mL	Áreas
Nivel 1	80%	0.16	11330.7
		0.16	11289.6
		0.16	11292.3
		0.18	12716.5
Nivel 2	90%	0.18	12717.5
		0.18	12717.9
		0.20	14081.8
		0.20	14132.3
Nivel 3	100%	0.20	14143.8
		0.22	15409.0
		0.22	15401.2
		0.22	15408.1
Nivel 4	110%	0.24	17045.8
		0.24	17078.6
		0.24	17068.1
		0.24	17068.1

Figura 178. Cromatogramas de Linealidad de Método

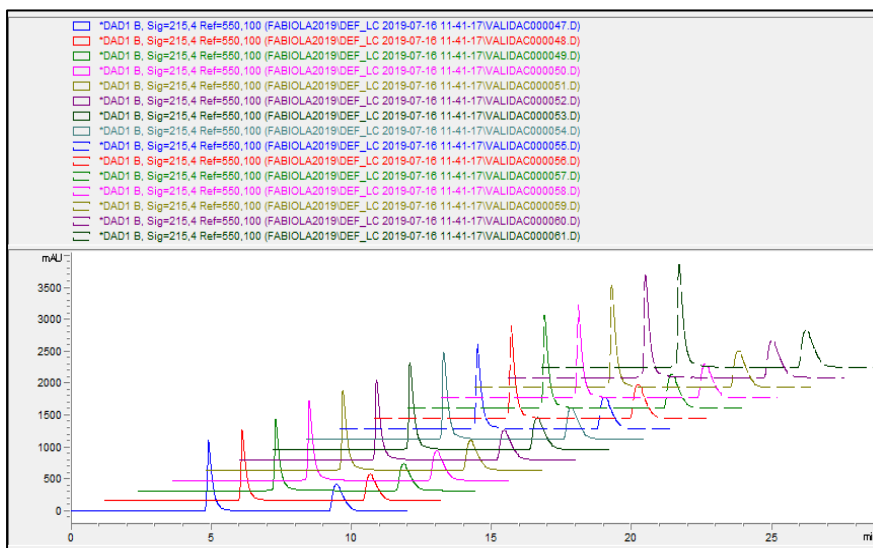


Figura 179. Cromatograma de la Linealidad de Método al 80 %

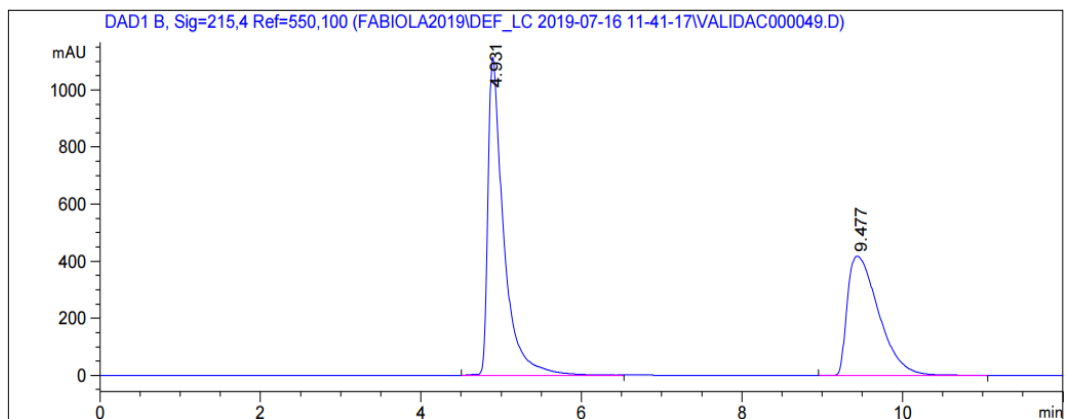


Figura 180. Cromatograma de la Linealidad de Método al 90 %

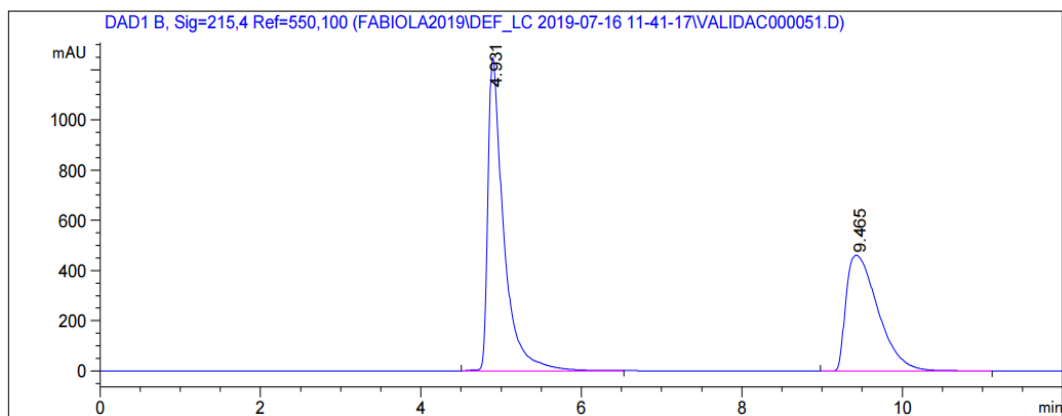


Figura 181. Cromatograma de la Linealidad de Método al 100 %

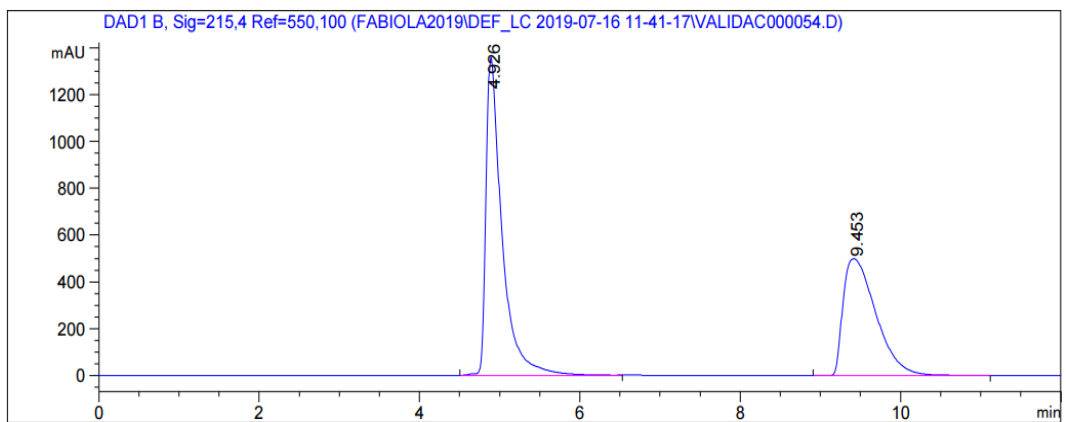




Figura 182. Cromatograma de la Linealidad de Método al 110 %

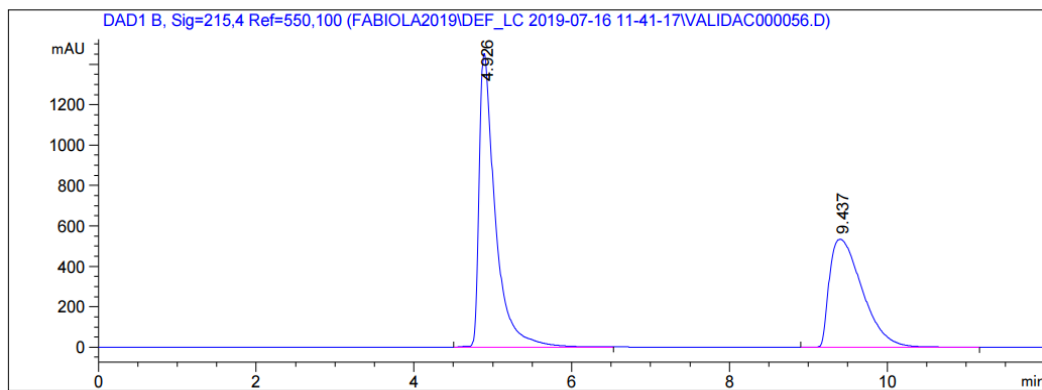


Figura 183. Cromatograma de la Linealidad de Método al 120 %

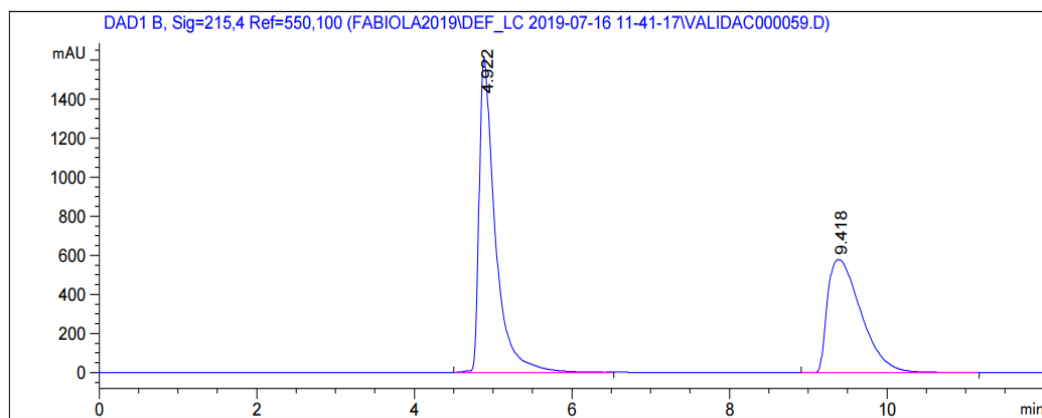
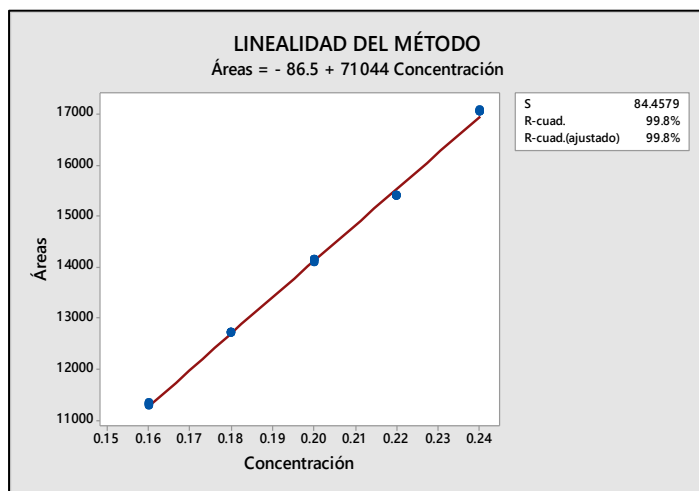


Figura 184. Grafica de Linealidad del método



#### 4.2.8.2.2.1 Análisis de regresión lineal

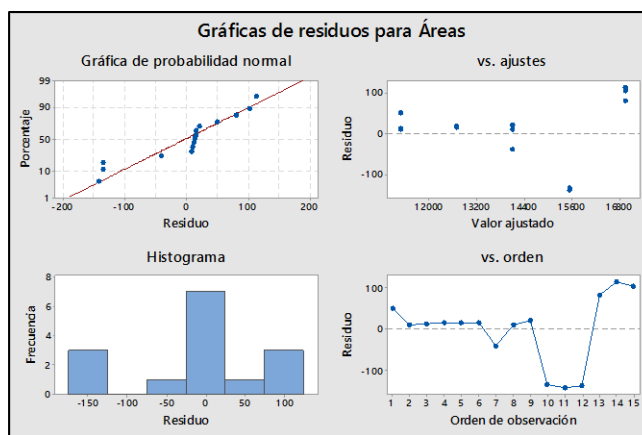
##### Análisis de regresión: Área vs. Concentración

Ecuación de la recta	$\text{Áreas} = - 86.5 + 71044 \text{ Concentración}$
Datos estadísticos	S = 84.4579 R-cuad. = 99.8% R-cuad.(ajustado) = 99.8%

En el modelo de la línea recta de regresión, existe una relación directa entre  $r$  y  $r^2$ , el valor calculado es de  $r^2$  igual a 99.8 % que nos indica que los datos tienen un ajuste satisfactorio y que, por lo tanto, la relación entre las variables X y variable Y es descrita adecuadamente por la línea recta.

#### 4.2.8.2.2.2 Exploración inicial de datos

Figura 185. Gráficas de residuos para la linealidad del Sistema



Los gráficos de la figura 185 muestra que los residuos tiene una distribución normal por lo tanto los datos pueden ser evaluados por el método de mínimos cuadrados.

#### 4.2.8.2.2.3 Análisis estadístico

La relación de las concentraciones (x) variable independiente y la respuesta área (y) variable dependiente se expresa matemáticamente como una recta de regresión obtenida por el método de ajuste de mínimos cuadrados.

## Análisis de correlación

### a) Planteamiento de la Hipótesis

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0: r = 0$ No hay correlación entre variables
<b>Hipótesis Alternativa</b>	$H_0: r \neq 0$ Hay correlación entre variables

### b) Regla de decisión

<b>Nivel de confianza %</b>	95 % Valor de P = 0.05
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si $P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Alternativa</b>	Si $P < 0.05$

Correlación de Pearson de Área y Concentración = 1.000

Valor p = 0.000

### c) Resultados de correlación entre variables

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
<b>0.05</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00 &lt; 0.05</b> Se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto hay correlación entre variables

El coeficiente de correlación de Pearson (r), nos indica el grado de correlación entre las variables (x) y variable (y), existiendo una correlación igual a 1 con una probabilidad del 95 %.

## Correlaciones: Concentración, Área

### Análisis de Varianza

Término	Coficiente	EE del coeficiente	Valor T	Valor p
Constante	-87	156	-0.56	0.588 (a)
Concentración	71044	771	92.15	0.000 (b)

Ecuación de regresión

Áreas = -87 + 71044 Concentración

**a) Prueba de Hipótesis para la pendiente (b)**

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0: b = 0$ No hay regresión en la población
<b>Hipótesis Alterna</b>	$H_0: b \neq 0$ Hay regresión en la población

**b) Regla de decisión**

<b>Nivel de confianza %</b>	95 % Valor de P = 0.05
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si $P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si $P < 0.05$

**c) Resultados de análisis**

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.00	<b>0 .00 &lt; 0.05</b> Se rechaza la hipótesis nula, hay regresión en la población la pendiente es diferente a 0

El valor de la pendiente (b) está relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad, el valor de P obtenido es menor al valor de P (0.05), lo que indica que la pendiente es diferente a cero por tanto existe regresión en la población con un nivel de confianza del 95 %.

**a) Prueba de Hipótesis para la ordenada al origen (a)**

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0: a = 0$ La recta pasa por el origen
<b>Hipótesis Alterna</b>	$H_0: a \neq 0$ La recta no pasa por el origen

**b) Regla de decisión**

<b>Nivel de confianza %</b>	95 % Valor de P = 0.05
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si $P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Alterna</b>	Si $P < 0.05$

**c) Análisis estadístico**

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.588	0.588 > 0.05 Se acepta la hipótesis nula, la recta pasa por el origen

El valor obtenido de valor de P (0.558) es mayor al valor de referencia de 0.05, lo que indica que el intercepto es igual a cero y la recta pasa por el origen con un nivel de confianza del 95 %. De acuerdo al análisis estadístico se concluye que el método cumple con la linealidad del sistema.

#### 4.2.8.3 Resultados de Exactitud

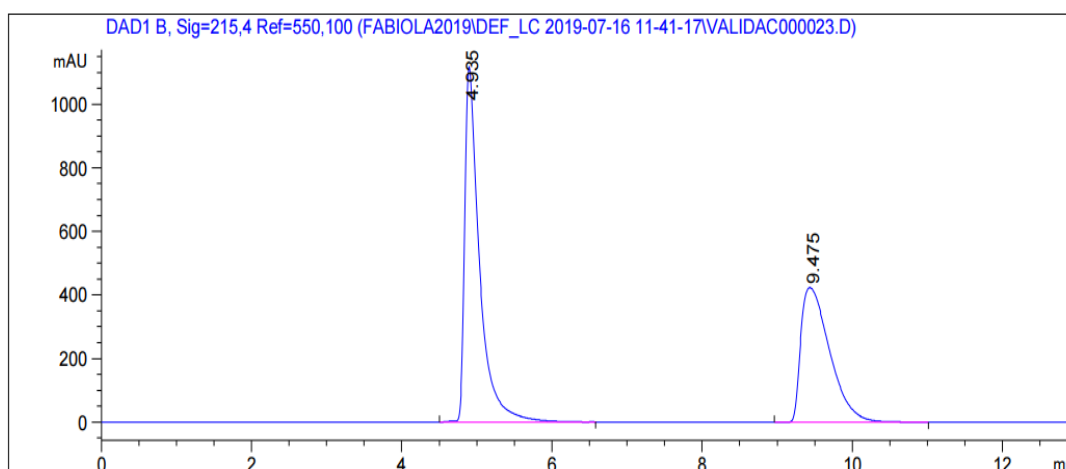
La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida del principio activo añadida sobre la matriz.

Donde el:  $\% R = \text{Área de la muestra} / \text{Área del estándar} * 100 \%$

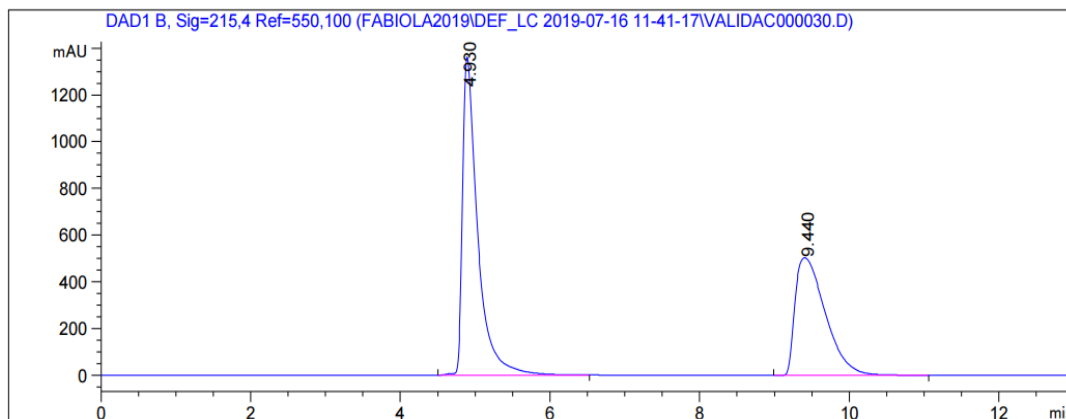
La evaluación de la recuperación del porcentaje de recuperación se realiza en el intervalo de valoración.

##### 4.2.8.3.1 Cromatogramas de las soluciones estándar y muestra

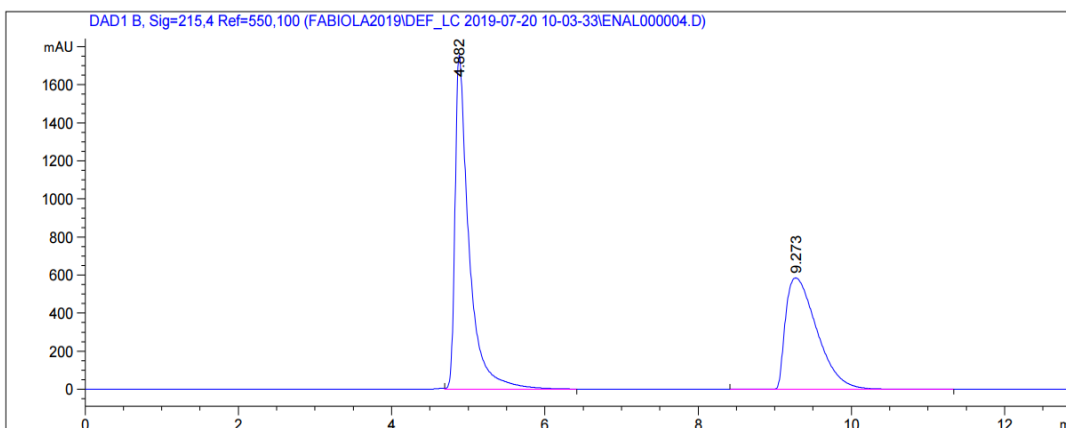
Figura 186. Cromatograma del Estándar de Exactitud a la concentración de 80 %



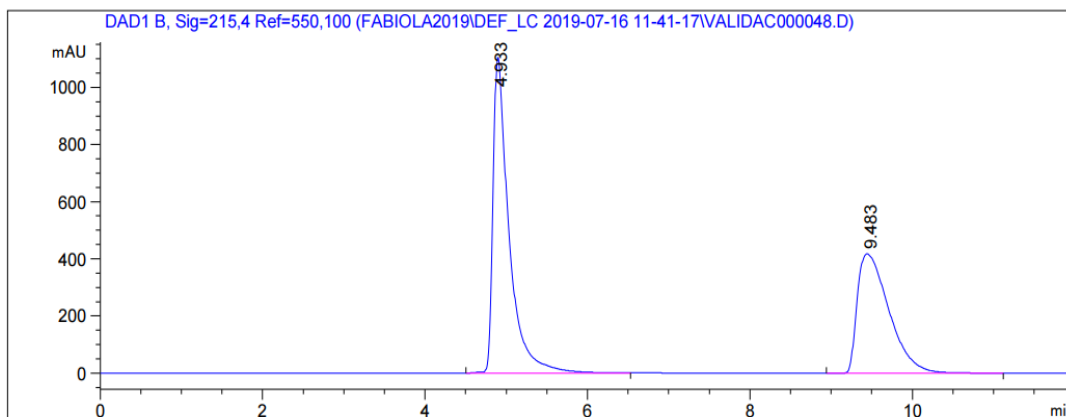
**Figura 187. Cromatograma del Estándar de Exactitud a la concentración de 100 %**

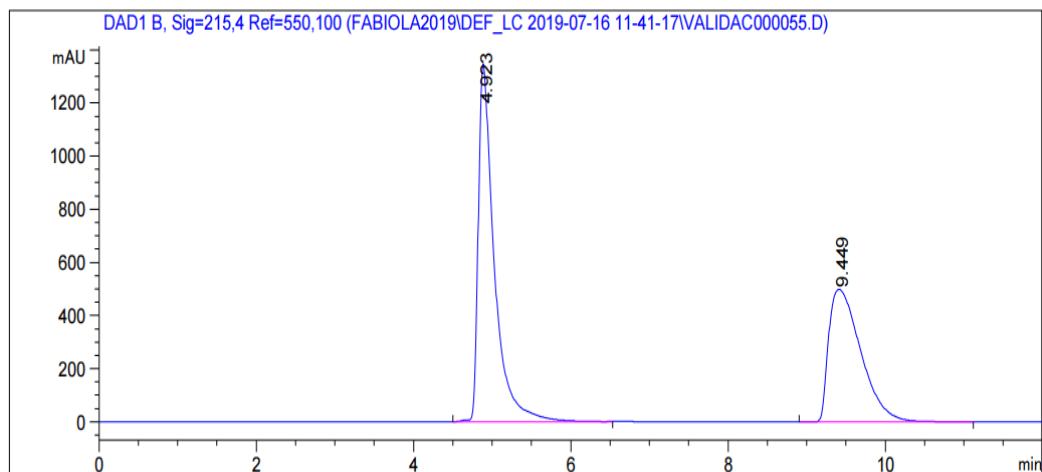
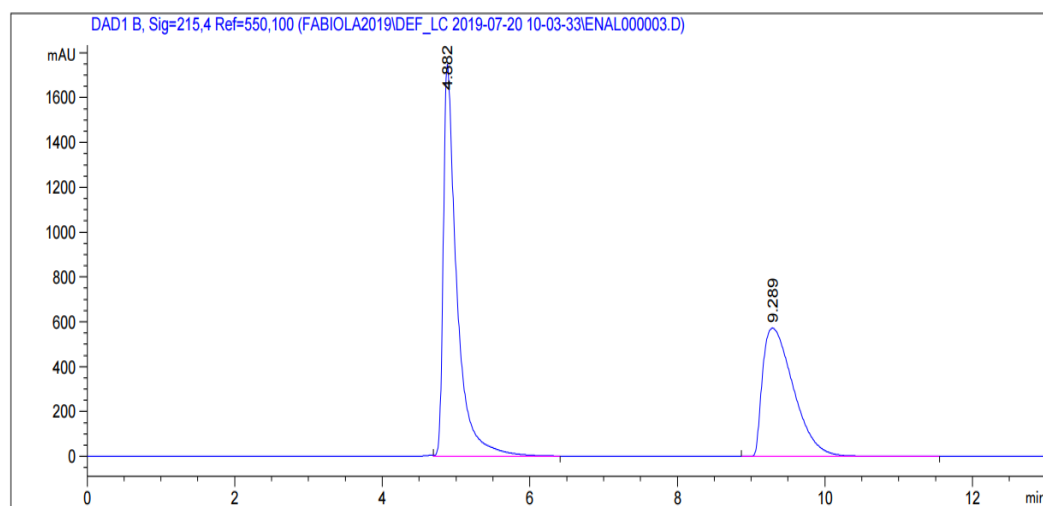


**Figura 188. Cromatograma del Estándar de Exactitud a la concentración de 120 %**



**Figura 189. Cromatograma de la muestra de Exactitud a la concentración de 80 %**



**Figura 190. Cromatograma de la muestra de Exactitud a la concentración de 100 %****Figura 191. Cromatograma de la muestra de Exactitud a la concentración de 120 %**

#### 4.2.8.3.2 Análisis estadístico de los datos de exactitud

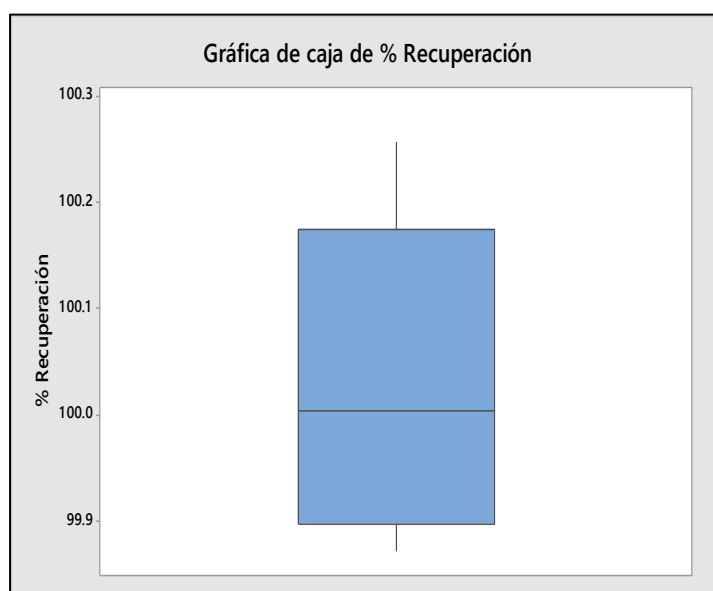
La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado del método analítico, es recomendable un mínimo de 9 determinaciones en tres niveles de concentración.

Tabla 53. Resultados de Exactitud

Concentración %	Concentración teórica(mg/mL)	Área del estándar	Área de la muestra	Concentración práctica	% Recuperación
80	0.16	11308.8	11330.7	0.160	100.194
80	0.16	11302.0	11289.6	0.160	99.890
80	0.16	11294.5	11292.3	0.160	99.981
100	0.20	14099.8	14081.8	0.200	99.872
100	0.20	14110.4	14132.3	0.200	100.155
100	0.20	14107.6	14143.8	0.201	100.257
120	0.24	16612.8	16597.1	0.240	99.905
120	0.24	16576.6	16578.4	0.240	100.011
120	0.24	16590.2	16590.8	0.240	100.004

#### 4.2.8.3.3 Exploración inicial de los datos

Figura 192. Gráfica de caja del % recuperación



De acuerdo a la gráfica 192 de cajas no se observa datos atípicos para los % de recuperación en los resultados de exactitud identificados como puntos por debajo y encima del gráfico.



#### 4.2.8.3.4 Prueba de Normalidad

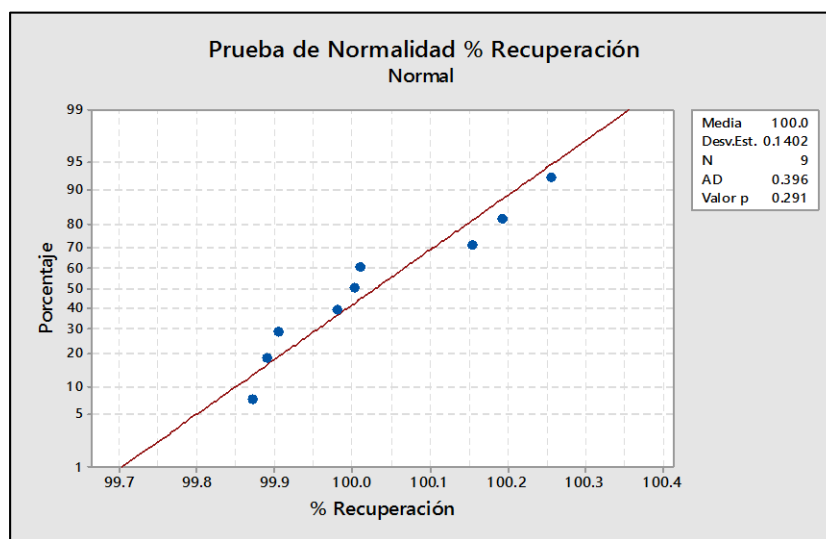
##### a) Planteamiento de la hipótesis para la prueba de normalidad

Hipótesis Nula	$H_0$ : Los datos siguen una distribución normal
Hipótesis Alternativa	$H_1$ : Los datos no siguen una distribución normal

##### b) Regla de decisión

Nivel de confianza %	95 %	Valor de P = 0.05
Se acepta la Hipótesis Nula	Si	$P > 0.05$
Se acepta la Hipótesis Alternativa	Si	$P < 0.05$

Figura 193. Prueba de Normalidad para los % de recuperación, Exactitud



##### c) Resultados de la prueba de Normalidad

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.291	$0.291 > 0.05$ Se acepta la hipótesis nula, los datos siguen una distribución normal

Los datos de exactitud tienen una distribución normal con un nivel de confianza del 95 %.

#### 4.2.8.3.5 Prueba T - Student para una muestra para la exactitud

La exactitud se expresa cómo % de recuperación de la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero (100 %).

Análisis de recuperación para la media, mediante la prueba de t – Student para una muestra.

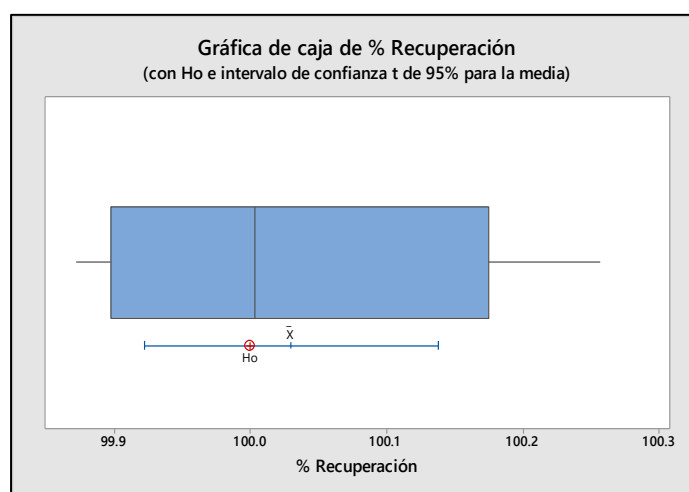
##### a) Planteamiento de la Hipótesis para la recuperación media de los datos de exactitud

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0$ : Recuperación media = 100	Exactitud adecuada
<b>Hipótesis Alterna</b>	$H_i$ : Recuperación media $\neq$ 100	Exactitud no adecuada

##### b) Regla de decisión

<b>Nivel de confianza %</b>	95 %	Valor de P = 0.05
Se acepta la Hipótesis Nula	Si	$P > 0.05$
Se acepta la Hipótesis Alterna	Si	$P < 0.05$

Figura 194. Gráfica de caja de % recuperación



En la Figura 194 se observa que la media se encuentra en el intervalo de confianza del 95 %, se acepta la hipótesis nula que indica que existe una exactitud adecuada.

## c) Análisis estadístico

## T de una muestra: % Recuperación

Prueba de  $\mu = 100$  vs.  $\neq 100$ 

Variable	N	Media	Desv.Est.	Media del error Estándar	IC de 95%	T	P
% Recuperación	9	100.030	0.140	0.047	(99.922, 100.138)	0.64	0.541

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
<b>0.05</b>	<b>0.541</b>	<b>0.541 &gt; 0.05</b> Se acepta la hipótesis nula, los datos tienen una recuperación cercana a 100 %.

El valor P obtenido según el cálculo estadístico t de una muestra es mayor al valor de P de referencia, por tanto, el método tiene una exactitud adecuada.

No existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95 % entre la recuperación media obtenida y el valor verdadero 100 %, por lo que se puede afirmar que el método es exacto en el intervalo de 80 % a 120 %.

## 4.2.8.4 Resultados de Precisión

## 4.2.8.4.1 Determinación de la Repetibilidad del sistema instrumental

Se determina la Repetibilidad del sistema instrumental analizando repetidamente una misma muestra 10 veces, la estimación de los resultados se realizó con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas.

Tabla 54. Resultados de Repetibilidad del sistema instrumental

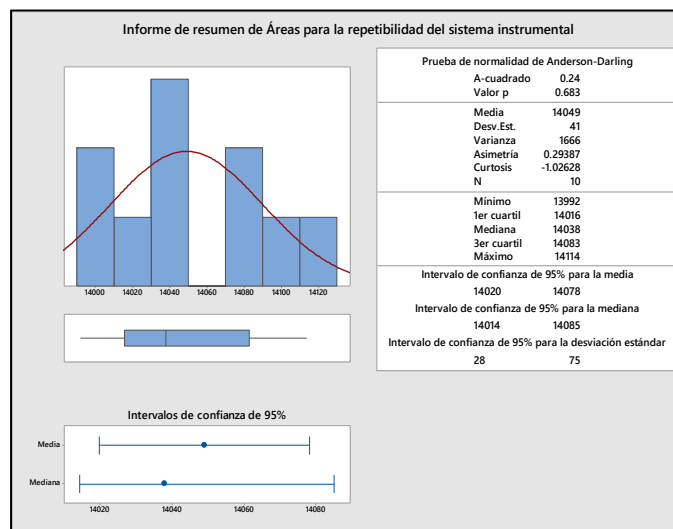
Replica	Concentración teórica(mg/mL)	Área del estándar
1	0.20	13992.0
2	0.20	14003.6
3	0.20	14041.4
4	0.20	14034.5
5	0.20	14076.2
6	0.20	14072.9
7	0.20	14034.1
8	0.20	14019.9
9	0.20	14113.8
10	0.20	14102.3

Con los siguientes datos se calcula los siguientes parámetros:

- Promedio de las 10 replicas
- Desviación estándar de las 10 replicas
- Coeficiente de Variación para las 10 replicas

#### 4.2.8.4.1.1 Exploración inicial de los datos

Figura 195. Informe resumen de las áreas e intervalo de confianza para la repetibilidad del sistema instrumental



No se observa resultados atípicos en la gráfica 195 de cajas para los datos de repetibilidad del sistema instrumental, por lo que se procede a realizar la prueba de normalidad previo requisito al análisis estadístico.

#### 4.2.8.4.1.2 Prueba de normalidad de datos de Anderson Darling

##### a) Planteamiento de hipótesis para la prueba de normalidad

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0$ : Los datos siguen una distribución normal
<b>Hipótesis Alterna</b>	$H_1$ : Los datos no siguen una distribución normal

##### b) Regla de decisión

<b>Nivel de confianza %</b>	95 %	Valor de P = 0.05
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si	$P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Alterna</b>	Si	$P < 0.05$

##### c) Análisis estadístico

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.683	$0.683 > 0.05$

En base a los datos de la prueba de normalidad se acepta la hipótesis nula que indica que los datos siguen una distribución normal con un valor de P (0.683) mayor al valor de P de referencia con un nivel de confianza del 95 %.

#### 4.2.8.4.1.3 Cumplimiento del Coeficiente de Variación según la AEFI

La prueba estadística, es una comparación del coeficiente de variación de los datos con el coeficiente de variación máxima permitida según la siguiente tabla.

**Tabla 55. Valor de aceptación para la Repetibilidad del sistema instrumental**

Intervalo de Aceptación %	CV(%) de Repetibilidad del sistema instrumental
90 % – 110 %	2.74 %

Valores máximos aceptados de coeficientes de variación según el intervalo de aceptación para la Repetibilidad del método (AEFI) (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria)

**a) Planteamiento de la hipótesis para el Coeficiente de Variación**

<b>Hipótesis nula</b>	$H_0: CV < 2.74 \%$
<b>Hipótesis alterna</b>	$H_i: CV > 2.74 \%$

**b) Prueba de valor de P**

Desviación estándar de las replicas	<b>41</b>
Coefficiente de Variación	<b>0.292 %</b>
Intervalo de Confianza para la desviación estándar	<b>28 - 75</b>

<b>Prueba estadística</b>	<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Valor CV calculado</b>
Comparación del coeficiente de variación calculado con el coeficiente de variación de tablas de referencia AEFI	$CV < 2.74 \%$	0.292 %

La Repetibilidad del sistema instrumental es aceptable cuando el coeficiente de variación obtenido es menor al coeficiente de variación de tablas (2.74 %) de acuerdo al intervalo de valoración de producto terminado.

**4.2.8.4.2 Determinación de la Repetibilidad del Método**

Se efectúa para determinar la Repetibilidad de todo el proceso de análisis desde la pesada, preparación de la muestra, de las preparaciones realizadas.

**Tabla 56. Resultados de Repetibilidad del método**

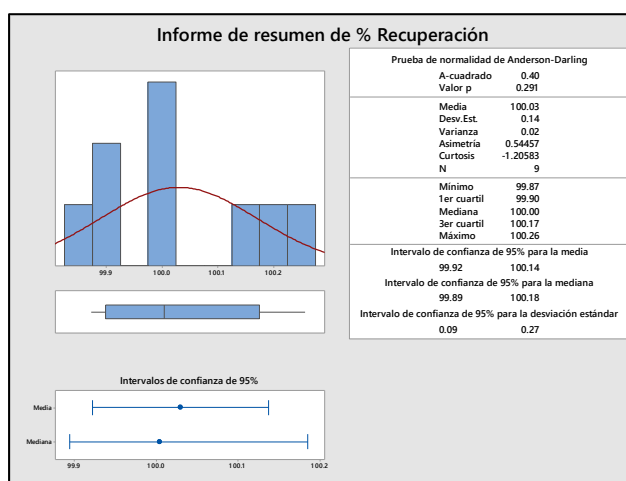
<b>Concentración teórica(mg/mL)</b>	<b>% Recuperación</b>
0.16	100.194
0.16	99.890
0.16	99.981
0.20	99.872
0.20	100.155
0.20	100.257
0.24	99.905
0.24	100.011
0.24	100.004

Con los siguientes datos se calcula los siguientes parámetros:

- Desviación estándar de % Recuperación
- Desviación estándar relativa
- Intervalo de confianza del 95 % para la desviación estándar

#### 4.2.8.4.2.1 Exploración inicial de los datos

Figura 196. Informe resumen de % de recuperación e intervalo de confianza



No se observa resultados atípicos en la gráfica de cajas para los datos de repetibilidad del método, por lo que se procede a realizar la prueba de normalidad previo requisito al análisis estadístico.

#### 4.2.8.4.2.2 Prueba de Normalidad de Anderson Darling

##### a) Planteamiento de hipótesis para la prueba de normalidad

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0$ : Los datos siguen una distribución normal
<b>Hipótesis Alternativa</b>	$H_1$ : Los datos no siguen una distribución normal

##### b) Regla de decisión

<b>Nivel de confianza %</b>	95 %	Valor de P = 0.05
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si	$P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Alternativa</b>	Si	$P < 0.05$

## c) Análisis estadístico

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.291	0.291 > 0.05

En base a los datos de la prueba de normalidad se acepta la hipótesis nula que indica que los datos siguen una distribución normal con un valor de P (0.291) mayor al valor de P de referencia con un nivel de confianza del 95 %.

## 4.2.8.4.2.3 Cumplimiento del Coeficiente de Variación según la AEFI

La prueba estadística, es una comparación del coeficiente de variación con el coeficiente de variación máxima permitida según la siguiente tabla.

**Tabla 57. Valor de aceptación para la Repetibilidad del método**

Intervalo de Aceptación %	CV(%) de Repetibilidad del método
90 % – 110 %	3.88 %

Valores máximos aceptados de coeficientes de variación según el intervalo de aceptación para la Repetibilidad del método (AEFI) (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria)

## a) Planteamiento de la hipótesis para el Coeficiente de Variación

Hipótesis nula	$H_0: CV < 3.88 \%$
Hipótesis alterna	$H_1: CV > 3.88 \%$

Desviación estándar del % Recuperación	<b>0.140</b>
Coeficiente de Variación	<b>0.140 %</b>
Intervalo de confianza del 95 % para “S”	<b>0.09 – 0.27</b>

Prueba estadística	Criterio de aceptación	Valor CV calculado
Comparación del coeficiente de variación con el coeficiente de variación de tablas de referencia AEFI	$CV < 3.88 \%$	0.140 %



De acuerdo al análisis estadístico de los datos de Repetibilidad se observa que el coeficiente de variación del método es aceptable comparado a el coeficiente de variación de tablas de AEFI (3.88 %) por tanto el método cumple Repetibilidad del método en 3 niveles de concentración.

#### 4.2.8.4.3 Determinación de la Precisión intermedia

Tabla 58. Resultados de Presión intermedia, analista “X” y “Y”

Determinación		Analista X		
		Área del estándar	Área de la muestra	% Recuperación
Día 1		13785.4	13796.2	100.078
		13837.3	13851.9	100.106
		13931.4	14031.3	100.717
		13726.8	13703.0	99.827
Día 2		13716.3	13685.4	99.775
		13705.4	13688.8	99.879

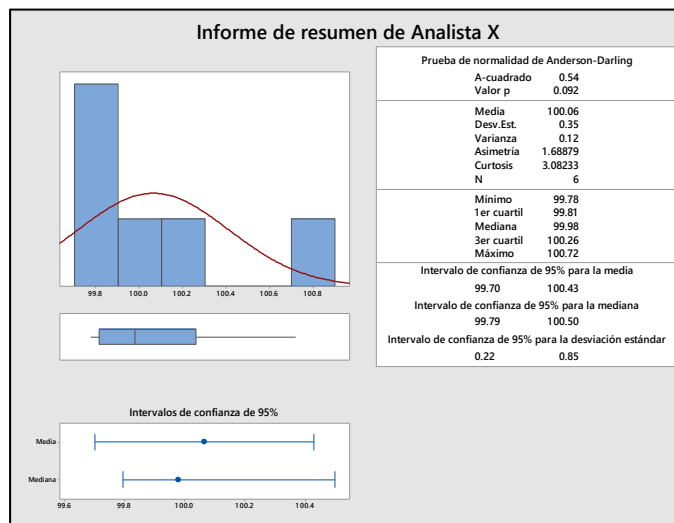
Determinación		Analista Y		
		Área del estándar	Área de la muestra	% Recuperación
Día 1		13921.0	13843.9	99.446
		14057.3	14066.5	100.065
		13911.3	13899.1	99.912
		13937.5	13868.8	99.507
Día 2		13831.9	13856.5	100.178
		14030.0	14121.0	100.649

Análisis	Analista X	Analista Y
Día 1	100.078	99.446
	100.106	100.065
	100.717	99.912
	99.827	99.507
Día 2	99.775	100.178
	99.879	100.649

#### 4.2.8.4.3.1 Análisis estadístico de los datos de la precisión intermedia para la Analista “X”

##### 4.2.8.4.3.1.1 Exploración inicial de los datos

Figura 197. Informe de datos estadísticos de Analista “X”



En base a la gráfica de cajas obtenida no se observa valores atípicos en los datos de % de recuperación para la analista X, se procede a realizar la prueba de normalidad.

##### 4.2.8.4.3.1.2 Prueba de normalidad para el % de recuperación de Analista “X”

###### a) Planteamiento de la hipótesis para la prueba de normalidad

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0$ : Los datos siguen una distribución normal
<b>Hipótesis Alternativa</b>	$H_1$ : Los datos no siguen una distribución normal

###### b) Regla de decisión

<b>Nivel de confianza %</b>	95 %	Valor de P = 0.05
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si	$P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Alternativa</b>	Si	$P < 0.05$

## c) Prueba de valor de P

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.092	<b>0.092 &gt; 0.05</b> Se acepta la hipótesis nula, los datos siguen una distribución normal

Las recuperaciones obtenidas por analista X siguen una distribución normal en base al análisis estadístico con un nivel de confianza del 95 %.

## 4.2.8.4.3.1.3 Cumplimiento del Coeficiente de Variación según la AEFI Analista “X”

Tabla 59. Valor de aceptación para la Precisión intermedia

Intervalo de Aceptación %	CV(%) de Repetibilidad de la precisión intermedia
90 % – 110 %	3.88 %

Valores máximos aceptados de coeficientes de variación según el intervalo de aceptación para la Repetibilidad del método (AEFI) (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria)

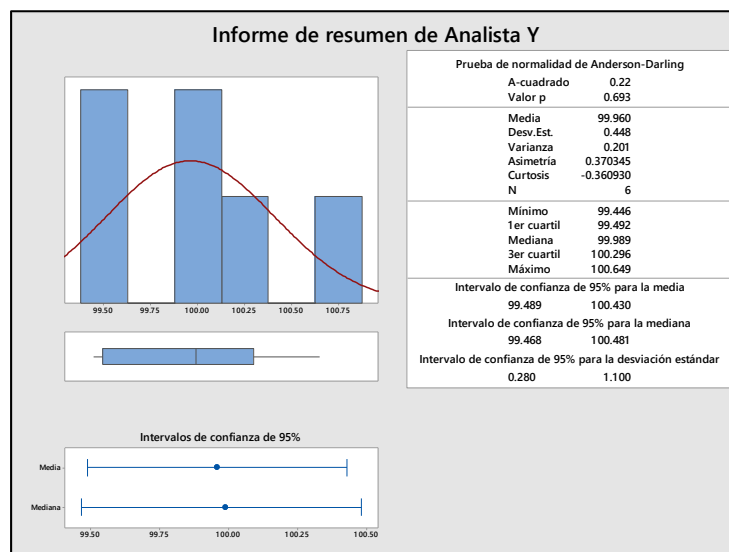
Desviación estándar del % Recuperación	<b>0.350</b>
Coefficiente de variación obtenida	<b>0.350 %</b>
Intervalo de confianza del 95 % para “S”	<b>0.220 – 0.850</b>

Prueba estadística	Criterio de aceptación	Valor CV calculado
Comparación del coeficiente de variación obtenido con el coeficiente de variación de tablas de referencia AEFI	CV < 3.88 %	0.350 %

#### 4.2.8.4.3.2 Análisis estadístico de los datos de la precisión intermedia para la Analista “Y”

##### 4.2.8.4.3.2.1 Exploración inicial de los datos

Figura 198. Informe de datos estadísticos de Analista “Y”



En base a la gráfica de cajas obtenida en figura 198 no se observa valores atípicos en los datos de % de recuperación para la analista “Y” se procede a realizar la prueba de normalidad.

#### 4.2.8.4.3.3 Análisis estadístico de los datos de la precisión intermedia para la Analista Y

##### a) Planteamiento de la hipótesis para la prueba de normalidad

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0$ : Los datos siguen una distribución normal
<b>Hipótesis Alternativa</b>	$H_1$ : Los datos no siguen una distribución normal

##### b) Regla de decisión

<b>Nivel de confianza %</b>	95 %	Valor de P = 0.05
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si	$P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Alternativa</b>	Si	$P < 0.05$

## c) Prueba de valor de P

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.693	0.693 > 0.05 Se acepta la hipótesis nula, los datos siguen una distribución normal

Las recuperaciones obtenidas por analista Y siguen una distribución normal en base al análisis estadístico con un nivel de confianza del 95 %.

## 4.2.8.4.3.3.1 Cumplimiento del Coeficiente de Variación según la AEFI Analista“Y”

Tabla 60. Valor de aceptación para la Precisión intermedia

Intervalo de Aceptación %	CV(%) de la Repetibilidad de la Precisión intermedia
90 % – 110 %	3.88 %

Valores máximos aceptados de coeficientes de variación según el intervalo de aceptación para la Repetibilidad del método (AEFI) (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria)

Desviación estándar del % Recuperación	0.448
Coefficiente de variación obtenida	0.448 %
Intervalo de confianza del 95 % para “S”	0.280 – 1.100

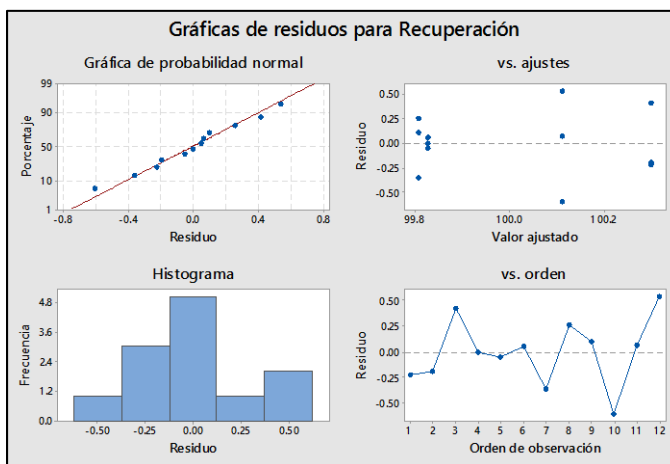
Prueba estadística	Criterio de aceptación	Valor CV calculado
Comparación del coeficiente de variación obtenido con el coeficiente de variación de tablas de referencia AEFI	CV < 3.88 %	0.448 %

## 4.2.8.4.3.4 Análisis de Varianza para la Precisión intermedia (ANOVA)

Para evaluar si hay influencia significativa de las variables analista y día sobre la variable respuesta se aplica la prueba de análisis de varianza totalmente anidado (ANOVA) y se estima los componentes de la varianza para cada variable (analista y día).

#### 4.2.8.4.3.4.1 Exploración inicial de los datos

Figura 199. Gráfica de residuos para el % de recuperación



#### 4.2.8.4.3.4.2 Análisis de los datos de análisis de varianza (ANOVA)

##### a) Planteamiento de la hipótesis

<b>Hipótesis Nula</b>	$H_0$ : No existe influencia de la variable (analista) sobre % de Recuperación No existe influencia de la variable (día) sobre el % de Recuperación
<b>Hipótesis Alternativa</b>	$H_1$ : Existe influencia de la variable analista sobre el % de Recuperación Existe influencia de la variable día sobre el % de Recuperación

##### b) Regla de decisión

<b>Nivel de confianza %</b>	95 %	Valor de $P = 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Nula</b>	Si	$P > 0.05$
<b>Se acepta la Hipótesis Alternativa</b>	Si	$P < 0.05$

##### c) Análisis de Varianza de % de Recuperación

##### ANOVA anidada: % Recuperación vs. Día, Analista

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Día	1	0.0216	0.0216	0.089	0.794
Analista	2	0.4853	0.2427	1.714	0.240
Error	8	1.1329	0.1416		
Total	11	1.6398			

**% Recuperación Vs Día**

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.794	0.794 > 0.05

En base al análisis de varianza el valor de P obtenido (0.794) es mayor al valor P de aceptación (0.05) por tanto se acepta la hipótesis nula que determina que no existe influencia significativa de la variable (día) sobre los % de Recuperación obtenidos con un nivel de confianza del 95 %.

**% Recuperación Vs Analista**

Valor P	Valor P experimental	Conclusión
0.05	0.240	0.240 > 0.05

En base al análisis de varianza el valor de P obtenido (0.240) es mayor al valor P de aceptación (0.05) por tanto se acepta la hipótesis nula que determina que no existe influencia significativa de la variable (analista) sobre los % de Recuperación obtenidos con un nivel de confianza del 95 %.

De acuerdo a los datos obtenidos se define que el método analítico cumple precisión intermedia.

**Figura 200. Gráfica de efectos principales para el % de Recuperación**

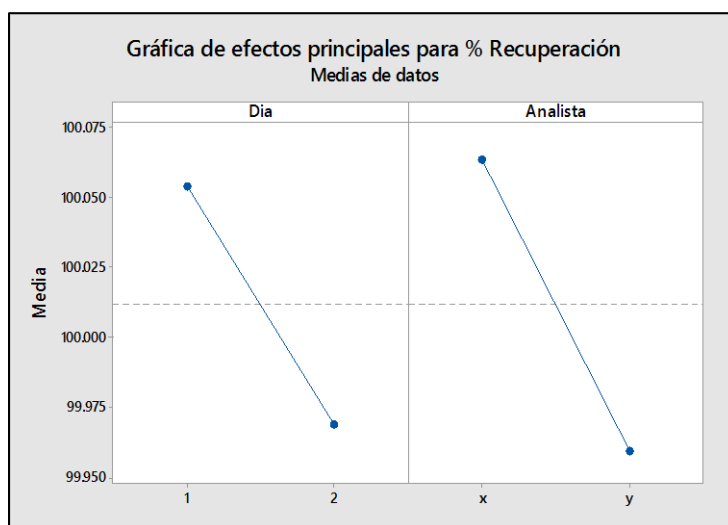
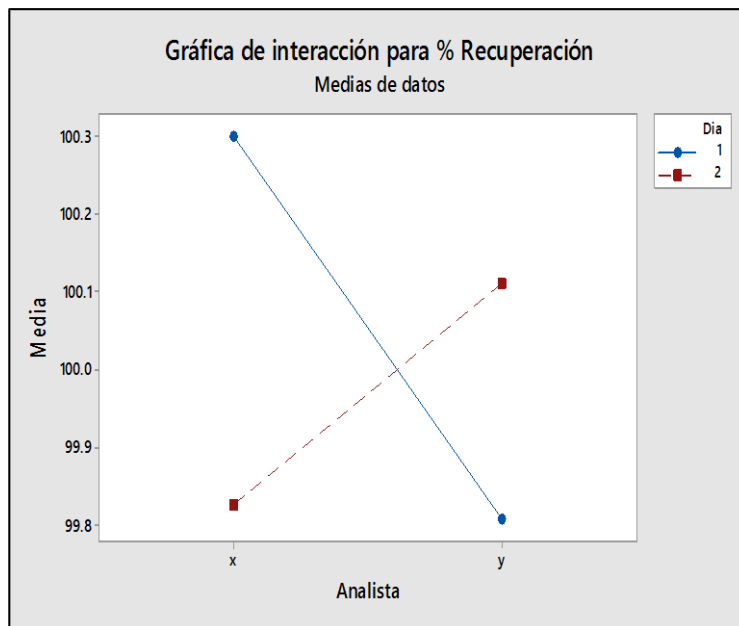


Figura 201. Gráfica de interacción para el % de Recuperación



#### 4.2.8.5 Resultados de la Comprobación del método en Producto Terminado

Figura 202. Cromatograma de Enalapril Maleato tableta Producto Terminado

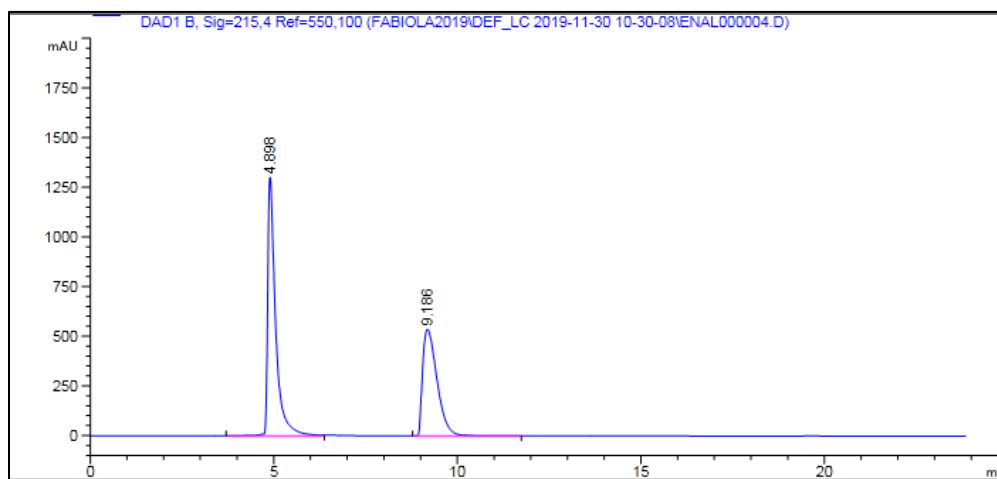
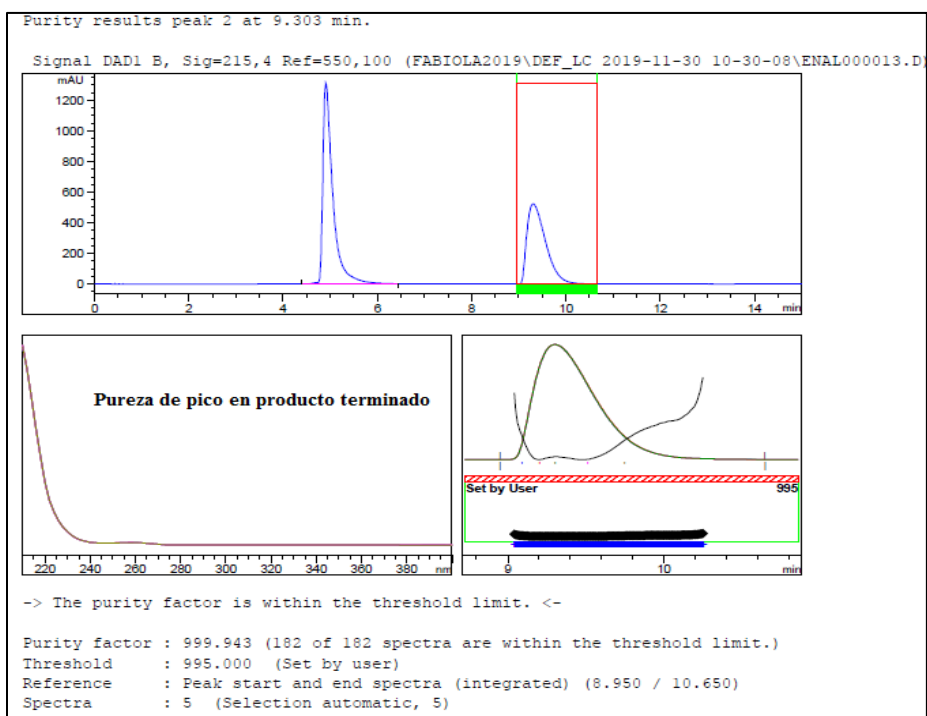


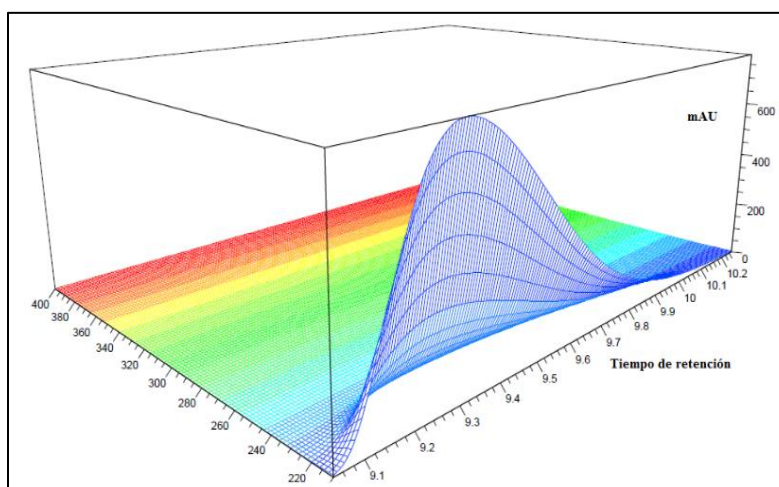


Figura 203. Pureza de pico de Enalapril Maleato tableta Producto Terminado



En la Figura 203, se observa que la pureza de pico obtenido para Enalapril Maleato tableta con el método validado, con un tiempo de retención aproximado de 9.5 minutos se encuentra dentro del límite de umbral de 995 lo que nos indica una diferencia espectral aceptable del 0.5 %.

Figura 204. Topograma en 3D Enalapril Maleato tableta Producto Terminado



Como se puede observar en Figura 204, el pico de Enalapril principio como producto terminado no presenta interferencia con otras impurezas o posibles productos de degradación.

**Tabla 61. Datos de Valoración de Enalapril Maleato tableta, Producto Terminado**

Replica	Área del estándar	Área de Lote 1	Área de Lote 2
1	14209.0	14439.9	14147.0
2	14213.0	14472.5	14116.4
3	14187.2	14537.6	14110.3
4	14199.2		
5	14175.2		
<b>Promedio</b>	14196.720	14483.333	14124.567
<b>DS</b>	15.618	49.743	19.666
<b>CV</b>	0.110	0.343	0.139

**Tabla 62. Rendimiento de Enalapril Maleato en tableta, producto terminado**

% Rendimiento	Lote 1	Lote 2
	102 %	98 %
	Cumple	Cumple
Criterio de aceptación : Entre 90 % - 110 % Enalapril Maleato		



## CAPÍTULO V



---

## CONCLUSIONES

## 5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el desarrollo, estandarización y validación del método analítico indicador de estabilidad para Enalapril Maleato, en base al estudio de las propiedades fisicoquímicas y conociendo las rutas de degradación del principio activo se puede concluir que:

- Durante el desarrollo del método analítico indicador de Estabilidad para Enalapril Maleato se realizó la identificación del principio activo y los productos de degradación de Enalapril Maleato mediante Espectrofotometría de absorción Infrarrojo siendo positiva para cada banda de los grupos funcionales característicos, también se optimizó un método de identificación por cromatografía en capa fina para la separación de los componentes de interés, de acuerdo a los resultados, se concluye que la fase móvil más óptima es aquella que consta de butanol: agua destilada: ácido acético en la proporción (3:1:1) obteniendo valores de Rf diferentes para Enalapril Maleato, Enalaprilat y Enalapril Dicotopiperazina.
- De acuerdo a los cálculos en base al pKa del principio activo y la fuerza de elución de los solventes cromatográficos para la elección de la fase móvil se demostró que una proporción de metanol grado cromatográfico y solución buffer de fosfato 10 mM en una proporción de (60:40) logra una buena separación de los picos de interés.
- El método analítico desarrollado es indicador de estabilidad específico ya que nos permite cuantificar el principio activo de forma inequívoca con relación a los productos de degradación, excipientes y aditivos obtenidos durante las pruebas de estrés.
- Mediante los resultados de robustez no se encontró diferencias significativas para las variables de temperatura, concentración del buffer, volumen de inyección y pH de la solución Buffer en base al gráfico de efectos normales y los valores obtenidos en el diagrama de paretos de los experimentos no superan el valor de referencia con un nivel de confianza del 95 %.

- El método analítico desarrollado cumple con los requisitos de idoneidad del sistema cromatográfico y en base a los cromatogramas obtenidos con la solución aptitud de sistema se determinó que el factor de asimetría, resolución y platos teóricos cumple lo indicado de acuerdo a los requisitos de la Farmacopea Americana USP vigente. Por tal razón el sistema cromatográfico es confiable y se procedió a realizar la validación de método analítico.
- En el estudio de estabilidad de las soluciones estándar, muestra y solución aptitud de sistema mediante el análisis estadístico de correlación de los datos, se obtuvo una estabilidad de 8 h para la solución estándar, 24 h para la solución muestra y 5 h para la solución aptitud de sistema.
- El Enalapril Maleato es un fármaco que sufre procesos de descomposición mediante hidrólisis alcalina ya que se hidroliza a Enalaprilat por un mecanismo de reacción de desesterificación hidrolítica en un porcentaje de 74 %, sufre también procesos de degradación por hidrólisis ácida a un 25 % de Enalapril Dicotopiperazina por un proceso de ciclización térmica y degradación por hidrólisis neutra en menor proporción a Enalaprilat y Enalapril Dicotopiperazina.
- Los ensayos de estrés para el Enalapril Maleato con matriz confirmó el resultado de la hidrólisis alcalina con principio activo, obteniendo una degradación del 99 % del fármaco a 98 % de Enalaprilat como principal producto de degradación para esta ruta. También se observó una degradación del 98 % de Enalapril Maleato a 5.5 % de Enalaprilat en la ruta de degradación por hidrólisis ácida.
- El método desarrollado es específico ya que los excipientes de la matriz de la tableta y los productos de degradación Enalaprilat y Enalapril Dicotopiperazina no causan interferencia en la cuantificación del principio activo Enalapril Maleato , demostrando así que el método cumple con el requisito de Especificidad exigido en la validación de métodos analíticos indicadores de estabilidad, con una probabilidad de 95 % de confianza en los resultados generados, aceptando así la hipótesis nula planteada que nos indica que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos.

- 
- El método analítico desarrollado cumple con los requisitos de Linealidad del sistema y Linealidad del método según los resultados obtenidos existe una correlación entre la variable independiente y la variable dependiente (concentración Vs Áreas) con un nivel de confianza del 95 %.
  - El método desarrollado es preciso, exacto y robusto de acuerdo al análisis de los resultados obtenidos con un nivel de confianza del 95 %.
  - El método analítico desarrollado cumple repetibilidad del sistema con un coeficiente de variación de 0.292 % menor respecto al valor de aceptación según las tablas de la AEFI (2.74 %), también se obtuvo un valor de 0.140 % para la repetibilidad del método menor al valor de las tablas de la AEFI ( 3.88 %), en cuanto a la precisión intermedia se demostró mediante un análisis de varianza anidado (ANOVA) que no hay influencia de las variables (analista y día) en la variable respuesta ( % Recuperación) con un nivel de confianza del 95 %. En base a estos resultados se demuestra que el método es preciso.
  - El método desarrollado y validado por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con arreglo de Diodos es sencillo, económico y cumple con los requisitos de pureza de pico tanto para el principio Enalapril Maleato y productos de degradación con un valor dentro del umbral de referencia de 995 y una diferencia espectral aceptable del 0.5 %.



## CAPÍTULO VI



---

## RECOMENDACIONES

## 6 RECOMENDACIONES

- Se recomienda que la solución amortiguadora del Buffer sea preparada el mismo día del análisis ya que las sales con el tiempo tienden a precipitar.
- Es recomendable que las muestras preparadas sean filtradas en viales de color ámbar para evitar la degradación del principio activo por acción de la luz.
- Al momento de realizar la degradación del principio activo para la obtención del Enalapril Dicotopiperazina, tener cuidado con el tiempo de exposición a la temperatura ya que la sobreexposición evidenciable por un color marrón oscuro puede llevar a la obtención de productos de degradación del Enalapril Dicotopiperazina.
- La columna a utilizar debe ser adecuadamente lavada a la temperatura de 35 °C con 100 % de agua grado HPLC para evitar la cristalización del fosfato monobásico de potasio, y almacenada con solvente orgánico metanol o Acetonitrilo HPLC.
- El control de la temperatura es importante para la simetría de los picos, por lo que debe ser monitorizado a lo largo del análisis.
- La estabilidad del Enalapril Maleato en interacción con los excipientes de acuerdo a los estudios de degradación forzada se ve afectada en mayor medida en medios alcalinos y ácidos por lo que se recomienda que al momento se realizar los estudios de preformulación en el desarrollo de un producto farmacéutico con Enalapril Maleato, evitar aquellas matrices básicas y ácidas que puedan acelerar la formación de productos de degradación en producto terminado.





## CAPÍTULO VII



---

## BIBLIOGRAFIA

## 7 BIBLIOGRAFÍA

1. Agencia Estatal de Medicamentos y Tecnología en Salud (AGEMED). (2018). LISTA NACIONAL DE MEDICAMENTOS ESENCIALES 2018 – 2020. En A. E. (AGEMED), *LISTA NACIONAL DE MEDICAMENTOS ESENCIALES 2018 – 2020* (pág. 71). La Paz- Bolivia: UNFPA – BOLIVIA.
2. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. (s.f.). *Validación de métodos analíticos*. Barcelona, España.
3. Baertschi, S. W. (2005). *Steven W. Baertschi, Eli Lilly and Company*. Indianapolis, Indiana, U.S.A.: Taylor & Francis Group, LLC.
4. Blessy Mn, R. (Septiembre 2013). Degradación de fármacos, pruebas de estrés. *Department of Pharmaceutical Analysis, Institute of Research and Development, Gujarat Forensic Sciences University, Sector-18A*.
5. Brenner, D. P. (1987). *Analytical Profiles of Drugs substances, Enalapril Maleato* (Vol. 16).
6. Causas de muerte 2008 [base de datos en línea]. (2008). Ginebra.
7. Causas de muerte 2008, Ginebra. (2008).  
[http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/cod\\_2008\\_sources\\_method.s.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_method.s.pdf).
8. Charegaonkar, P. S. (s.f.). *Pruebas de Identificación de Drogas en Formulaciones Farmacéuticas para Cromatografía en Capa Fina* ( 2 da edición ed.).
9. Departamento de sustancias de referencia . Centro de Investigación y desarrollo de medicamentos. (2007). Obtención de Enalapril Dicotopiperazina como Sustancia de Referencia. *Latin American Journal of Pharmacy*, 131.
10. Dusing R, K. G. (1987). Baroreflex setting and sensitivity in normal subjects: effects of pharmacologic inhibition of the angiotensin I converting enzyme. *Am J Cardiol*. En K. G. Dusing R, *Dusing R, Kayser G, Wagner S* (págs. 59:50D-54D).

11. Ercolano, I. P. (2009). Estabilidad de drogas y medicamentos. En I. P. Ercolano, *Estabilidad de drogas y medicamentos* (págs. 28-29). Buenos Aires, Argentina: VR. S.A.
12. Farmacopea Americana USP 42 NF 37. (2019). En *Farmacopea Americana USP 42 NF 27* (págs. 6,293). 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852.; Copyright © 2018 The United States Pharmacopeial Convention.
13. Farmacopea Americana USP 42 NF 37. (2019). Farmacopea Americana USP 42 NF 37. En T. U. CONVENTION, *Farmacopea Americana USP 42 NF 37* (Vol. 1, pág. 1651).
14. Gilman, G. a. (2007). *Las bases farmacológicas de la terapeutica*. México: Mc Graw Hill.
15. Jato, J. L. (2001). *Tecnología Farmacéutica* (Vol. 1). (J. L. Jato, Ed.) Madrid, España: Sintesis S.A.
16. Lim SS, V. T. (1190 - 2010). . *A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions,*.
17. M.M. Al-Omari, M. A. (Diciembre de 2000). Effect of the drug-matrix on the stability of enalapril. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 899.
18. Macian, R. S. (1996). *Estabilidad de Medicamentos*. Barcelona.
19. Monika Bakshi, S. S. (19 de enero de 2002). Desarrollo de métodos de ensayo validados que indica estabilidad, revisión crítica. *análisis de Departamento de productos farmacéuticos, Instituto Nacional de la industria farmacéutica educación e investigación, Sector 67, S.A.S.*
20. Opie, H. L. (1992). Angiotensin-Converting Enzyme inhibitors: Scientific Basis for Clinical Use. En H. L. Opie, *Angiotensin-Converting Enzyme inhibitors: Scientific Basis for Clinical Use*. USA: Wiley-Liss.
21. Organización mundial de la Salud. (2010). *Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no trasmisibles*. Ginebra 2011.
22. Oscar Alberto Quattrocchi, S. A. (1992). *Introducción al HPLC*. Buenos aires, Argentina.

23. Oscar Alberto Quattrocchi, S. A. (1992). *Introducción al HPLC*. Buenos aires, Argentina: Artes Gráficas Farro S.A.
24. PABA, J. E. (2013). Estudios de estabilidad física y química de una preparación . *Universidad Nacional de Colombia*, 19,20,21,22.
25. *PubChem*. (29 de Junio de 2005). Recuperado el 22 de julio de 2019, de PubChem: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enalapril\\_maleate#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enalapril_maleate#section=Top)
26. Quattrocch, O. A. (1992). Introducción aL HPLC. En O. A. Quattrocchi, *Introducción aL HPLC* (pág. 277). Buenos aires,Argentina: Artes Graficas Farro S.A.
27. QUIMICA, U. C. (2008). *GUIA DE CROMATOGRAFÍA*. Caracas.
28. Roger K. Verbeeck, I. K. (2017). Biowaiver Monographs for Immediate-Release Solid Oral Dosage. *Elsevier*, 2,3.
29. Singh, B. S. (2002). Development of stability - indicating assay methods - critical review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1011-1040.
30. Stahl, M. (1 de Abril de 2003). Análisis de pureza de pico en HPLC y CE utilizando tecnología de arreglo de diodos. (A. Technologies, Ed.) *Agilent Technologies*(5988-8647 EN), 1-15.
31. Tania Marquez,Ilsa Corrales, Manuel Gil, Luis Martinez. (2006). Obtención de Enalapril Dicotopiperazina como sustancia de referencia. *Latin American Journal of Pharmacy* .
32. Ulm EH, H. M. (1982). Enalapril maleate and a lysine analogue (MK-521). En H. M. Ulm EH, *Enalapril maleate and a lysine analogue (MK-521)* (pág. 357 .362).
33. Zan, M. M. (2011). Utilización de Quimiometría para mejorar el rendimiento de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución. (U. N. Litoral, Recopilador)

<b>CONTENIDO</b>		Pág.
<b>CAPÍTULO</b>		
I.....		17
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>		
7		1
1	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	1
8		
1.1	Antecedentes.....	1
8		
1.2	Justificación.....	2
1		
1.3	Planteamiento del Problema.....	22
1.4	Objetivos.....	2
3		
1.4.1	Objetivo general.....	
23		
1.4.2	Objetivos específicos.....	
23		
1.5	Hipótesis.....	2
3		
<b>CAPÍTULO</b>		
II.....		24
2	<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	25
2.1	Introducción.....	2
5		
2.2	Generalidades.....	2
5		
2.3	Métodos analíticos indicadores de estabilidad.....	26
2.4	Situación reglamentaria de los ensayos de estabilidad mediante un método analítico indicador de estabilidad.....	28
2.5	Estudios de degradación forzada.....	28
2.5.1	Objetivos de los estudios de degradación forzada.....	29
2.5.2	Degradación Hidrolítica.....	30

2.5.3	Degradación Térmica.....	30
2.5.4	Degradaciones Oxidativas.....	32
2.5.5	Degradación Fitolítica.....	32
2.5.6	Humedad.....	33
2.6	Revisión de la literatura sobre Métodos Analíticos Indicadores de Estabilidad...34	
2.7	Desarrollo de métodos indicadores de estabilidad validados.....	35
2.7.1	Pasos a seguir para el desarrollo de métodos indicadores de estabilidad.....	36
	Paso I.- Estudio de la estructura del principio activo para evaluar las probables rutas de descomposición.	36
2.8	Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	39
2.9	Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas del Enalapril Maleato.....	40
2.9.1	Descripción .....	40
2.9.2	Propiedades generales.....	41
2.9.3	Estabilidad del Enalapril Maleato.....	42
2.9.4	Mecanismo de Acción.....	43
2.9.5	Farmacocinética.....	43
2.9.6	Perfil Farmacocinético.....	45
2.9.7	Estabilidad.....	45
2.10	Desarrollo de métodos.....	46
2.10.1	Bases de la Separación.....	49
2.10.2	Análisis de compuestos disociables.....	49
2.10.3	Selección de la Fase Móvil.....	50
2.10.4	Estandarización de Métodos Analíticos.....	50
2.10.5	Pureza de pico.....	51
2.10.6	Validación de Métodos Analíticos Indicadores de Estabilidad.....	55
2.10.7	Características de Desempeño Analítico.....	56
2.10.8	Datos requeridos para la Validación.....	62
	CAPÍTULO III.....	63
	DISEÑO METODOLÓGICO.....	63
3	DISEÑO METODOLÓGICO.....	64
3.1	Equipos o Instrumentos.....	65
3.2	Materiales y reactivos.....	67

3.3	Procedimiento de investigación.....	68
3.3.1	Preparación de la Matriz.....	68
3.3.2	Pruebas preliminares previo al Desarrollo del Método Analítico Indicador de Estabilidad.....	69
3.4	Desarrollo del método analítico indicador de estabilidad.....	74
3.4.1	Barrido Espectral por Espectrofotometría de Absorción UV – Visible.....	74
3.4.2	Selección de las Condiciones Cromatográficas.....	75
3.4.3	Desarrollo del método analítico.....	75
CAPÍTULO		
IV	.....	110
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	111
4.1	Identificación del Principio Activo y Productos de Degradación.....	111
4.1.1	Resultados de la identificación por espectrofotometría de absorción IR.....	111
4.1.2	Resultados de la Identificación por Cromatografía en Capa Fina.....	114
4.2	Desarrollo del Método Analítico Indicador de Estabilidad.....	117
4.2.1	Selección de la longitud de Onda.....	117
4.2.2	Identificación del principio activo por cromatografía líquida de alta eficiencia, pureza de pico de principio activo y productos de degradación.....	119
a)	Identificación de Ácido Maleico.....	119
b)	Identificación de producto de degradación Enalaprilat.....	120
4.2.3	Ensayo de robustez.....	125
4.2.4	Estabilidad de las soluciones.....	142
4.2.5	Resultados de Aptitud de Sistema.....	161
4.2.6	Estudios de Stress (descomposición forzada) con el principio activo.....	165
4.2.7	Estudios de Stress (descomposición forzada) con el principio activo y matriz...185	
4.2.8	Validación del Método Analítico Indicador de Estabilidad .....	194
CAPÍTULO V.....		
5	CONCLUSIONES.....	236
CAPÍTULO VI.....		
		239



---

6	RECOMENDACIONES.....	240
	CAPÍTULO VII.....	241
7	BIBLIOGRAFÍA.....	242



---

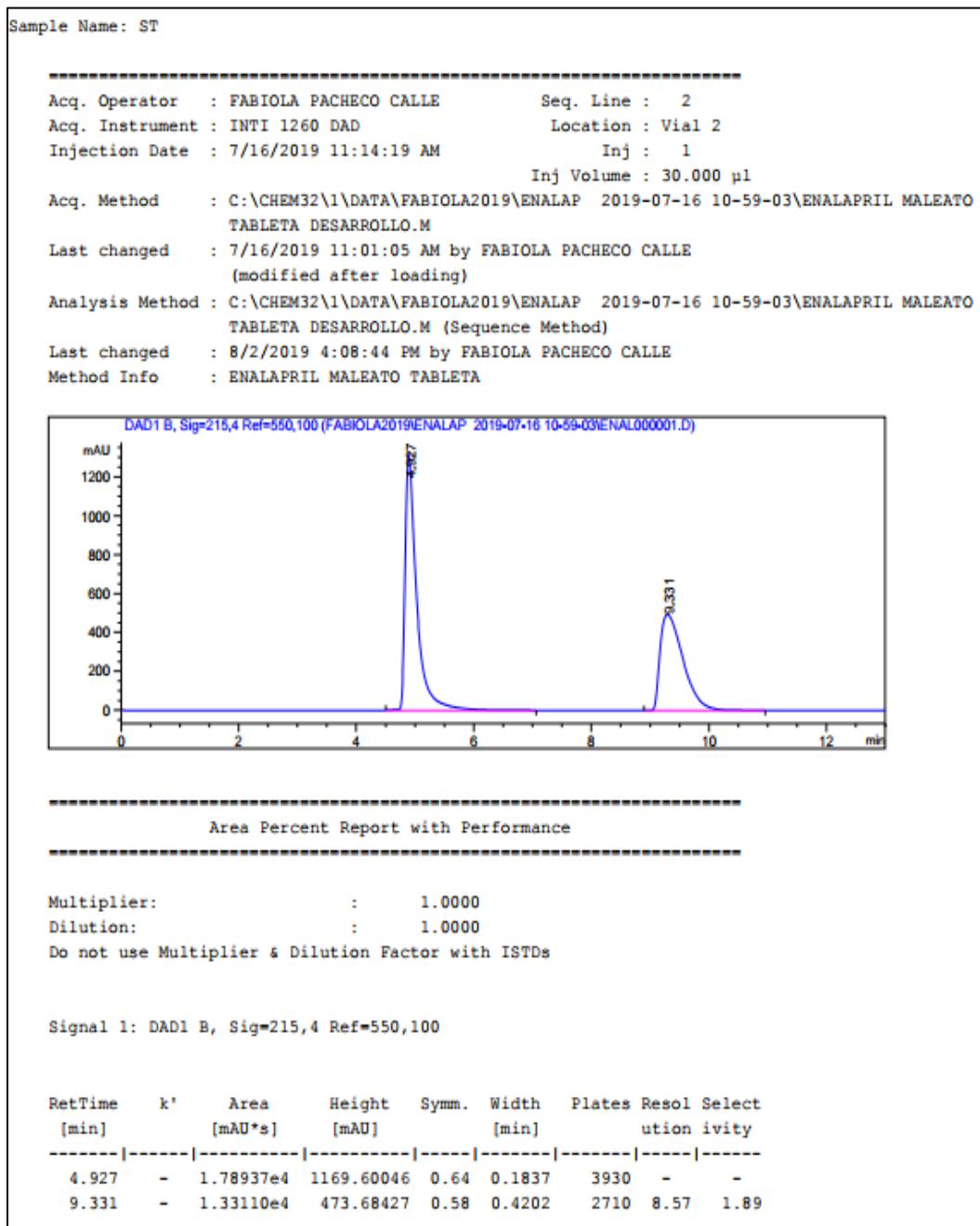
## **ANEXOS**

---

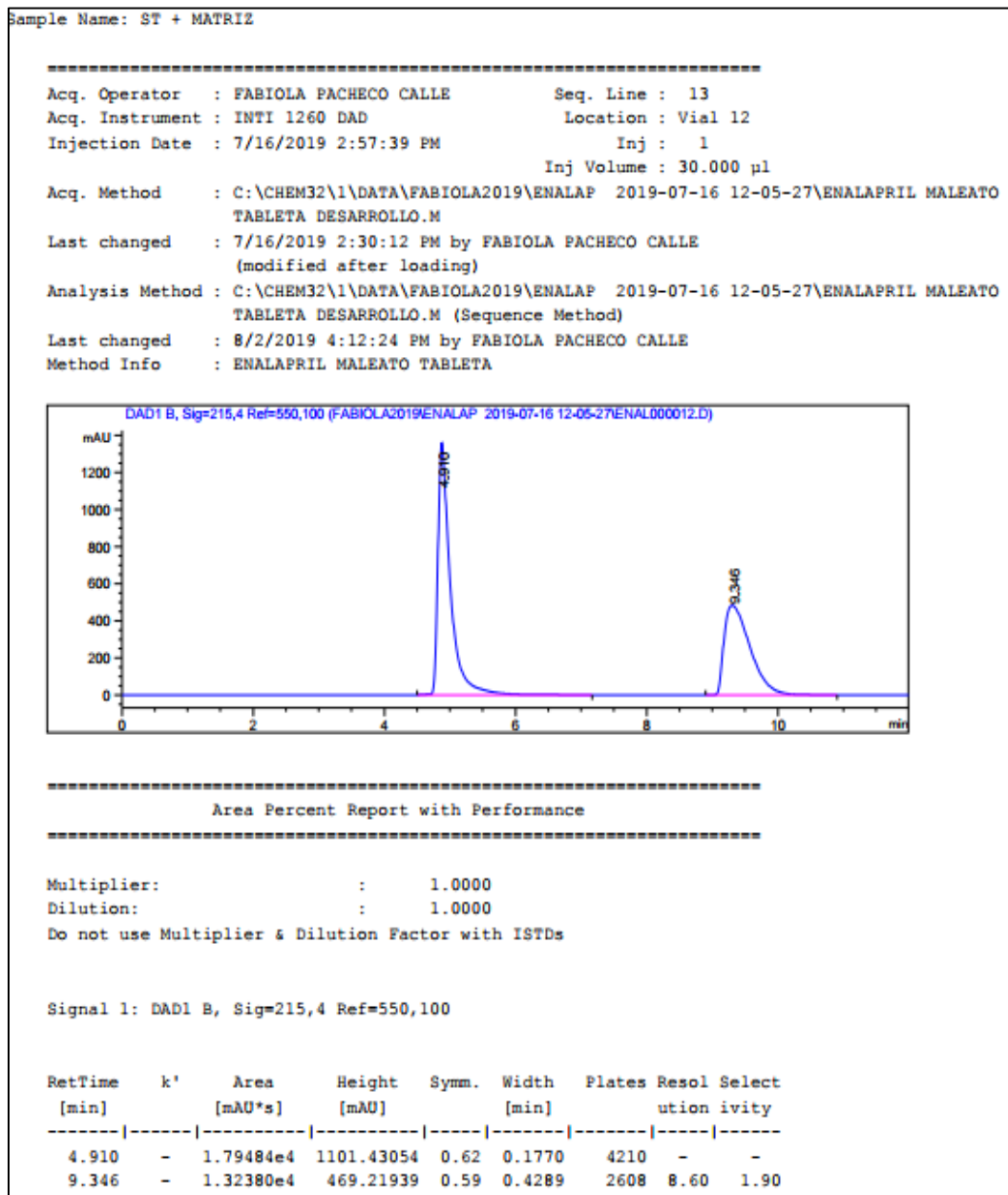
Los anexos correspondientes a los Cromatogramas de la validación del método analítico indicador de estabilidad se encuentra en el CD adjuntó en el presente trabajo

### **ANEXOS**

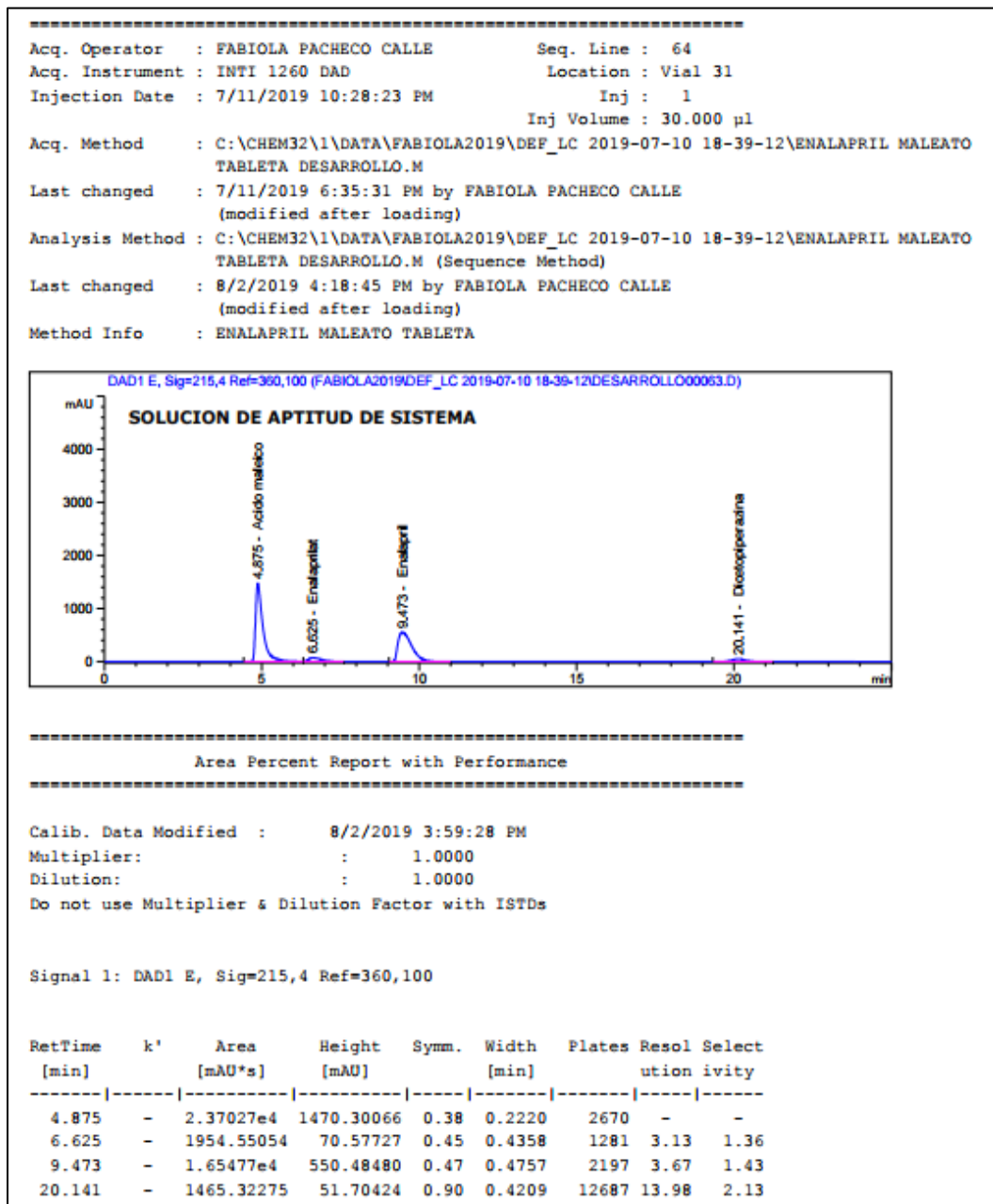
#### **ANEXO 1. Cromatograma de Especificidad, Solución estándar**



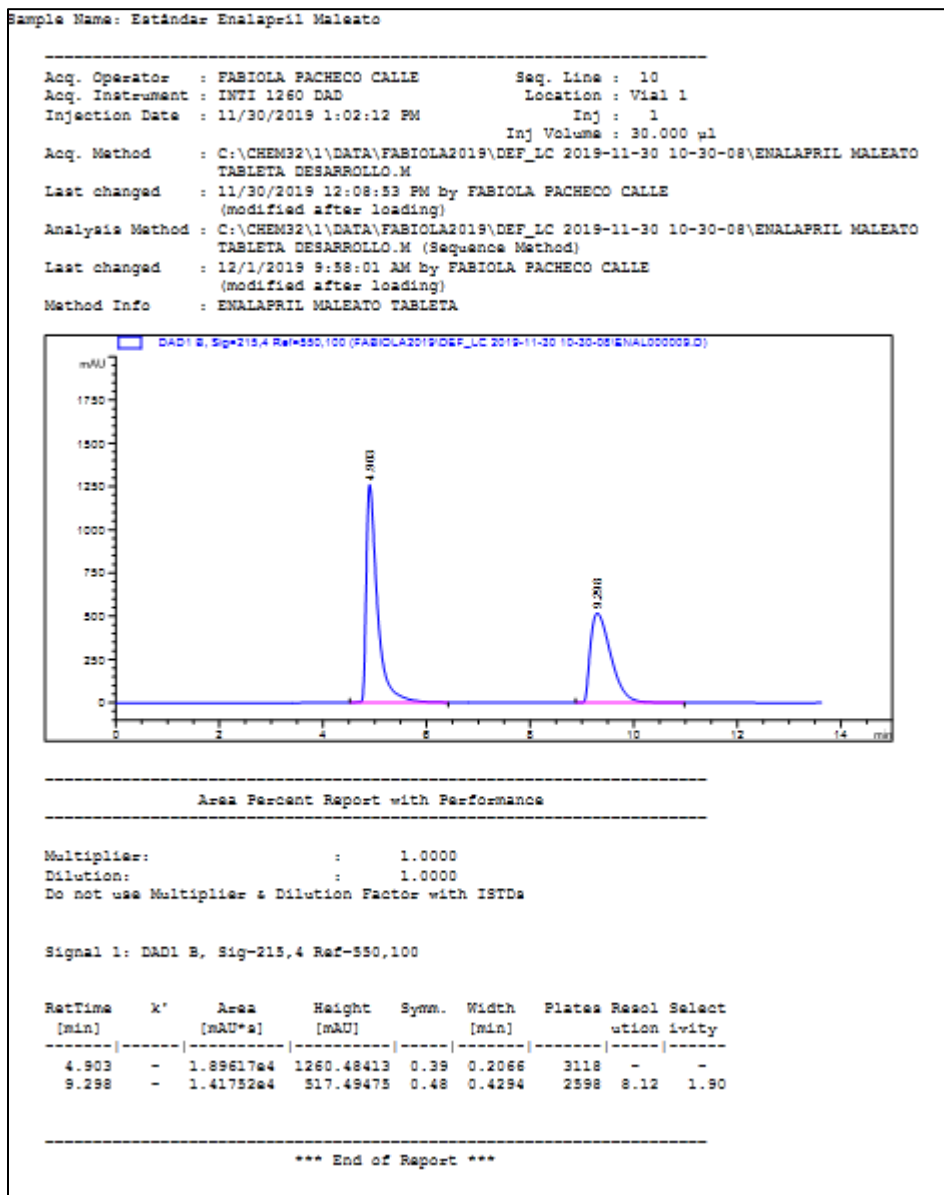
**ANEXO 2. Cromatograma de Especificidad, Solución estándar + matriz**



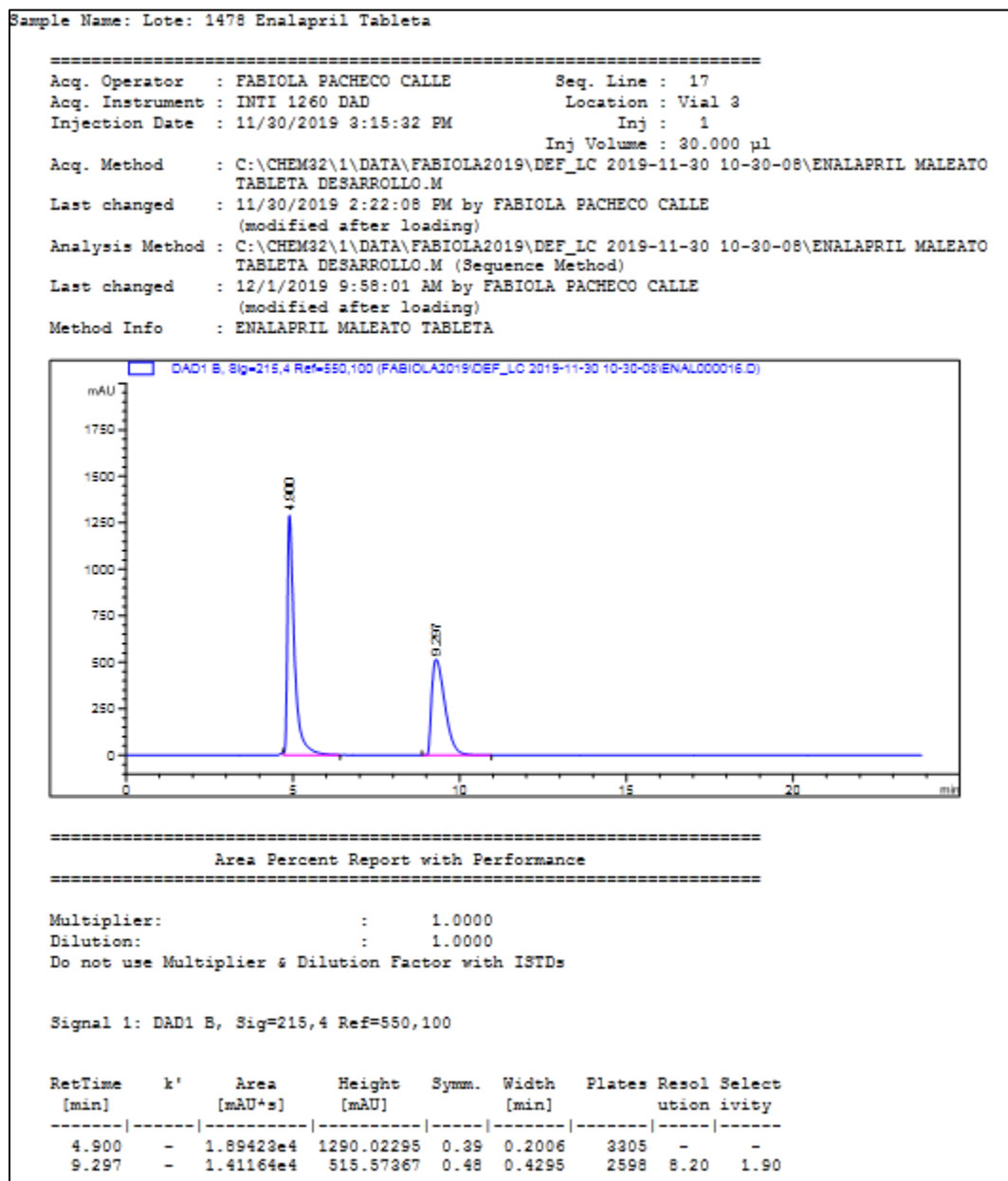
### ANEXO 3. Solución aptitud de sistema



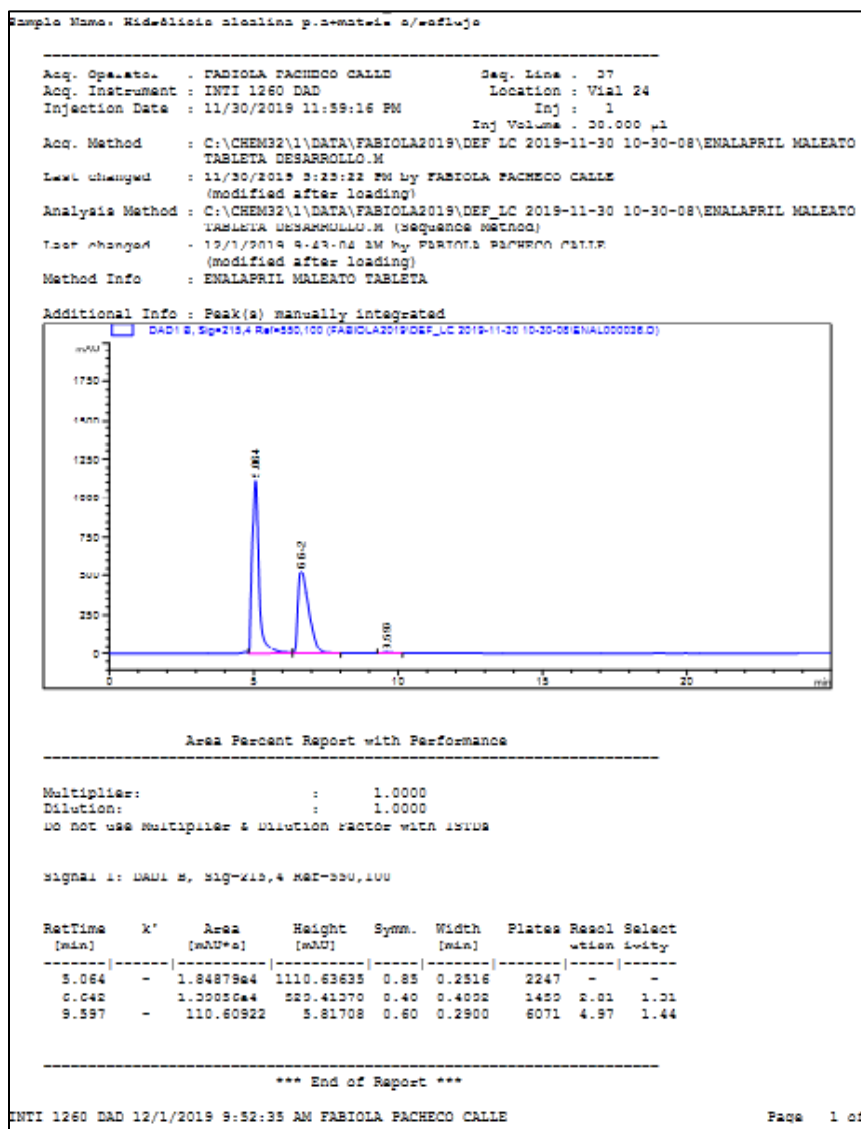
**ANEXO 4. Estándar de Enalapril Maleato del ensayo de comprobación de Producto terminado**




**ANEXO 5. Cromatograma de Enalapril Maleato, Tableta, Producto Terminado**



## ANEXO 6. Ruta de degradación principal de degradación por Hidrólisis alcalina (principio activo y matriz)



ANEXO 7. Certificado de Estándar primario de Enalaprilat USP

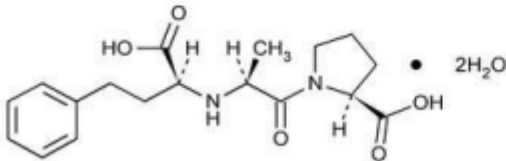


## Certificate


### ENALAPRILAT

*(1-[N-[(S)-1-Carboxy-3-phenylpropyl]-L-alanyl]-L-proline dihydrate)*

USP Catalog No.:	1235274
USP Lot No.:	R024A0




CAS No.:	84680-54-6
Molecular Formula:	C <sub>38</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ·2H <sub>2</sub> O
Molecular Weight:	384.42



**LABEL TEXT**

For use with specified USP compendial tests. Refer for use as a drug. See USP prior to use at www.usp.org/standards.



L02: R024A0

**USP REFERENCE STANDARD**

**ENALAPRILAT 300 mg**

Danger! May damage fertility or the unborn child. May cause damage to organs (cardiovascular system) through prolonged or repeated exposure.

Do not dry. For quantitative applications, determine the water content gravimetrically at the time of use and use a value of 0.907 mg of enalaprilat per mg of material on the anhydrous basis. Keep container tightly closed. Hygroscopic. Protect from light.

USP, 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD • +1-301-891-6868  
CAT No. 1235274 Material mfg. in India

Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. If exposed or concerned: Get medical advice/attention. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

*Jeri L. Joth*

Quality Assurance

ANEXO 8. Certificado de Estándar primario de Enalapril Maleato USP

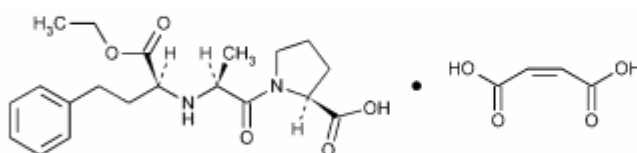




U.S. Pharmacopeia  
The Standard of Quality™

# USP Certificate

## Enalapril Maleate LOT K0L429



**Molecular Formula**

**C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>**

**Molecular Weight**

**492.52**

**CAS Number**

**76095-16-4**

**LABEL TEXT**



**USP REFERENCE STANDARD**  
**ENALAPRIL MALEATE 200 mg**

**Danger!** Causes serious eye irritation. May damage fertility or the unborn child. May cause damage to organs (cardiovascular system) through prolonged or repeated exposure.

Do not dry. For quantitative applications, use a value of 0.865 mg of enalapril maleate per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Protect from light.

USP, 12011 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-8888  
CMT No. 120580 Manufactured in India

Independently over-labeled for USP compliance

For use with methods described in USP <41> and USP <42> for the purpose of stability testing. It is not for use as a reference standard for the purpose of assay or for other purposes.

Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wash thoroughly after handling. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection if exposed or concerned. Get medical advice/attention if exposed. Store continuously well-ventilated for several minutes. Remove contaminated, if present and stop to do. Continue using if eye irritation persists. Get medical advice/attention. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.