



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO.

Facultad de química.



Identificación por UHPLC acoplado a MS de los productos de la
degradación forzada de Bromuro de Pinaverio en fase sólida y
solución.

Tesis

Para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Presenta:

Jonathan Alejandro Zúñiga Domínguez.

Asesor Académico:

Dr. Jorge Javier Ramírez García.

Asesor Externo:

Dra. María de la Luz Reyes Reyes.

“Aquellos que tienen el privilegio de saber,
tienen la obligación de actuar”

Albert Einstein.



ÍNDICE

TÓPICO.	Página
INTRODUCCIÓN	13
RESUMEN	14
1. ANTECEDENTES:	16
2. MARCO TEÓRICO:	18
2.1. AGUA	18
2.1.1. PROPIEDADES DEL AGUA	18
2.1.2. CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR SUSTANCIAS QUÍMICAS ORGÁNICAS	19
2.2. BROMURO DE PINAVERIO	22
2.2.1. PRINCIPALES PROPIEDADES DEL BROMURO DE PINAVERIO	22
2.2.2. USO DE BROMURO DE PINAVERIO EN EL IMSS.	23
2.3. TOXICIDAD EN ORGANOHALOGENADOS	23
2.4. DEGRADACIÓN DE ORGANOHALOGENADOS	24
2.4.1. FOTODEGRADACIÓN DE ORGANOHALOGENADOS	24
2.4.2. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN	24
2.4.3. POSIBLES IMPUREZAS DE DEGRADACIÓN DE BROMURO DE PINAVERIO	25
2.5. CROMATOGRAFÍA	27
2.5.1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS	27
2.6. ESPECTRO ULTRA VIOLETA-VISIBLE	28
2.6.1. BARRIDO UV	28
2.7. ESPECTOMETRO DE MASAS	29
2.7.1. IONIZACIÓN POE ELECTROSPRAY	29
2.7.2. ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO	30
JUSTIFICACIÓN:	32
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:	32
METAS:	32
OBJETIVOS:	33
OBJETIVO GENERAL:	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	33



TÓPICO.	Página
HIPÓTESIS:	33
3. METODOLOGÍA	35
3.1. EQUIPOS Y REACTIVOS	35
3.2. EQUIPOS	35
3.3. OBTENCIÓN DE ESPECTROS ULTRAVIOLETA.	36
3.4. DESARROLLO DEL MÉTODO HPLC-UV PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BROMURO DE PINAVERIO.	36
3.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO BÁSICO POR HPLC-UV	37
3.6. PRECISIÓN DEL SISTEMA:	39
3.7. PRECISIÓN:	39
3.8. EXACTITUD:	39
3.9. LINEALIDAD:	40
3.10. SELECTIVIDAD:	41
3.11. ESTABILIDAD DE LA FASE MÓVIL:	41
3.12. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA:	41
3.13. ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR:	41
3.14. ROBUSTEZ:	41
3.15. DEGRADACIÓN FORZADA.	43
3.15.1. FASE ACUOSA:	43
3.15.2. FASE SÓLIDA:	44
3.15.3. CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN:	45
3.16. IDENTIFICACIÓN DE IMPUREZAS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN POR UHPLC ACOPLADO A MASAS.	47
4. RESULTADOS.	49
4.1. MEDICIÓN DEL MÁXIMO DE ABSORCIÓN DE PINAVERIO Y SUS IMPUREZAS.	49
4.2. ESPECTROS ULTRAVIOLETA DE PIN Y CADA IMPUREZA	50
4.3. DESARROLLO DEL MÉTODO HPLC	51
4.4. VALIDACIÓN	52
4.4.1. PRECISIÓN DEL SISTEMA:	53
4.4.2. PRECISIÓN:	55
4.4.3. EXACTITUD:	56



TÓPICO.	Página
4.4.4. LINEALIDAD:	59
4.4.5. ESTABILIDAD DE LA FASE MOVIL:	61
4.4.6. ESTABILIDAD DEL ESTANDAR:	62
4.4.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA:	62
4.4.8. SELECTIVIDAD:	63
4.4.9. ROBUSTEZ.	64
4.5. DEGRADACIÓN FORZADA.	66
4.5.1. FASE SÓLIDA:	66
4.5.2. FASE ACUOSA:	67
4.6. IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN POR UHPLC.	77
4.6.1. FASE ACUOSA.	79
5. CONCLUSIONES:	92
REFERENCIAS:	93
ANEXOS:	98

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Página.
Tabla 1: Principales contaminantes orgánicos y sus efectos.	19
Tabla 2: Concentraciones de los fármacos en agua residuales de argentina.	20
Tabla 3: Cuadro básico de medicamentos, bromuro de pinaverio.	23
Tabla 4: Impurezas de Bromuro de Pinaverio Durante la Síntesis.	25
Tabla 5: Pruebas que se realizaron a las muestras.	33
Tabla 6: Reactivos	35
Tabla 7: Equipos	35
Tabla 8: Condiciones del equipo HPLC para la identificación de impurezas de bromuro de pinaverio.	36
Tabla 9: Diferentes Métodos a desarrollar para cuantificar Bromuro de pinaverio y también para la identificación de sus productos de degradación.	37
Tabla 10: Preparación de las soluciones para las exactitudes al 80%, 100% y 120%	40



TABLA.	Página.
Tabla 11: Preparación de la solución madre de linealidad.	40
Tabla 12: Diluciones preparadas para la linealidad.	40
Tabla 13: Parámetros utilizados para evaluar las robusteces.	42
Tabla 14: Desarrollo de método analítico en HPLC.	51
Tabla 15: Gradiente utilizado para la validación del Método de Ensayo.	53
Tabla 16: Resultados del % de ensayo para la precisión del sistema	54
Tabla 17: Resultados de los principales parámetros de los Ensayos.	54
Tabla 18: Resultados de la precisión.	55
Tabla 19: Resultados de la prueba de exactitud al 80%	56
Tabla 20: Resultados de la prueba de exactitud al 100%	57
Tabla 21: Resultados de la prueba de exactitud al 120%	58
Tabla 22: Preparación, concentración y resultados de las soluciones de la linealidad.	59
Tabla 23: Resultados de las pruebas de estabilidad para la fase móvil.	61
Tabla 24: Estabilidad del estándar.	62
Tabla 25: Estabilidad de la muestra.	62
Tabla 26: Resultados de la selectividad de cada una de las impurezas de bromuro de pinaverio.	64
Tabla 27: Resultados y comparación de cada una de las robusteces corridas para este método.	65
Tabla 28: Resultados de la degradación forzada con calor a 80°C	68
Tabla 29: Tiempo vs concentración para determinar el orden de reacción.	69
Tabla 30: Resultados de la regresión lineal para la determinación del orden de reacción.	70
Tabla 31: Resultados de la degradación forzada con luz.	71
Tabla 32: Tiempo vs concentración para determinar el orden de reacción.	73
Tabla 33: Resultados de la regresión lineal para la determinación del orden de reacción.	75
Tabla 34: Resultados de la degradación forzada a pH de 12	76
Tabla 35: Condiciones del UHPLC para la identificación.	78



TABLA.	Página.
Tabla 36: Condiciones del MS para la Identificación de impurezas (Polaridad positiva).	78
Tabla 37: Estructuras propuestas de los productos de degradación de bromuro de pinaverio.	87

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura	Página.
Figura 1: Bromuro de pinaverio.	22
Figura 2: Espectro electromagnético.	29
Figura 3: Diagrama de bloques de la metodología.	34
Figura 4: Cromatograma de barrido ultravioleta en el equipo waters.	49
Figura 5: Barridos ultravioletas de bromuro de pinaverio y sus impurezas.	50
Figura 6: Cromatograma de la primera inyección de las cinco para la precisión del sistema.	54
Figura 7: Cromatograma 1 de 6 muestras preparadas para la precisión.	59
Figura 8: Cromatograma uno de tres muestras preparadas al 80% para la exactitud.	57
Figura 9: Cromatograma uno de tres muestras preparadas al 100% para la exactitud.	58
Figura 10: Cromatograma uno de tres muestras preparadas al 120% para la exactitud.	59
Figura 11: Cromatograma de la muestra adicionada al 0.1% de las impurezas para la selectividad.	64
Figura 12: Cromatograma de la muestra expuesta a 80°C y vacío durante 12 días.	66
Figura 13: Cromatograma de la muestra expuesta a luz durante 12 días.	67
Figura 14: Cromatograma de la muestra expuesta con calor durante 12 días.	68
Figura 15: Cromatograma de la muestra expuesta a la luz durante 12 días.	72



Figura	Página.
Figura 16: Cromatograma de la muestra expuesta a pH 12 durante 12 días.	77
Figura 17: Espectro de masas de PIN VI.	79
Figura 18: Espectro de masas de PIN V.	80
Figura 19: Espectro de masas de PIN.	80
Figura 20: Espectro de masas de PIN II.	81
Figura 21: Espectro de masas de PIN IV.	81
Figura 22: Espectro de masas de PIN.	82
Figura 23: Espectro de masas de impureza 1.	83
Figura 24: Espectro de masas de impureza 2.	83
Figura 25: Espectro de masas de impureza 3.	84
Figura 26: Espectro de masas de impureza 1.	85
Figura 27: Espectro de masas de PIN.	85
Figura 28: Espectro de masas de impureza 2.	86
Figura 29: Espectro de masas de impureza 3.	86
Figura 30: Espectro de masas de impureza 4.	87
Figura 31: Cromatograma de las robusteces con alta proporción de la fase móvil A.	98
Figura 32: Cromatograma de las robusteces con alta proporción de la fase móvil B.	98
Figura 33: Cromatograma de las robusteces con flujo de 0.5mL / min.	99
Figura 34: Cromatograma de las robusteces con flujo de 0.7mL / min.	99
Figura 35: Cromatograma de las robusteces con temperatura de la columna a 35°C.	100
Figura 36: Cromatograma de las robusteces con temperatura de la columna a 45°C.	100
Figura 37: Cromatograma de las robusteces con pH de 8.15.	101
Figura 38: Cromatograma de las robusteces con pH de 8.25.	101
Figura 39: Cromatograma del estándar al 20% para la linealidad.	102
Figura 40: Cromatograma del estándar al 40% para la linealidad.	102
Figura 41: Cromatograma del estándar al 60% para la linealidad.	102



Figura	Página.
Figura 42: Cromatograma del estándar al 80% para la linealidad.	103
Figura 43: Cromatograma del estándar al 100% para la linealidad.	103
Figura 44: Cromatograma del estándar al 120% para la linealidad.	103

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Gráfico	Página.
Gráfico 1: Linealidad del 20% hasta el 120%.	61
Gráfico 2: Degradación Forzada de Bromuro de Pinaverio con Calor.	68
Gráfico 3: Muestra expuesta al calor durante 12 días (orden cero)	69
Gráfico 4: Muestra expuesta al calor durante 12 días (orden uno)	70
Gráfico 5: Muestra expuesta al calor durante 12 días (orden dos)	70
Gráfico 6: Muestra expuesta con Luz durante 12 días.	72
Gráfico 7: Muestra expuesta con Luz durante 12 días (orden cero)	74
Gráfico 8: Muestra expuesta con Luz durante 12 días (orden uno)	74
Gráfico 9: Muestra expuesta con Luz durante 12 días (orden dos)	75
Gráfico 10: Muestra expuesta con pH 12, durante 12 días.	76



ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

ICH	International Conference on Harmonisation.
pH	Potencial de Hidrógeno.
UHPLC	Ultra-high performance liquid chromatograph.
°C	Grados Celsius.
HPLC	High performance liquid chromatograph.
v/v	Volumen / Volumen.
UV	Ultravioleta.
nm.	Nanómetros
mL	Mililitros.
min	Minutos.
µg	Microgramos.
mm	Milímetros.
re-dox	Óxido-Reducción.
O₂	Oxígeno.
mg	Miligramos.
PLM	Product Lifecycle Management.
MS	Mass Spectrometry.
SNC	Sistema Nervioso Central.
Vis	Visible.
Hz	Hertz.
p mol.	Picomol
µL	Microlitros.
CV	Coeficiente de Variación.
g	Gramos.
N	Normal.
cm	Centímetros.
r²	Coeficiente de determinación.
No	Número.
bar	Bares.
TR	Tiempo de retención.
ln	Logaritmo Natural.
m/z	Relación carga masa (Masa atómica / Número de carga del ion).
L	Litros.



INTRODUCCIÓN.

El estudio de los productos de un fármaco en las aguas residuales ha sido de suma importancia en los últimos años debido a que no se tiene la suficiente información de los posibles efectos que puedan tener los fármacos dentro de un ecosistema, y de la misma forma tampoco se conocen los efectos de sus respectivos productos de degradación. Sin embargo, los mismos terminan en los ecosistemas debido al sistema de desagüe, por lo tanto, son capaces de contaminar mares, ríos o lagos. Uno de entre los diversos Fármacos que se pudiera encontrar en las aguas residuales es el Bromuro de pinaverio, ya que es altamente recetado por el sector salud mexicano; Por lo tanto, este con sus posibles productos de degradación y metabolitos pueden estar presentes en el ambiente y provocar daño permanente a los ecosistemas.

En la presente tesis se llevó a cabo una degradación forzada de bromuro pinaverio para afirmar bajo qué condiciones se degradada (Luz, Calor y pH básico) y también saber cuáles son los productos de degradación del mismo. Por lo cual se realizó un desarrollo de un método analítico de ensayo para HPLC acoplado a espectrómetro de masas con una Columna Zorbax eclipse plus C18, que de manera consiguiente fue validado, posteriormente se obtuvo la cinética de degradación del bromuro de pinaverio.

Los productos de degradación sugeridos deben ser investigados más afondo con mayores pruebas de identidad, a través de métodos fisicoquímicos para que sean comprobados.



RESUMEN:

La presencia de compuestos farmacéuticos en los efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales se ha convertido, en los últimos años, en un potencial e importante problema medioambiental. Pese a que la concentración de los mismos es del orden de $\mu\text{g/L}$ o ng/L y que se documenta que de manera individual no generan grandes complicaciones, no se conoce con total seguridad el riesgo que puede generar sobre los ecosistemas acuáticos la combinación de varios de estos fármacos.

En esta tesis se estudió la degradación del fármaco conocido como bromuro de pinaverio el cual actúa como un antagonista del calcio, bloqueando el canal de calcio voltaje-dependiente de las células del músculo liso, induciendo una relajación de los tractos digestivo y biliar.

Se llevó a cabo pruebas de degradación forzada por medio de calor a 80°C , luz y pH básico de 12. Los resultados demuestran que Bromuro de pinaverio es sensible a las exposiciones de calor en fase acuosa. Adicionalmente, mediante UHPL acoplado a MS se demostró que el principal producto de degradación formado es (2-Bromo-4, 5-dimethoxyphenyl) metanol, tanto para las exposiciones a luz como las exposiciones a calor. Sin embargo, en la exposición a pH de 12 demostró ser estable durante al menos 12 días.

La cinética de degradación de Bromuro de pinaverio indica una velocidad de $v = 0.0153 \mu\text{g}/(\text{mL min})$ por exposición a 80°C en fase acuosa con un tiempo de vida media de 277.94 horas, la cinética de degradación para la exposición con Luz en fase acuosa la velocidad es de $v = 0.0008 \mu\text{g}/(\text{mL min})$ con un tiempo de vida media de 5235.20 horas.

Con base en lo anterior se puede concluir que el método analítico desarrollado, basado en la técnica por cromatografía de líquidos acoplado a un detector de espectrometría de masas (UHPLC- MS) permite la detección y cuantificación de Bromuro de Pinaverio y la identificación de sus productos de degradación en agua acondicionada y en medio sólido. Esta Investigación permite contar con estudios preliminares para poderlo aplicar en aguas residuales.



Capítulo 1: Antecedentes.



CAPÍTULO 1

1. ANTECEDENTES:

El bromuro de pinaverio es un fármaco poco estudiado, pero que con el paso del tiempo va creciendo en popularidad al ser incluido en el sector salud mexicano, por lo cual a continuación se mencionan los autores que han trabajado con el mismo:

En la industria farmacéutica se hacen estudios de estabilidad para obtener datos sobre la degradación del fármaco en condiciones normales de almacenamiento y bajo condiciones de degradación forzada con el propósito de poder predecir sus productos de degradación ya sea por luz, humedad, calor o pH. Para llevar a cabo estos estudios, es necesario diseñar métodos que permitan conocer la pureza de los compuestos, y a su vez observar las impurezas formadas después de su degradación (Bakshi. 2002).

El Bromuro de pinaverio ha sido estudiado por Amrunthraj A. K. y Venkatesha B. M. en el 2014, los cuales realizaron un método de ensayo para determinar bromuro de pinaverio de forma pura y de manera formulada, la selectividad del método que desarrollaron, fue demostrada a través de estudios de estrés en diferentes condiciones como fue medio ácido, básico, oxidativo, fotolítico y térmico durante 24 horas en cada caso. La señal correspondiente a bromuro de pinaverio se muestra libre de contaminantes provenientes de la degradación, demostrando así que el método es selectivo. Posteriormente del método fue validado de acuerdo a las guías ICH. La selectividad fue confirmada con la adición de un estándar de bromuro de pinaverio; la fase móvil del método fue buffer de fosfatos a pH de 6.5 con metanol a 40°C en una columna Acquity UPLC BEH C18 100 mm* 2.1 mm 1.7 µm (Amrunthraj. 2014).

M. Balaji, Pawanjeet J. Srinivasarao V. Desarrollaron un método de ensayo de Bromuro de pinaverio por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), para la cuantificación del bromuro de pinaverio y la identificación de sus productos de degradación. A través de un método de ensayo. La separación se realizó por un método isocrático con una columna Zorbax SB C8 (4.6x250) mm, 5 µm y como fase móvil A (0.1% de ácido ortofosfórico con una solución B (Acetonitrilo) 30:70



v/v por un flujo de 1.0 mL/min. El detector UV fue leído a una longitud de onda de 245 nm y a temperatura de 25°C. El tiempo de retención fue de 4.84 min y la linealidad se realizó de 20-150 µg/mL con un coeficiente de correlación de 0.9999. Toda la metodología fue validada de acuerdo a las guías de la Conferencia internacional de Armonización (ICH). El bromuro de pinaverio fue expuesto a pH ácido, básico, oxidación, calor y condiciones fotolíticas (Balaji. 2014).

Sachin T Deodhe, Disha M Dhabarde y Manish A Kamble en el 2016 desarrollaron un método selectivo por HPLC para la determinación de bromuro de pinaverio en forma de tabletas. Se utilizó una columna Phenomenox C18 (250 x 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 5µm) con un buffer de acetato de amonio a pH 3.0 y Acetonitrilo (20:80) como fase móvil. Con un flujo de 1 mL/min y un detector UV a 214 nm de longitud de onda por detector UV. El bromuro de pinaverio eluye a los 5.067 min. El método fue validado, determinando la linealidad, exactitud, precisión, y robustez de acuerdo a las guías ICH. Los estudios de degradación forzada se realizaron a pH ácido, básico, temperatura, fotólisis y estrés oxidativo, donde los picos formados fueron monitoreados. El método se realizó con una concentración entre 12.5-75µg/mL (r^2 de 0.999), exactitud (% recobro de 100.2% y Desviación estándar relativa menor que 2%). (Sachin 2016).



2. MARCO TEÓRICO:

2.1. AGUA

El agua es una sustancia de capital importancia para la vida con excepcionales propiedades consecuencia de su composición y estructura. Es una molécula sencilla formada por tres pequeños átomos, uno de oxígeno y dos de hidrógeno, con enlaces polares que permiten establecer puentes de hidrógeno entre moléculas adyacentes (Carbajal y González, 2012).

Los organismos vivos están compuestos de agua en una gran proporción, desde un 45% en insectos, pasando por un 70% en mamíferos y en algunos como las medusas se compone hasta en un 95% de sus cuerpos. Por lo tanto, es el componente inorgánico más abundante de los seres vivos y sirve como regulador de temperatura, transportador de nutrientes, sales y desechos dentro de los seres vivos. Por lo cual, sin agua no existe la vida. (Hernández 2010)

2.1.1. PROPIEDADES DEL AGUA

Las propiedades químicas más relevantes del agua son:

(a) HIDRATACIÓN, o penetración del agua dentro de la red reticular del cristal, formando compuestos químicos denominados "hidratos".

(b) HIDRÓLISIS, o descomposición mutua entre la sal que se disuelve y el agua.

(c) ÓXIDO-REDUCCIÓN. Se da tanto en la zona de infiltración y en el agua libre: implica el tránsito de electrones. El equilibrio re-dox se da entre el O₂ aportado por el aire disuelto en el agua que se infiltra, y el consumo del gas en procesos de oxidación de las sustancias reductoras existentes en el medio.

(d) pH, que puede provocar reacciones de disolución de sales presentes en rocas y minerales, sobre todo en condiciones ácidas (así la provocada por "lluvia ácida", rica en ácidos sulfúrico y nítrico de alto poder corrosivo frente a materiales naturales y artificiales) (Marín, 2003).



2.1.2. CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR SUSTANCIAS QUÍMICAS ORGÁNICAS

De acuerdo a Sanchón, uno de los principales contaminantes del agua son las sustancias químicas orgánicas. En este grupo de contaminantes se encuentran todas aquellas sustancias provenientes de la síntesis química para cualquier uso humano (Sanchón, 2002).

Los compuestos químicos orgánicos al momento de ser liberados en las aguas residuales no son degradadas totalmente por el ambiente por lo cual presentan un peligro eminente para los ecosistemas.

Los principales productos que se clasifican en este grupo de contaminantes y sus efectos en el ambiente se encuentran listados en la Tabla 1.

Tabla 1: Principales contaminantes orgánicos y sus efectos.

Fármacos	Esteroides y anticonceptivos	Feminización en machos
	Antibióticos	Resistencia microbiana. Alteración de la cadena trófica.
Aditivos industriales.	Bisfenol-A	Actividad estrogénica en ratas y hormonal en seres humanos. Aumento del riesgo de cáncer de mama.
	Ftalatos	Alteraciones en el embarazo y abortos involuntarios
	Alquilfenoles	Alteraciones en el desarrollo del proceso reproductivo.
Productos de higiene y cuidado personal.	fragancias con almizcle	Poder cancerígeno en roedores
	Parabenos	Actividad estrogénica
	desinfectantes y antisépticos	Resistencia microbiana y biocida
Surfactantes	Perflourados	cancerígeno

Transcrito de: (Rubio, 2013)



2.1.2.1. PRINCIPALES FARMACOS PRESENTES EN AGUA RESIDUALES

La presencia de compuestos farmacéuticos en los efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales, se ha convertido, en los últimos años, en un potencial e importante problema medioambiental. Pese a que la concentración de los mismos es del orden de $\mu\text{g/L}$, de manera individual no generan grandes complicaciones, ni se conoce con total seguridad el riesgo que pueden generar sobre los ecosistemas acuáticos la combinación de varios de estos fármacos. (Manzano, 2008).

En la tabla 2 se muestran los principales fármacos encontrados en depuradoras de aguas residuales tanto en el afluente como en el efluente:

Afluente: Aguas residuales que entran en una depuradora o que son sometidas a un proceso de tratamiento.

Efluente: fluido liberado desde un foco emisor.

Tabla 2: Concentraciones de los fármacos en agua residuales de argentina.

Analito	Valor $\mu\text{g/L}$ ENTRADA				Valor $\mu\text{g/L}$ SALIDA		
	Promedio	Mínimo	Máximo	LC *	Promedio	Mínimo	Máximo
Naproxeno	< 0,1	< 0,1	1,2	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Diclofenaco	3,0	< 0,1	17,0	0,1	3,7	< 0,1	28,3
Ibuprofeno	41,0	3,2	91,6	0,1	29,5	1,1	84,8
Acetaminofeno	6,1	< 0,1	53,6	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
α-Ethinyl Estradiol	10,4	< 0,1	78,0	0,1	0,6	< 0,1	3,5
Cloranfenicol	< 0,1	< 0,1	0,9	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Estriol	< 0,1	< 0,1	0,8	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Amoxicilina	< 0,1	< 0,1	0,3	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Benzafibrato	2,1	< 0,1	5,9	0,1	0,4	< 0,1	1,1
Cenifibrozil	2,5	< 0,1	7,2	0,1	0,1	< 0,1	0,6
Genfibrozil	2,4	0,7	9,0	0,1	0,2	< 0,1	1,1
Lasalocid	0,4	< 0,1	1,3	0,1	0,3	< 0,1	1,1
OH-THC-Hidroxi-THC	4,7	< 0,1	14,3	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
PFBS	77,9	< 0,1	238,8	0,1	35,7	6,4	120
PFOA	0,4	< 0,1	1,6	0,1	0,8	< 0,1	11,2
PFOS	6,5	< 0,1	29,0	0,1	1,8	< 0,1	16,7



Analito	Valor µg/L ENTRADA				Valor µg/L SALIDA		
	Promedio	Mínimo	Máximo	LC*	Promedio	Mínimo	Máximo
Progesterona	15,2	< 0,1	44,8	0,1	1,5	< 0,1	4,1
Diazepan	3,6	< 0,1	47,5	0,1	4,4	< 0,1	67,9
Sulfametosazol	9,0	< 0,1	73,9	0,1	3,5	< 0,1	24,6
Sulfadiazina	1,1	< 0,1	5,4	0,1	0,9	< 0,1	10,5
Cafeina	131,7	12,8	287,7	0,1	2,1	< 0,1	34,3
Ciprofloxacín	< 0,1	< 0,1	1,5	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Anfetamina	12,5	< 0,1	138,0	0,1	0,5	< 0,1	9,1
Atenolol	0,4	< 0,1	2,2	0,1	0,2	< 0,1	1,6
Bisoprolol	0,8	< 0,1	6,1	0,1	0,3	< 0,1	2,2
Metadona	0,1	< 0,1	1,0	0,1	0,3	< 0,1	2,4
BE-benzoilecgonina	2,1	< 0,1	14,6	0,1	< 0,1	< 0,1	0,4
Carbamazepina	5,9	< 0,1	11,8	0,1	5,3	< 0,1	13,1
Cocaína	3,6	< 0,1	14,3	0,1	< 0,1	< 0,1	0,2
Codeína	0,2	< 0,1	5,6	0,1	0,1	< 0,1	3,0
EDDP	6,3	< 0,1	14,6	0,1	8,1	< 0,1	19,7
Dilantin	0,1	< 0,1	1,5	0,1	0,1	< 0,1	3,2
Enalapril	2,7	< 0,1	9,4	0,1	3,6	< 0,1	8,4
Ketoprofeno	6,6	1,4	14,8	0,1	3,0	< 0,1	16,4
Sotalol	0,5	< 0,1	4,4	0,1	1,8	< 0,1	20,4
Atorvastatin	0,1	< 0,1	1,0	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
o-Hidroxy Atorvastatin	0,2	< 0,1	0,9	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
p-Hidroxy Atorvastatin	0,2	< 0,1	1,8	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
THCCOOH	4,3	< 0,1	13,0	0,1	1,5	< 0,1	10,2
Triamcinolona	0,3	< 0,1	6,7	0,1	0,8	< 0,1	6,4
Meclociclina	0,4	< 0,1	2,1	0,1	0,5	< 0,1	7,1
Norfloxacin	< 0,1	< 0,1	<0,1	0,1	0,2	< 0,1	7,6
Enrofloxacin	0,9	< 0,1	3,3	0,1	1,6	< 0,1	4,2
Erytromicina	0,1	< 0,1	1,3	0,1	0,2	< 0,1	1,5

Transcrito de: (Fundación tekniker, 2010)

2.1.2.1.1. BROMURO DE PINAVERIO EN AGUAS RESIDUALES

No se encontró información actual sobre la existencia de Bromuro de pinaverio en aguas residuales, debido a que el bromuro de pinaverio se receta en el sector salud de México es uno de los contaminantes emergentes que pueden encontrarse en aguas residuales.



2.2. BROMURO DE PINAVERIO

El bromuro de pinaverio actúa como un antagonista del calcio, bloqueando el canal de calcio voltaje-dependiente de las células del musculo liso, induciendo una relajación de los tractos digestivo y biliar. Sus efectos inhibidores de los estímulos por alimentos o de otro tipo sobre las respuestas motoras, lo hacen particularmente útil en el tratamiento del síndrome del colon irritable. El pinaverio no tiene ningún efecto cardiovascular y solo muestra un ligero efecto anticolinérgico (Guslandi. 1994).

Después de la administración oral de 50 mg, la absorción del bromuro de pinaverio es baja, siendo su biodisponibilidad del orden de 10%. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en una hora, siendo el tiempo de vida media para eliminación, es de 1.5 horas. El fármaco se une en 97% a las proteínas del plasma. El pinaverio experimenta un metabolismo hepático importante, siendo eliminado en la orina (PLM, 2016).

2.2.1. PRINCIPALES PROPIEDADES DEL BROMURO DE PINAVERIO

Bromuro de Pinaverio es un derivado del amonio cuaternario de nombre químico bromuro de 4-(6-bromoveratri)-4-{2-[2-(6,6dimetil-2-norpinil) etoxil] etil} morfolinium, cuya fórmula química es: $C_{26}H_{41}Br_2NO_4$ y su peso molecular: 591.4 (García, 2006).

La estructura molecular del Bromuro de pinaverio.



Figura 1: visto el 6 de febrero del 2017, obtenido de: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/formulas/pinaverio.jpg>



2.2.2. USO DE BROMURO DE PINAVERIO EN EL IMSS.

El bromuro de pinaverio ya se encuentra incluido en el cuadro básico de los medicamentos del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Tabla 3: Cuadro básico de los medicamentos, bromuro de pinaverio

Clave	Descripción	Indicaciones	Vía de administración y Dosis.
	TABLETA: Cada tableta contiene: Bromuro de pinaverio 100 mg	Síndrome de intestino irritable.	Oral. Adultos: 100 mg dos veces al día
010.000.1210.00	Envase con 14 tabletas.		
010.000.1210.01	Envase con 28 tabletas.		

Transcrito de: (IMSS, 2016)

2.3. TOXICIDAD EN ORGANOHALOGENADOS

El bromuro de pinaverio también puede ser considerado un compuesto polifenilo por contener varios sustituyentes en el anillo bencílico, además de ser contener cuatro éteres y también contener enlaces bromados por lo cual se incluye la siguiente información de este grupo en partículas:

Los éteres polibromofenilicos (PBDE).

El periodo de máximo crecimiento del SNC va desde el tercer trimestre de gestación a los dos primeros años de vida, y está bajo una influencia determinante del sistema hormonal tiroideo. La neurotoxicidad de los PBDE se debe a las acciones indirectas sobre el eje hormonal tiroideo y por acciones directas en los mecanismos de señalización y crecimiento cerebral. Las agresiones del SNC desde la octava semana de gestación hasta los dos años de vida son determinantes y capaces de



provocar alteraciones en la inteligencia y en las habilidades psicomotoras. (Ortega, 2005).

2.4. DEGRADACIÓN DE ORGANOHALOGENADOS

Son conocidas numerosas bacterias y hongos que pueden degradar compuestos haloorgánicos en diversas rutas metabólicas bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La biodegradación de moléculas haloorgánicas ocurre, por suerte, con enzimas no específicas (co-metabolismo) o mediante enzimas altamente específicas que tienen como fin el de aprovechar tales moléculas como fuente de nutrientes y/o energía que aportan al crecimiento de dichos microorganismos (Arbeli, 2009).

2.4.1. FOTODEGRADACIÓN DE ORGANOHALOGENADOS

La posibilidad de fotodegradación de un compuesto orgánico en el medio ambiente depende del grado de solapamiento entre su espectro de absorción UV/VIS y el espectro de emisión de luz del sol. Los diferentes efectos de la irradiación UV incluyen la transformación de compuestos orgánicos en otras sustancias por rotura de enlaces químicos e incluso la degradación completa de las sustancias. Además, la radiación UV induce la disociación de compuestos con oxígeno y la formación de radicales libres altamente reactivos (Sánchez, 2007).

En el presente trabajo se realizará el estudio de degradación de bromuro de pinaverio para evaluar la cinética de degradación y caracterizar los productos de degradación, por lo cual se requiere conocer los siguientes conceptos:

2.4.2. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN

La rama de la química que estudia la velocidad o rapidez con la que ocurre una reacción se denomina cinética química. La importancia de la cinética química abarca dos aspectos:

- predecir la velocidad que tendrá una reacción en unas condiciones determinadas de presión, temperatura, concentración, catalizador.
- determinar y comprender el mecanismo por el que tiene lugar una reacción (Gómez, 2009).



2.4.2.1. TIEMPO DE VIDA MEDIA

Tiempo de vida media ($t_{1/2}$): Es el tiempo que debe transcurrir para que la concentración inicial de un reactivo se reduzca a la mitad de su valor (González, 2009).

$$[A]_{t_{1/2}} = \frac{[A]_0}{2} \quad \text{Ecuación 1}$$

(González, 2009).

2.4.2.2. CONSTANTE

Es una constante de proporcionalidad entre la velocidad de reacción y la concentración de los reactivos (Pozuelo, 2015).


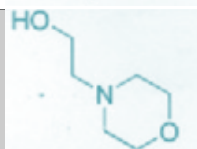

$$k = \frac{\text{Velocidad de reacción}}{\text{concentración de reactivos}} \quad \text{Ecuación 2}$$

(Pozuelo, 2015).

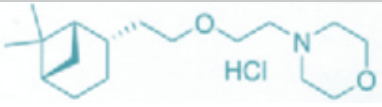
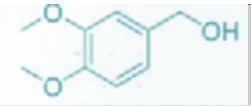
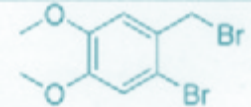
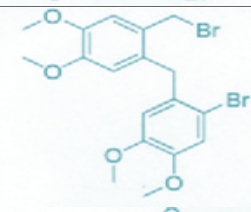
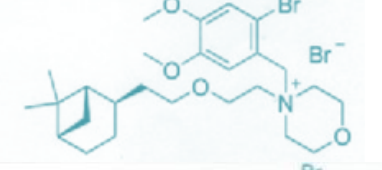
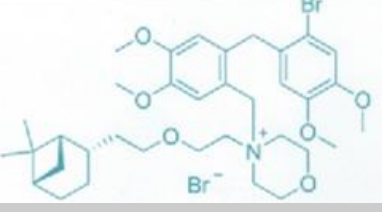
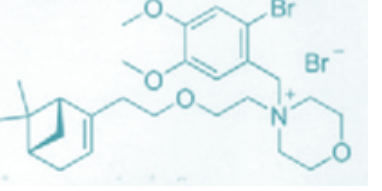
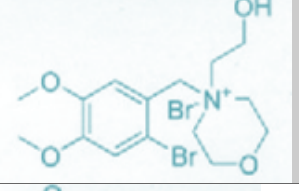
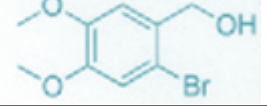
2.4.3. POSIBLES IMPUREZAS DE DEGRADACIÓN DE BROMURO DE PINAVERIO.

Con base en la estructura molecular del bromuro de pinaverio, los compuestos listados en la Tabla 3 se pueden encontrar como impurezas en el fármaco mismo o bien pueden ser productos de degradación del fármaco.

Tabla 4: Posibles impurezas degradación de Bromuro de Pinaverio

Nombre.	Estructura.	Formula.	Peso molecular
(1S, 2S, 5S)-2-(6, 6-Dimethyl-bicyclo [3. 1. 1.] hept-2-yl)-ethanol		C ₁₁ H ₂₀ O	168.2759
4-(2-Hydroxyethyl) morpholine		C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.1729
(1S, 2S, 5S)-6,6-Dimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-ethyl chloride		C ₁₁ H ₁₉ Cl	186.7216



Nombre.	Estructura.	Formula.	Peso molecular
N-{2-[2-((1S, 2S, 5S)-6, 6-Dimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-yl)-ethoxy]-ethyl} morpholine hydrochloride		$C_{17}H_{32}ClNO_2$	317.8945
3,4-Dimethoxybenzyl alcohol		$C_9H_{12}O_3$	168.1898
2-Bromo-4,5-Dimethoxybenzyl bromide		$C_9H_{10}Br_2O_2$	309.9825
2-(2'-Bromo-4',5'-dimethoxy)benzyl- 4, 5-dimethoxybenzyl bromide		$C_{18}H_{20}Br_2O_4$	460.1570
4-(6-bromoveratri)-4-{2-[2-(6,6dimetil-2-norpinil) etoxil] etil} morfolinium		$C_{26}H_{41}Br_2NO_4$	591.4160
4-[(2-(2'-Bromo-4', 5'-dimethoxyphenyl) methyl-4, 5-dimethoxyphenyl) methyl] -4-[2-[2-((1S, 2S, 5S) -6, 6-dimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-yl) ethoxy] ethyl] morpholinium bromide		$C_{35}H_{51}Br_2NO_6$	741.5905
4-(2-Bromo-4, 5-dimethoxybenzyl)-4-(2-(2- ((1R, 5S)-6,6-dimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-en-2-yl) ethoxy) ethyl) morpholin-4-ium bromide		$C_{26}H_{39}Br_2NO_4$	587.1246
4-(2-Bromo-4, 5-dimethoxybenzyl) -4-(2-hydroxyethyl) morphelin-4-ium bromide		$C_{15}H_{23}Br_2NO_4$	441.1554
(2-Bromo-4, 5-dimethoxyphenyl) metanol		$C_9H_{11}BrO_3$	247.0900



2.5. CROMATOGRAFÍA.

La cromatografía agrupa un conjunto de métodos que facilitan la separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados con en mezclas complejas. En todas ellas la muestra se disuelve con una fase móvil (que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico) la cual se hace pasar por una fase estacionaria inmiscible fija en una columna o en una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria (Skoog, 2008).

2.5.1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. La separación cromatográfica en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria de una manera forzada (Ozores, 2016).

2.5.1.1. PRINCIPALES PARAMETROS DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

Tiempo de retención

El tiempo que un soluto permanece en la columna. Se mide desde el momento de la inyección hasta la elución del máximo del pico. Es característico del soluto para condiciones de operación constantes. Auxiliar en la identificación de los solutos.

Número de platos teóricos (N)

Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos. Se calcula con cualquiera de las ecuaciones (Rojo, 1997):

$$N = 16\left(\frac{t_r}{W_b}\right)^2 = 5.545\left(\frac{t_r}{W_{\frac{1}{2}}}\right)^2 = 2\pi\left(\frac{t_r}{\frac{AREA}{ALTURA}}\right)^2 \quad \text{Ecuación 3}$$

(Rojo, 1997)



2.5.1.2. DETECTOR DE CROMATOGRAFÍA

Los principales detectores para HPLC son los siguientes:

- 🦟 Quimioluminiscencia
- 🦟 Conductividad
- 🦟 Electroquímica
- 🦟 Evaporativo de dispersión de luz
- 🦟 Fluorescencia
- 🦟 Espectrómetro de Masas
- 🦟 Laser Multi ángulo de dispersión de luz
- 🦟 Rotación óptica
- 🦟 Fotodiodo
- 🦟 Índice de refracción
- 🦟 Radiactiva
- 🦟 Fotométrica

Transcrito de: (Skoog, 2008).

2.6. ESPECTRO ULTRA VIOLETA - VISIBLE

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución en el rango espectral de 190 a 750 nm. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración (Nieves A, 2009).

2.6.1. BARRIDO UV

El barrido es una técnica analítica en la cual se hace una medición por cada longitud de onda o más, dependiendo de la programación del método, por todo el espectro Ultra Violeta (Nieves A, 2009).



Espectro electromagnético.

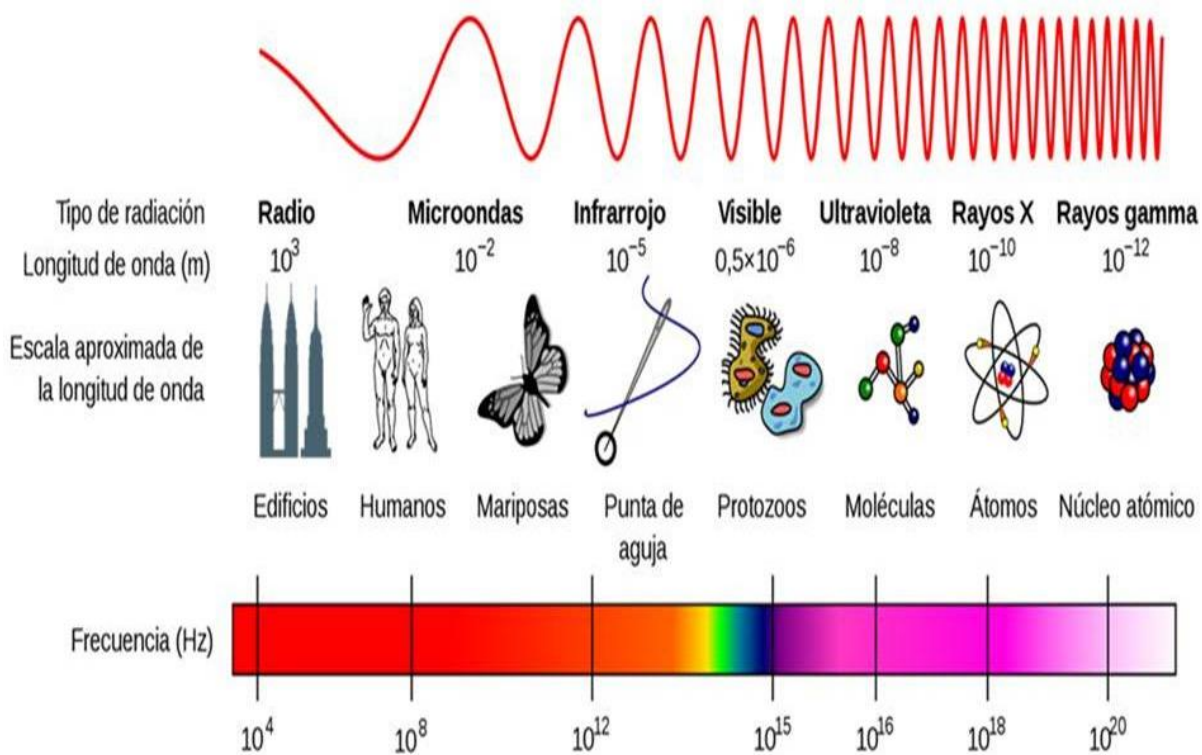


Figura 2: espectro electromagnético visto el día 6 de febrero del 2017, obtenido de: <http://www.escolares.net/fisica/espectro-electromagnetico/>

2.7. ESPECTOFOTOMETRO DE MASAS

La Espectrometría de Masas es una poderosa técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas (algunos p moles) de muestra y obtener información característica como el peso molecular y algunas veces la estructura del analito (Díaz, 2017).

2.7.1. IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY.

Es una ionización a presión atmosférica que se aplica a un amplio grupo de muestras. En la ionización por electrospray, la muestra disuelta en un disolvente adecuado pasa a través de un capilar metálico, en cuya punta se aplica un potencial de 3 a 4 KV y una presión de 1 atmósfera. Se produce una fina niebla de gotas de



elevada carga y la evaporación del solvente hace que aumente la densidad de carga, produciéndose la desorción en fase gaseosa. El análisis por ESI, se puede hacer provocando una ionización positiva o negativa. Se selecciona la polaridad de los iones que se desea analizar mediante el voltaje del capilar. Permite la obtención del ión molecular, y si se desea obtener una fragmentación, se puede inducir aumentando el voltaje en la punta del cono del capilar (Cortes 2017).

2.7.2. ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO.

El principio de operación del analizador de tiempo de vuelo (time-of-flight TOF) involucra la medición del tiempo requerido por un ion para viajar desde la fuente de iones hasta el detector localizado a 1-2m de la fuente. Todos los iones reciben el mismo incremento de energía cinética durante la aceleración (3000 eV), de tal forma que cada valor de m/z , tendrá una velocidad diferente con la cual recorrerán una región libre de campo en diferentes tiempos entre la fuente de iones y el detector. Los iones chocan secuencialmente en el detector en forma de un incremento de m/z . Los iones de baja m/z llegan al detector antes que aquellos con m/z alta debido a que entre más m/z tengan los iones tendrán una velocidad menor (Plasencia, 2003).



Capítulo 2: Metodología.



CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN:

En la actualidad los residuos de los fármacos que ya son considerados medicamentos caducos o que provienen del metabolismo posterior a la administración del mismo, en su mayoría terminan en aguas residuales de carácter municipal, en lugar de tener un proceso llamado disposición final o de una correcta eliminación por medio de filtración eficiente; por tal motivo, se han encontrado trazas de fármacos en aguas potables y mares, las trazas de algunos fármacos y los productos de degradación de los mismos, pueden tener características tóxicas para los humanos o para la flora y fauna del ecosistema, afectar su equilibrio y provocar daños irreversibles; por lo tanto la identificación de los compuestos de degradación de los fármacos, puede ayudar a identificar cuáles de ellos pueden ser tóxicos y con ello se puede prevenir su contacto con el medio ambiente; además de hacer conciencia a la población de lo peligrosos que pueden ser los fármacos y sus productos de degradación.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

La técnica analítica desarrollada por cromatografía de líquidos acoplado a un detector de espectrometría de masas (UHPLC- MS) permite la detección y cuantificación de Bromuro de Pinaverio e identificación de sus productos de térmicos y de foto-degradación en agua acondicionada y en medio sólido.

METAS:

- ✦ Contar con un método analítico, capaz de cuantificar e identificar los productos de degradación en bromuro de pinaverio.
- ✦ Estudiar la disminución de bromuro de pinaverio con el tiempo, en solución acuosa y fase sólida, para determinar su cinética de degradación de cada una.



OBJETIVOS:

🌱 **Objetivo general:**

- 👉 Identificar de los principales productos de degradación de bromuro de pinaverio en estudio de degradación forzada en fase sólida y en solución.

🌱 **Objetivos específicos:**

- 👉 Desarrollar un método por HPLC para la cuantificación de bromuro de pinaverio y la separación de sus productos de degradación.
- 👉 Validar un método por HPLC para la cuantificación de bromuro de pinaverio y la separación de los productos de degradación.
- 👉 Elaborar la degradación forzada de bromuro de pinaverio bajo condiciones indicadas en la tabla 5.

Tabla 5: Pruebas que se realizaron a las muestras.

Fase Sólida.	Fase Acuosa.
Calor (80 °C / 12 Días).	Calor (80°C / 12 Días).
Luz (luxes / 12 Días).	Luz (luxes / 12 Días).
	Hidrolisis Básica (pH 12 / 12 Días).

- 👉 Elaborar la cinética de degradación de Bromuro de pinaverio en solución y la determinar del tiempo de vida media.
- 👉 Identificar de los productos de degradación de bromuro de pinaverio.

HIPÓTESIS:

La técnica analítica desarrollada por cromatografía de líquidos acoplado a un detector de espectrometría de masas (UHPLC- MS), identificará los productos de degradación forzada de bromuro de pinaverio.



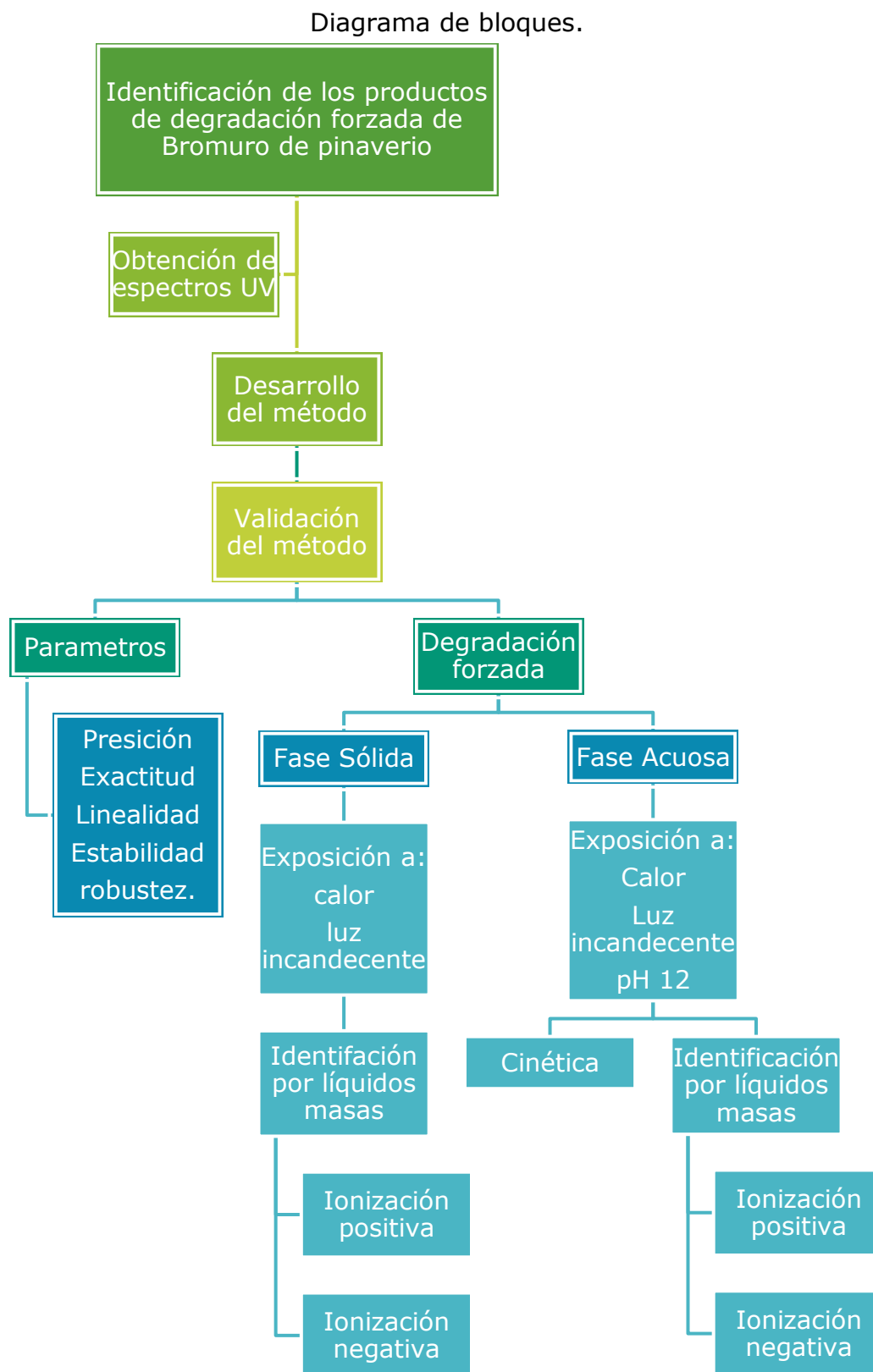


Figura 3: Diagrama de bloques de la metodología.



3. METODOLOGÍA

Para dicho trabajo se realizó un método nuevo para la cuantificación de e identificación de Bromuro de pinaverio, y también para la identificación de los productos de degradación, de modo que el método fuese transferible hacia el detector de masas; Por lo tanto, se realizó un método ácido para la favorecer la ionización positiva y un método básico para la ionización negativa. Sin embargo, solo un método fue validado para la cuantificación de Bromuro de pinaverio.

3.1. EQUIPOS Y REACTIVOS.

Los reactivos utilizados para la investigación son los siguientes:

Tabla 6: Reactivos

Nombre.	Grado.	Marca.	Pureza.
Acetato de Amonio	Reactivo	Merck	98%
Acetonitrilo	HPLC	Merck	99.9%
Ácido Clorhídrico	Reactivo	J. T. Baker	36.5%
Ácido Fórmico	Reactivo	Sigma-Aldrich	95%
Hidróxido de Amonio	Reactivo	Sigma-Aldrich	30%
Hidróxido de Sodio	Reactivo	Sigma-Aldrich	99%
Metanol	HPLC	Merck	99.8%
Metanol	HPLC	Sigma	99.9%

Los equipos utilizados para la investigación son los siguientes:

Tabla 7: Equipos

Equipo.	Marca.	Modelo.
HPLC	Waters.	2996
UHPLC	Thermo Scientific.	3000
HPLC	HP- Agilent	1050
Espectrómetro de Masas	Bruker	micrOTOF-Q ESI-Qq-TOF
Potenciómetro	Agilent	3200P



Equipo.	Marca.	Modelo.
Balanza	Sartorius	MSA3.6P0TRDM
Estufa	Thermo Scientific.	3625A

3.2. OBTENCIÓN DE ESPECTROS ULTRAVIOLETA.

Se preparó una solución estándar de bromuro de pinaverio y sus impurezas de síntesis bromuro de 2-Bromo-4,5-dimetoxybenzilo (PIN-III), bromuro de 4-[(2-2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil) metil] -4-[2-[2,((1S,2S,5S)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptil) etoxi] etil] morfolina (PIN IV), bromuro de 4-(2-bromo-4,5-dimetoxibencil) -4-(2-(2-((1R,5S)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] hept-2-en 2il) etoxi) etil) morfol-4-ina (PIN V), bromuro de 4-(2-bromo-4,5-dimetoxibencil)-4-(2-hidroxietyl) morfel-4-in (PIN VI), Los cuales se adicionaron al 0.1 % de la concentración de la muestra, es decir a 2 µg/mL, de manera conjunta y de forma separada para la identificación de los tiempos de retención de cada impureza; para diluirlas se utilizó 10 mL de Acetonitrilo y se completó con 40 mL de agua desionizada (20:80 V/V) las cuales se inyectaron en un equipo HPLC Waters (2996).

Tabla 8: Condiciones del equipo HPLC para la identificación de impurezas de bromuro de pinaverio.

Fase A: Agua con ácido fórmico al 0.1%.	Modo: Gradiente.
Fase B: Acetonitrilo.	Flujo: 1.2 mL/min.
	Temperatura de la columna: 40°C
	Volumen de inyección: 5 µL

Posteriormente se realizó un barrido entre 190 y 400 nm, para identificar el máximo de absorbancia UV.

3.3. DESARROLLO DEL METODO HPLC-UV PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BROMURO DE PINAVERIO.

Se desarrollaron dos Métodos HPLC para la cuantificación de Bromuro de pinaverio probándolos en un equipo Agilent HP 1050 con la finalidad de favorecer ambas ionizaciones en el equipo de espectrofotometría de masas para lo cual se realizó



un método ácido para favorecer la ionización positiva y un método básico para favorecer la ionización negativa. En la tabla 7 se muestran las condiciones cromatografías de ambos métodos.

Tabla 9: Diferentes Métodos a desarrollar para cuantificar Bromuro de pinaverio y también para la identificación de sus productos de degradación.

	Método ácido	Método Básico
Fase Móvil:	Fase A: Agua desionizada con 0.1 mL de ácido fórmico. Fase B: Se utilizó Acetonitrilo grado HPLC.	Fase A: Se preparó una solución amortiguadora de acetatos (1g de acetato de amonio ajustado con hidróxido de sodio al 3%). Fase B: Se utilizó metanol grado HPLC.
Columna:	Zorbax eclipse plus C18 de 250 mm * 4.6 mm * 5µm	Zorbax eclipse plus C18 de 250 mm * 4.6 mm * 5µm
Temperatura de la columna:	40 °C	40 °C
Modo:	Isocrático	Isocrático.
Flujo:	0.6 mL/min	0.6 mL/min

3.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO BÁSICO POR HPLC-UV.


El método elegido para la validación fue el método que presento mayor resolución entre las impurezas de Bromuro de pinaverio para que los productos de degradación que se formaron, no eluyan entre sí dentro del cromatograma.





3.4.1. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

En la validación del método se evaluaron los siguientes parámetros: la precisión del sistema, la linealidad, precisión, estabilidad de la muestra, estabilidad del estándar, estabilidad de la fase móvil, la exactitud, la selectividad y las robusteces de los puntos críticos del método.

A continuación, se indica el significado y los parámetros de cada uno de los criterios de aceptación:


 Los ensayos sirven para determinar la concentración de Bromuro de pinaverio presente en la muestra inyectado. Un recobro es cuando se determina cuanto se recupera en un análisis de una muestra fortificada con una concentración conocida de analito, los ensayos se deben encontrar entre 98% y 102%.


 El tiempo de retención es el tiempo que tarda el compuesto en atravesar la columna y llegar al detector, para el presente trabajo se estableció que el Tiempo de retención no debe variar más del 5% del tiempo de retención del estándar.

 La Coeficiente de Variación es una medida estadística que describe la propagación de los datos con respecto a la media y el resultado se expresa como un porcentaje no más del 2% (Valcárcel y Ríos, 2002).

$$CV = 100 \frac{s}{\text{Promedio}} (\%) \quad \text{Ecuación 4}$$

(Valcárcel y Ríos, 2002).

 Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna. El criterio de aceptación es Platos teóricos arriba de 1500. (Romero, 2002).

 El coeficiente de determinación es un índice que mide la proporción de la variación de Y que se explica por la variable independiente X en el modelo de regresión. Sus valores absolutos oscilan entre 0 y 1. Esto es, si tenemos dos variables X e Y. El criterio es r^2 no menos de 0.998 (Berenson, 2016).



3.4.2. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES:

Se tomó la concentración al 100% de la muestra que es 0.5 mg/mL y se inyectaron de forma secuencial.

3.5. PRECISIÓN DEL SISTEMA:

Es la evidencia objetiva para demostrar que, al aplicar un método normalizado, se cumple con las especificaciones del mismo y se cuenta con la competencia técnica para realizarlo adecuadamente (COFEPRIS, 2016).

Se realizó inyectando el estándar 1 de bromuro de pinaverio, 5 veces y se comprobaron los criterios de aceptación y posteriormente se inyectó el estándar 2 de bromuro de pinaverio, una vez y se observó que el recobro fuera entre 98% y 102%.

3.6. PRECISIÓN:

Define la proximidad de la concordancia entre los resultados de las mediciones sucesivas del mismo mensurando, con las mediciones realizadas con la aplicación de la totalidad de las siguientes condiciones (EMA, 2004).

Se prepararon 6 muestras independientes con la misma concentración y se inyectaron de manera secuencial, posteriormente se verificó que la Coeficiente de variación no sea mayor al 2%.

3.7. EXACTITUD:

Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero (material de referencia interno de la firma), sea como un valor de referencia aceptado (material de referencia certificado o estándar de una farmacopea) y el valor encontrado (valor promedio) obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces (ICH, 1998).

Se inyectó por triplicado las concentraciones al 80%, 100% y 120%.



Tabla 10: Preparación de las soluciones para la prueba de exactitud al 80%, 100% y 120%

Nivel (%)	Peso (mg)	Volumen de Aforo (mL)	Concentración (µg/mL)
80	8	20	400
100	10	20	500
120	12	20	600

El criterio de aceptación es que el porcentaje de ensayo se encuentre entre el 80 y 120%.

3.8. LINEALIDAD:

Define la habilidad del método para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito en la prueba (EMA, 2004)

Se preparó una solución estándar de bromuro de pinaverio.

Tabla 11: Preparación de la solución madre de linealidad.

Peso (mg)	Volumen de aforo (mL)	Concentración (µg/mL)
25	25	1000

Se hicieron seis diluciones a partir de la solución madre dentro del siguiente intervalo:

Soluciones Estándar al 20% -120%

Tabla 12: Diluciones preparadas para la linealidad.

Nivel (%)	Alícuota de la Solución madre (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración (µg/mL)
20	1.0	10	100
40	2.0	10	200
60	3.0	10	300
80	4.0	10	400
100	2.5	5	500
120	3.0	5	600



El criterio de aceptación es una r^2 mayor al 0.98

3.9. SELECTIVIDAD:

La capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones de prueba establecidas (EMA, 2004).

Se prepara las soluciones de las impurezas conocidas de bromuro de pinaverio de manera separada y una de manera conjunta, a concentración de 0.1% en relación a concentración de la muestra, para lo cual se evalúa que los picos de Bromuro de pinaverio las impurezas de Bromuro de pinaverio no eluyan entre sí.

3.10. ESTABILIDAD DE LA FASE MÓVIL:

Se verificó el pH de la fase móvil por tres periodos además de la inicial, también se midió la presión del sistema por los mismos tres periodos, El criterio de aceptación es que el pH no varíe más 0.5 y que los reservorios no tengan aparente crecimiento microbiológico.

3.11. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA:

Se preparó una muestra de concentración de 0.5 mg/mL (100%) y se inyectó de manera inmediata posterior a su preparación y de ahí se volvió a inyectar por dos periodos más y se verificó que el porcentaje de ensayo del oscile entre 98 y 120%.

3.12. ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR:

Se preparó un estándar de concentración de 0.5 mg/mL (100%) y se inyectó de manera inmediata posterior a su preparación y de ahí se volvió a inyectar por dos periodos más y se verificó que el porcentaje de ensayo del área se oscile entre 98 y 120%.

3.13. ROBUSTEZ:

La robustez de un procedimiento analítico, es una medida de su capacidad de permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas, variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal (EMA, 2004).



Se preparan las soluciones como en la idoneidad del sistema y se prueba con cada uno de los siguientes métodos.

Tabla 13: Parámetros utilizados para evaluar las robusteces.

Parámetro	Rango		
pH de la Solución A de la fase móvil	Nominal: 8.2		
	8.25 8.15		
Proporción de los componentes en la fase móvil:	Nominal:		
	t (min)	Fase acuosa %	Fase orgánica %
	0.0	80	20
	5.0	25	75
	25.0	25	75
	30.0	10	90
	35.0	10	90
	35.1	80	20
	45.0	80	20
	Método A:		
t (min)	Fase acuosa %	Fase orgánica %	
0.0	80.4	19.6	
5.0	26.5	73.5	
25.0	26.5	73.5	
30.0	11.8	88.2	
35.0	11.8	88.2	
35.1	80.4	19.6	
45.0	80.4	19.6	



	Método B:		
	t (min)	Fase acuosa %	Fase orgánica %
	0.0	79.6	20.4
	5.0	23.5	76.5
	25.0	23.5	76.5
	30.0	8.2	91.8
	35.0	8.2	91.8
	35.1	79.6	20.4
	45.0	79.6	20.4
Proporción de flujo de la fase móvil:	Nominal: 0.6 mL/min		
	0.5 mL/min		
	0.7 mL/min		
Temperatura de la columna:	Nominal: 40°C		
	35°C		
	45°C		

3.14. DEGRADACIÓN FORZADA.

Se realizó una degradación forzada de bromuro de pinaverio en fase sólida y en fase acuosa, del cual se obtuvieron los productos de degradación de cada exposición y así realizó su posterior identificación por UHPLC acoplado a masas.

3.14.1. FASE ACUOSA:

Se prepararon soluciones de bromuro de pinaverio, que posteriormente fueron expuestas al calor, a la luz incandescente, y finalmente a pH de 12, del cual se obtuvieron los productos de degradación, estos resultados pueden ser utilizados para predecir los productos de degradación en aguas residuales.

3.14.1.1. EXPOSICIÓN AL CALOR:

Se prepararon muestras a 0.5 mg/mL, para lo cual se pesaron 10 mg de bromuro de pinaverio y se adiciona 1 mL de acetonitrilo, y 15 mL de agua deionizada, posteriormente se colocaron en parrilla de calentamiento con termómetro durante 12 días con su respectivo blanco, el cual se prepara de la misma manera solo que



a esta no se le agrega muestra; Al finalizar el periodo de cada muestra se transfiere en un matraz de 20 mL y se lleva al aforo con acetonitrilo, para su posterior lectura en el HPLC.

3.14.1.2. EXPOSICIÓN A pH 12:

Se prepararon muestras a 0.5 mg/mL, para lo cual se pesaron 10 mg de bromuro de pinaverio y se adiciona 1 mL de acetonitrilo, y 15 mL de agua deionizada, posteriormente se ajustó el pH a 12 con una solución de hidróxido de sodio al 0.1 N y se resguardo de la luz en una gaveta durante 12 días con su respectivo blanco, el cual se prepara de la misma manera, solo que a esta no se le agrega muestra; Al finalizar el periodo se de cada muestra se neutraliza con una solución de ácido clorhídrico 0.1 N y se transfiere en un matraz de 20 mL, se lleva al aforó con acetonitrilo, para su posterior lectura en el HPLC.

3.14.1.3. EXPOSICIÓN A LA LUZ:

Se prepararon muestras al 0.5 mg/mL, para lo cual se pesaron 10 mg de bromuro de pinaverio y se adiciona 1 mL de acetonitrilo, y 15 mL de agua deionizada, posteriormente se coloca en una cámara de luz durante 12 días con su respectivo blanco, el cual se prepara de la misma manera solo que a esta no se le agrega muestra; Al finalizar el periodo de cada muestra se transfiere en un matraz de 20 mL y se lleva al aforo con Acetonitrilo, para su posterior lectura en el HPLC.

3.14.2. FASE SÓLIDA:

Se prepararon muestras de bromuro de pinaverio sobre placas que fueron expuestas al calor y con luz incandescente, a partir del cual se obtuvieron sus productos de degradación, estos resultados pueden ser utilizados como prueba de estabilidad del API.

3.14.2.1. EXPOSICIÓN AL CALOR:

Se preparó una caja Petri con aproximadamente 1 g de bromuro de pinaverio, formando una capa de 0.5 cm de manera uniforme, posteriormente se tapó y se colocó en una estufa a 80 °C durante 12 días, también se preparó un testigo en cual se resguarda una muestra de la luz y el calor.



Finalmente se prepara una solución de 0.5 mg/mL de la muestra degradada y del testigo pesando 10 mg de cada una en un matraz de 20 mL; y se diluyo con una solución de Agua: Acetonitrilo (80:20).

3.14.2.2. EXPOSICIÓN CON LUZ:

Se preparó una caja Petri con un extendido de bromuro de pinaverio, procurando formar una capa uniforme, después se coloca en la cámara de luz durante 12 días. El testigo se prepara de la misma manera que la muestra, solo que esta se cubre con papel aluminio para que sea protegida de la luz.

Finalmente se prepara una solución de 0.5 mg/mL de la muestra degradada y del testigo pesando 10 mg de cada una en un matraz de 20 mL; y se diluyo con una solución de Agua: Acetonitrilo (80:20).

3.14.3. CINETICAS DE DEGRADACIÓN:

Se grafican los resultados obtenidos en la degradación forzada, con cada una de las condiciones probadas durante el experimento.

3.14.3.1. DETERMINACIÓN DEL ORDEN DE REACCIÓN:

Se utilizó el método integral para determinar el orden de reacción:

A través de las ecuaciones correspondientes a cada uno de los órdenes de reacción se realizan los gráficos y se determina r^2 y también la ecuación a la recta para obtener b y también la constante a través de m .

Ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

Ecuación 5

(Tusell, 2011)

Dónde:

- ✿ y = corresponde a la variable dependiente.
- ✿ x = corresponde a la variable independiente.
- ✿ m = es la pendiente de la recta
- ✿ b = la ordenada al origen



Ecuación de Orden cero:

$$[A] = -kt + [A]_0 \quad \text{Ecuación 6}$$

(Moreno, 2005)

Ecuación de primer orden:

$$\ln [A] = -kt + \ln[A]_0 \quad \text{Ecuación 7}$$

(Moreno, 2005)

Ecuación de segundo orden:

$$\frac{1}{[A]} = kt + \frac{1}{[A]_0} \quad \text{Ecuación 8}$$

(Moreno, 2005)

3.14.3.2. CÁLCULOS DE LOS PARAMETROS DE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN.

Después de que se determinó el orden de reacción se siguieron las fórmulas de acuerdo al orden de reacción para determinar los parámetros de velocidad de reacción (v), y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$).

Orden cero:

✿ Velocidad de reacción:

$$v = k [A]^0 \quad \text{Ecuación 9}$$

(Moreno, 2005)

✿ Tiempo de vida media:

$$t_{1/2} = \frac{[A]_0}{2k} \quad \text{Ecuación 10}$$

(Moreno, 2005)



Ecuación de primer orden:

✿ Velocidad de reacción:

$$v = k [A]^1$$

Ecuación 11
(Moreno, 2005)

✿ Tiempo de vida media:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Ecuación 12
(Moreno, 2005)

Ecuación de segundo orden:

✿ Velocidad de reacción:

$$v = k [A]^2$$

Ecuación 13
(Moreno, 2005)

✿ Tiempo de vida media:

$$t_{1/2} = \frac{1}{k[A]_0}$$

Ecuación 14
(Moreno, 2005)

3.15. IDENTIFICACIÓN DE IMPUREZAS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN POR UHPLC ACOPLADO A MASAS.

Se pesaron 10 mg de bromuro de pinaverio en un matraz de 20 mL, al cual se adiciono cada una de las impurezas probadas para la validación, al 1.0% de la concentración de la muestra; y se diluyo con una solución de agua: acetonitrilo (80:20).

Posteriormente se corren las muestras y el estándar, bajo las mismas condiciones cromatografías utilizadas para la validación del método de ensayo.



Capítulo 3: Resultados.



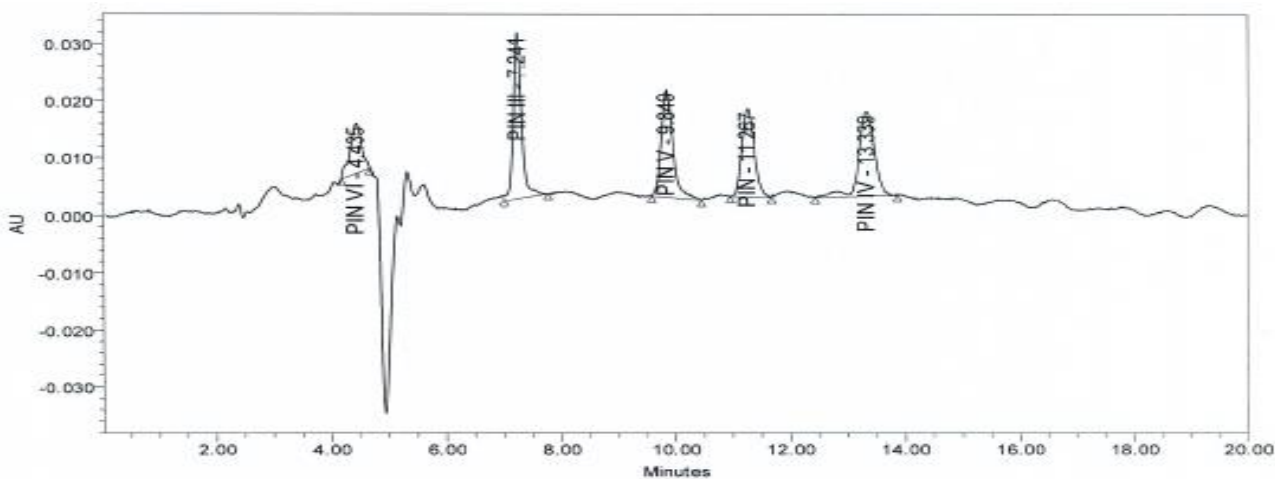
CAPÍTULO 3

4. RESULTADOS.

4.1. MEDICIÓN DEL MÁXIMO DE ABSORCIÓN DE PINAVERIO Y SUS IMPUREZAS.

Para la medición de las impurezas y de bromuro de pinaverio se realizó un barrido ultravioleta de una muestra adicionada con las impurezas de bromuro de 2-Bromo-4,5-dimetoxybenzilo (PIN-III), bromuro de 4-[(2-2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil)metil]-4-[2-[2,((1S,2S,5S)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]heptil)etoxi]etil]mopholinia (PIN IV), bromuro de 4-(2-bromo-4,5-dimetoxibencil)-4-(2-(2-((1R,5s)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-2-en-2il)etoxi)etil)morfol-4-ina (PIN V), bromuro de 4-(2-bormo-4,5-dimetoxibencil)-4-(2-hidroxi)etil)morfel-4-in (PIN VI) y de bromuro de pinaverio; de 190nm a 400 nm.

Se tomó una concentración de 2 µg/mL de cada impureza y de bromuro de pinaverio la cual fue separada por HPLC, en un equipo Waters 2996.



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	PIN VI	4.435	120837	10.12	8861
2	PIN III	7.241	294961	24.71	29274
3	PIN V	9.849	265787	22.26	18798
4	PIN	11.267	228351	19.13	15506
5	PIN IV	13.339	283845	23.78	14892

Figura 4: Cromatograma de barrido ultravioleta en el equipo waters.

Este cromatograma corresponde a la inyección de prueba para la identificación de los máximos de absorbancia de bromuro de pinaverio y sus impurezas.



4.2. ESPECTROS ULTRAVIOLETA DE PIN Y CADA IMPUREZA

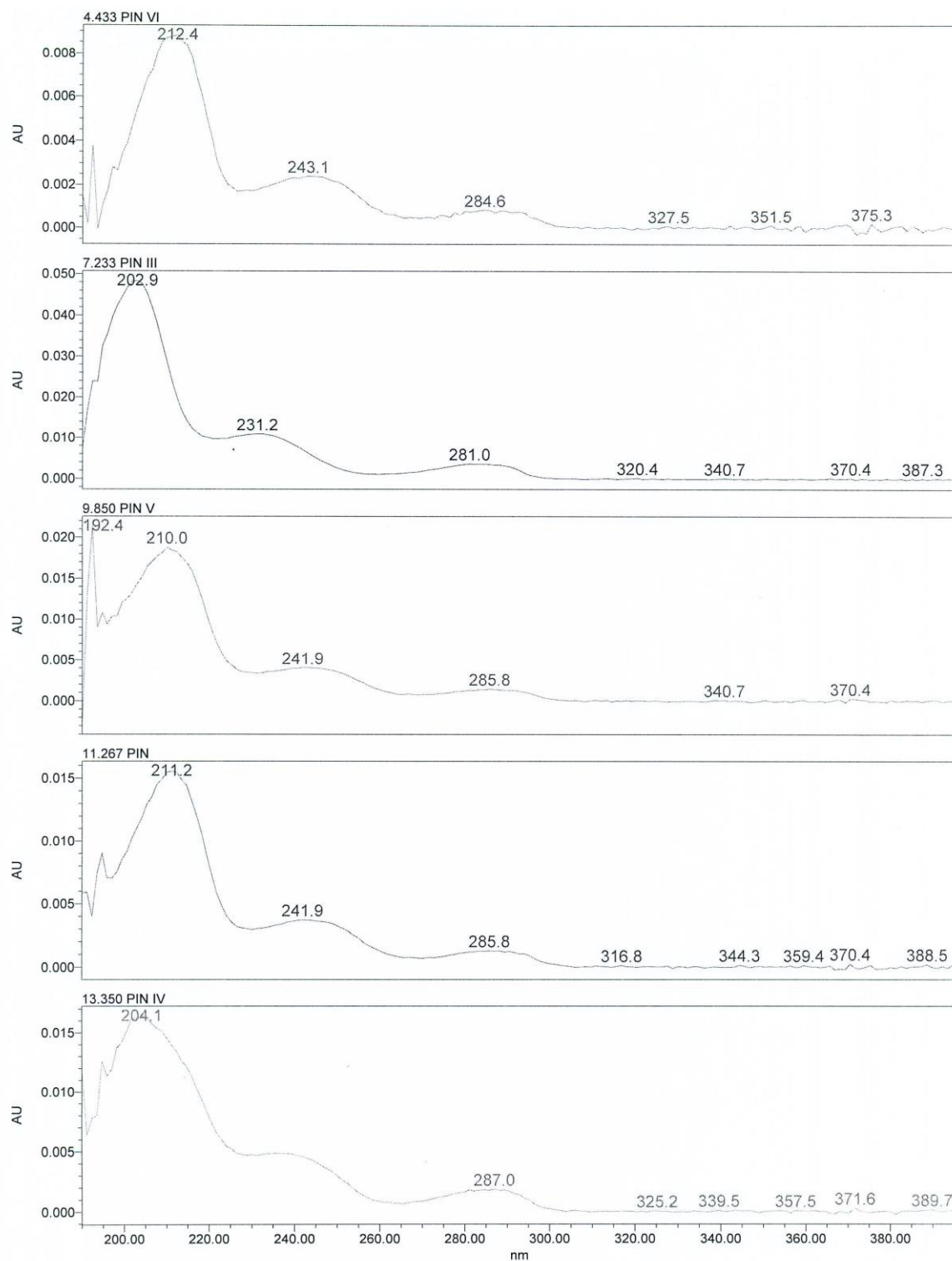


Figura 5: Barridos ultravioletas de bromuro de pinaverio y sus impurezas.



Los barridos con luz ultravioleta de cada una de las impurezas PIN, PIN III, PIN IV, PIN V y PIN VI, muestran que su máxima absorbancia se encuentra entre 202 y 212nm, pero como la mayoría se encuentra cerca de 210 nm, inclusive PIN, por lo tanto, se decidió tomar esta como la longitud de onda para el método analítico.

4.3. DESARROLLO DEL MÉTODO HPLC

Tabla 14: Desarrollo de método analítico en HPLC

Método	Condiciones generales	Variables	Observaciones
Medio ácido.	Fase A: agua con ácido fórmico al 0.1%. Fase B: acetonitrilo. Temperatura de la columna: 40°C Volumen de inyección: 5 µL	Modo: Gradiente. Flujo: 1.2 mL/min. Se prueban proporciones de fase móvil.	Se muestra que la concentración administrada por la inyección es insuficiente para ser diferenciada del ruido.
	Fase A: agua con 0.1% de ácido fórmico. Fase B: acetonitrilo. Temperatura de la columna: 40°C Volumen de inyección: 15 µL	Modo: Gradiente. Flujo: 1.0 mL/min. Se prueban proporciones de fase móvil.	Se probaron diferentes proporciones de fase, aunque no se logró tener una buena resolución entre PIN y PIN V.
	Fase A: agua con 0.1% ácido fórmico Fase B: metanol con 0.1% de ácido fórmico Temperatura de la columna: 40°C Volumen de inyección: 15 µL	Modo: Isocratico. Flujo: 0.5 mL/min. Se prueban proporciones de fase móvil.	Se observa una buena resolución entre los picos de PIN y de PIN V sin embargo los últimos picos de PIN y PIN VI se ensanchan y no se diferencian de la línea base.
	Fase A: agua con 0.1% de ácido fórmico Fase B: metanol con 0.1% de ácido fórmico. Temperatura de la columna: 40°C Volumen de inyección: 15 µL	Modo: Gradiente. Flujo: 0.5 mL/min. Se prueban proporciones de fase móvil.	Se mejora con el gradiente la separación entre el frente del disolvente y el pico de PIN VI.



Método	Condiciones generales	Variables	Observaciones
Medio ácido.	Fase A: agua con 0.1% ácido fórmico Fase B: metanol con 0.1% de ácido Temperatura de la columna: 40°C Volumen de inyección: 15µL	Modo: Gradiente. Flujo: 0.6 mL/min.	Se mejoró y se resolvió el problema de resolución, por lo cual se toma este método para las siguientes pruebas.
Medio básico.	Fase A: Buffer de acetatos (acetato de amonio ajustado con hidróxido de amonio). Fase B: metanol Temperatura de la columna: 40°C Volumen de inyección: 15 µL	Modo: Gradiente. Flujo: 0.6 mL/min pH: 8.7	Bajo estas condiciones no se observan los últimos picos, que son PIN y PIN IV, se cambió el pH debido a que estaba muy alto para la columna.
	Fase A: Buffer de acetatos (acetato de amonio ajustado con hidróxido de amonio). Fase B: metanol Temperatura de la columna: 40°C Volumen de inyección: 15 µL	Modo: Isocrático. Flujo: 0.6 mL/min pH: 8.2 Se prueban proporciones de fase móvil.	De esta manera se presentan dos problemas, se junta PIN VI con el frente del disolvente y también aumento los tiempos de retención de los picos de PIN, PIN V, PIN VI.
	Fase A: Buffer de acetatos (acetato de amonio ajustado con hidróxido de amonio). Fase B: metanol Temperatura de la columna: 40°C Volumen de inyección: 15 µL	Modo: Gradiente. Flujo: 0.6 mL/min pH: 8.2 Se prueban proporciones de fase móvil.	Se resolvieron los problemas con el frente del disolvente y el tiempo de retención de PIN, inclusive se mejoró la resolución entre PIN V y PIN, por lo tanto, se valida este método.

4.4. VALIDACIÓN:

De acuerdo a los datos obtenidos del desarrollo el método utilizado para la validación, fue el medio básico por la separación de las señales de las impurezas de pinaverio.



Las condiciones del método elegido para la validación son las siguientes:

- 🐞 Fase móvil: La **fase A** es un Buffer de acetatos a pH 8.2 (acetato de amonio ajustado con hidróxido de amonio). La **fase B** es metanol grado HPLC.
- 🐞 Modo: Gradiente
- 🐞 Columna: Es una Zorbax eclipse plus C18 de 250 mm * 4.6 mm * 5µm a 40°C
- 🐞 Volumen de inyección: 15 µL
- 🐞 Flujo: 0.6 mL/min

Tabla 15: Gradiente utilizado para la validación del Método de Ensayo.

Tiempo (minutos)	% fase A	% fase B	Flujo (mL/min.)
0.00	80	20	0.6
5.00	25	75	0.6
25.00	25	75	0.6
30.00	10	90	0.6
35.00	10	90	0.6
35.10	80	20	0.6
45.00	80	20	0.6

4.4.1. PRECISIÓN DEL SISTEMA:

Se pesó exactamente 10 mg del estándar de Bromuro de pinaverio, posteriormente se pesó 10 mg de bromuro de pinaverio del mismo estándar, con una pureza de 0.9985 en un matraz de 20 mL aforado con diluyente (agua: acetonitrilo 80:20).

Para correr la precisión se inyectó el blanco para verificar que no esté ruidosa la línea base, posteriormente se inyectó un estándar para verificar recobro y tiempo de retención, después se inyectó un blanco para confirmar que no hubiera arrastre para que se inyectó 5 veces el primer estándar para así comprobar que la desviación relativa no fue mayor al estándar 2 de bromuro de pinaverio y por último se inyecta una vez el estándar 2 de bromuro de pinaverio para confirmar el % recobro, además todos los recobros y el promedio de los mismos debe estar entre 98% y 102%.



Tabla 16: Resultados del % de ensayo para la precisión del sistema

ESTÁNDAR	ÁREA	% Recuperación	Criterio de aceptación
ESTÁNDAR 2	34078.0	99.09	98-102%
ESTÁNDAR 1 ¹	34778.5	101.15	98-102%
ESTÁNDAR 1 ²	34562.9	100.52	98-102%
ESTÁNDAR 1 ³	34114.6	99.22	98-102%
ESTÁNDAR 1 ⁴	34192.6	99.44	98-102%
ESTÁNDAR 1 ⁵	34271.8	99.67	98-102%
ESTÁNDAR 1 ⁶	34632.2	100.72	98-102%

El superíndice ¹, indica el número de inyección realizada.

Tabla 17: Resultados de los principales parámetros de los Ensayos.

PARÁMETRO	RESULTADO.	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
PROMEDIO DEL TIEMPO DE RETENCIÓN	21.67 min.	N/A
CV DEL TIEMPO DE RETENCIÓN	0.03 %	NMD 2%
PROMEDIO DEL ÁREA	34384.08 mAU*s	N/A
CV DEL ÁREA	0.81 %	NMD 2%
FACTOR DE COLEO ¹	4	NMD 4
EFICIENCIA DE LA COLUMNA ¹	3741 platos	< 1500

¹El resultado corresponde a la inyección 1-5 del estándar 1 de bromuro de pinaverio.

NMD: No más de, N/A: no aplica.

Cromatograma de la primera inyección

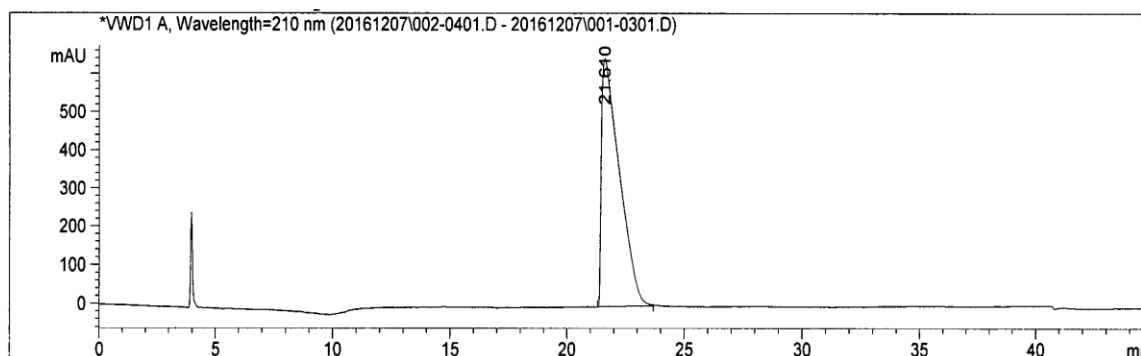


Figura 6: Cromatograma de la primera inyección de las cinco para la precisión del sistema.



De acuerdo a la precisión del sistema el porcentaje de recobro del segundo estándar de bromuro de pinaverio es de 99.09% con lo cual cumple con la especificación de que el recobro del 2 estándar debe estar entre el 98 y 102%.

4.4.2. PRECISIÓN.

Se pesaron 6 muestras de manera independiente, con valores de 10 ± 0.1 mg y se diluyeron en 20 mL de una mezcla de agua: acetonitrilo (80:20).

Después se obtuvieron los parámetros correspondientes, el criterio de aceptación es que los ensayos individuales deben estar entre 98-102%, y que el coeficiente de variación entre las muestras no debe ser más del 2%.

Tabla 18: Resultados de la precisión.

MUESTRA	PESO (mg)	ÁREA	% ENSAYO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
1	10.004	34483.5	100.1	98-102%
2	10.005	35060.5	101.8	98-102%
3	10.001	34709.7	100.8	98-102%
4	10.008	34738.3	100.8	98-102%
5	10.011	34915.4	101.3	98-102%
6	10.007	34903.4	101.3	98-102%
PROMEDIO			101.0	98-102%
DRESVIACIÓN ESTANDAR			0.58	N/A
COEFICIENTE DE VARIACIÓN.			0.6	No más del 2%

Cromatograma de la muestra.

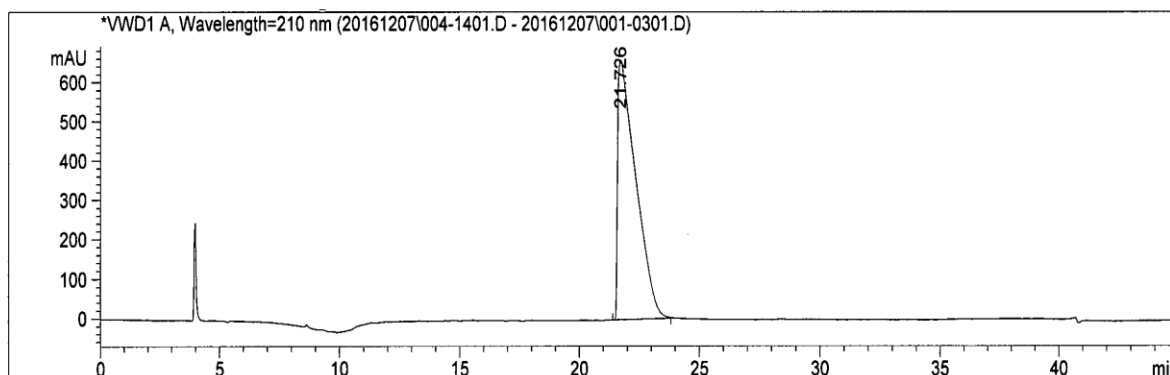


Figura 7: Cromatograma 1 de 6 muestras preparadas para la precisión.



La precisión cumple con los parámetros establecidos de validación que son el % Ensayos entre 98 y 102%, tanto los individuales, como el promedio y la CV no mayor a 2%, confirmando que el método es Preciso.

4.4.3. EXACTITUD:

La prueba de exactitud se corrió con un estándar certificado de bromuro de pinaverio para identificar el 100% de la concentración, posteriormente se repitieron al 80% y 120% del estándar definido al 100%.

4.4.3.1. EXACTITUD AL 80%

Se pesaron 3 muestras de alrededor de 8 mg de bromuro de pinaverio de forma independiente y se disolvieron en matraces de 20 mL, con una mezcla de agua: acetonitrilo (80:20).

Posteriormente se obtuvieron los siguientes resultados en los cuales el criterio de aceptación es que los ensayos estén entre 98-102%, y que el coeficiente de variación no sea más del 2%.

Tabla 19: Resultados de la prueba de exactitud al 80%

No DE MUESTRA	PESO (mg)	ÁREA	% ENSAYO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
1	8.002	27310.8	99.1	98-102%
2	8.002	27768.4	100.8	98-102%
3	8.009	27546.5	99.9	98-102%
PROMEDIO			99.9	98-102%
DESVIACIÓN ESTANDAR			0.85	N/A
COEFICIENTE DE VARIACIÓN.			0.9	No más del 2%



Cromatograma de la muestra 1 al 80%

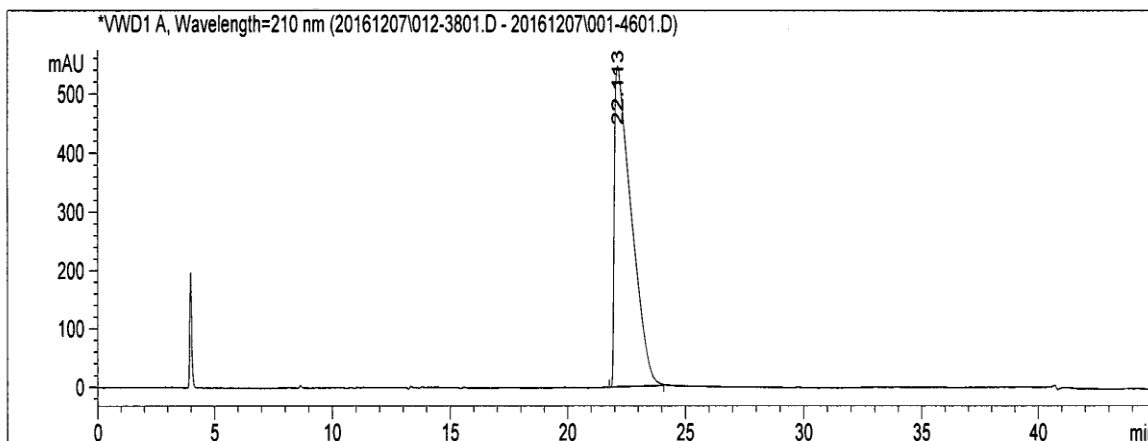


Figura 8: Cromatograma uno de tres muestras preparadas al 80% para la exactitud.

4.4.3.2. EXACTITUD AL 100%

Se pesaron 3 muestras de alrededor de 10 mg de bromuro de pinaverio de forma independiente y se disolvieron en matraces de 20 mL, con una mezcla de agua: acetonitrilo (80:20).

Posteriormente se obtuvieron los siguientes resultados en los cuales el criterio de aceptación es que los ensayos estén entre 98-102%, y que el coeficiente de variación no sea más del 2%.

TABLA 20: Resultados de la prueba de exactitud al 100%

No DE MUESTRA	PESO (mg)	ÁREA	% ENSAYO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN.
1	10.004	34483.5	100.1	98-120%
2	10.005	35060.5	101.8	98-120%
3	10.001	34709.7	100.8	98-120%
PROMEDIO			100.9	98-120%
DESVIACIÓN ESTANDAR			0.85	N/A
COEFICIENTE DE VARIACIÓN.			0.8	No más de 2%



Cromatograma de la muestra 1 al 100%.

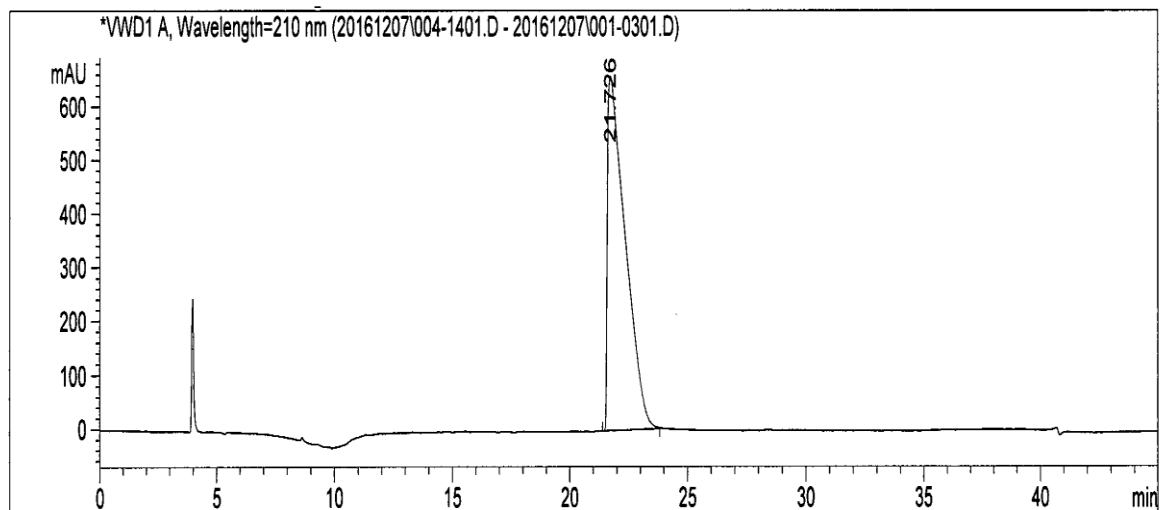


Figura 9: Cromatograma uno de tres muestras preparadas al 100% para la exactitud.

4.4.3.3. EXACTITUD AL 120%

Se pesaron 3 muestras de alrededor de 12 mg de bromuro de pinaverio de forma independiente y se disolvieron en matraces de 20 mL, con una mezcla de agua: acetonitrilo (80:20).

Posteriormente se obtuvieron los siguientes resultados en los cuales el criterio de aceptación es que los ensayos estén entre 98-102%, y que el coeficiente de variación no sea más del 2%.

Tabla 21: Resultados de la prueba de exactitud al 120%

No DE MUESTRA	PESO (mg)	ÁREA	% ENSAYO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
1	12.001	41578.6	100.6	98-120%
2	12.004	41723.3	100.9	98-102%
3	12.001	41661.3	100.8	98-102%
PROMEDIO			100.8	98-102%
DESVIACIÓN ESTANDAR			0.15	N/A
COEFICIENTE DE VARIACIÓN.			0.2	No más de 2%



Cromatograma de la muestra al 120%

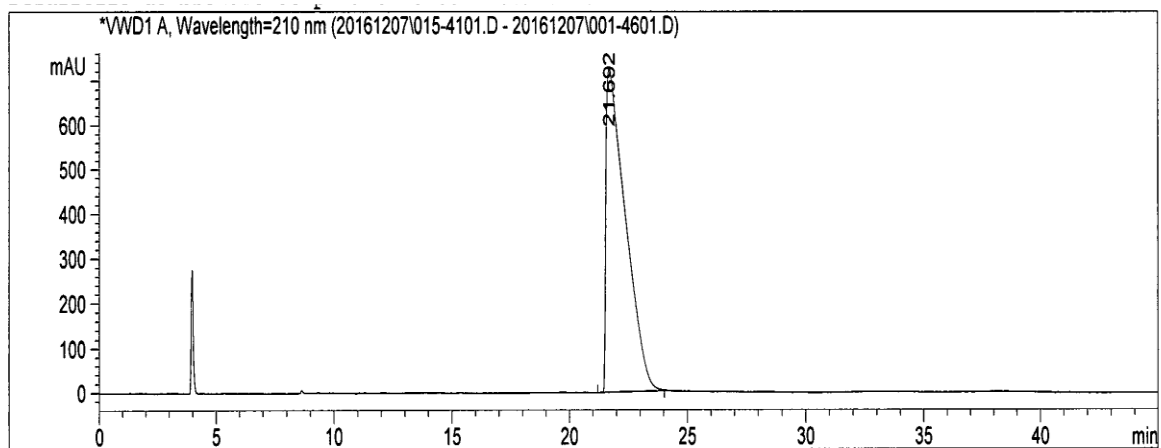


Figura 10: Cromatograma uno de tres muestras preparadas al 120% para la exactitud.

En los tres casos cumplen con los parámetros de validación, por lo cual se confirma que el método es exacto debido a que los % de ensayos se encuentran entre 98-102%, y la CV no mayor de 2%.

4.4.4. LINEALIDAD:

La linealidad se hizo una solución madre de la concentración más alta y a partir de ahí se realizaron diluciones para el resto de las concentraciones con la finalidad de obtener 6 puntos para realizar la gráfica y a partir de los datos mostrados se realizó un análisis de datos y una regresión lineal.

4.4.4.1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE:

Se pesaron exactamente 25.014 mg de bromuro de pinaverio y se disolvió en un matraz de 25 mL de diluyente, a partir de esta solución se prepararon las soluciones mostradas en la siguiente tabla:

Tabla 22: Preparación, concentración y resultados de las soluciones de la linealidad.

NIVEL (%)	SOLUCIÓN ESTÁNDAR		CONCENTRACION µg/mL	ÁREA
	ALÍCUOTA DEL STOCK (mL)	VOLUMEN DE AFORO (mL)		
20	1	10	99.9059	6589.6
40	2	10	199.8118	13739.7



NIVEL (%)	SOLUCIÓN ESTÁNDAR		CONCENTRACION $\mu\text{g/mL}$	ÁREA
	ALÍCUOTA DEL STOCK (mL)	VOLUMEN DE AFORO (mL)		
60	3	10	299.7177	20503.7
80	4	10	399.6237	27836.6
100	3	5	499.5296	35016.9
120	3	5	599.4355	41582.9

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA REGRESIÓN LINEAL.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999904098
Coefficiente de determinación r^2	0.999808205
r^2 ajustado	0.999760257
Error típico	203.7261938
Observaciones	6

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	865434583.5	865434583.5	20851.65368	1.37953E08
Residuos	4	166017.4482	41504.36205		
Total	5	865600601			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	-401.5202467	189.6587649	2.117066653	0.101677448
Variable X 1	70.38933992	0.48745737	144.4010169	1.37953E-08

	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	-928.0973961	125.0569028	928.0973961	125.0569028
Variable X 1	69.03594129	71.74273855	69.03594129	71.74273855



LINEALIDAD DEL 20% HASTA EL 120%

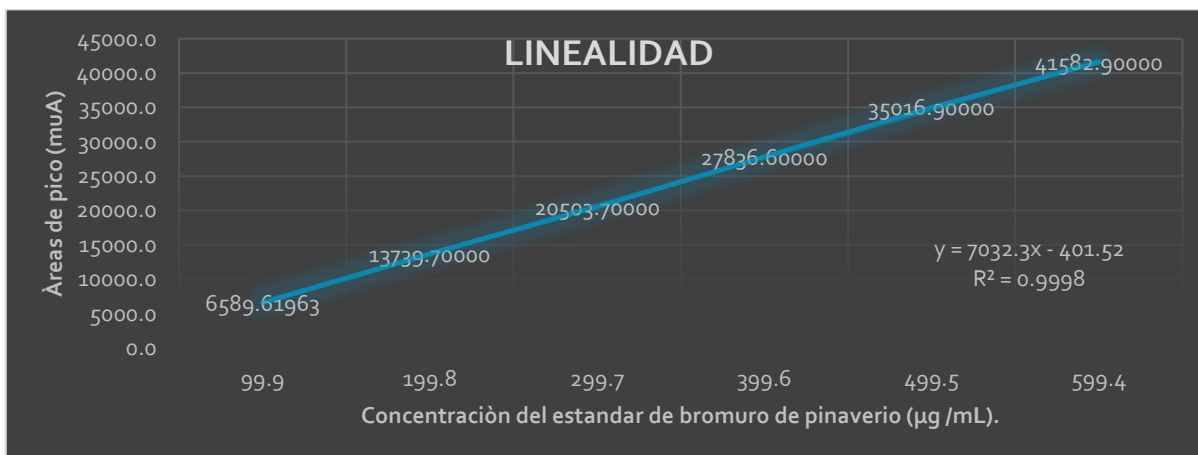


Grafico 1: Linealidad del 20% hasta el 120%

La r² al ser mayor de 0.99 cumple con la especificación, demostrando así que el método es lineal en el rango de 99.9 a 599.4 mg/mL.

4.4.5. ESTABILIDAD DE LA FASE MOVIL:

Se monitoreo los siguientes parámetros durante 4 días para la estabilidad de la fase móvil.

Tabla 23: Resultados de las pruebas de estabilidad para la fase móvil.

DÍA	APARIENCIA	PRESIÓN DEL SISTEMA (bar)	pH	LÍNEA BASE	TR (min)	% DIFERENCIA
Inicial 06/12/2016	SOLUCIÓN INCOLORA	N/A	8.2	Estable	21.69	N/A
07/12/2016	SOLUCIÓN INCOLORA	83	8.2	Estable	21.61	0
08/12/2016	SOLUCIÓN INCOLORA	82	8.2	Estable	21.74	0
09/12/2016	SOLUCIÓN INCOLORA	84	8.2	Estable	21.24	2

Al demostrar que la fase móvil no presenta cambios significativos, se puede confirmar que la fase móvil es estable al menos 4 días después de su preparación.



4.4.6. ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR:

Se pesó exactamente 10.003 mg del estándar de bromuro de pinaverio en 20 mL de diluyente y se inyectó de manera inmediata, posteriormente se resguardo por un periodo de 137 horas.

Tabla 24: Estabilidad del estándar.

PERIODO	No. INYECCIÓN	ÁREA	% Ensayo
INICIAL 08-12-2016	1	31082.1	90.3
	2	31842.8	92.5
		Promedio	91.4
		% Recobro	100
Periodo 1 22 horas	1	31965.2	91.7
	2	31325.2	89.8
		Promedio	90.8
		% Recobro	99
PERIODO	No. INYECCIÓN	ÁREA	% Ensayo
Periodo 2 137 horas	1	31860.8	90.9
	2	31977.3	91.3
		Promedio	91.1
		% Recobro	100

De acuerdo a la especificación, indica que el estándar no debe variar entre 98% y 102% por lo cual al tener recobro en el último periodo de 100%, también al no presentarse picos de los productos de degradación, se comprueba que el estándar es estable hasta por 6 días.

4.4.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA:

Se pesó exactamente 10.001 mg de la muestra de bromuro de pinaverio en un matraz de 20 mL, y se disolvió con diluyente, posteriormente de manera inmediata se inyectó en el HPLC, posteriormente se almaceno por un periodo de 137 horas.

Tabla 25: ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

PERIODO	No. INYECCIÓN	ÁREA	% Ensayo
INICIAL 08-12-2016	1	34266.4	99.5
	2	34175.3	99.3
		Promedio	99.4
		% Recobro	100



PERIODO	No. INYECCIÓN	ÁREA	% Ensayo
Periodo 1 22 horas	1	33991.9	97.5
	2	34132.4	97.9
	Promedio		97.7
		% Recobro	98
Periodo 2 137 horas	1	34394.3	98.1
	2	34418.9	98.2
	Promedio		98.2

De acuerdo a la especificación del % de Ensayo este entre 98% y 102%, por lo cual al estar las muestras al 98% se puede confirmar que la muestra estable durante 6 días.

4.4.8. SELECTIVIDAD:

Se pesaron exactamente de manera separada 5 mg de cada una de las impurezas de bromuro de pinaverio en un matraz aforado de 100 mL, (bromuro de 2-Bromo-4,5-dimetoxibencilo (PIN-III), bromuro de 4-[(2-2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil)metil]-4-[2-[2,((1S,2S,5S)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]heptil)etoxi]etil]mofolina (PIN IV), bromuro de 4-(2-bromo-4,5-dimetoxibencil)-4-(2-(2-((1R,5s)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-en-2il)etoxi)etil)morfol-4-ina (PIN V), bromuro de 4-(2-bromo-4,5-dimetoxibencil)-4-(2-hidroxietil)morfel-4-in (PIN VI)) y se diluyeron con 20 mililitros de Acetonitrilo y se aforo con agua desionizada, posteriormente se realizó una disolución de 1mL en 100mL para llegar a la concentración 0.5 µg/mL por separado y por ultimo de manera conjunta para hacer un estándar de impurezas

La muestra adicionada se preparó pesando 10mg de bromuro de pinaverio y se diluyo con la solución de las impurezas preparada previamente.



Tabla 26: Resultados de la selectividad de cada una de las impurezas de bromuro de pinaverio.

ANALITO	CONCENTRACIÓN TEÓRICA (µg/mL)	CONCENTRACIÓN REAL (µg/mL)	TR INDIVIDUAL (min)	TR EN LA MUESTRA ADICIONADA (min)
PIN	500	500	22.166	21.950
PIN III	0.5	0.5016	11.327	11.331
PIN IV	0.5	0.5002	26.063	25.921
PIN V	0.5	0.5015	20.683	20.467
PIN VI	0.5	0.5023	8.685	8.692

TR: Tiempo de retención

En este caso se comprueba que el método es capaz de identificar cada una de las impurezas, además de separarlas con resoluciones mayores a 1.5, por lo cual se demuestra que el método selectivo.

Cromatograma de la muestra adicionada al 0.1% de la muestra adicionada.

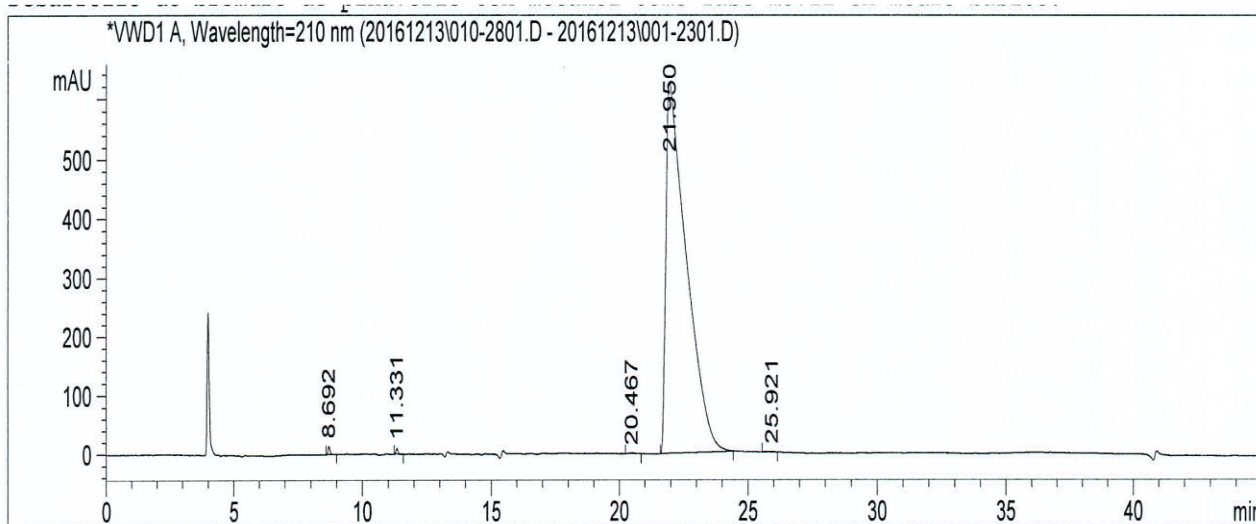


Figura 11: Cromatograma de la muestra adicionada al 0.1% de las impurezas para la selectividad.

4.4.9. ROBUSTEZ.

Se pesó 10 mg de estándar de bromuro de pinaverio exactamente 10.008 al cual se llevó a un matraz de 20 mL y se aforó con una mezcla de agua:acetonitrilo



80/20%, posteriormente se pesó otro estándar independiente de exactamente 10.006, al cual también se llevó a un matraz de 20 mL y se aforó con la misma solución.

Las robusteces se inyectaron de la misma forma que en la precisión del sistema, es decir, se inyectó el blanco para verificar que no esté ruidosa la línea base, posteriormente se inyectó un estándar para verificar recobro y tiempo de retención, después se inyectó un blanco para confirmar que no hubiera arrastre para que se inyecte 5 veces el primer estándar para así comprobar que la desviación relativa no sea mayor al 2° y por último se inyecta una vez el estándar 2 para confirmar el recobro.

Se realizó las robusteces a las siguientes condiciones:

Tabla 27: Resultados y comparación de cada una de las robusteces corridas para este método.

Parámetro.	Nominal.	pH de la fase móvil.		Proporción de la fase.		Flujo mL/min		Temperatura de la columna.		Criterio.
		8.15	8.25	A	B	0.5	0.7	35°C	45°C	
Promedio de tiempo de retención.	21.74	22.27	22.42	23.58	20.46	24.74	18.66	23.85	21.79	N/A
Eficiencia de la columna.	3580	1621	1716	3372	3282	3272	3570	2753	2823	<1500
Factor de coleo.	3.5	2.1	2.3	4.0	2.4	3.6	3.4	2.8	2.3	NMD 4.0
%CV del área.	0.43	1.29	0.53	1.00	0.19	0.17	0.35	0.45	1.05	NMD 2.0%
%CV del tiempo de retención.	0.44	0.51	0.12	0.53	0.21	0.10	0.48	0.41	0.66	NMD 1.0%
% Diferencia de retención de las últimas dos inyecciones.	0.6	0.3	0.3	0.8	0.0	0.0	0.8	0.8	1.3	NMD 2.0%
% Recuperación del estándar 2.	99.87	98.52	98.27	100.00	98.72	100.98	100.49	96.88	96.46	98%-102%

NMD: No más de, N/A: No aplica.



De acuerdo a los parámetros de validación se demuestra que el método es robusto en las variaciones de flujo, pH y la proporción de la fase móvil, pero en el caso de la temperatura de la columna, se observa que es un punto crítico en el método al dar % Ensayo alrededor del 96%.

4.5. DEGRADACIÓN FORZADA.

Se prepararon muestras para la degradación forzada de bromuro de pinaverio en fase sólida y en fase acuosa, del cual se obtuvieron los productos de degradación de cada exposición.

4.5.1. FASE SÓLIDA:

Se prepararon muestras de bromuro de pinaverio sobre placas que fueron expuestas al calor y con luz incandescente, a partir del cual se obtuvieron sus productos de degradación, y la cinética de degradación del API.

4.5.1.1. CALOR:

Se pesó exactamente 10 mg de la muestra sometida a degradación a 80°C a vacío durante 12 días y 10 mg de un testigo resguardado a temperatura ambiente, posteriormente se leyeron por el método validado HPLC para determinar si hubo degradación posterior a la exposición.

Cromatograma de la muestra expuesta a 80°C y vacío durante 12 días

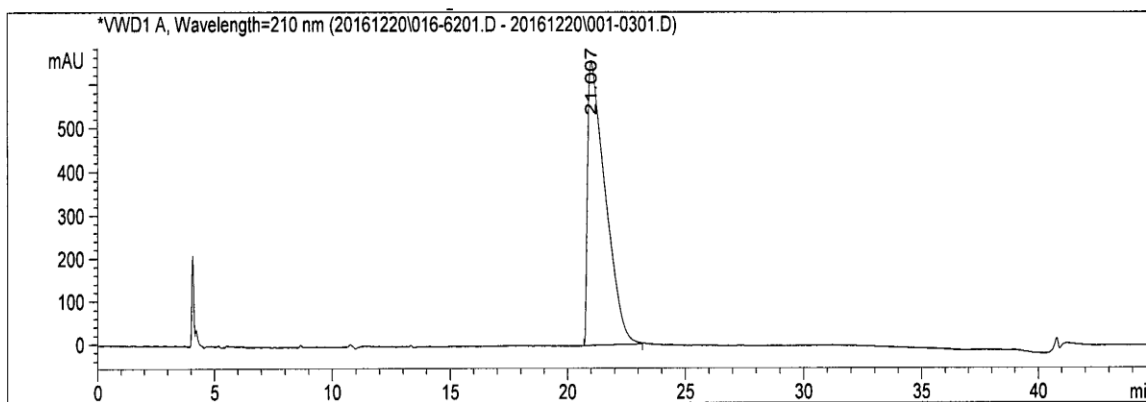


Figura 12: Cromatograma de la muestra expuesta a 80°C y vacío durante 12 días.

Se demostró que bromuro de pinaverio en Fase sólida es estable por un periodo de 12 días con temperatura de 80°C.



4.5.1.2. LUZ:

Se pesó exactamente 10 mg de la muestra sometida a degradación en cámara de luz y 10 mg de un testigo resguardado de los cambios de luz envuelta en aluminio, posteriormente se leyeron por el método validado HPLC para determinar si hubo degradación posterior a la exposición.

Cromatograma de la muestra expuesta a la luz durante 12 días.

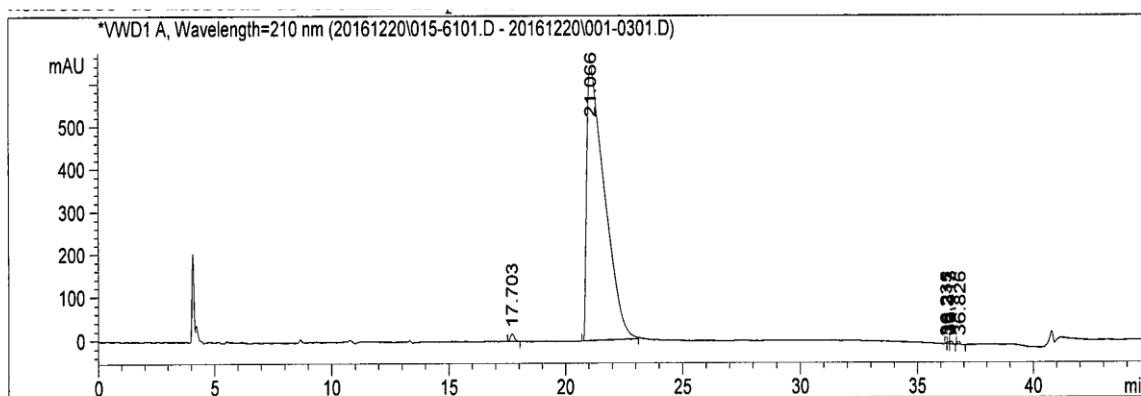


Figura 13: Cromatograma de la muestra expuesta a luz durante 12 días.

Se demostró que bromuro de pinaverio es ligeramente inestable a exposiciones con luz, debido a que en la muestra se observa la aparición de 5 impurezas; por lo cual se recomienda resguardar a bromuro de pinaverio de la Luz cuando se va a utilizar durante periodos largos de tiempo.

4.5.2. FASE ACUOSA:

Se prepararon soluciones de bromuro de pinaverio, que posteriormente fueron expuestas al calor, a la luz incandescente, y finalmente a pH de 12, del cual se obtuvieron los productos de degradación, y la cinética de degradación del API.

4.5.2.1. CALOR:

Se pesó exactamente 10 mg de bromuro de pinaverio y se disolvió con 1 mL de acetonitrilo, y 15 mL de agua deionizada, posteriormente se colocó en una parrilla de calentamiento con termómetro durante 12 días con su respectivo blanco, el cual se preparó de la misma manera solo que a esta no se le agrego muestra; Posteriormente cada muestra se transfirió en un matraz de 20 mL y se llevó al aforo con acetonitrilo.



Tabla 28: Resultados de la degradación forzada con calor a 80°C

TIEMPO (h)	PESO (mg)	ÁREA	VOLUMEN DEL AFORO (mL)	CONCENTRACIÓN (µg/mL)
0	10.004	35043.9	20	510.30
27	10	32975.7	20	480.18
93	10.012	27539.9	20	401.03
141	10.013	26435.7	20	384.95
169	10.005	28599.7	20	416.46
266	10.007	17175.6	20	250.11

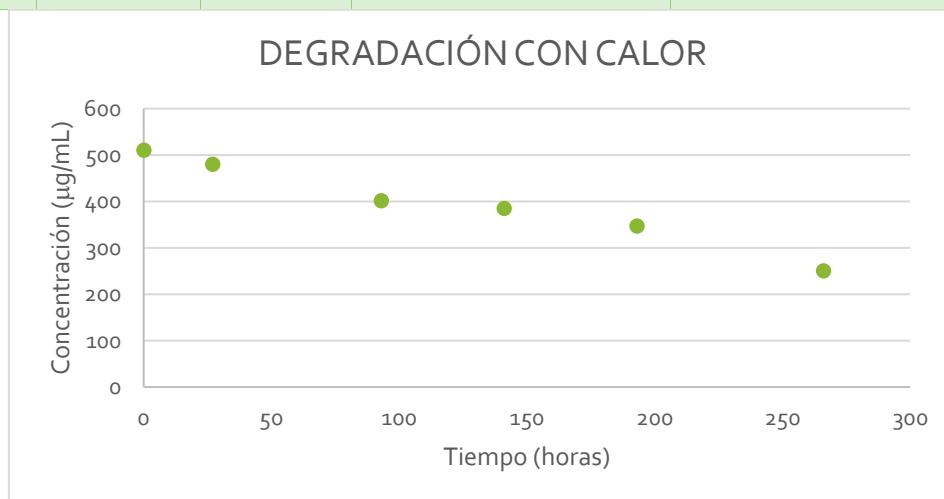


Gráfico 2: Degradación Forzada de Bromuro de Pinaverio con calor.

Cromatograma de la muestra expuesta con calor durante 12 días.

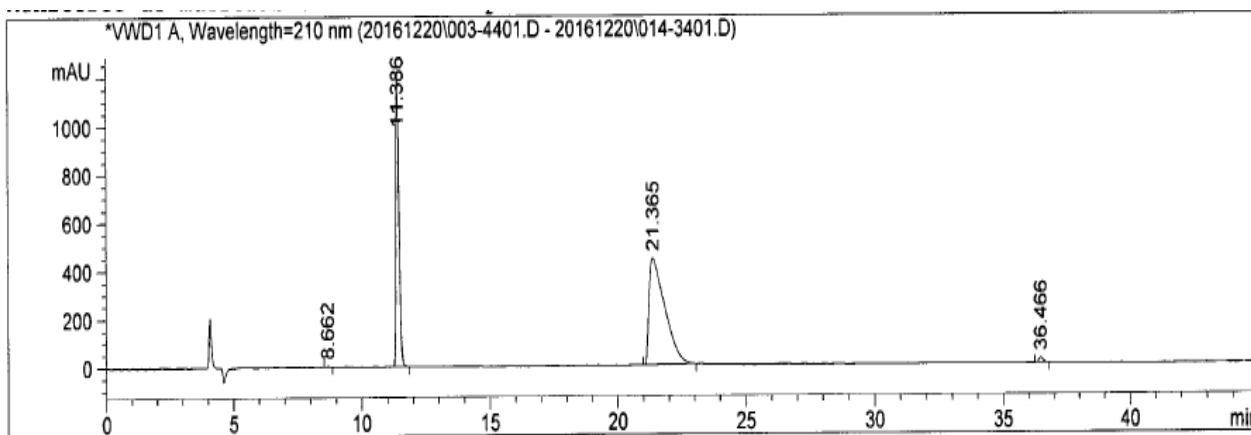


Figura 14: Cromatograma de la muestra expuesta con calor durante 12 días.



Después de la prueba realizada, se comprobó que Bromuro de Pinaverio es altamente sensible a temperaturas de 80 °C desde el primer día, debido a que de manera lineal la concentración de Bromuro de pinaverio y la aparición de sus impurezas, se hace presente y va aumentando con forme al tiempo que se expone, por lo cual en forma de solución es mejor evitar el contacto con fuentes de calor para evitar su posterior degradación.

4.5.2.2. DETERMINACIÓN DEL ORDEN DE REACCIÓN.

Para la determinación del orden de reacción se utilizó el método integral, para el cual utilizan las ecuaciones de la recta de cada uno de los órdenes de reacción; se graficaron y se obtuvo la pendiente, de acuerdo a la pendiente con r^2 más cercano a uno se toma este como el orden de reacción.

Tabla 29: Tiempo vs concentración para determinar el orden de reacción.

Tiempo (minutos)	CONCENTRACION (µg/mL)	ln (Cao/Ca)	1/Ca
0	510.2972171	0	0.00195964
1581	480.1808001	0.06083063	0.00208255
5561	401.0265504	0.2409657	0.0024936
8462	384.9475698	0.28188619	0.00259776
11577	347.1455108	0.3852493	0.00288064
15922	250.105179	0.71311179	0.00399832

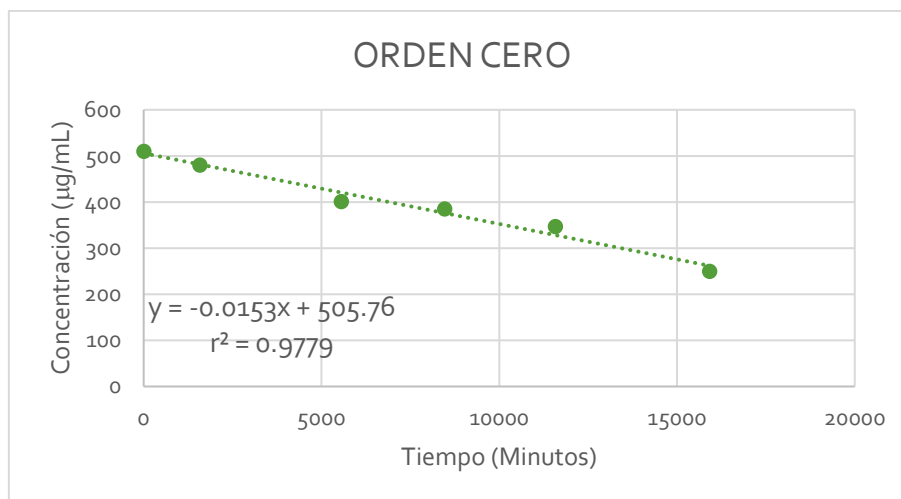


Gráfico 3: Muestra expuesta al calor durante 12 días (orden cero)



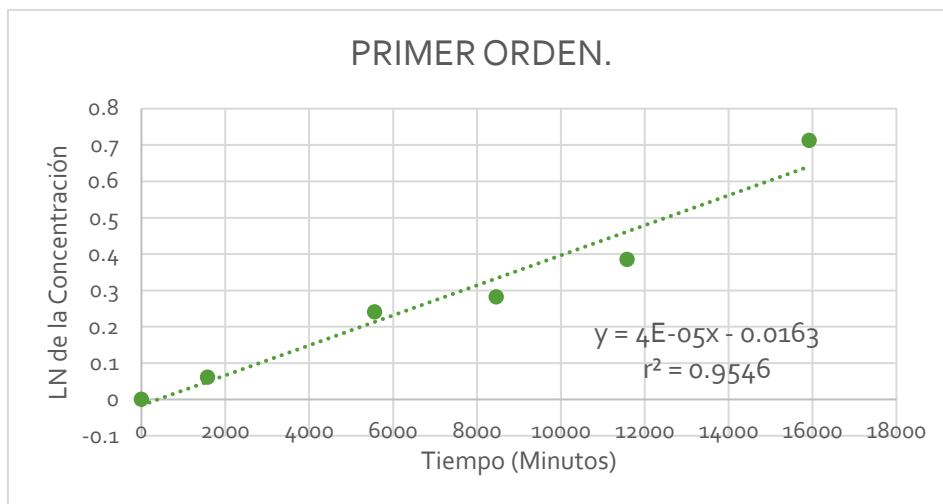


Gráfico 4: Muestra expuesta al calor durante 12 días (orden uno)

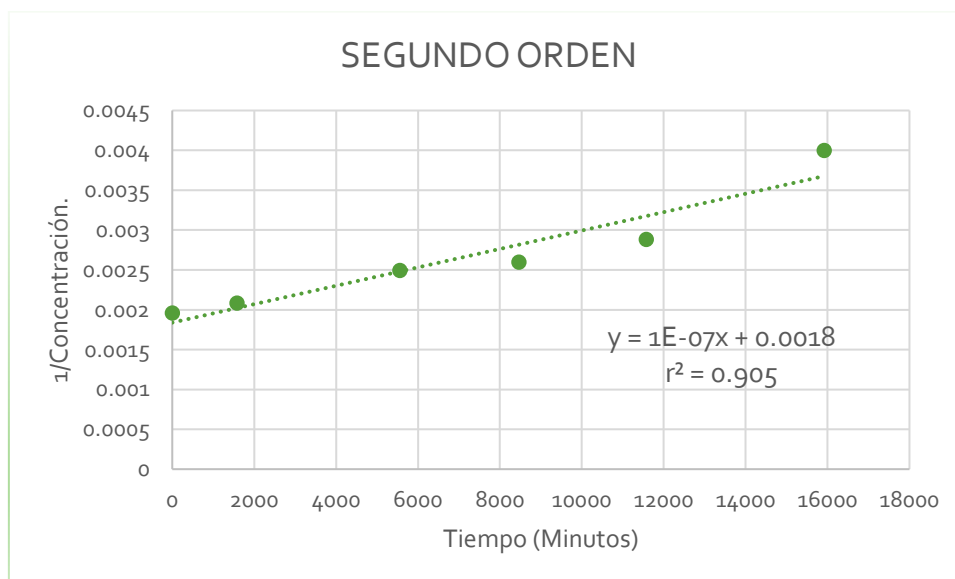


Gráfico 5: Muestra expuesta al calor durante 12 días (orden dos)

Tabla 30: Resultados de la regresión lineal para la determinación del orden de reacción.

Orden de reacción	Pendiente	Ordenada al origen	r²
Cero	0.0153	505.76	0.9779
Primero	0.0004	0.0163	0.9546
Segundo	0.0000001	0.0018	0.905



De acuerdo a los gráficos que se obtuvieron se indicó que el orden de reacción es 0, para la exposición en solución con temperatura de 80 °C, utilizando el método gráfico. Por consiguiente, se afirma que el bromuro de pinaverio se degrada con las exposiciones al calor, lo cual también aplica en aguas residuales, lo que lo vuelve un peligro potencial para el ambiente.

4.5.2.2.1. TIEMPO DE VIDA MEDIA Y VELOCIDAD DE REACCIÓN.

De acuerdo con las fórmulas para orden de reacción 0 se obtuvieron los siguientes resultados.

$$\infty v = 0.0153 \mu\text{g/mL min}$$

$$\infty t_{1/2} = 16676.38 \text{ minutos} \quad \text{ó} \quad 277.94 \text{ horas}$$

La velocidad de reacción es siempre constante e independiente de la concentración de bromuro de pinaverio en la solución; Sin embargo, el API tarda 277.9 horas en degradarse al 50% de la concentración en la solución.

4.5.2.3. LUZ:

Se pesó exactamente 10 mg de bromuro de pinaverio y se disolvió con 1 mL de acetonitrilo, y 15 mL de agua deionizada, posteriormente se colocó en una cámara de luz incandescente durante 12 días con su respectivo blanco, el cual se preparó de la misma manera solo que a esta no se le agregó muestra; Ya que finalizó el periodo, cada muestra se transfirió en un matraz de 20 mL y se llevó al aforo con acetonitrilo.

Tabla 31: Resultados de la degradación forzada con luz.

TIEMPO (h)	PESO (mg)	ÁREA	VOLUMEN DEL AFORO (mL)	CONCENTRACIÓN (µg/mL)
0	10.004	34513.9	20	502.58
27	10.006	34357.1	20	500.30
53	10.006	34336.5	20	500.00
119	10.001	31075.1	20	452.50



TIEMPO (h)	PESO (mg)	ÁREA	VOLUMEN DEL AFORO (mL)	CONCENTRACIÓN (µg/mL)
144	10.004	34116	20	496.79
168	10.010	33918	20	493.90
195	10.002	33958.3	20	494.49
292	10.012	33463.4	20	487.28

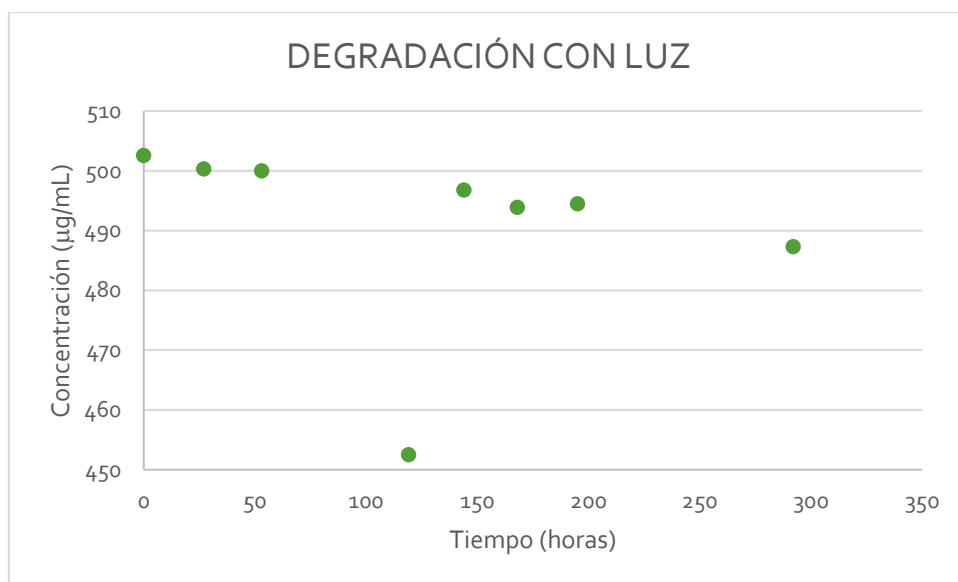


Gráfico 6: Muestra expuesta con Luz durante 12 días.

Cromatograma de la muestra expuesta a la luz durante 12 días.

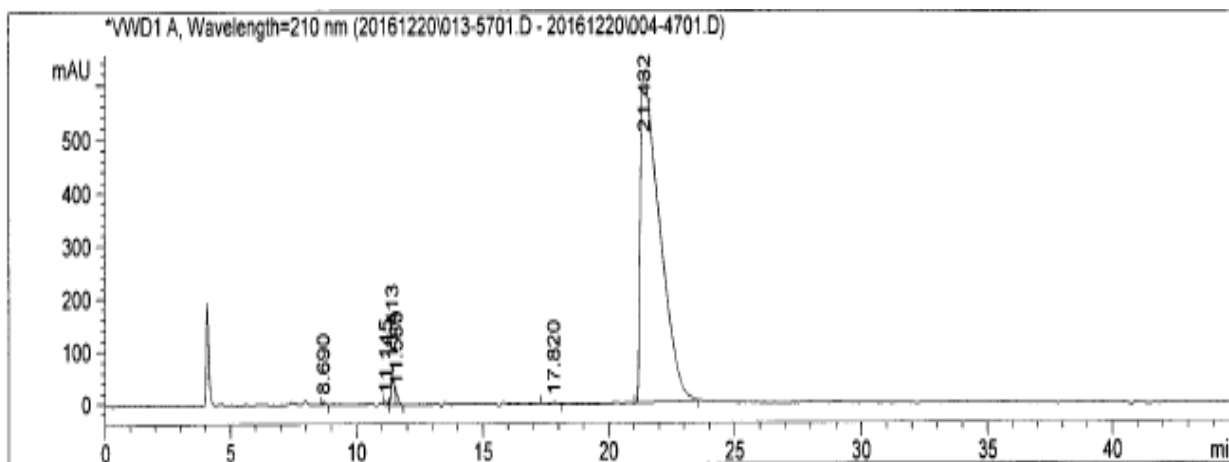


Figura 15: Cromatograma de la muestra expuesta a luz durante 12 días.



Después de la prueba realizada, se comprobó que Bromuro de pinaverio es ligeramente sensible a la Luz de acuerdo a lo examinado se presentan 4 impurezas las cuales se demuestra su presencia al aumentar su concentración con forme pasan los días. Sin embargo, la señal obtenida a los 8.690 minutos es parte de la línea base, debido a que a medida que pasan los días la concentración y la altura de este no crece, para lo cual se recomienda que si bromuro de pinaverio va a estar en solución durante varios días se debe resguardar de la luz para evitar la degradación del mismo.

4.5.2.3.1. Determinación de la valides de un dato anómalo

Debido a que el dato cuatro de 452.50 µg/mL dentro de este gráfico, no cuenta con la exactitud prevista se analiza este dato por el análisis de datos anómalos con los contrastes de Dixon.

$$Q = \frac{[valor\ sospechoso - valor\ más\ cercano]}{\{Valor\ más\ grande - valor\ más\ pequeño\}} \quad \text{Ecuación 15}$$

$$Q = \frac{[452.5 - 500.00]}{\{502.58 - 487.28\}} = -3.1 \quad \text{Ecuación 16}$$

Por lo tanto, de acuerdo a la tabla de valores de Dixon para dos colas el valor es de 0.570 por lo cual el dato es rechazado dentro de la gráfica ya que es un resultado anómalo.

4.5.2.3.2. Determinación del orden de reacción:

Para la determinación del orden de reacción se utilizó el método integral, para el cual utilizan las ecuaciones de la recta de cada uno de los órdenes de reacción; se graficaron y se obtuvo la pendiente, de acuerdo a la pendiente con r² más cercano a uno se tomó este como el orden de reacción.

Tabla 32: Tiempo vs concentración para determinar el orden de reacción.

tiempo (minutos)	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	LN(Cao/Ca)	1/Ca
0	502.5795394	0	0.00198973
1622	500.2962717	0.00455345	0.00199882
3203	499.9963016	0.00515321	0.00200001



tiempo (minutos)	CONCENTRACION (µg/mL)	LN(Cao/Ca)	1/Ca
7183	452.5049167	0.10495529	0.00220992
8672	496.7854565	0.01159566	0.00201294
10084	493.9022486	0.01741629	0.00202469
11747	494.4890833	0.01622884	0.00202229
17548	487.2825197	0.03090984	0.0020522

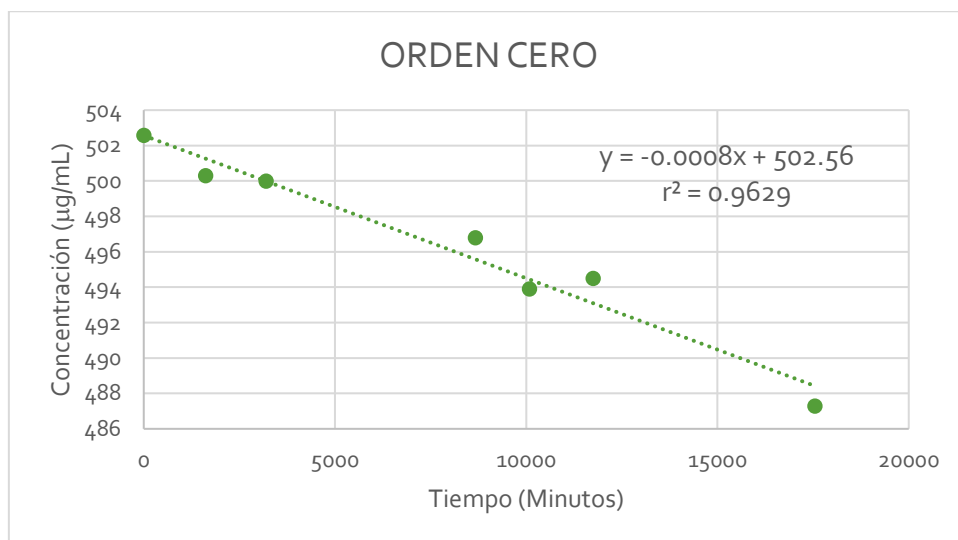


Gráfico 7: Muestra expuesta con luz durante 12 días (orden cero)

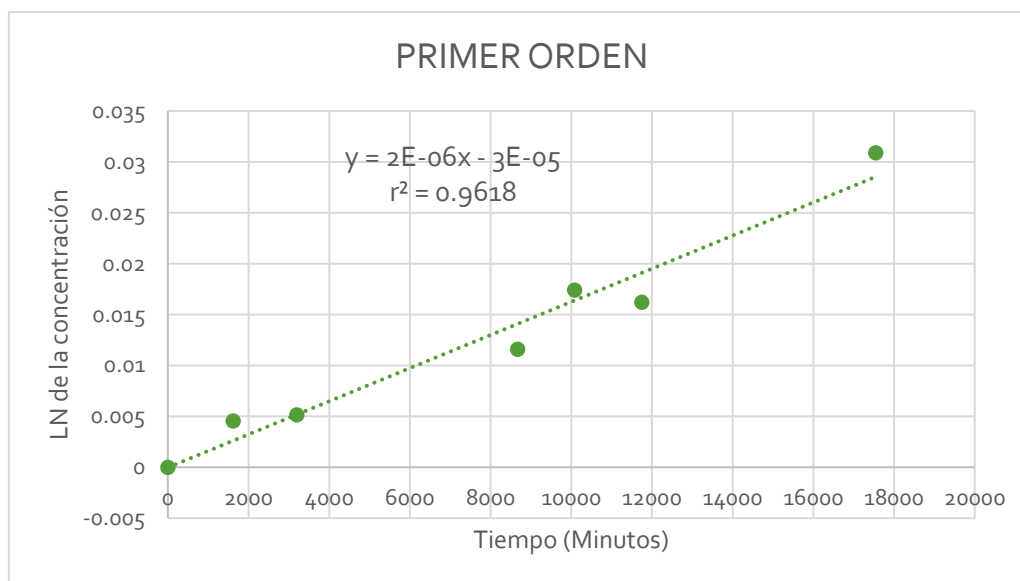


Gráfico 8: Muestra expuesta con luz durante 12 días (orden uno)



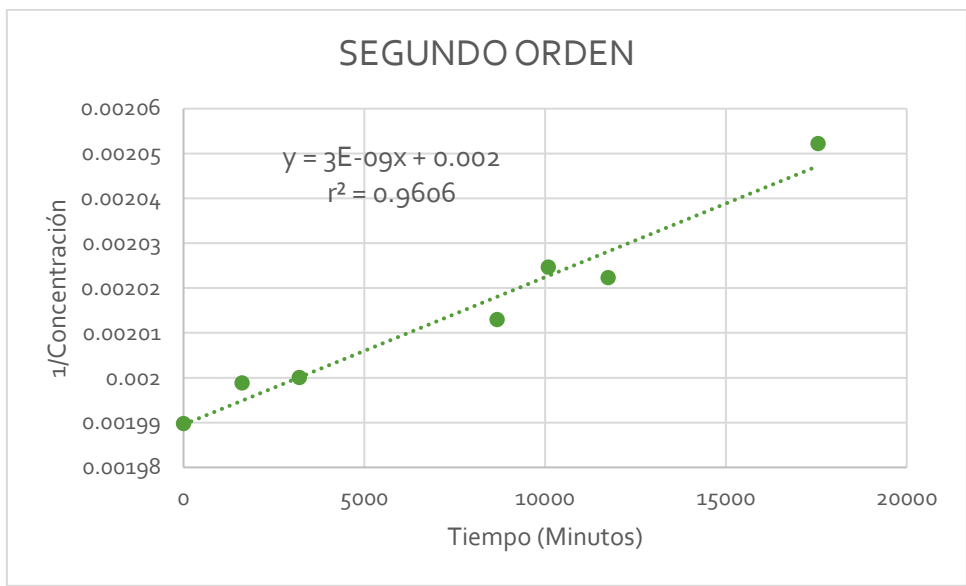


Gráfico 9: Muestra expuesta con luz durante 12 días (orden dos)

Tabla 33: Resultados de la regresión lineal para la determinación del orden de reacción.

Orden de reacción	Pendiente	Ordenada al origen	r²
Cero	0.0153	505.76	0.9779
Primero	0.0004	0.0163	0.9546
Segundo	0.0000001	0.0018	0.905

De acuerdo a los gráficos que se obtuvieron se indicó que el orden de reacción es 0, para la exposición en solución con Luz; Por consiguiente, se afirma que el bromuro de pinaverio se degrada con las exposiciones a la luz, lo cual también aplica en aguas residuales, lo que lo vuelve un peligro potencial para el ambiente.

4.5.2.3.3. TIEMPO DE VIDA MEDIA Y VELOCIDAD DE REACCIÓN.

De acuerdo con las fórmulas para orden de reacción 0 se obtuvieron los siguientes resultados.

$$\infty v = 0.0008 \mu\text{g/mL min}$$



$$\infty t_{1/2} = 314112.21 \text{ minutos} \quad \text{ó} \quad 5235.20 \text{ horas}$$

La velocidad de reacción es siempre constante e independiente de la concentración de bromuro de pinaverio en la solución. Sin embargo, el API tarda 5235.2 horas en degradarse al 50% de la concentración en la solución.

4.5.2.4. pH de 12:

Se pesó exactamente 10 mg de bromuro de pinaverio y se disolvió con 1 mL de acetonitrilo, y 15 mL de agua deionizada, posteriormente se ajustó el pH a 12 con una solución de hidróxido de sodio al 0.1 N y se resguardo de la luz en una gaveta durante 12 días con su respectivo blanco, el cual se preparó de la misma manera solo que a esta no se le agrego muestra; Ya que finalizó el periodo, cada muestra se transfirió en un matraz de 20 mL y se llevó al aforó con Acetonitrilo.

Tabla 34: Resultados de la degradación forzada a pH de 12

TIEMPO (h)	PESO (mg)	ÁREA	VOLUMEN DEL AFORO (mL)	CONCENTRACIÓN (µg/mL)
0	10	34718.1	20	505.55
66	10.006	33480.8	20	487.54
91	10.002	33388.2	20	486.19
115	10.011	33430.7	20	486.81
142	10.006	33570.8	20	488.85
166	10.019	33509.4	20	487.95
235	10.01	33304.1	20	484.96
263	10.007	33646.6	20	489.95
288	10.003	31561.2	20	459.58

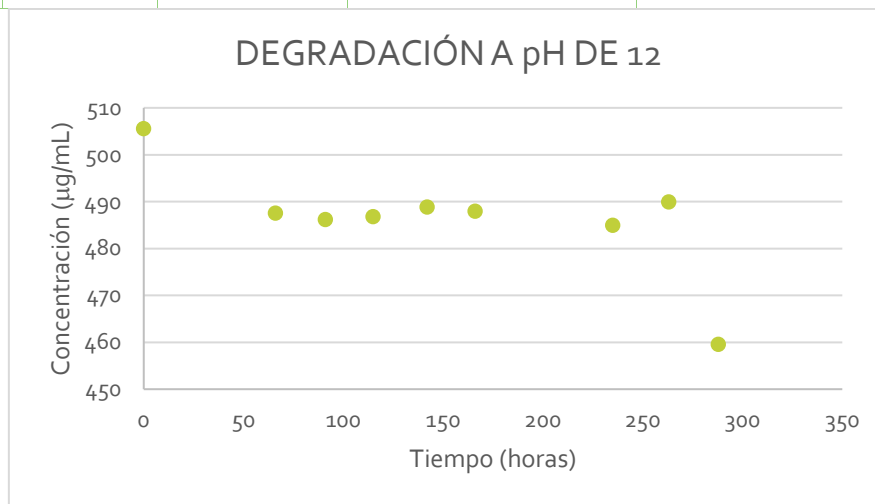


Gráfico 10: Muestra expuesta con pH 12, durante 12 días.



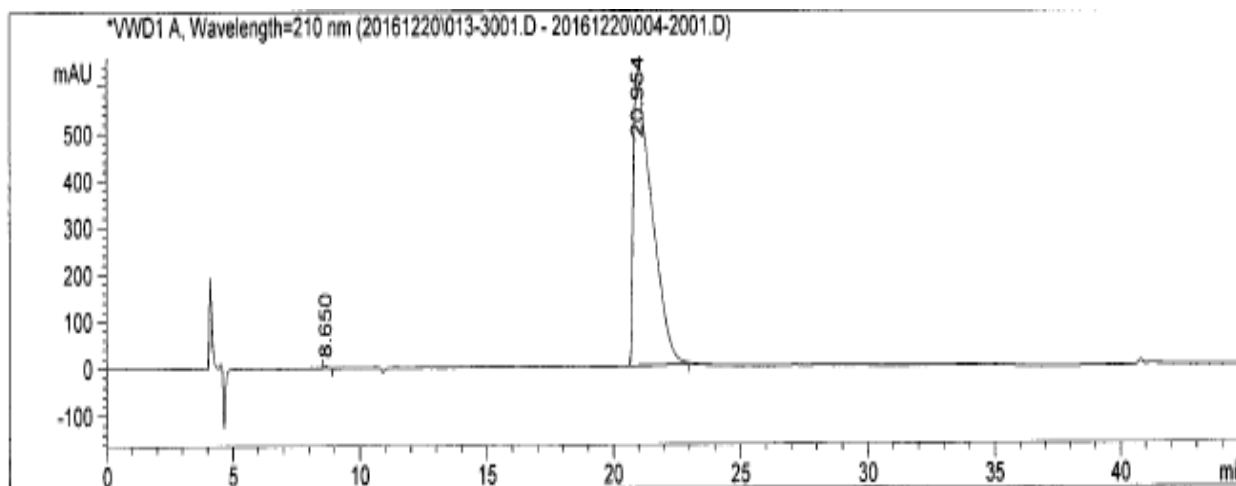


Figura 16: Cromatograma de la muestra expuesta a pH 12 durante 12 días.

De acuerdo al gráfico anterior no hay picos presentes fuera del Bromuro de Pinaverio con lo cual se indica que el mismo es estable en solución acuosa a pH de 12, El pico que eluye a los 8.6 minutos no es una impureza debido a que sale en todas las muestras presentes en esta degradación, pero se mantiene constante el área, con lo cual no se demuestra degradación.

4.5.2.4.1. DETERMINACIÓN DEL ORDEN DE REACCIÓN.

Debido a que la cantidad de datos obtenidos fueron pocos para determinar el orden de reacción ya que el Bromuro de Pinaverio demostró ser estable durante 12 días a pH de 12 en solución acuosa.

4.6. IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN POR UHPLC.

En un equipo UHPLC *thermo scientific ultimate 3000*, se acondicionó el equipo bajo las mismas condiciones del método de Ensayo, ya validado con anterioridad.

Para el detector de masas se utilizó un Espectrómetro de masas Compact LC-QqTOF, para espectrometría de cromatografía cuádrupola líquida, de la marca Bruker, por tanto. Se corrió bajo las siguientes condiciones:



Tabla 35: Condiciones del UHPLC para la identificación.

UHPLC	MS
Fase A: Buffer de acetatos (acetato de amonio ajustado con hidróxido de amonio). Fase B: Metanol Temperatura de la columna: 40°C Volumen de inyección: 15 µL Modo: Gradiente. Flujo: 0.6 mL/min pH: 8.2	Comienzo de escáner: 50 m/z Termino de escáner: 1000 m/z Polaridad del ion: Negativo. Capilaridad: 4500 V. Nebulizador: 3.0 Bar. Temperatura del gas acarreador: 200 °C Flujo del gas acarreador: 12.0 L/min

Tabla 36: Condiciones del MS para la Identificación de impurezas (Polaridad positiva).

Comienzo de escáner: 50 m/z Termino de escáner: 1000 m/z Polaridad del ion: Positiva. Capilaridad: 4500 V. Nebulizador: 0.3 Bar. Temperatura del gas acarreador: 180 °C Flujo del gas acarreador: 4.0 L/min

4.6.1. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE IMPUREZAS:

Se pesaron exactamente de manera separada 5 mg de cada una de las impurezas de bromuro de pinaverio, en un matraz de 100 mL (bromuro de 2-Bromo-4,5-dimetoxybenzilo (PIN-III), bromuro de 4-[(2-2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil)metil]-4-[2-[2,((1S,2S,5S)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]heptil)etoxi]etil]mofolina (PIN IV), bromuro de 4-(2-bromo-4,5-dimetoxibencil)-4-(2-(2-((1R,5s)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-2-en-2il)etoxi)etil)morfol-4-ina (PIN V), bromuro de 4-(2-bromo-4,5-dimetoxibencil)-4-(2-hidroxietil)morfel-4-in (PIN VI)) y se diluyeron con 20 mililitros de Acetonitrilo y se aforó con agua desionizada, posteriormente se realizó una disolución de 10 mL en 100 mL para llegar a la concentración 5 µg /mL de manera conjunta en un matraz donde previamente se pesó 10 mg de



Bromuro de Pinaverio, y se aforó con la mezcla de para hacer un estándar de impurezas con una mezcla de Agua: Acetonitrilo (80:20).

4.6.2. FASE ACUOSA.

Posterior a la degradación forzada en fase acuosa, se volvieron a inyectar en un UHPLC *thermo scientific ultimate 3000*, acoplado a un equipo para la lectura de masas *Bruker micrOTOF-Q ESI-Qq-TOF* para su identificación por peso molecular, los resultados obtenidos fueron:

4.6.2.1. ESTÁNDARES.

Para verificar método se volvió a inyectar el estándar de bromuro de pinaverio, junto con sus impurezas y se realizó su identificación por peso molecular.

4.6.2.1.1. IONIZACIÓN NEGATIVA.

Para la ionización negativa se acondiciono el equipo UHPLC con el método básico para favorecer la ionización de los estándares debido a que la mayoría de las impurezas son detectables con este método.

- Bromuro de 4-(2-bromo-4,5-dimetoxibencil)-4-(2-hidroxiethyl) morfel-4-in (PIN VI)

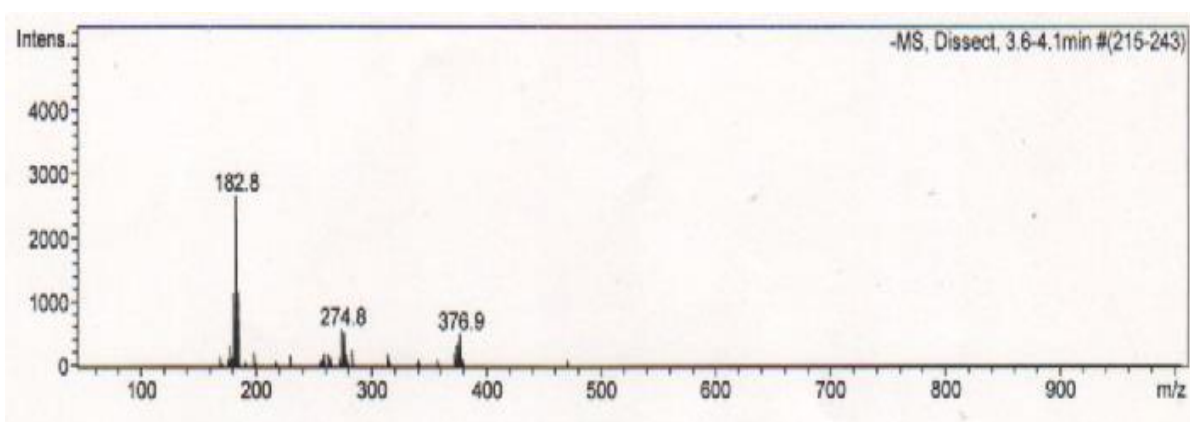


Figura 17: Espectro de masas de PIN VI.

De acuerdo a los datos obtenidos la masa es de 376.9 g/mol a diferencia de la masa de PIN VI es de 361.25 g/mol, la diferencia entre ambos es de 15.65 g/mol



- Bromuro de 4-(2-bromo-4,5-dimetoxibencil)-4-(2-(2-((1R,5s)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1]hept-2-en-2il)etoxi)etil)morfol-4-ina (PIN V).

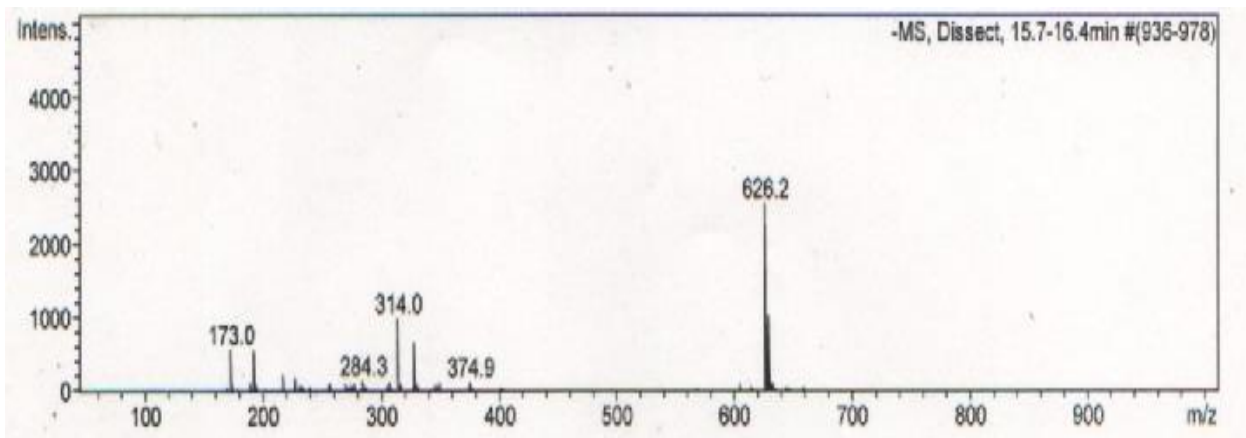


Figura 18: Espectro de masas de PIN V.

De acuerdo a los datos obtenidos la masa es de 626.2 g/mol a diferencia de la masa de PIN V es de 587.12 g/mol, la diferencia entre ambos es de 39.08 g/mol, con lo cual indica que se adicionó un átomo de potasio dentro de la molécula.

- Bromuro de Pinaverio.

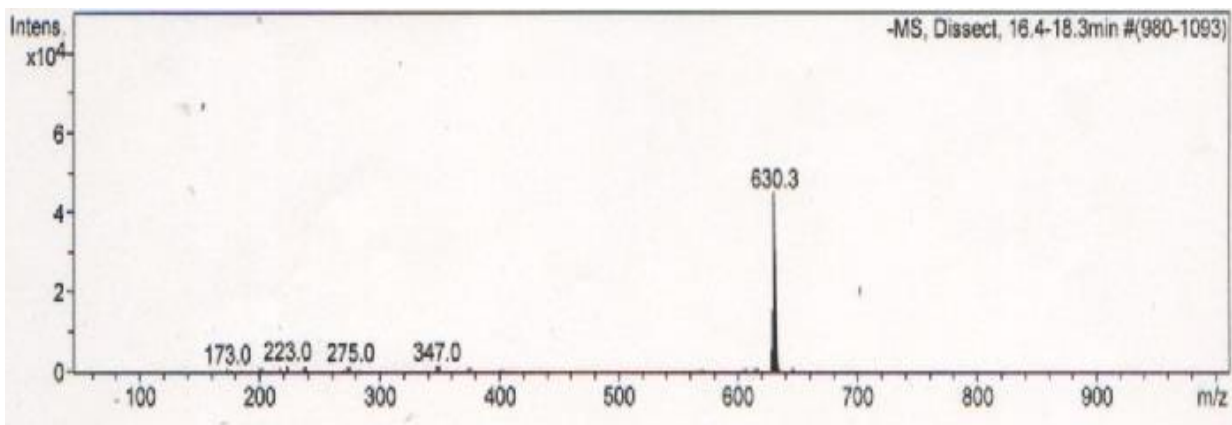


Figura 19: Espectro de masas de PIN.

De acuerdo a los datos obtenidos la masa es de 630.3 g/mol a diferencia de la masa de PIN es de 591.41 g/mol, la diferencia entre ambos es de 38.89 g/mol, con lo cual indica que se adicionó un átomo de potasio dentro de la molécula.



- Clorhidrato de N-{2-[2-((1S, 2S, 5S)-6, 6-Dimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-yl)-ethoxy]-ethyl} morpholine (PIN II)

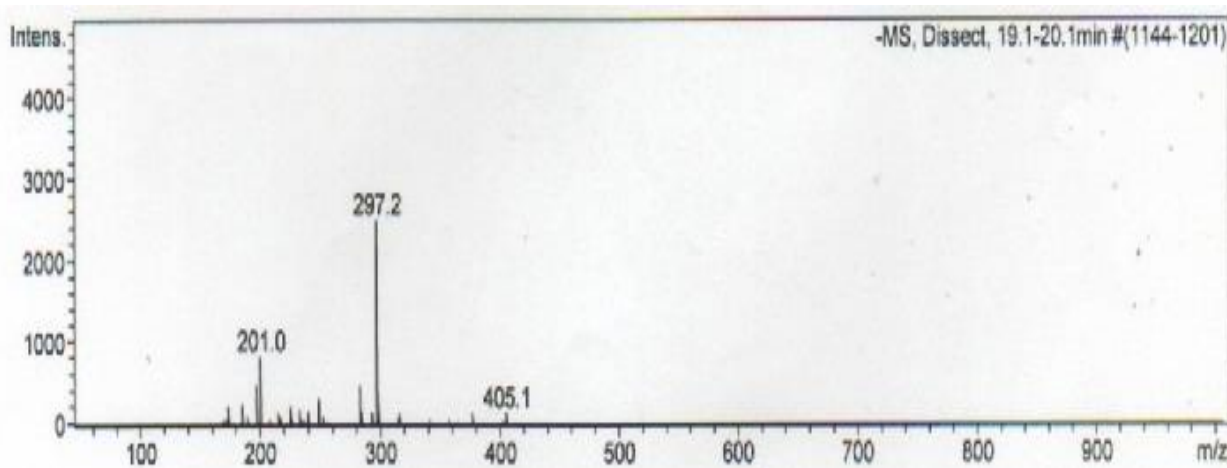


Figura 20: Espectro de masas de PIN II.

De acuerdo a los datos obtenidos la masa es de 297.2 g/mol a diferencia de la masa de PIN II es de 281.89 g/mol, la diferencia entre ambos es de 15.31, con lo cual indica que se adicionó una molécula de amonio para neutralizar la carga.

- Bromuro de 4-[(2-2'-bromo-4',5'-dimetoxifenil) metil]-4-[2-[2-((1S,2S,5S)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]heptil)etoxi]etil]mophilina (PIN IV)

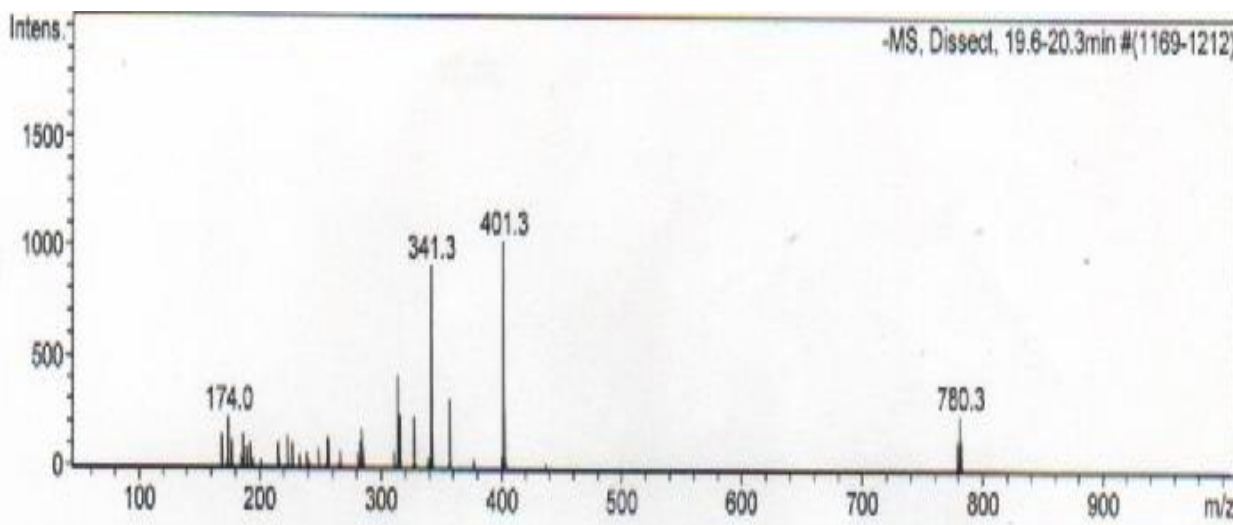


Figura 21: Espectro de masas de PIN IV.

De acuerdo a los datos obtenidos la masa es de 780.3 g/mol a diferencia de la masa de PIN VI es de 741.59 g/mol, la diferencia entre ambos es de 38.71, con lo cual indica que un átomo de potasio se adicionó dentro de la molécula.



4.6.2.2. CALOR.

Posterior a los 12 días de exposición al calor en medio acuoso se inyectaron las muestras en el UHPLC acoplado a masas, para llevar a cabo la identificación de los productos de degradación por peso molecular.

4.6.2.2.1. IONIZACIÓN NEGATIVA.

Para la ionización negativa se acondiciono el equipo UHPLC con el método básico para favorecer la ionización de las muestras debido a que la mayoría de las impurezas son detectables con este método.

- Bromuro de Pinaverio.

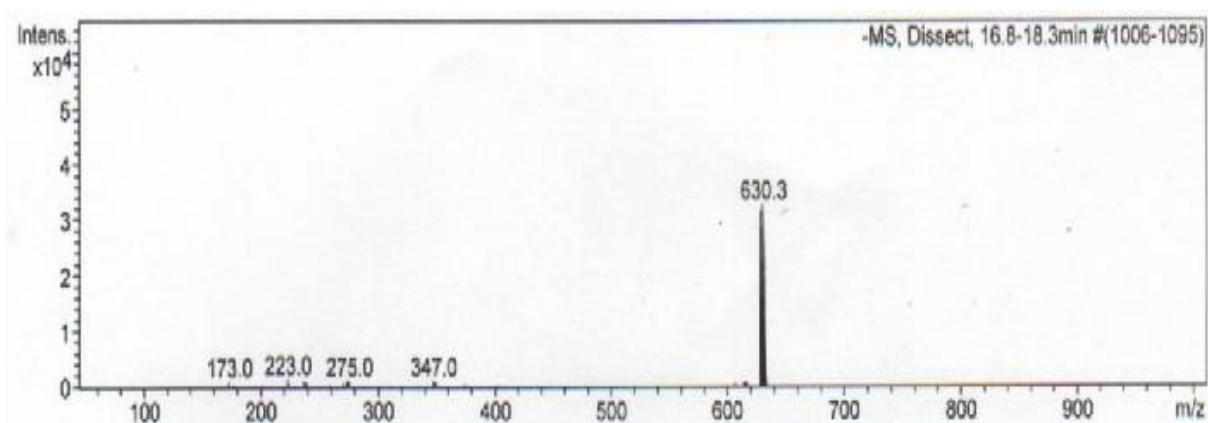


Figura 22: Espectro de masas de PIN.

Este resultado es perteneciente a Bromuro de pinaverio por su peso molecular de 630.3 g/mol, cuando su peso reportado es de 591.41 g/mol con una diferencia de 38.89 g/mol con lo cual indica una adición de un átomo de potasio dentro de la molécula, durante la lectura.



- Impureza 1

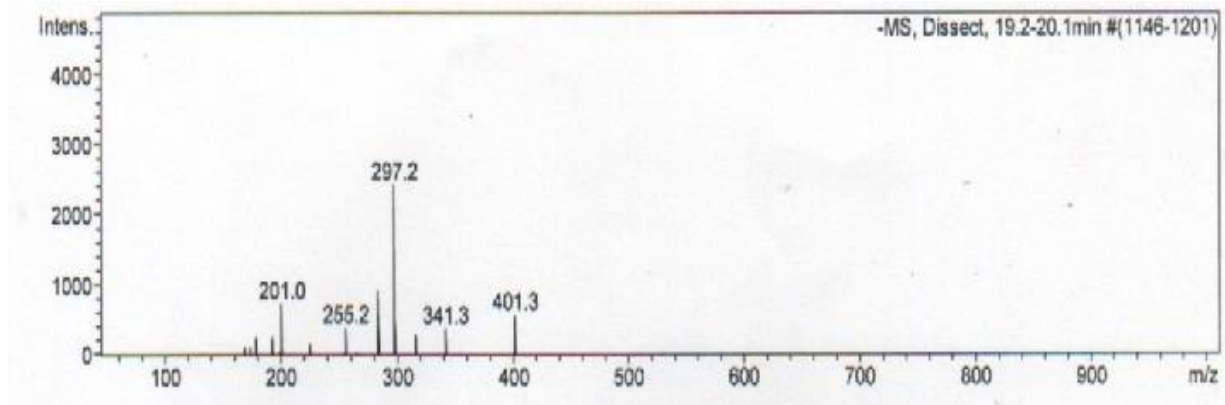


Figura 23: Espectro de masas de la impureza 1.

De acuerdo al resultado anterior se demuestra la presencia de PIN II como producto de degradación con un peso molecular de 281.43. Sin embargo, dentro de las muestras de degradación muestran la adición de un radical hidroxilo en el átomo de nitrógeno.

- Impureza 2

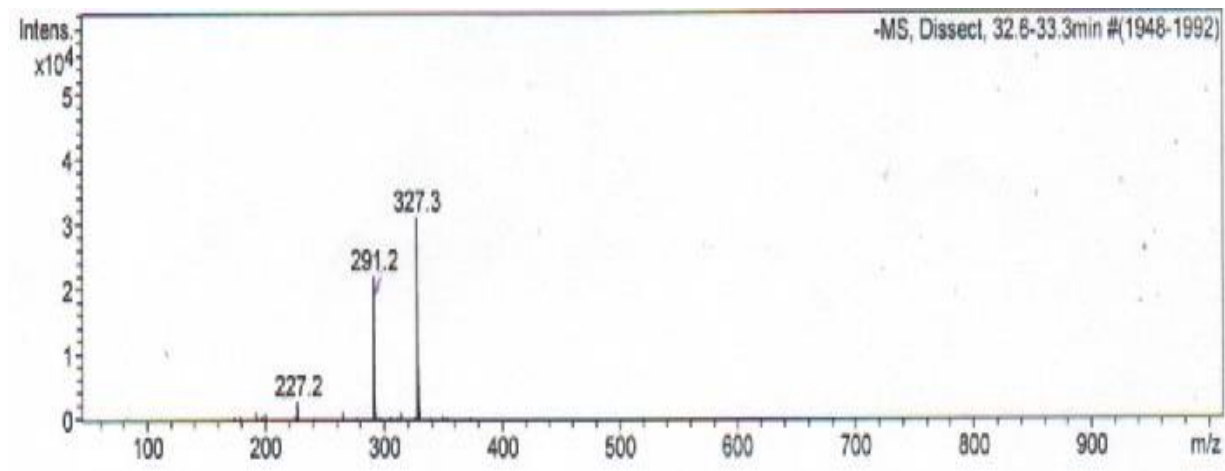


Figura 24: Espectro de masas de la impureza 2.

El producto de degradación más probable es el 4-(2-cloro-4,5-dimetoxibencil)-4-(2- hidroxil) morfel-4-in cuyo peso molecular es 288.7 con lo cual indica la adición de un átomo de potasio dentro de la molécula para soportar la carga.



4.6.2.2.2. IONIZACIÓN POSITIVA.

La cual se realizó la identificación por inyección directa, debido a que es la única impureza que no se pudo identificar por la ionización negativa.

- Impureza 3

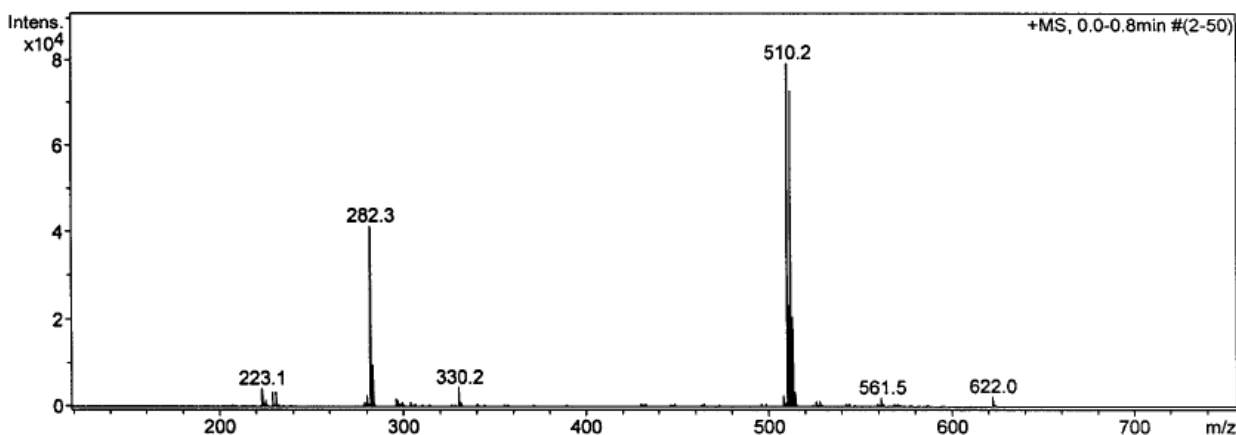


Figura 25: Espectro de masas de la impureza 3.

En esta inyección directa se muestran tanto Bromuro de pinaverio que es la masa de 510.2 g/mol en contraste del peso teórico de 511.5 g/mol con lo cual se comprueba la presencia de la molécula, En caso de la segunda masa de 282.3 g/mol de acuerdo al peso molecular de PIN30-II es de 247.09 con una diferencia de 35.21 con lo cual se muestra la adición de un átomo de cloro dentro de la molécula.

4.6.2.3. LUZ INCANDESCENTE.

Posterior a los 12 días de exposición a la luz incandescente en medio acuoso se inyectaron las muestras en el UHPLC acoplado a masas, para llevar a cabo la identificación de los productos de degradación por peso molecular

4.6.2.3.1. IONIZACIÓN NEGATIVA.

Para la ionización negativa se acondiciono el equipo UHPLC con el método básico para favorecer la ionización de las muestras debido a que la mayoría de las impurezas son detectables con este método.



- Impureza 1

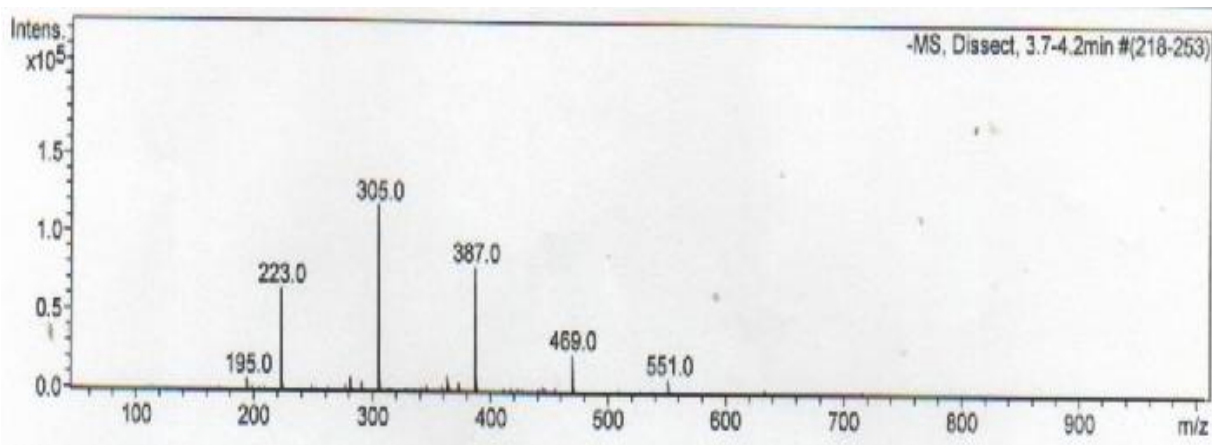


Figura 26: Espectro de masas de la impureza 1.

El producto de degradación más probable es el cloruro de 4-(2-hidroxi-4,5-dimetoxibencil)-4-(2- amino) morfel-4-in cuyo peso molecular es de 304.76 g/mol.

- Bromuro de Pinaverio.

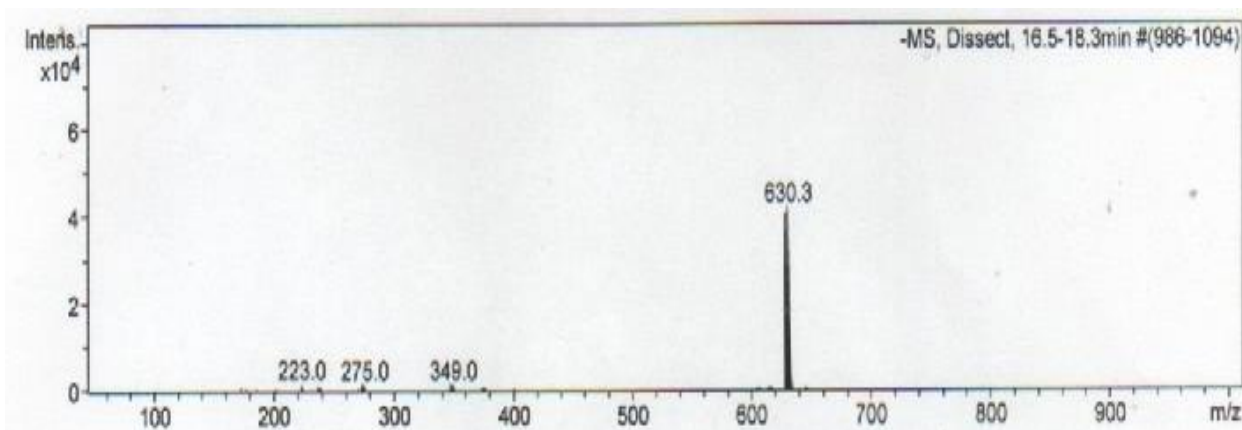


Figura 27: Espectro de masas de PIN.

Este resultado es perteneciente a Bromuro de pinaverio por su peso molecular de 630.3 g/mol, cuando su peso reportado es de 591.41 g/mol con una diferencia de 38.89 g/mol con lo cual indica una adición de un átomo de potasio dentro de la molécula, durante la lectura.



- Impureza 2

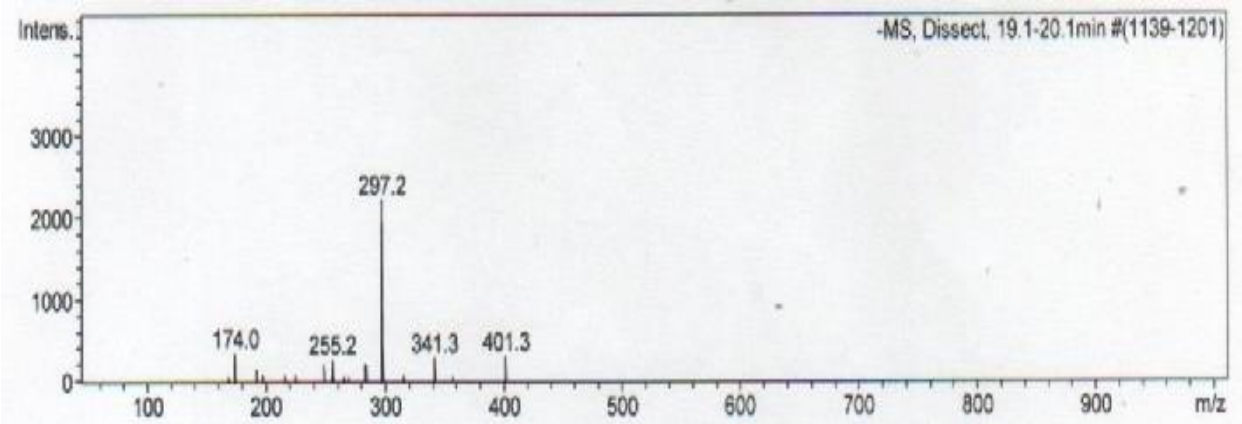


Figura 28: Espectro de masas de la impureza 2.

De acuerdo al resultado anterior se demuestra la presencia de PIN II como producto de degradación con un peso molecular cuyo peso molecular es de 281.43. Sin embargo, dentro de las muestras de degradación muestran la adición de un radical hidroxilo en el átomo de nitrógeno.

- Impureza 3

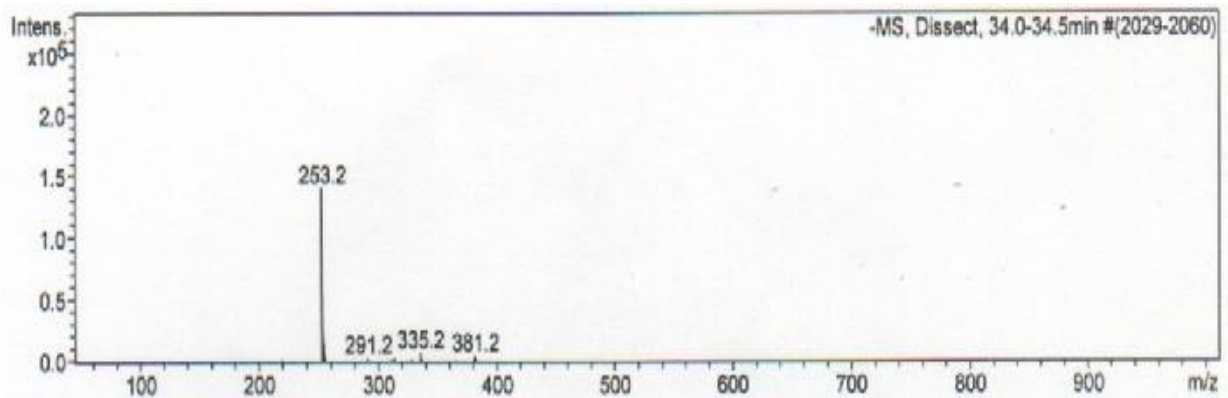


Figura 29: Espectro de masas de la impureza 3.

De acuerdo al peso molecular obtenido de 253.2 g/mol el producto de degradación más probable para dicho análisis es el 4-(2-hidroxi-4,5-dimetoxibencil)-4-morfolina cuyo peso molecular es de 253.29 g/mol.



- Impureza 4

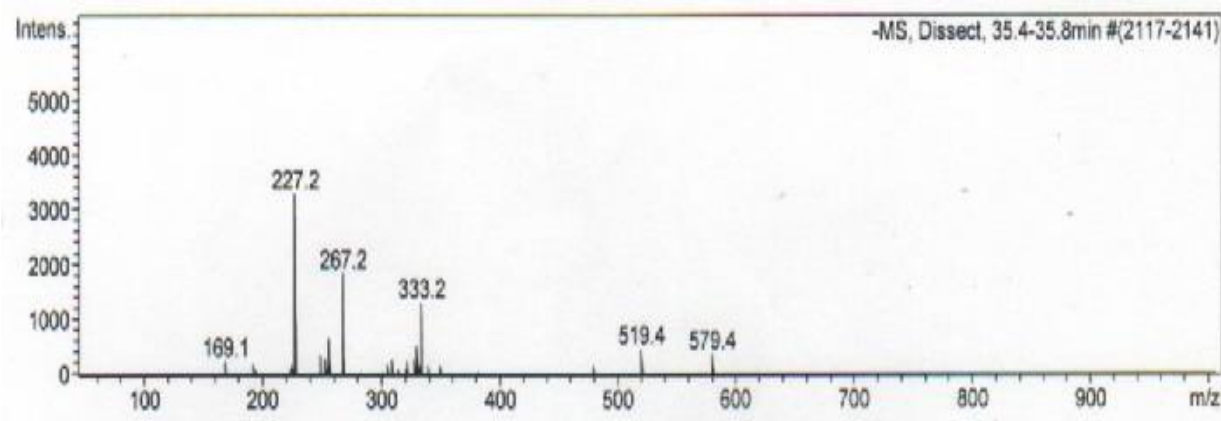


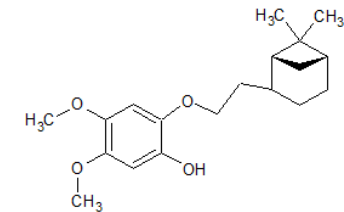
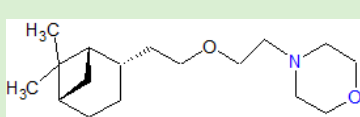
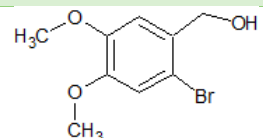
Figura 30: Espectro de masas de la impureza 4.

El peso molecular del producto de degradación obtenido es de 333.2 g/mol con lo cual se menciona que el producto de degradación más probable es el (2[1S, 2S, 5S]-2- [6, 6-Dimethyl-bicyclo {3. 1. 1.} hept-2-yl]-etil -4,5- dimetoxifenil) metanil-éter cuyo peso molecular es 334.45 en cual se desarrolla en una reacción secundaria posterior a los productos de degradación primarios.

Tabla 37: Estructuras propuestas de los productos de degradación de bromuro de pinaverio.

Nombre	Estructura	Presencia como producto de degradación.	
		Degradación al calor.	Degradación a la Luz incandescente.
Cloruro de 4-(2-hidroxi-4,5-dimetoxibencil)-4-(2- amino) morfel-4-in.			X
4-(2-chloro-4,5-dimetoxibencil)-4-(2- hidroxil) morfel-4-in.		X	X
4-(2-hidroxi-4,5-dimetoxibencil)-4-morfolina.			X



Nombre	Estructura	Presencia como producto de degradación.	
		Degradación al calor.	Degradación a la Luz incandescente.
(2[1S, 2S, 5S]-2-[6, 6-Dimethylbicyclo {3. 1. 1.} hept-2-yl]-etil - 4,5-dimetoxyfenil) metanil-éter.			X
N- {2-[2-((1S, 2S, 5S)-6, 6-Dimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-yl)-ethoxy]-ethyl} morpholine.		X	X
(2-Bromo-4, 5-dimethoxyphenyl) metanol.		X	

Para las propuestas de las estructuras de los productos de degradación se utilizaron los mecanismos de sustitución nucleofílica y eliminación debido a la gran cantidad de electrófilos y nucleófilos presentes en el medio (Wade, 2010)

DISCUSION DE RESULTADOS:

- El desarrollo demostró que el mejor método para la cuantificación de bromuro de pinaverio es con 210 nm de longitud de onda con un buffer básico de 8.2 en escala de pH con el cual se demostró que sus respectivos productos de degradación son separados a través de la columna Zorbax eclipse C18 por lo cual este método puede ser aplicado para su identificación por HPLC acoplado a masas.
- La validación del método probado demostró que el mismo es preciso, tanto para el mismo sistema como para la precisión del equipo, también demostró ser exacto con un criterio de aceptación de 98 -102% de recuperación de bromuro de pinaverio, Lineal con una $r^2 = 0.9998$, también es robusto para modificaciones de pH, proporción de la fase móvil, variación de flujo en la fase móvil. Sin embargo, para la variación de temperatura, se recomienda volver a



realizar la prueba debido a que se asegura que la anomalía de los datos se deben a que el equipo necesito mayor tiempo de acondicionamiento para estas pruebas, y selectivo entre el Bromuro de pinaverio y sus impurezas. Por lo tanto, el método puede ser utilizada para la cuantificación de bromuro de pinaverio, y también para la identificación de los productos de degradación. La fase móvil comprobó estabilidad durante 4 días, el estándar con una estabilidad mínima de 137 horas y la muestra con una estabilidad mínima de 137 horas

🌿 La exposición en:

- 🌿 Fase solida con calor demostró ser estable durante al menos 12 días.
- 🌿 Fase solida con luz demostró tener una ligera degradación con lo cual se recomienda mantener la exposición más tiempo para demostrar si son productos de degradación las señales del cromatograma.
- 🌿 Fase acuosa a pH 12 demostró ser estable por lo menos durante 12 días a diferencia del autor M. Balaji (2014), que menciona que el bromuro de pinaverio es sensible a esta exposición la discrepancia se debe a que Balaji expuso la muestra a 80°C durante el periodo de exposición a pH 12, Sin embargo. En este trabajo se demuestra que las exposiciones a calor degradan la muestra.
- 🌿 Fase acuosa con calor, demostró ser sensible a la degradación por lo cual se obtuvo que el orden de reacción es cero por lo cual la velocidad de reacción es independiente de la cantidad de bromuro de pinaverio presente en el medio, Los productos de degradación son:
 - 🌿 N- {2-[2-((1S, 2S, 5S)-6, 6-Dimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-yl)-ethoxy]-ethyl} morpholine.
 - 🌿 4-(2-chloro-4,5-dimetoxibencil)-4-(2- hidroxil) morfel-4-in.
 - 🌿 (2-Bromo-4, 5-dimethoxyphenyl) metanol.

Los productos de degradación se predijeron de acuerdo con reacciones de eliminación – sustitución nucleofílica del libre Wade (2010). Se recomienda realizar más estudios para obtener la identificación completa y de este modo puedan realizarse posteriores estudios de su posible toxicidad tanto en humanos como en el medio ambiente.



🦋 Fase acuosa con luz incandescente, demostró ser sensible a la degradación por lo cual se obtuvo que el orden de reacción es cero por lo cual la velocidad de reacción es independiente de la cantidad de bromuro de pinaverio presente en el medio, Los productos de degradación son:

- 🦋 N- {2-[2-((1S, 2S, 5S)-6, 6-Dimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-yl)-ethoxy]-ethyl} morpholine.
- 🦋 Cloruro de 4-(2-hidroxi-4,5-dimetoxibencil)-4-(2- amino) morfel-4-in.
- 🦋 4-(2-chloro-4,5-dimetoxibencil)-4-(2- hidroxil) morfel-4-in.
- 🦋 4-(2-hidroxi-4,5-dimetoxibencil)-4- morfolina.
- 🦋 (2[1S, 2S, 5S]-2-[6, 6-Dimethyl-bicyclo {3. 1. 1.} hept-2-yl]-etil -4,5- dimetoxifenil]) metanil-éter.

Los productos de degradación se predijeron de acuerdo con reacciones de eliminación – sustitución nucleofílica del libre Wade (2010). Se recomienda realizar más estudios para obtener la identificación completa y de este modo puedan realizarse posteriores estudios de su posible toxicidad tanto en humanos como en el medio ambiente.



Conclusiones!



CONCLUSIONES.

- ✦ Se desarrolló un método por HPLC capaz de separar bromuro de pinaverio de sus impurezas y también se sus productos de degradación.
- ✦ Se validó un método por HPLC capaz de separar bromuro de pinaverio de sus impurezas y también se sus productos de degradación.
- ✦ Se realizó degradación forzada en fase sólida expuestas al calor y a la luz incandescente, también se realizó la degradación forzada en fase acuosa expuestas al calor, a la luz y a la hidrolisis básica, con lo cual se obtuvieron los productos de degradación de cada una de las condiciones.
- ✦ Se realiza la cinética de degradación de las muestras de bromuro de pinaverio expuestas a la luz incandescente y al calor en fase acuosa, debido a que fueron las condiciones que presentaron degradación y se determinó el tiempo de vida media y la velocidad de degradación.
- ✦ Se identificaron por masas los productos de degradación de las muestras expuestas a la luz incandescente y al calor en fase acuosa.



REFERENCIAS:

1. Amruthraj A. K., Venkatasha B. M., Ananda S. (2014) "Rapid ultra-high performance liquid chromatographic assay of pinaverium bromide and its stability studies". University of Mysore, Mysore India, Int. J. Pharm. Sci, Reav.
2. Arbeli Z. (2009) "Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): i. El caso de las bifenilos policlorados (PCB)". Colombia. Volumen 1, N° 1. Scielo. Dirección de desarrollo sectorial sostenible, ministerio de ambiente.
3. Armenta M. E. G. (2007) "Combinación sinergia de bloqueadores de los canales de calcio tipo-I selectivos para tracto gastrointestinal y un silicón inerte". Patente WO 2007102725 A1. Visto el día 06-02-2017 obtenido de: <https://www.google.com/patents/WO2007102725A1?cl=es>
4. Bajali M., Pawanjeet J., Chhabda, Srinivasarao V., Appa rao K. M. Ch., Ramakrishna K. (2014) "Development and validation of a new and stability indicating LC method for analysis of pinaverium bromide in bulk drug and pharmaceutical dosage form", GITAM University Visakhapatnam India, Pharma Science Monitor an international journal of pharmaceutical sciences.
5. Bakshi M. Saranjit S. (2002), "Development of validated stability-indicating assay methods – critical review". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, ELSEVIER, Department of pharmaceutical analysis, National institute of pharmaceutical education and research, sector 67, India.
6. Berenson M., Levine D., Krehbiel. (2016), "Estadística para administración", Editorial Pearson Educación, Capítulo 12, pag. 424.
7. Carbajal A. A., Gonzales M.F., (2012), "Agua para la salud; Pasado, presente y futuro", Madrid, Capítulo 3, pp. 33-45.
8. COFEPRIS (2011), "Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos" Secretaria de salud. Visto el 18 de septiembre del 2017, obtenido de: <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/cvfq032011.pdf>
9. Cohen, J., & Cohen, P. (1983). Applied multiple regression/correlation analysis for the behavioral sciences. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Inc.
10. Cortez M. F., Gómez C. Ortiz A. Pelosso R. Pili A. Rivero J. Roldán A. S. Sandoval F. San Juan M. "ESI-MALDI-TOF", Espectrometría de masas, Visto el 24-07-2017, obtenido de: <http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BQblog/MALDI-ESI-TOF.pdf>



11. Díaz N. A., Ruiz J. W. B., Reyes E. F., Cejudo A. G., Novo J. J. "Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colotimétrica de biomoléculas". Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universidad de Rabanales. pp: 1-8 Visto el 2017-07-24
12. Diego, J. P. d. (2008). Tema 5. Cinética química, termodinámica y equilibrio (I). Visto el 31-05-2017, obtenido de OCW - UC3M: <http://ocw.uc3m.es/ciencia-e-oin/quimica-de-los-materiales/Material-de-clase/tema-5.-cinetica-quimica-termodinamica-y-equilibrio-i>.
13. E.C y G. N. (2013), "Consecuencias de la contaminación del agua", visto el día 05/02/2017 obtenido de: http://pep.ieepo.oaxaca.gob.mx/recursos/interactivo/suficiente_agua/consecuencias.pdf
14. Fundación TEKNIKER, (2010) "Contaminantes emergentes en el agua". Visto el 06/02/2017 obtenido de: http://www.uragentzia.euskadi.eus/u81-0003/es/contenidos/informacion/fuente/es_fuente/adjuntos/TEKNIKER_2010.pdf
15. Fundación tekniker, (2010) "contaminantes emergentes en el agua" visto el 06 de febrero del 2017, obtenido de: http://www.uragentzia.euskadi.eus/u81-0003/es/contenidos/informacion/fuente/es_fuente/adjuntos/TEKNIKER_2010.pdf
16. GENAM, EMA. (2004), "Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), México.
17. Gómez C., González R. (2009), "Cinetica". Universidad de Valencia, open course ware. Visto el 2017-08-07 obtenido de: http://ocw.uv.es/ciencias/1-1/teo_cinetica_nuevo.pdf
18. Guslandi, M. The clinical pharmacological profile of pinaverium bromide. Minerva medica, 1994, vol. 85, no 4, p. 179-185.
19. Hernández A. E. (2005). "Importancia del agua en los seres vivos", Elementelwatson "la" revista, Año 1, Numero 1, Visto el 24-07-2017, obtenido de: <http://www.elementalwatson.com.ar/Revista%201%20N%201b.pdf>
20. Hernández E. M. (2016). "Cómo escribir una tesis" Metodología de la investigación, Escuela nacional de salud pública.
21. ICH (1998), "Guía de validación de métodos analíticos". Visto el 18 de septiembre del 2017, obtenido de:



- <http://www.controlmetrologico.com/docs/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>
22. IMSS (diciembre, 2016). "cuadro básico de medicamentos del instituto mexicano del seguro social". México. Coordinación de unidades de médicas de alta especialidad. Gobierno de la república. Número de claves 957.
 23. Jimenez B. E. C., (2001), México, "La contaminación ambiental en México", Limusa Noriega editores. Colegio de Ingenieros ambientales en México, pp: 79-81.
 24. Manzano M. María E. (2008) "Eliminación de fármacos presentes en aguas residuales urbanas mediante procesos tipo fenton heterogéneos", ítems de digital-BURJC, Universidad Rey Juan Carlos. Biblioteca. DSpace 4.2
 25. Marín R. G. (2003) "Características físicas, químicas y biológicas de las aguas". EMACSA. PP. 2-3.
 26. Moreno A. (2005), "Cinética Química", Facultad de Química, UNAM visto el 10 de junio del 2017, obtenido de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CINETICAQUIMICA ACTUALIZADO_19881.pdf
 27. Nieves A., Bàrcena A., Fernàndez E., Galván A. (2009) "Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas", Departamento de Bioquímica molecular, Campus universitario de Rebanales. Visto el 2017-08-23, obtenido de: <https://es.slideshare.net/asaor/espectrofotometria-presentation>
 28. Ortega G. J A., Totajada. f, Cánovas C. Morales C. L., Berdel T. P.(2005) "Neurotóxicos medioambientales (III). Organoclorados, organobromados y bisfenol A: efectos adversos en el sistema nervioso central". EUA. Nutrición infantil. Pedíatrica, Paediatric environmental health speciality.
 29. Ozores M. "Cromatografía de líquidos HPLC", Laboratorio de Técnicas instrumentales UVA. Visto el 2017-08-23 obtenido de: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-lquidos-hplc>
 30. Plasencia V. G. (2003). "Espectrometría de masas", Curso de Métodos, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos. Visto el 24-07-2017, obtenido de: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec_Masas.pdf
 31. PLM. (2016) "bromuro de pinaverio" visto el 06-02-2017 obtenido de: http://www.medicamentosplm.com/home/productos/planex_capsulas/151/101/9291/14



32. Rodríguez J. (2010). "Seminario de espectrometría de masas para los usuarios de SUIC", Agilent Technologies, Visto el 24-07-2017, obtenido de: http://www.um.es/documents/1765772/1843567/sic_seminario_em_usuarios_2010.pdf/a7b695e4-2594-4f32-8150-fe8ffbe98ee1
33. Rojo F. (1997). "Generalidades de cromatografía", Facultad de Química, UNAM. Visto el 2017-08-07, obtenido de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Conceptos_cromatografia_19973.pdf
34. Romero G. A., (2002) "Instituto de biotecnología, cromatografía". UNAM. Curso de métodos visto el 2017-02-13, obtenido de: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>
35. Rubio A. C., Lenin E. C. A., Peñuela C. A.G. (2013) "Procesos de tratamiento de aguas residuales para la eliminación de contaminantes orgánicos emergentes" *Ambiente & Agua – An interdisciplinary journal of applied science*, Universidad de Antioquia p 95.
36. Sachin T. D., Dhabarde D. M., Kamble M. A., y Mahapatra D. K., (2016) "Novel satability indicating RP-HPLC Method for the Estimation of pinaverium bromide in tablat formulation: Assay development and validation. *Eurasian Journal of analytical chemistry*, iSer publications.
37. Sanchez L. P, (2007). "Estudio de la fotodegradación de compuestos orgánicos mediante microextracción en fase sólida, cromatografía de gases y espectrometría de masas", universidad de Santiago de Compostela. pp 12-15
38. Sanchón M. V., 2002 "Principales contaminantes del agua", UNICAN, España, Tema 11 pp-1-5
39. Skoog D., Holler F., Crouch S., (2008), "Principios de análisis instrumental". Sexta edición, México, CENGAGE Learning.
40. Tusell F. (2011) "Análisis de regresión. Introducción teórica y práctica basada en R" Bilbao
41. Valcárcel M., Ríos A. (2002), "La calidad en los laboratorios analíticos". Editorial Reverté, Bogotá Colombia, Reimpresión Noviembre del 2002. pp 48.
42. Wade L. G. (2010), "Química Orgánica". Quinta edición, Madrid, Pearson educación.



Anexos!



ANEXOS:

Cromatogramas de cada una de las robusteces probadas.

Proporción 1 de la fase móvil, alta proporción de A.

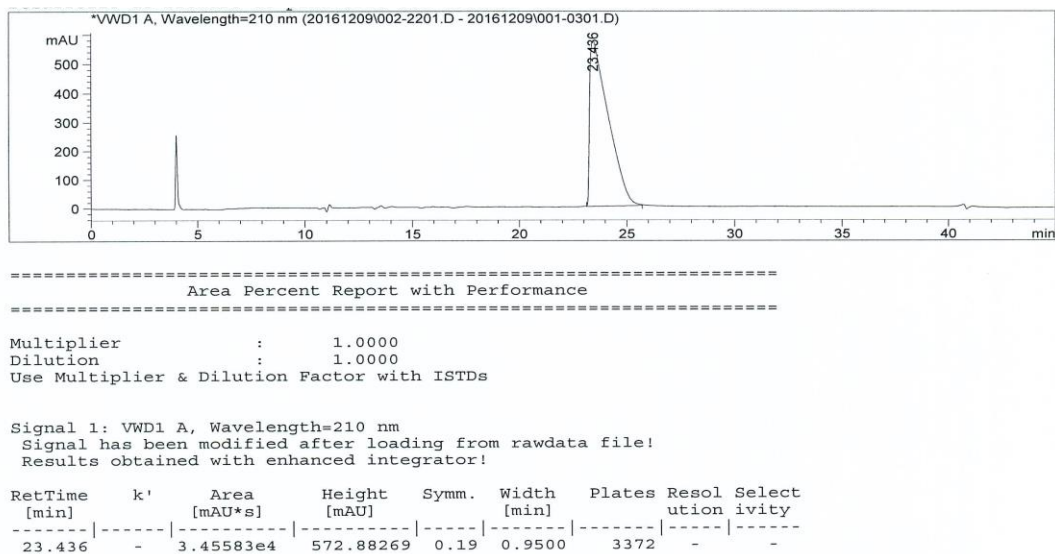


Figura 31: Cromatograma de las robusteces con alta proporción de la fase móvil A.

Proporción 2 de la fase móvil, baja proporción de A.

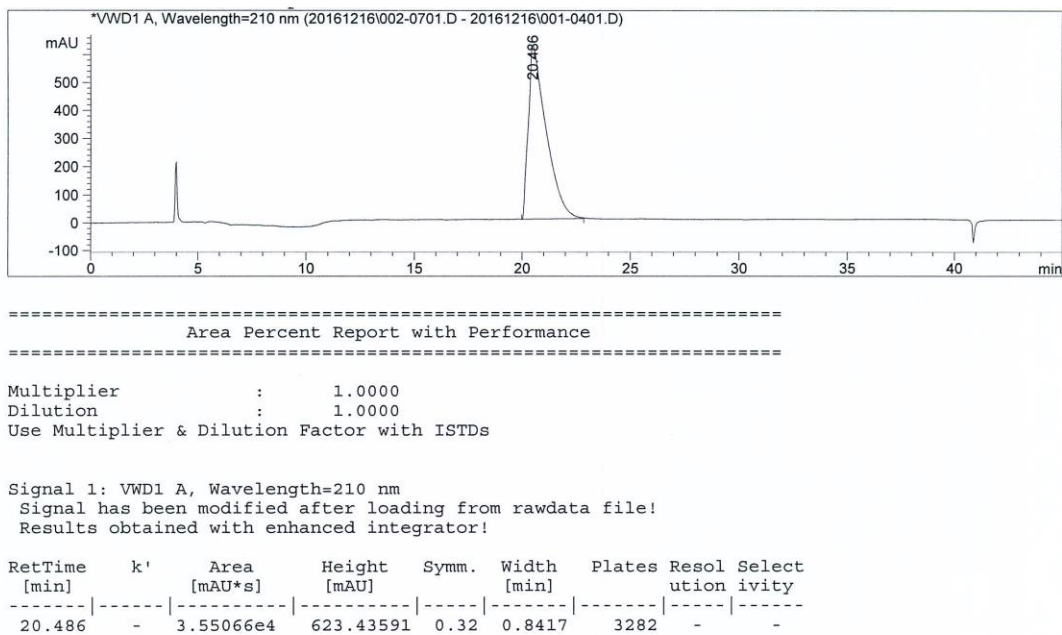
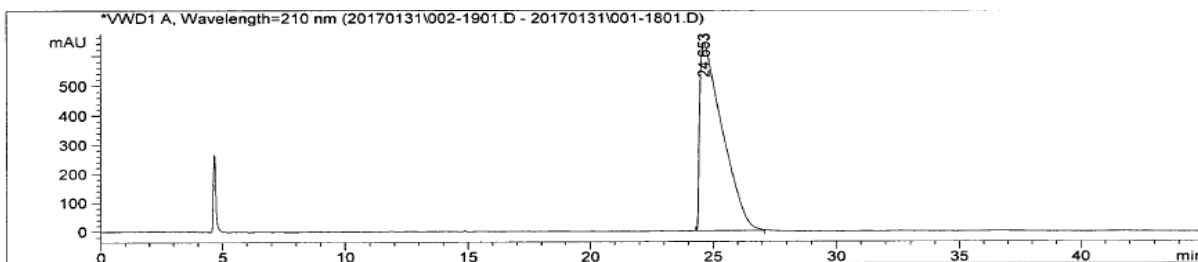


Figura 32: Cromatograma de las robusteces con alta proporción de la fase móvil B.



Flujo de 0.5mL/min.



=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

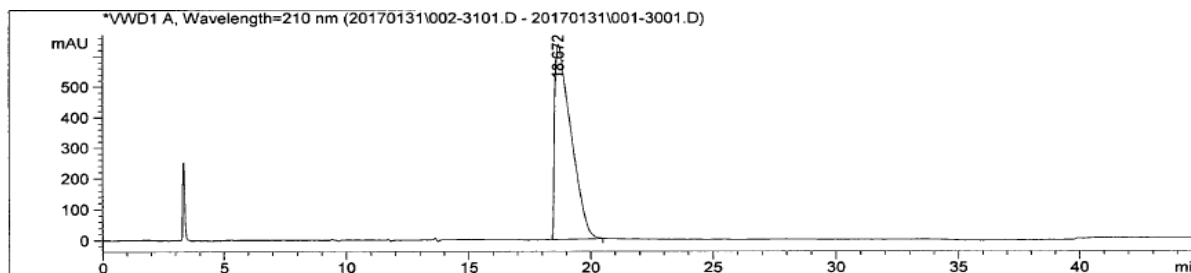
Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm
 Signal has been modified after loading from rawdata file!
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
24.653	-	4.12607e4	642.64923	0.22	1.0167	3258	-	-

Figura 33: Cromatograma de las robustecas con flujo de 0.5mL / min.

Flujo de 0.7mL/min.



=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

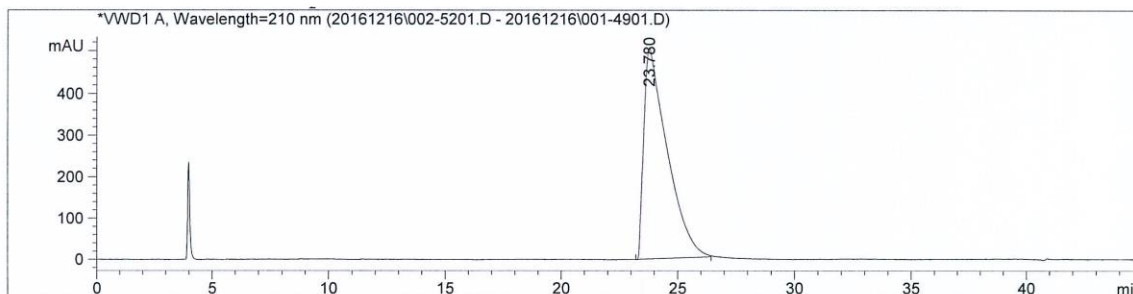
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm
 Signal has been modified after loading from rawdata file!
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
18.672	-	2.93403e4	638.83087	0.25	0.7278	3647	-	-

Figura 34: Cromatograma de las robustecas con flujo de 0.7mL / min.



Temperatura de la columna 35°C.



```

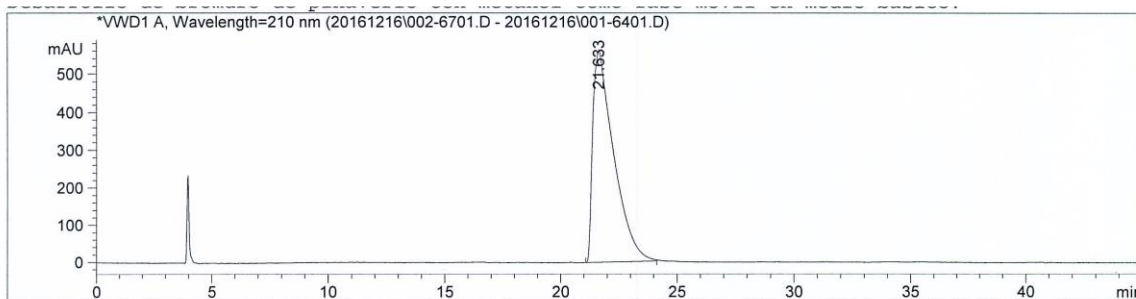
=====
                        Area Percent Report with Performance
=====
Multiplier           :      1.0000
Dilution             :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm
Signal has been modified after loading from rawdata file!
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime   k'      Area      Height   Symm.   Width   Plates  Resol  Select
 [min]    [min]  [mAU*s]  [mAU]   [min]   [min]   [min]   [min]  [ivity]
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 23.780  -      3.53523e4  506.36923  0.29  1.0667   2753   -      -
    
```

Figura 35: Cromatograma de las robustecas con temperatura de la columna a 35°C.

Temperatura de la columna 45°C.



```

=====
                        Area Percent Report with Performance
=====
Multiplier           :      1.0000
Dilution             :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm
Signal has been modified after loading from rawdata file!
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime   k'      Area      Height   Symm.   Width   Plates  Resol  Select
 [min]    [min]  [mAU*s]  [mAU]   [min]   [min]   [min]   [min]  [ivity]
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 21.633  -      3.54279e4  561.88513  0.37  0.9583   2823   -      -
    
```

Figura 36: Cromatograma de las robustecas con temperatura de la columna a 45°C.



Fase a pH de 8.15

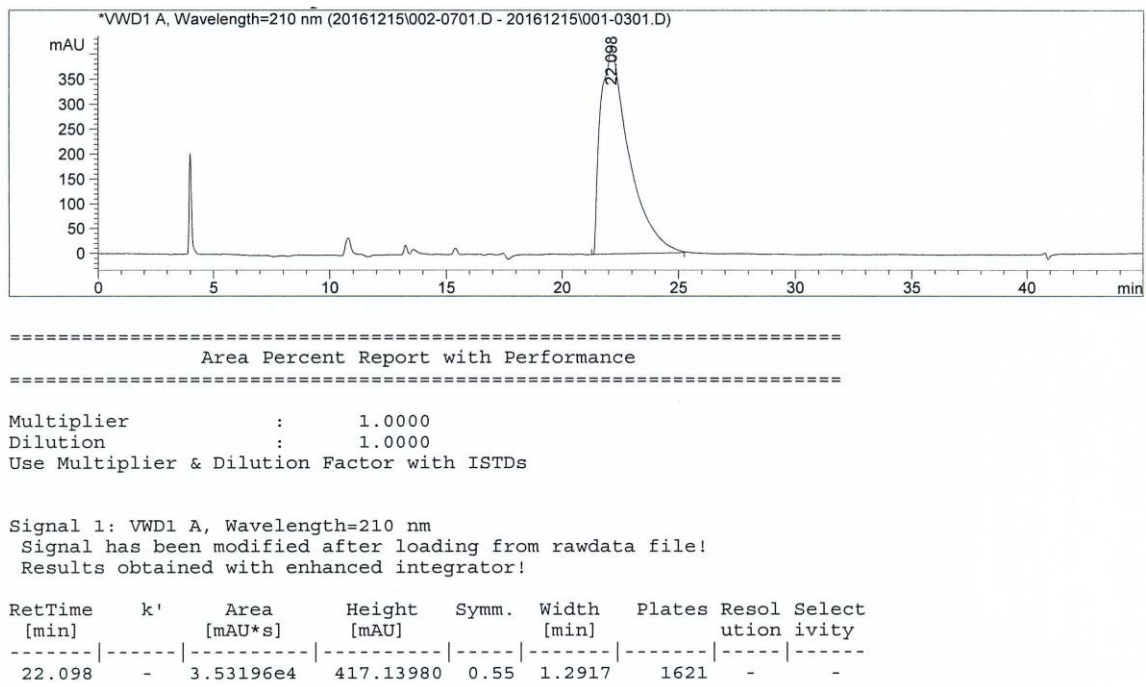


Figura 37: Cromatograma de las robustecas con pH de 8.15.

Fase a pH de 8.25

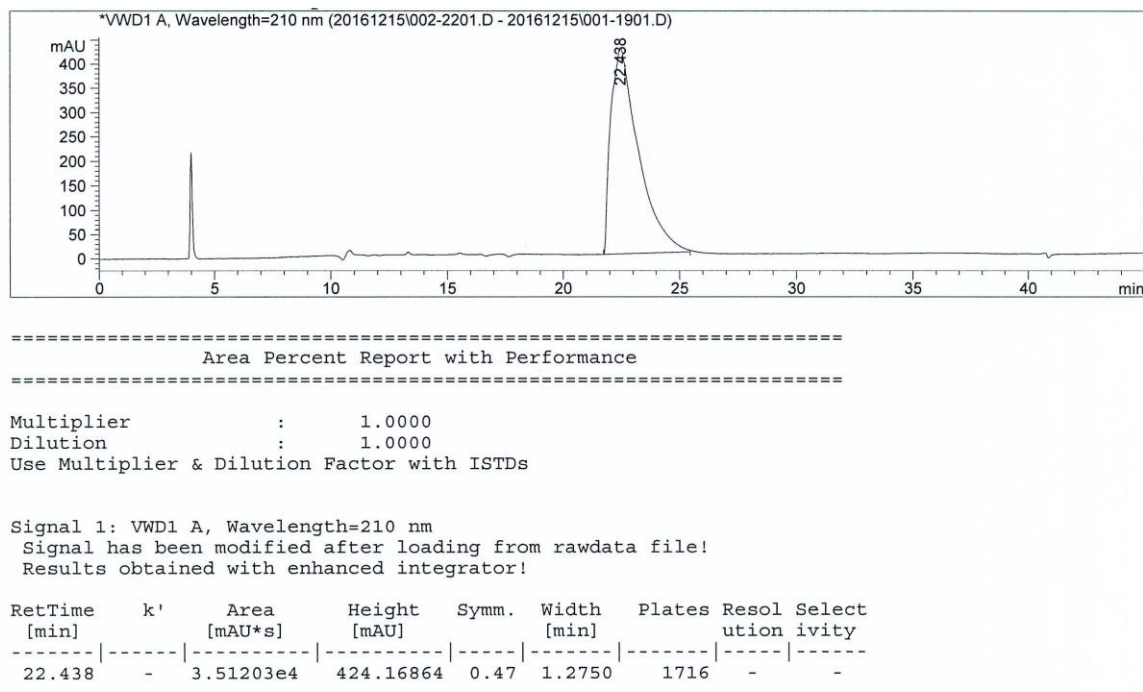


Figura 38: Cromatograma de las robustecas con pH de 8.25.



Cromatograma al 20%

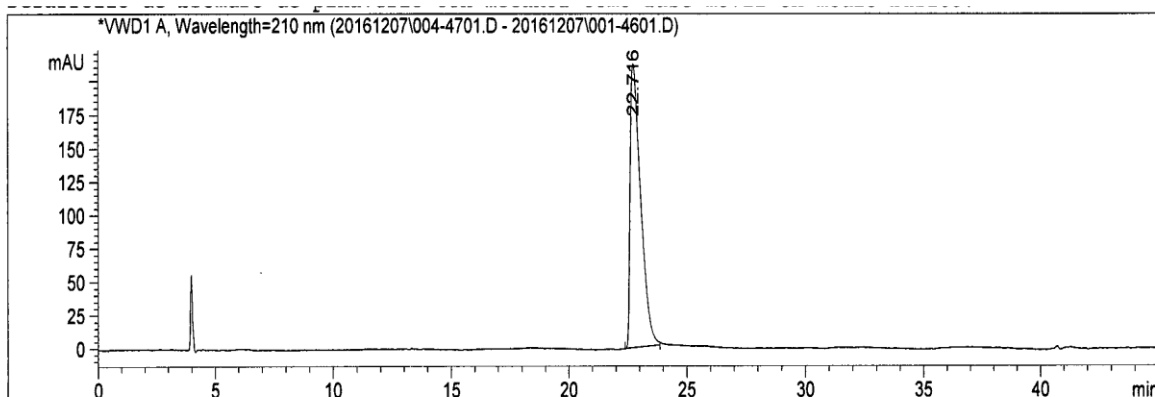


Figura 39: Cromatograma del estándar al 20% para la linealidad.

Cromatograma 40%

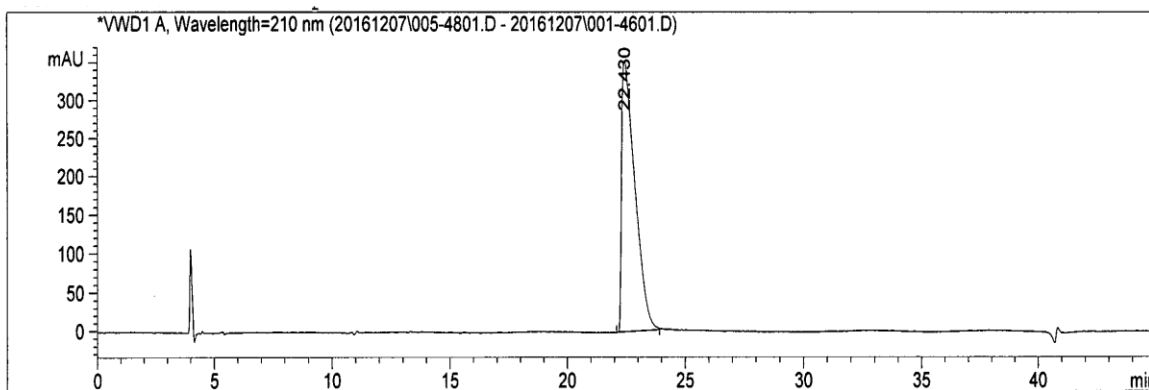


Figura 40: Cromatograma del estándar al 40% para la linealidad.

Cromatograma 60%

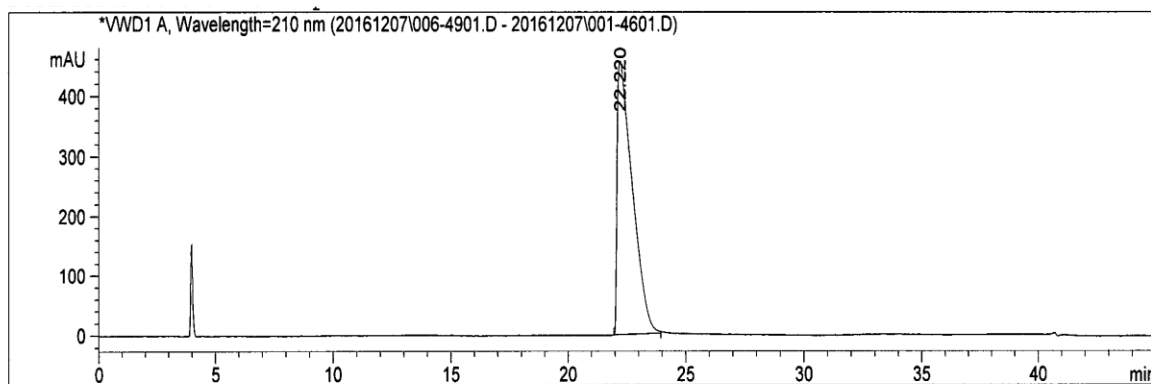


Figura 41: Cromatograma del estándar al 60% para la linealidad.



Cromatograma 80%

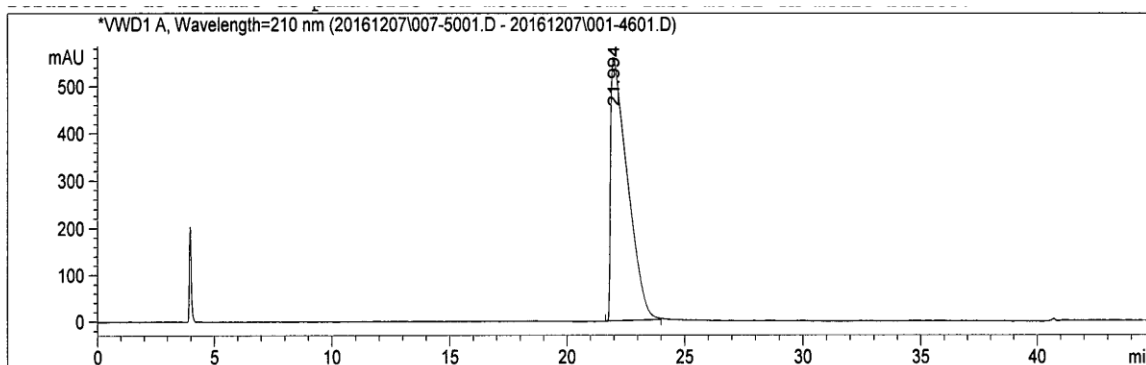


Figura 42: Cromatograma del estándar al 80% para la linealidad.

Cromatograma 100%

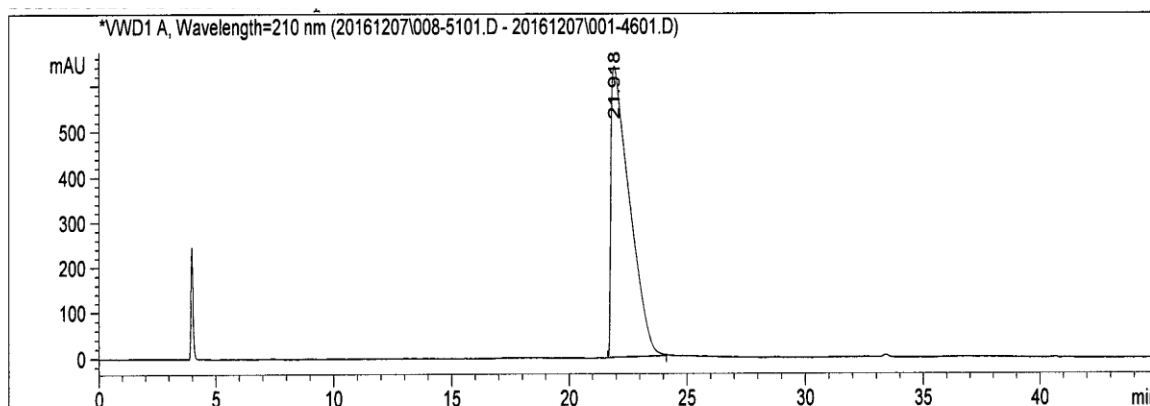


Figura 43: Cromatograma del estándar al 100% para la linealidad.

Cromatograma 120%

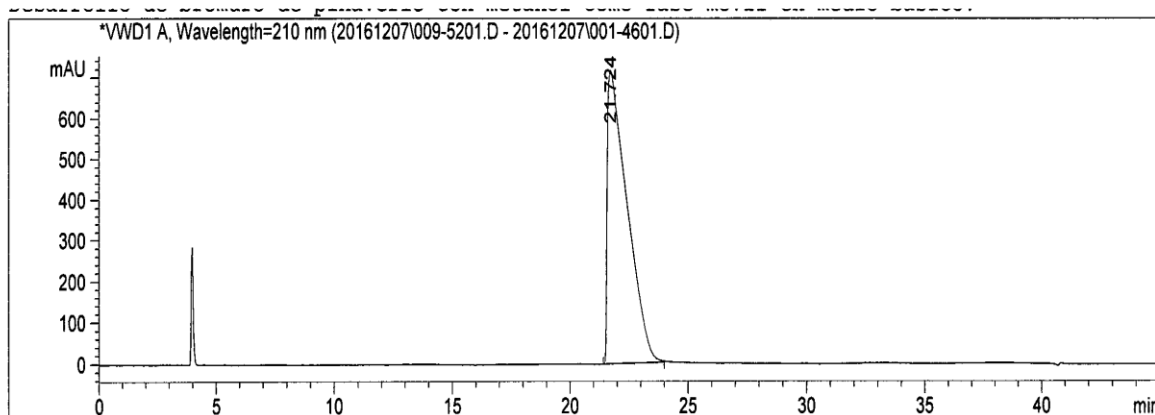


Figura 44: Cromatograma del estándar al 120% para la linealidad.

