



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: DISEÑO Y EVALUACIÓN DE FORMAS
FARMACÉUTICAS**

**“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE SALIVA ARTIFICIAL
CON AFININA COMO ALTERNATIVA EN EL TRATAMIENTO DE LA
XEROSTOMÍA”**

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

PRESENTA

ALDO JIMÉNEZ JARAMILLO

MATRICULA: 2231801346

COMITÉ TUTORAL

CO-TUTORA: DRA. NORMA ANGÉLICA NOGUEZ MÉNDEZ

CO-TUTOR: M en I. ALEJANDRO RUBIO MARTÍNEZ

ASESOR: DR. JOSÉ DE JESÚS LIRA RICARDEZ

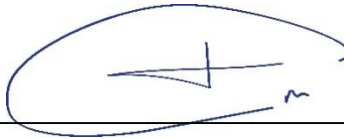
DICIEMBRE, 2025

**“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE SALIVA ARTIFICIAL
CON AFININA COMO ALTERNATIVA EN EL TRATAMIENTO DE LA
XEROSTOMÍA”**

Vo. Bo COMITÉ TUTORAL



CO-TUTORA: DRA. NORMA ANGÉLICA NOGUEZ MÉNDEZ



CO-TUTOR: M en I ALEJANDRO RUBIO MARTÍNEZ



ASESOR: DR. JOSÉ DE JESÚS LIRA RICARDEZ



Q.F.B ALDO JIMÉNEZ JARAMILLO

Matrícula: 2231801346

**“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE SALIVA
ARTIFICIAL CON AFININA COMO ALTERNATIVA EN EL TRATAMIENTO
DE LA XEROSTOMÍA”**

JURADO DE EXAMEN DE GRADO



PRESIDENTE: DRA. GABRIELA PINEDA CHACÓN



VOCAL: DRA. CYNTHIA GRACIELA FLORES
HERNÁNDEZ



SECRETARIO: DRA. NORMA ANGÉLICA NOGUEZ
MÉNDEZ

RESUMEN

La xerostomía, también conocida como hiposalivación, se define como la sensación subjetiva de sequedad bucal, consecuencia de una disminución o ausencia en la secreción salival, así como de alteraciones en su composición. Esta condición se asocia con dificultades para masticar y deglutir, mayor incidencia de caries, lesiones ulcerativas y deterioro en la calidad de vida. Afecta aproximadamente al 30 % de los adultos mayores de 65 años, y su prevalencia se incrementa hasta un 70 % en pacientes oncológicos. No obstante, en muchos casos, la xerostomía no es reportada por los pacientes, sino que se identifica mediante interrogatorios clínicos específicos.

Los tratamientos actuales incluyen sustitutos salivales basados en compuestos hidrofílicos, métodos de estimulación mecánica y agentes farmacológicos como pilocarpina o cevimelina. Sin embargo, la evidencia que respalda el uso de otras opciones terapéuticas es limitada, lo que resalta la necesidad de desarrollar nuevas formulaciones eficaces y seguras.

En este trabajo se desarrolló una formulación de saliva artificial con propiedades fisicoquímicas que emulan de manera efectiva las características de la saliva natural, optimizando la compatibilidad con la vía de administración y minimizando interacciones entre los excipientes. Se llevó a cabo una evaluación integral de sus propiedades para asegurar un perfil funcional adecuado, potenciando así su eficacia terapéutica. Asimismo, se realizaron estudios de estabilidad para definir su vida útil y garantizar el cumplimiento de los estándares de calidad, seguridad y eficacia. Finalmente, se desarrolló y validó un método analítico específico para la formulación, permitiendo su adecuado control de calidad, especialmente en lo relativo a la cuantificación de afinina como principio activo. Este enfoque integral no solo asegura la reproducibilidad y consistencia del producto, sino que también establece una base sólida para el diseño de futuras formulaciones farmacéuticas destinadas al tratamiento de la xerostomía

Palabras clave: Afinina, saliva, calidad, desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Farmacéuticas, así como al Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-X, por haberme brindado el acceso a sus instalaciones y recursos para la realización de este proyecto de investigación y la obtención del grado académico.

Expreso mi reconocimiento a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo financiero otorgado mediante la beca número CVU. 1273125, la cual fue clave para la ejecución de este trabajo.

Agradezco igualmente al Christus Latam Hub Center of Excellence and Innovation por el financiamiento proporcionado para el desarrollo y culminación de este proyecto (número de proyecto 34612403, convenio 324030).

Finalmente, a Falcón División Analítica, por facilitarme el acceso a sus equipos especializados, cuyo uso fue esencial para el desarrollo experimental y la conclusión exitosa de esta investigación.

Agradezco profundamente:

A mi comité tutorial, conformado por la Dra. Norma Angélica Noguez Méndez, el M. en I. Alejandro Rubio Martínez y el Dr. José de Jesús Lira Ricárdez. Expreso mi más sincero agradecimiento por su invaluable acompañamiento, el tiempo dedicado y los conocimientos compartidos a lo largo de este proceso. Su orientación fue fundamental para la realización y éxito de este proyecto.

Al Q.F.B. Adrián Pereyra, gracias por tu constante acompañamiento, tu apoyo desinteresado y tu amistad. Tu ayuda fue esencial para la culminación de esta etapa.

A mis padres, Lidia Jaramillo y Antonio Jiménez, y a mis hermanos, Marco y Orlando, por su amor incondicional, su apoyo constante y su presencia firme en cada momento. Gracias por ser mi base, por no soltarme nunca y por brindarme, desde siempre, el mismo afecto abundante que me ha sostenido a lo largo de mi vida.

A mis amigos Lalo, Daniel, Sebastián, Iván, José, Osvaldo, Axel y Areli, con quienes tengo el privilegio de compartir más de una década de amistad. Agradezco profundamente los consejos, la confianza, el tiempo compartido y la lealtad que hemos cultivado juntos. Ustedes han sido parte esencial de mi crecimiento personal y profesional, y confío en seguir construyendo juntos nuevas etapas de vida.

A Nicol y Margo, cuyo amor incondicional ha perdurado en medio de los desafíos, las noches en vela y los días interminables. Su compañía ha sido un refugio y una fuente de fortaleza en los momentos más exigentes.

Sin cada uno de ustedes, la culminación de este proyecto no habría sido posible. Gracias, de corazón.

Índice

	Página
1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	10
3. MARCO TEORICO	14
3.1 Glándulas salivales	14
3.1.1 Glándulas salivales mayores	14
3.1.2 Glándulas salivales menores	14
3.2 Actividades de la saliva	15
3.2.1 Composición de la saliva	15
3.2.2 Función de la saliva	16
3.3 Xerostomía	16
3.3.1 Tratamientos para la xerostomía	17
3.4 Aplicación de la saliva artificial	17
3.5 Afinina (espilantol)	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
5. JUSTIFICACIÓN	19
6. HIPÓTESIS	20
7. OBJETIVO GENERAL	20
8. OBJETIVOS PARTICULARES	20
9. MATERIAL Y MÉTODOS	21
9.1 Material	21
9.2 Evaluación de los excipientes de acuerdo con la monografía individual de la farmacopea	21
9.3 Estudios de preformulación	22
9.4 Identificación y determinación de concentración de afinina por el método analítico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución	22
9.5 Pruebas de calidad para las soluciones tópicas orales	22
9.5.1 Características organolépticas	22
9.5.2 Determinación de pH	23
9.5.3 Viscosidad	23
9.5.4 Pruebas de estabilidad	23
9.6 Prueba de humectabilidad	23
Análisis estadístico	24
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
10.1 Estudios de preformulación	24
10.1.1 Diseño factorial en la evaluación de las formulaciones	25
10.2 Características organolépticas de las formulaciones	25
10.3 Evaluación del pH	26
10.4 Viscosidad de la formulación de saliva artificial con afinina	27
10.5 Ángulo de contacto	30
10.5.1 Tensión superficial	31
10.5.2 Energía de adhesión	33
10.6 Optimización de la formulación	36
10.7 Validación del método analítico para la cuantificación de afinina en la formulación de saliva artificial por CLAR	40
10.7.1 Resultados de validación	42
Estabilidad de la fórmula optimizada	43
11. CONCLUSIONES	46
12. PERSPECTIVAS	46

13. REFERENCIAS	47
14. ANEXOS	58
14.1 ANEXO I. Desarrollo y validación del método analítico para cuantificación de afinina en una formulación de saliva artificial (0.1 mg/mL)....	58
14.2 ANEXO II. Constancia de participación en el Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas 2024	106

Índice de tablas y figuras

	Página
TABLAS	35
Tabla 1. Resultados de las formulaciones elaboradas con CMC.....	35
Tabla 2. Concentración y propiedades de los excipientes en la formulación de saliva artificial	38
Tabla 3. Resultados de la formulación optimizada de saliva artificial con afinina.....	39
Tabla 4. Parámetros evaluados en el desarrollo y validación del método analítico CLAR para la cuantificación de afinina.	41
Tabla 5. Estabilidad de la formulación optimizada durante 3 meses.....	45
FIGURAS	12
Figura 1. Estructura química de la pilocarpina	12
Figura 2. Estructura química de la afinina	13
Figura 3. Localización de las glándulas salivales mayores y menores... ..	15
Figura 4. Viscosidad de formulaciones de saliva artificial con CMC.....	28
Figura 5. Representación de la mucoadhesión de los polímeros en la membrana mucosa	33
Figura 6. Gráficos de superficie con las diferentes concentraciones de CMC y glicerina	36
Figura 7. Valoración de la afinina en la formulación de saliva artificial por un periodo de 3 meses en condiciones de estabilidad acelerada.....	45

1. INTRODUCCIÓN

La xerostomía se define como la sensación de sequedad en la boca, también conocida como hiposalivación. Se manifiesta como disminución o ausencia de la secreción salival y cambios en la composición de la saliva, provocando problemas para deglutir y masticar, lesiones por caries y úlceras bucales (Blitzer, *et al.*, 2022; Kim, Y. J. 2023). Este padecimiento está asociado con enfermedades autoinmunes y enfermedades crónicas como la diabetes, el síndrome de Sjögren y al uso de diversos medicamentos como: antihipertensivos, descongestionantes, broncodilatadores, diuréticos y antidepresivos, asimismo, es uno de los principales efectos secundarios asociados a la radioterapia para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello (Kashi *et al.*, 2017; Bhattarai *et al.*, 2018). Afecta alrededor del 30% de las personas mayores de 65 años, y en pacientes oncológicos, esta cifra se eleva al 70%. Sin embargo, la mayoría de los pacientes no menciona este problema hasta ser interrogados acerca de síntomas relacionados con la boca seca (García López en 2010).

Actualmente los tratamientos para la xerostomía son: sustitutos de saliva a base de moléculas hidrofílicas, estimulación mecánica y agentes estimulantes de la salivación, como la pilocarpina. Mosqueda y col. 2004, demostraron la efectividad del empleo de clorhidrato de pilocarpina en dosis de 5 mg 3 veces al día, produjo un incremento significativo en la producción salival y mejoría clínica en cuanto a la sintomatología bucal secundaria a hiposalivación con mínimos efectos secundarios como: sudoración, cefalea y diarrea en pacientes sometidos a radio terapia e cabeza y cuello (Mosqueda *et al.*, 2004). García y col. 2010, del laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada de la UAM-Xochimilco, realizaron un estudios prospectivo doble ciego en pacientes con hiposalivación secundaria a radiación, en el cual se evaluó el efecto de la aplicación tópica por atomización en la cavidad bucal de dos formulaciones: una solución humectante (saliva artificial) conteniendo clorhidrato de pilocarpina y otra solución de la misma formulación pero sin el principio activo obteniendo un aumento en el flujo salival en los pacientes tratados con la saliva artificial. Aun cuando mostró una buena aceptación la saliva artificial

en los pacientes bajo protocolo clínico, la problemática que se enfrenta para la elaboración de la formulación es que se ha dificultado la adquisición del clorhidrato de pilocarpina por parte del proveedor debido a que el fabricante ya no cuenta con los insumos suficientes para llevar a cabo la síntesis del activo. Además, actualmente hay poca evidencia que respalde el uso de otros fármacos en el tratamiento de la xerostomía (Davies, A. N., & Thompson, J. 2015; Witsell, D. L, *et al.*, 2012), de ahí la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas.

Con base a lo anteriormente expuesto, el propósito de este trabajo es el diseño y evaluación de una formulación con afinina (saliva artificial), aprovechando las propiedades anestésicas, sialagogas y antioxidantes de este compuesto (Ley *et al.*, 2006; Nhiem *et al.*, 2021 Prachayasittikul *et al.*, 2013; Rios y Olivo, 2014; Satoh, *et al.*, 2013), útiles en el aumento de la secreción salival y la actividad de la amilasa.

2. ANTECEDENTES

La saliva es una secreción exocrina compleja que se origina tanto de las glándulas salivales mayores como de las glándulas salivales menores, así como del fluido crevicular (Hernández Castañeda, A., Aranzazu Moya, G. 2012). Tiene una composición de 99% agua, contiene linfocitos y factores inmunes, enzimas como: amilasa, lipasa, proteínas como la albumina y la mucina. Además, la mezcla de saliva también puede contener microorganismos y células epiteliales (Basilicata *et al.*, 2023; Müller *et al.*, 2023). Actúa como mecanismo de defensa evitando la formación de caries y enfermedades periodontales, inicia el proceso de digestión de los alimentos al masticar, lubrica los tejidos orales y modula los procesos de remineralización y desmineralización del diente (Gualtero *et al.*, 2015). Debido a lo anterior, la disminución en la secreción salival no debe subestimarse ya que afecta la calidad de vida de la población, desde problemas para deglutir, hablar, caries, úlceras bucales y depresión.

Bartley en 1868 fue quien definió por primera vez a la xerostomía, al establecer una relación entre la sintomatología y sus repercusiones en la calidad de vida como son;

problemas para masticar o deglutir, insomnio e irritabilidad; favorecer lesiones por caries e infecciones bucales, úlceras bucales y depresión (Hernández *et al.*, 2012). La patogénesis de la xerostomía es múltiple y puede ser resultado de una alteración localizada en las glándulas salivales o una alteración de índole sistémica (Gallardo, J. M. 2008; Ito *et al.*, 2023).

Sin embargo, la edad por sí misma no puede relacionarse directamente con la xerostomía, sino con las enfermedades que se suelen padecer en esta etapa y los medicamentos que se suelen administrar para el tratamiento de estas (García López E. A. 2010; Hernández *et al.*, 2017). Siendo así, la causa más común de xerostomía es el uso de múltiples medicamentos, de los cuales, más de cuatro cientos son fármacos de uso común: descongestionantes, broncodilatadores, diuréticos, antidepresivos, antihistamínicos, entre otros (Tsibouklis *et al.*, 2013; Jané *et al.*, 2014). De igual forma el 90% de los adultos mayores consumen al menos un medicamento que puede afectar su función salival (Ibáñez *et al.*, 2011). La xerostomía también es uno de los principales efectos causados por la radioterapia en tratamiento de cáncer de cabeza y cuello (Lee *et al.*, 2020).

Las enfermedades causantes de xerostomía son: alteraciones autoinmunes como el síndrome de Sjögren y el lupus eritematoso sistémico; enfermedades crónicas como diabetes mellitus, anemia hemolítica, tuberculosis crónica e infecciones por virus de inmunodeficiencia humana (Tsibouklis *et al.*, 2013; May *et al.*, 2015). Se ha observado que el estrés oxidativo presente y la perturbación en la señalización de iones calcio provocada por las enfermedades autoinmunes o crónicas mencionadas, causan un procesamiento postraducciona l y plegamiento inadecuado de las proteínas del retículo endoplásmico (RE) en células de glándulas salivales, lo que disminuye la actividad de la amilasa salival, y la secreción de fluidos, provocando xerostomía (Kimura, *et al.*, 2010; Wang, *et al.*, 2011 & Satoh, *et al.*, 2013).

El enfoque actual para tratar la xerostomía abarca diferentes opciones desde la estimulación mecánica hasta el tratamiento farmacológico (García López, E. A. 2010; Ito *et al.*, 2023). Sin embargo, actualmente se cuenta con poca información

sobre otros fármacos con estas propiedades terapéuticas, además de la pilocarpina (fig. 1) para el tratamiento de la xerostomía. En un estudio realizado por Davies, A. N., & Thompson, J. 2015, entre el 6% y el 15% de los pacientes con disfunción de las glándulas salivales por radioterapia, tuvieron que dejar de tomar la pilocarpina debido a los efectos secundarios como: sudoración, dolor de cabeza, orinar con frecuencia y rubor. Estas limitantes pueden representar un desafío significativo para los pacientes que dependen de la pilocarpina para tratar condiciones médicas como el síndrome de Sjögren. Por lo tanto, continuar con la búsqueda de alternativas para el tratamiento de la xerostomía es fundamental.

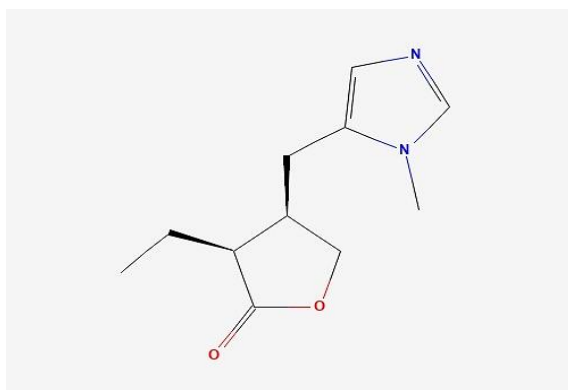


Figura 1. Estructura química de la pilocarpina, obtenida de National Center for Biotechnology Information (2024).

El uso de plantas es ampliamente conocido por la medicina tradicional mexicana, se ha encontrado a especies como *Heliopsis longipes* (comúnmente conocida como chilcuague o raíz de oro) la cual contiene un compuesto llamado afinina (fig. 2), es conocido por sus propiedades como antibiótico, antioxidante, antimicótico, analgésico, anestésico, sialogogo, cicatrizante e insecticida (García *et al.*, 2004; González *et al.*, 2011; Parola *et al.*, 2020). Además, en la FDA y FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), tiene registro como agente saborizante, adyuvante, y no se tienen registrados posibles efectos adversos.

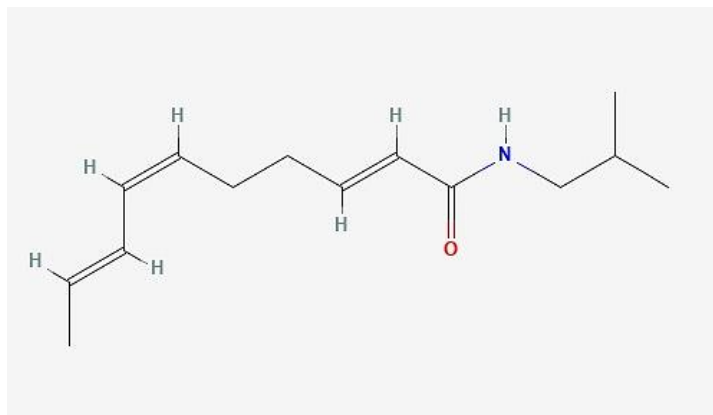


Figura 2. Estructura química de la afinina, obtenida de National Center for Biotechnology Information (2024).

Las farmacóforos de la afinina, identificados como la amida y el acilo graso insaturado (alquenilo), son los responsables de la actividad analgésica, así como el efecto de hormigueo y salivación (Ley *et al.*, 2006, Rios y Olivo, 2014; Prachayasittikul *et al.*, 2013). Las propiedades como anestésico, estimulante de la salivación y antioxidante estudiadas en diversos modelos de ratón, son de interés en el tratamiento de la xerostomía (Cilia *et al.*, 2010; Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. 2001; Huan *et al.*, 2019; Nhiem *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2019; Rios, M. Y *et al.*, 2007; Sahu *et al.*, 2011). Asimismo, la consulta de la patente MX2013001942A “Composición de goma que humectan la boca y productos que contienen la misma” específicamente, la composición de goma de mascar comprende una mezcla de componentes comprendiendo afinina para reducir o eliminar la percepción de la sequedad de la boca en un individuo. Por lo tanto, la utilización de este compuesto podría desempeñar un papel clave como ingrediente funcional y/o agente sialagogo, con potencial aplicación en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para la xerostomía (Vu *et al.*, 2018).

3. MARCO TEORICO

3.1 Glándulas salivales

La cavidad oral está constituida por diversas estructuras anatómicas, donde las glándulas salivales desempeñan una de las funciones más importantes para la homeostasis de la boca, como es la producción y secreción de la saliva. Las glándulas salivales se dividen en dos categorías principales según su tamaño y función: glándulas salivales mayores y menores (fig. 3). Existen tres pares de glándulas salivales mayores: las parótidas, las submandibulares y las sublinguales, todas situadas externamente a la cavidad bucal pero conectadas a ella a través de sus conductos principales (Rebattú *et al.*, 2022).

3.1.1 Glándulas salivales mayores

Las glándulas parótidas son las más voluminosas, pesando en promedio 25 g. La saliva se transporta desde estas glándulas hasta la boca por el conducto parotídeo, también conocido como el conducto de Stensen. En términos de tamaño, las siguen las glándulas submandibulares, que pesan alrededor de 7 g. La saliva de estas glándulas se excreta a través del conducto submandibular, o conducto de Wharton, que es más largo y ancho que el conducto de Stensen. El par más pequeño de las glándulas salivales mayores son las sublinguales, localizadas bajo el piso de la boca y pesan aproximadamente 3 g. Estas se caracterizan por ser una colección de varias glándulas más pequeñas que drenan su saliva a través de múltiples conductos diminutos, conocidos como conductos de Rivinus, algunos de los cuales desembocan directamente en el suelo de la boca o en el conducto de Wharton (Armstrong, M. A., & Turturro, M. A. 2013; Rebattú *et al.*, 2022).

3.1.2 Glándulas salivales menores

Por otro lado, las glándulas salivales menores se distribuyen en gran número, entre 600 y 1000, a lo largo del tracto aerodigestivo superior. Se ubican principalmente en las mucosas bucal, labial, palatina y lingual. Estas glándulas son pequeñas, con tamaños que oscilan entre 1 y 5 mm, y drenan directamente su saliva en la cavidad oral mediante pequeños conductos. Este sistema complejo de glándulas y

conductos juega un papel crucial en mantener la funcionalidad y la salud de la boca y el sistema digestivo en general. (Bowers, *et al.*, 2015; Quinn, S., & Braxton, L. 2013; Rebattú *et al.*, 2022)

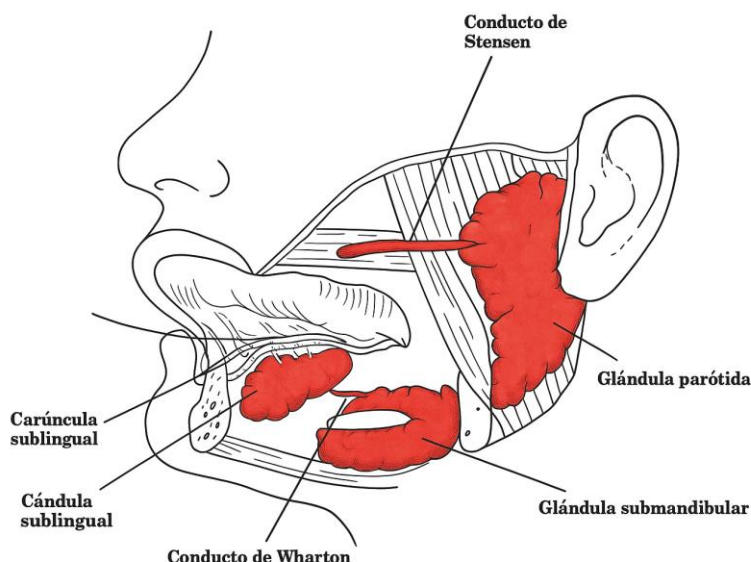


Figura 3. Localización de las glándulas salivales mayores y menores, obtenida de dominio público (2024).

3.2 Actividades de la saliva

Las actividades que desempeña la saliva en la cavidad oral son múltiples, pero su capacidad de mantener un pH cercano a la neutralidad (entre 6.0 y 7.0), y lubricar para evitar el desgaste de las piezas dentales, son fundamentales en el bienestar de esta. La saliva puede ser serosa, mucosa o mixta, y es secretada por las glándulas parótidas, sublinguales y submaxilares (Martínez *et al.*, 2021).

3.2.1 Composición de la saliva

La saliva es un componente esencial de la cavidad bucal, con una producción diaria que oscila entre 1 y 1.5 litros. Contiene diversos electrolitos, tales como fosfatos, sodio, potasio, magnesio, calcio y bicarbonatos, así como enzimas, proteínas, mucina e inmunoglobulinas importantes en el proceso de remineralización, efecto

tampón y mecanismo defensivo del hospedador (Martínez Del Ángel et al., 2024). Cuando alguno de estos elementos se altera, se produce un desequilibrio en la homeostasis de la cavidad bucal. Este desequilibrio puede ser provocado por diferentes causas como: estado de salud, enfermedades glandulares, alimentación e higiene bucal, disminución del flujo salival y variaciones del pH salival (Escobedo, A. 2021).

3.2.2 Función de la saliva

La saliva tiene propiedades importantes, como su capacidad buffer para neutralizar ácidos, lo que protege las piezas dentales del daño ácido causado por ciertos alimentos al estabilizar el pH bucal. Esto también ayuda a disminuir el riesgo de caries en la cavidad oral (Lamy *et al.*, 2018). Además, la evidencia indica que la saliva es fundamental para modular diversas sensaciones orales, incluyendo la astringencia, los sabores básicos y la percepción de olores. Por lo tanto, es esencial ampliar nuestro entendimiento sobre la composición de este fluido biológico y los factores que afectan su producción (Sáenz Masís, M. F., & López, D. M. 2019).

3.3 Xerostomía

La reducción en la producción de saliva, conocida como hiposalivación, y la sensación asociada de boca seca, llamada xerostomía, afectan significativamente la salud sistémica y la calidad de vida de las personas, especialmente cuando la disminución es severa (Li *et al.*, 2006). Fisiopatológicamente se produce por dos causas: alteración del parénquima glandular o alteración funcional glandular. La alteración estructural se observa en enfermedades que cursan con destrucción del parénquima glandular, disminuyendo la producción de saliva, por ejemplo, infecciones, autoinmunidad (síndrome de Sjögren), y la radioterapia ionizante utilizada en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello. En cambio, la alteración funcional glandular corresponde a la disminución de la producción salival con parénquima normal o alteración de la consistencia de la saliva por cambios bioquímicos, provocada por el uso de fármacos, deshidratación, tabaquismo y falta de higiene (Liu *et al.*, 2012; Ulloa, J. P., & Fredes, F. 2016).

3.3.1 Tratamientos para la xerostomía

Actualmente, existen múltiples alternativas terapéuticas para tratar esta afección. Entre ellas se encuentran los agentes farmacológicos pilocarpina y cevimelina, que han sido probados en diversos padecimientos, logrando resultados satisfactorios en el aumento del flujo salival y en la reducción de los síntomas de xerostomía (Pulido *et al.*, 2017).

La pilocarpina y la cevimelina son agonistas muscarínicos que aumentan el flujo de saliva al estimular los receptores en las glándulas salivales. La pilocarpina, administrada en dosis de 5 mg tres veces al día, empieza a actuar en 15 minutos, alcanza su máximo efecto en 60 minutos y dura aproximadamente dos horas. Sin embargo, puede causar sudoración, rinitis, náuseas y aumento de la frecuencia urinaria. Por su parte, la cevimelina, derivada de la acetilcolina, estimula los receptores M3. En caso de sobredosis, puede causar sudoración excesiva, náuseas y vómito (Pulido *et al.*, 2017; Voskoboynik, B., Babu, K., & Hack, J. B. 2011). En pacientes con síndrome de Sjögren primario, los efectos adversos han llevado a tasas de suspensión del tratamiento del 61% para la pilocarpina y del 32% para la cevimelina, lo que complica el manejo adecuado de la xerostomía en estos pacientes (Noaiseh *et al.*, 2014).

3.4 Aplicación de la saliva artificial

El primer reporte sobre la investigación del uso de saliva artificial fue realizado por W. Souder y W. T. Sweeney en 1931. Los autores emplearon una fórmula basada en una composición arbitraria de la saliva humana. Este trabajo impulsó décadas de investigación en la búsqueda de un modelo de saliva artificial adecuado para pruebas *in vitro*. En los últimos años, la saliva artificial se ha utilizado en investigaciones para estudiar el impacto del blanqueamiento láser en el esmalte dental (Dionysopoulos *et al.*, 2017). Además de evaluar la duración de diversas sustancias en la boca, aspecto crucial para el tratamiento de la xerostomía, se ha investigado cómo prolongar el tiempo de acción de los medicamentos en la boca, dado que tienden a eliminarse rápidamente (Engelhart *et al.*, 2016; Pistone *et al.*, 2017).

3.5 Afinina (espilantol)

Las alcanidas son compuestos naturales caracterizados por la unión de ácidos alifáticos de cadena lineal, predominantemente insaturados, con diversas aminas a través de enlaces amida. Entre las N-alcanidas, destaca la afinina, también conocida como epilantol (N-isobutil 2E,6Z,8E decatrienamida), reconocida por su uso en productos cosméticos y medicinales. Este compuesto se emplea como ingrediente activo en cremas y tónicos antiarrugas tradicionales a base de alcohol, así como en enjuagues bucales (Greger, H., 2015). Los usos tradicionales de la afinina incluyen su aplicación como condimento y como analgésico para dolores de muelas (Ozuna et al., 2016). Investigaciones han demostrado que la afinina, aislada de diversas especies del género *Acmella*, posee propiedades larvicidas, insecticidas, antioxidantes, antifúngicas, analgésicas y estimulantes de la salivación (Cilia et al., 2010; Sharma et al., 2022; Silveira et al., 2016). Estas múltiples propiedades subrayan su potencial como un compuesto multifacético, relevante tanto en aplicaciones tradicionales como en investigaciones científicas actuales.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La saliva es una de las secreciones más abundantes del cuerpo humano, se secretan alrededor de 700 a 800 mL diariamente (García et al., 2020). Al participar en diversos mecanismos, la saliva mantiene un papel fundamental en mantener las condiciones óptimas necesarias en la cavidad oral.

Por lo tanto, la disminución en el flujo salival afecta de manera sustancial la calidad de vida de la población. Esta disminución o ausencia de flujo salival es conocida como xerostomía, también llamada hiposalivación. Es provocada por enfermedades autoinmunes, enfermedades crónicas, consumo de diversos medicamentos y por la radioterapia utilizada en el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello. Los pacientes que presentan xerostomía pueden padecer diversos síntomas que van desde problemas para comer o masticar hasta la depresión.

La farmacoterapia ha sido una opción, utilizando agentes con acción sialagoga como el clorhidrato de pilocarpina. Sin embargo, el tratamiento con la pilocarpina presenta algunas contraindicaciones en ciertos tipos de pacientes con: hipersensibilidad, enfermedades cardiorrenal significativa y no controlada, asma y otras enfermedades crónicas que empeoren con agonistas colinérgicos, bronquitis crónica y/o EPOC, insuficiencia hepática, insuficiencia renal. Se han reportado interacciones farmacológicas como: aumentar los efectos adversos de antagonistas β -adrenérgicos y antagoniza efectos anticolinérgicos de atropina e ipratropio inhalado. Por lo tanto, es necesario la búsqueda de sustancias alternativas que tengan actividad terapéutica similar.

5. JUSTIFICACIÓN

La saliva desempeña un papel esencial en el mantenimiento del equilibrio bucal, y cualquier alteración en su flujo puede tener un impacto significativo en la salud oral (Bhattarai *et al.*, 2018; García *et al.*, 2020). La xerostomía puede ser desencadenada por diversas causas, desde enfermedades crónicas, hasta por el uso de diversos medicamentos. Para aliviar los síntomas asociados a la xerostomía, los pacientes recurren a la estimulación mecánica, y/o al uso de agentes farmacológicos. Sin embargo, es importante destacar que no se tiene conocimiento de nuevos fármacos que puedan ser una alternativa en el tratamiento de la xerostomía.

Por lo tanto, es importante seguir desarrollando nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la calidad de vida de los pacientes. En este contexto, se ha identificado a la afinina como posible tratamiento, debido a sus propiedades anestésicas, antioxidantes, y de estimulación de la saliva, que podrían ayudar en el tratamiento de este padecimiento.

Con base a lo anterior se propone diseñar una formulación tópica oral con afinina, tomando como base una formulación de saliva artificial previamente realizada por García López, 2010 con clorhidrato de pilocarpina al 2%. Este estudio busca

contribuir al desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para la xerostomía, aprovechando los posibles beneficios de la afinina, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen esta condición.

6. HIPÓTESIS

La formulación tópica oral con afinina a concentraciones de *0.05 mg/mL* y *0.1 mg/mL* cumplirá con las características farmacotécnicas y de calidad para este tipo de formulaciones con la finalidad de que sea una alternativa en el tratamiento para la xerostomía.

7. OBJETIVO GENERAL

Diseñar y evaluar mediante pruebas de calidad una formulación tópica oral con afinina, para emplearse como tratamiento alternativo para la xerostomía.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

- a. Realizar estudios de preformulación para la selección de los aditivos compatibles con el principio activo afinina.
- b. Evaluar la calidad de los excipientes seleccionados para el desarrollo de la formulación tópica oral mediante las pruebas establecidas por la FEUM.
- c. Diseñar y validar el método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de la afinina en la formulación tópica oral.
- d. Establecer el período útil de la formulación tópica oral con afinina de acuerdo con lo indicado en la NOM-073-vigente, a través de pruebas de viscosidad, identidad, pH, características organolépticas y pruebas de estabilidad.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 Material

La afinina (espilantol) fue adquirido en ChromaDex®, las materias primas y reactivos utilizados en la formulación se obtuvieron de Reactivos Química MEYER®. Los solventes utilizados en el desarrollo y validación del método analítico son de grado HPLC, el acetonitrilo y metanol utilizados también se obtuvieron de Reactivos Química MEYER®.

9.2 Evaluación de los excipientes de acuerdo con la monografía individual de la farmacopea

Se realizó el análisis siguiendo las indicaciones de las monografías respectivas, de las materias primas y principio activo que se utilizaron en la preparación de la saliva artificial con afinina.

Excipientes utilizados en la formulación de saliva artificial
• Ácido cítrico
• Ácido tartárico
• Carboximetilcelulosa
• Citrato de sodio
• Cloruro de potasio
• Cloruro de sodio
• Fluoruro de sodio
• Glicerina
• Mentol
• Propilparabeno
• Sorbitol

9.3 Estudios de preformulación

Se determinó la concentración de cada uno de los excipientes que participarán en la formulación tópica oral con afinina en concentración de 0.05 mg/mL y 0.1 mg/mL . Las concentraciones propuestas para el diseño de la formulación con afinina se basaron en lo descrito por diversos autores para el efecto de estimulación de la saliva (Barbosa *et al.*, 2016; Cilia *et al.*, 2010; Guan *et al.*, 2013; Hatasa, S. & Iio, I. 1973). La proporción de cada excipiente y la metodología para la preparación de la solución tópica oral se realizaron según lo descrito por García López, 2010.

9.4 Identificación y determinación de concentración de afinina por el método analítico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Se preparó una solución estándar de afinina (CAS: 25394-57-4) en concentración $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ en acetonitrilo. Se tomaron 2 ml de la formulación de saliva artificial con afinina, se diluyó en acetonitrilo (5 ml), se agitó mecánicamente por 5 minutos a temperatura ambiente, y se llevó a volumen en un matraz volumétrico de 10 mL, se filtró con membrana de PVDF de $0.45\text{ }\mu\text{m}$. Las condiciones para analizar fueron: una columna C18, fase móvil acetonitrilo: agua (65%:35%), flujo volumétrico de 1.0 mL/min y longitud de onda 228 nm . El tiempo de retención esperado previamente descrito fue de 5 min correspondiente a la afinina (Singh *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2016).

9.5 Pruebas de calidad para las soluciones tópicas orales

Se realizaron las pruebas de calidad a las soluciones tópicas orales, según lo establecido en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).

9.5.1 Características organolépticas

Se determinaron las características organolépticas presentes como el color, apariencia y la presencia de partículas.

9.5.2 Determinación de pH

Se midió directamente el pH de las formulaciones de saliva artificial con afinina y con clorhidrato de pilocarpina en un potenciómetro Hanna HI2210. El rango de pH fisiológico de la saliva humana generalmente es alrededor de 6.0 a 7.0 (Walsh, L. 2008).

9.5.3 Viscosidad

Se realizó la determinación de la viscosidad de la saliva artificial con afinina y con clorhidrato de pilocarpina. Siguiendo lo indicado en la FEUM, empleando un aparato adecuado para la fluidez de la muestra y/o lo indicado en la monografía del producto. La determinación de la viscosidad de las formulaciones se realizó con un viscosímetro Brookfield (Brookfield DV1). Un sustituto salival reológicamente adecuado según Gésime, *et al.*, 2009. debe ajustarse a una viscosidad promedio entre 1.5 y 3.0 mPa.s. y una elasticidad entre 0.1 y 1.0 mPa.s y una frecuencia de 1.5 s^{-1}

9.5.4 Pruebas de estabilidad

Las condiciones y pruebas de estabilidad se realizaron según lo descrito en la NOM-073-SSA1-2015 Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. Se determinó la estabilidad física evaluando el aspecto visual de las formulaciones, cambios en el pH, viscosidad, y la estabilidad química para evaluar si existe degradación de los componentes activos en la formulación. Se mantuvieron las condiciones de estabilidad acelerada indicadas en la NOM-073, por un periodo de 3 meses.

9.6 Prueba de humectabilidad

El ángulo de contacto, también conocida como prueba de humectabilidad, proporciona información valiosa sobre cómo una formulación líquida interactúa con la superficie a la que se aplica (Andrews *et al.*, 2009).

Se realizó sobre una membrana de colágeno colocada sobre un portaobjetos. Se aplicó una cantidad estándar de la formulación líquida sobre el sustrato (10 μL) y se

tomaron de 10 a 20 fotografías en un periodo de 30 segundos, se utilizó el software ImageJ para determinar el ángulo de contacto de las formulaciones obtenidas.

9.7 Análisis estadístico

Se realizó un diseño factorial completo (2^k , donde k es el número de factores) para comparar los atributos de calidad de las formulaciones obtenidas (viscosidad, pH, humectabilidad). Con esta prueba se determinó si existe diferencia en la evaluación de las formulaciones de saliva artificial con afinina y pilocarpina. Posteriormente una prueba de Tukey para identificar diferencias significativas entre los grupos. Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se analizaron mediante un programa con software estadístico.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Estudios de preformulación

Se realizó una investigación preliminar de las propiedades fisicoquímicas del principio activo y de los excipientes que participarán en la formulación, se llevó a cabo en diversas bases de datos como: PubMed, EBSCO, Google Académico, Drug Bank, Springer y MDPI. La concentración de cada excipiente y la preparación de la saliva artificial se basó en el trabajo realizado por García y colaboradores, 2010. Además, se realizó una búsqueda de la problemática y situación actual en el tratamiento de la xerostomía, se tomó en cuenta las necesidades de los pacientes y los procesos en el desarrollo de una formulación. Para obtener una formulación de calidad, se tomó el enfoque de calidad por diseño (QbD) para diseñar el perfil de calidad del producto objetivo y continuar con los análisis de los atributos críticos de calidad. El enfoque QbD, permitió definir la vía de administración, la dosis de afinina en la formulación y los atributos críticos de calidad que influyen directamente en la calidad, seguridad y eficacia del producto final. De esta forma, se determinaron las concentraciones a utilizar en el desarrollo de las formulaciones, considerando que el efecto deseado es el aumento de la secreción salival.

10.1.1 Diseño factorial en la evaluación de las formulaciones

En el presente estudio se realizó un diseño factorial 2^3 con un punto central, para obtener nueve formulaciones y estudiar el efecto de las variables independientes de carboximetilcelulosa (CMC), glicerina, y afinina, sobre las variables dependientes, como la viscosidad, pH, tensión superficial y humectabilidad (ángulo de contacto). El diseño fue realizado por triplicado, y aleatorizado. La matriz utilizada para la elaboración de este diseño de experimentos fue la siguiente:

BLOQUE	Glicerina %	CMC %	Afinina mg/mL	Viscosidad cP	Tensión superficial dyn/cm	Angulo de contacto °	Energía de adhesión dyn/cm
1	10	0.1	0.05				
1	10	0.3	0.1				
1	30	0.1	0.05				
1	20	0.2	0.075				
1	10	0.1	0.1				
1	30	0.3	0.1				
1	10	0.3	0.05				
1	30	0.1	0.1				
1	30	0.3	0.05				

Las variables independientes fueron seleccionadas ya que se identificaron como factores clave en la formulación. Los gráficos de superficie (Figura 6) y la tabla 1 revelan cómo estas variables influyen en las propiedades fisicoquímicas de la formulación. Las formulaciones evaluadas presentaron una desviación estándar menor al 1.5%, lo que indica alta reproducibilidad en los análisis realizados. El análisis ANOVA reveló diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de tensión superficial, viscosidad, ángulo de contacto y energía de adhesión entre las formulaciones elaboradas ($p < 0.05$).

10.2 Características organolépticas de las formulaciones

Las formulaciones desarrolladas utilizando CMC como agente viscosante presentaron una apariencia transparente y estable tanto al inicio como después de

48 horas de almacenamiento a 25°C, independientemente de la concentración de CMC, glicerina y afinina en la formulación. Este comportamiento puede atribuirse a la naturaleza hidrofílica y coloidalmente estable de la CMC. La CMC es un polisacárido aniónico altamente soluble en agua, lo que le permite formar soluciones homogéneas sin inducir separación de fases o precipitación de partículas insolubles. Su comportamiento coloidal es estable en un amplio rango de concentraciones y condiciones de almacenamiento. Su estructura altamente hidrofílica facilita la retención de agua y evita la desestabilización de la red polimérica, lo que contribuye a la transparencia de la formulación. Esto sugiere que la CMC es una opción adecuada cuando se busca mantener la claridad en formulaciones que contienen glicerina, debido a su carácter higroscópico.

10.3 Evaluación del pH

En el desarrollo y la preformulación de la presente investigación, el pH fue identificado como un atributo crítico de calidad (CQA) debido a su influencia directa en la funcionalidad, seguridad y aceptación de la formulación. Este parámetro es especialmente relevante en productos diseñados para mimetizar la saliva natural, debido a que el pH afecta propiedades como la estabilidad de los componentes, la biocompatibilidad con las mucosas orales y la capacidad de replicar el microentorno fisiológico. De acuerdo con la literatura científica, la saliva humana presenta un pH promedio que oscila entre 6.2 y 7.4 dependiendo de factores individuales como la dieta, el estado de salud bucal y la producción de saliva. En este contexto, las formulaciones realizadas en el diseño de experimentos presentaron valores de pH 6.41, lo que se encuentra dentro del rango del espectro fisiológico de la saliva natural. Estos resultados son consistentes con los valores reportados por Foglio-Bonda *et al.*, 2022, quienes analizaron las características fisicoquímicas de diversos sustitutos salivales disponibles comercialmente. Según su estudio, el pH de estos productos oscila generalmente entre 6.0 y 7.0, cumpliendo con los requerimientos para garantizar compatibilidad con el entorno bucal y prevenir efectos adversos como irritación o alteraciones en el equilibrio ácido-base oral. La similitud del pH

logrado en la formulación con el de la saliva natural no solo valida el enfoque de diseño, sino que también sugiere un alto potencial para replicar las condiciones fisiológicas del entorno oral. Esto es crucial para aplicaciones terapéuticas dirigidas a pacientes con xerostomía, donde la restauración de las propiedades fisicoquímicas de la saliva natural puede contribuir significativamente a mejorar la calidad de vida y prevenir complicaciones como caries, infecciones o malestar generalizado en la cavidad oral.

10.4 Viscosidad de la formulación de saliva artificial con afinina

Para evaluar la viscosidad relativa de las formulaciones estudiadas, se midió la viscosidad de cada muestra a diferentes velocidades de rotación, desde 0.1 rpm hasta 100 rpm, utilizando un viscosímetro rotacional. Las viscosidades obtenidas se compararon con la viscosidad de un fluido de referencia, en este caso, agua, con una viscosidad conocida de 2.4 cP a 25°C.

La determinación de la viscosidad de las formulaciones se realizó con un viscosímetro Brookfield DV1, en la figura 4 cada punto es el promedio de tres lecturas realizadas.

La viscosidad relativa (η_{rel}) en cada formulación se calculó utilizando la siguiente expresión.

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{formulación}}{\eta_{referencia}}$$

Donde:

- $\eta_{formulación}$ es la viscosidad de cada formulación medida en una velocidad de rotación específica a 25°C
- $\eta_{referencia}$ es la viscosidad del fluido de referencia (agua) a 25°C.

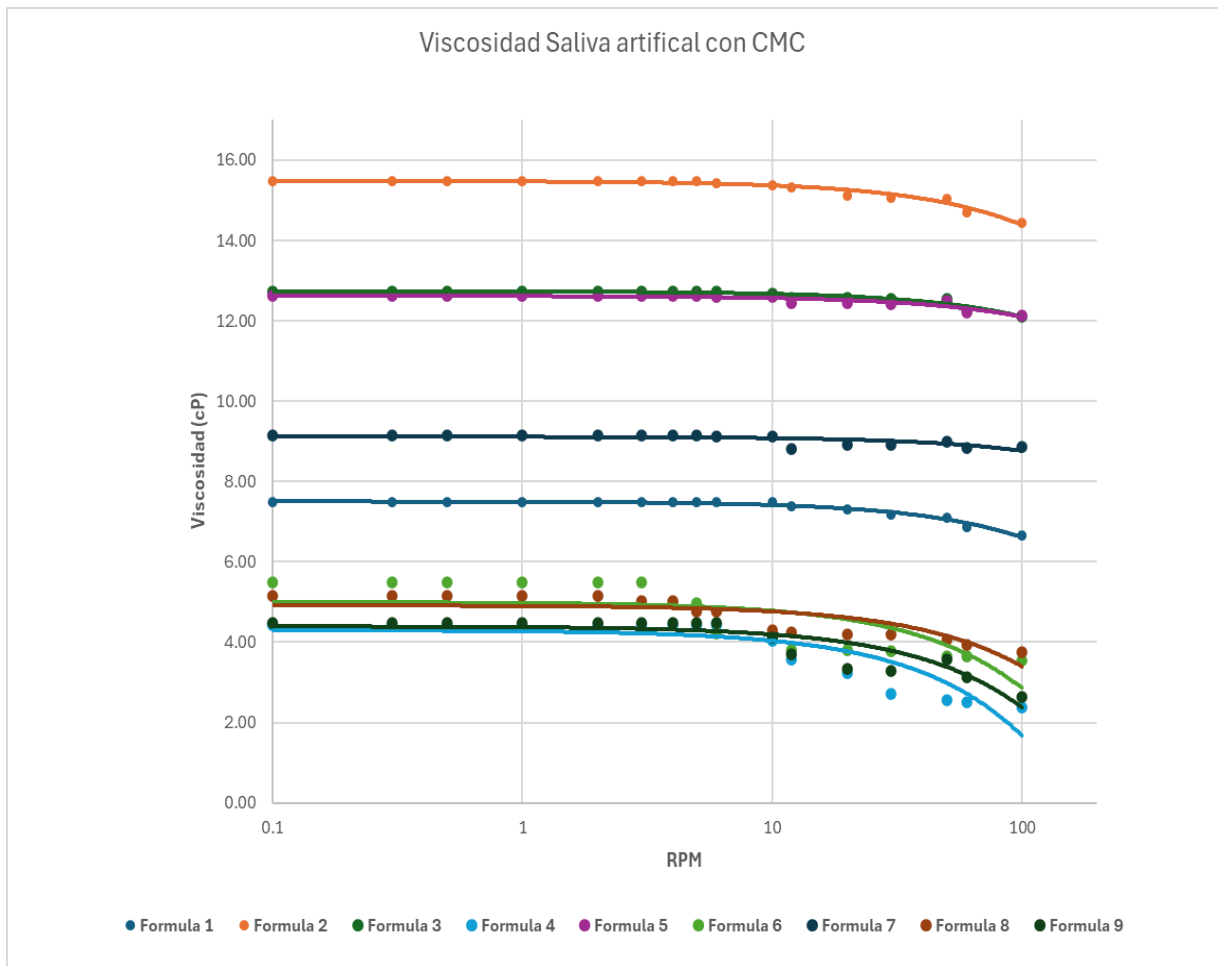


Figura 4. Viscosidad de formulaciones de saliva artificial con CMC.

La viscosidad es otro atributo crítico de calidad en la formulación de saliva artificial, ya que influye directamente en su correcta aplicación y funcionalidad. La obtención de una viscosidad adecuada es esencial para replicar las propiedades protectoras y lubricantes de la saliva natural (Bjrn, *et al.*, 2012). Durante las pruebas reológicas, se observó que, la viscosidad de las formulaciones se mantiene constante bajo ciertas fuerzas de corte, y esta disminuye progresivamente a medida que la fuerza aplicada aumenta. Como se observa en la figura 4, las formulaciones presentan un comportamiento pseudoplástico característico. Este comportamiento reológico es fundamental para garantizar que el producto tenga el efecto adecuado y sea fácil de administrar.

Mediante el diseño de experimentos, se determinó que la viscosidad de las formulaciones depende directamente de la concentración de carboximetilcelulosa (CMC) y de la cantidad de glicerina incorporada. Las formulaciones desarrolladas presentaron valores de viscosidad que oscilaron entre 4.32 cP y 15.55 cP (Tabla 1). Se observó que, a mayores concentraciones de CMC y glicerina, la viscosidad de las formulaciones aumentaba significativamente (figura 6). Este comportamiento era esperado, ya que ambos componentes son conocidos por sus propiedades espesantes y humectantes, respectivamente. Sin embargo, es importante destacar que valores de viscosidad demasiado altos o bajos pueden afectar negativamente la efectividad de la formulación. Una viscosidad excesiva podría dificultar la administración y la distribución uniforme en la cavidad oral, mientras que una viscosidad demasiado baja podría comprometer la retención y la capacidad lubricante de la formulación. De acuerdo con Gésime *et al.* (2009), un sustituto salival adecuado debe presentar una viscosidad dentro del rango de 1.5 cP a 4.0 cP, valores que garantizan un equilibrio entre la facilidad de administración y la funcionalidad.

Este aspecto es particularmente relevante, ya que las formulaciones de saliva artificial están diseñadas para un uso intermitente, a diferencia de la saliva natural, que fluye de manera continua. Por lo tanto, es crucial que la viscosidad de la formulación permita una aplicación cómoda y efectiva, imitando las propiedades

reológicas de la saliva humana sin comprometer su desempeño en condiciones reales. Los resultados de este estudio demuestran que la viscosidad de las formulaciones puede ajustarse mediante la modulación de las concentraciones de CMC y glicerina. No obstante, es esencial mantener estos valores dentro de un rango óptimo (1.5 cP a 4.0 cP) para garantizar que la formulación sea funcional y adecuada para su uso como sustituto salival.

10.5 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto, también conocido como prueba de humectabilidad, se define como el ángulo formado entre la superficie sólida y la tangente a la gota del líquido en el punto de contacto, y es un indicador clave de la capacidad de humectación del líquido (Andrews *et al.*, 2009).

Un ángulo de contacto bajo (generalmente menor a 90°) sugiere una buena humectabilidad, lo que indica que el líquido se extiende fácilmente sobre la superficie, favoreciendo la adhesión y la cobertura uniforme. Por el contrario, un ángulo de contacto alto (mayor a 90°) refleja una mala humectabilidad, donde el líquido tiende a formar gotas y no se adhiere eficientemente a la superficie. Además, el ángulo de contacto no solo depende de las propiedades del líquido, como su tensión superficial, sino también de las características de la superficie sólida, como la energía superficial y rugosidad. (Andrews *et al.*, 2009; Lopez-Polo, *et al.*, 2020). En el contexto de las formulaciones de saliva artificial, el ángulo de contacto es un parámetro crítico para evaluar su eficacia. Una formulación ideal debería presentar un ángulo de contacto bajo, para garantizar una humectación adecuada de las superficies orales y una óptima lubricación.

Las formulaciones desarrolladas en este estudio presentaron valores de ángulo de contacto que oscilaron entre 30.33° y 54.51°. Estos resultados indican que todas las formulaciones exhibieron una buena humectabilidad, ya que ningún ángulo superó los 60°. Se observó que la viscosidad de las formulaciones está directamente relacionada con el ángulo de contacto: aquellas soluciones con una viscosidad más alta tendieron a presentar valores de ángulo de contacto más elevados. Este comportamiento puede atribuirse a una menor capacidad de las soluciones viscosas

para extenderse sobre la superficie sólida, lo que resulta en una menor área de contacto y, por ende, en un ángulo de contacto mayor.

A pesar de estas variaciones, todas las formulaciones demostraron una extensión adecuada sobre la superficie sólida, lo que se traduce en una humectabilidad efectiva. Este aspecto es crucial en el desarrollo de saliva artificial, ya que una mayor extensión sobre la superficie oral implica una mejor cobertura y lubricación de la mucosa, características esenciales para imitar las propiedades de la saliva humana.

10.5.1 Tensión Superficial

La tensión superficial de un líquido y la energía superficial de un sólido son factores determinantes en el proceso de humectación. Cuando un líquido presenta una baja tensión superficial en contacto con un sólido de alta energía superficial, se favorece la humectación, es decir, el líquido tiende a extenderse y mojar la superficie de manera eficiente. Por el contrario, si el líquido tiene una alta tensión superficial y el sólido una baja energía superficial, la humectación se dificulta, lo que provoca que el líquido forme gotas sobre la superficie en lugar de extenderse (López *et al.*, 2020; Vidal *et al.*, 2024; Wei *et al.*, 2023). Este principio es fundamental para comprender la interacción entre líquidos y sólidos en diversos contextos, incluyendo la formulación de saliva artificial.

En el caso específico de la saliva humana, la tensión superficial es un parámetro crítico que influye en su funcionalidad biológica. Estudios reportan que los valores de tensión superficial de la saliva humana oscilan entre 44.9 y 68.7 dyn/cm, variando en función del tiempo transcurrido desde la formación de la superficie (Nayebi *et al.*, 2019). Esta variabilidad puede atribuirse a la composición química de la saliva, la cual incluye una alta concentración de proteínas, enzimas y fosfolípidos.

La presencia de proteínas como la mucina y enzimas como la amilasa no solo reducen la tensión superficial, sino que también influyen en la viscosidad y la capacidad lubricante de la saliva. Estos componentes tienen una actividad

superficial significativa, lo que contribuye a reducir la tensión superficial y, por ende, a mejorar la capacidad de humectación (Qianqian *et al.*, 2024). Estas propiedades son esenciales para funciones biológicas como la digestión, la protección de la mucosa oral y la facilitación del habla (Nayebi *et al.*, 2019; Qianqian *et al.*, 2024). Por lo tanto, al diseñar formulaciones de saliva artificial, es crucial replicar estos aspectos fisicoquímicos para garantizar su eficacia y biocompatibilidad.

Las formulaciones desarrolladas en este estudio presentaron valores de tensión superficial que oscilaron entre 57.11 y 51.56 dyn/cm (Tabla 1). Estos valores están directamente relacionados con la concentración de glicerina y carboximetilcelulosa (CMC) incorporadas en las formulaciones. La CMC, en particular, es un agente espesante que no solo incrementa la viscosidad de las soluciones, sino que también contribuye a reducir la tensión superficial. Este efecto dual es crucial para lograr propiedades fisicoquímicas similares a las de la saliva humana. Durante la investigación, se observó que incluso pequeñas cantidades de CMC son capaces de modificar significativamente la tensión superficial de las formulaciones. Este hallazgo es relevante, ya que permite alcanzar una viscosidad adecuada y una tensión superficial reducida, ambos parámetros esenciales para imitar el comportamiento de la saliva natural.

La capacidad de la CMC para reducir la tensión superficial puede atribuirse a su naturaleza anfifílica, que le permite interactuar con las interfaces líquido-aire y líquido-sólido, modificando así las propiedades superficiales de las soluciones (Wei *et al.*, 2023). Además, la glicerina, conocida por sus propiedades humectantes, complementa el efecto de la CMC. Esta combinación de agentes resulta en una formulación que no solo replica estas propiedades fisicoquímicas de la saliva humana, sino que también podría ser adecuada para aplicaciones clínicas, como el alivio de la xerostomía (boca seca) o la protección de la mucosa oral.

10.5.2 Energía de adhesión

En la administración de fármacos, el concepto de bioadhesión se refiere a la unión de un sistema transportador de medicamentos a un sitio biológico determinado. Esta unión puede ocurrir directamente con el tejido epitelial o con la capa de moco que recubre el tejido. Cuando la adhesión se produce específicamente con la capa de moco, el fenómeno se denomina mucoadhesión (Shaikh, *et al.*, 2011).

Los polímeros ligeramente reticulados desempeñan un papel fundamental en la mucoadhesión debido a su capacidad para mejorar la retención y regular la descarga de ingredientes farmacéuticos en la boca. Tienen la capacidad para hidratarse y formar redes expandidas. Estas redes interactúan con la capa de moco presente en superficies mucosas, como la mucosa oral, mediante mecanismos que incluyen el enredo mecánico y la formación de enlaces de hidrógeno (Figura 5). Un ejemplo destacado es el uso de la carboximetilcelulosa (CMC), un polímero que, al hidratarse, forma una red expandida capaz de interactuar eficazmente con el moco, lo que facilita la mucoadhesión (Shaikh, *et al.*, 2011; Velopoulos, *et al.*, 2024).

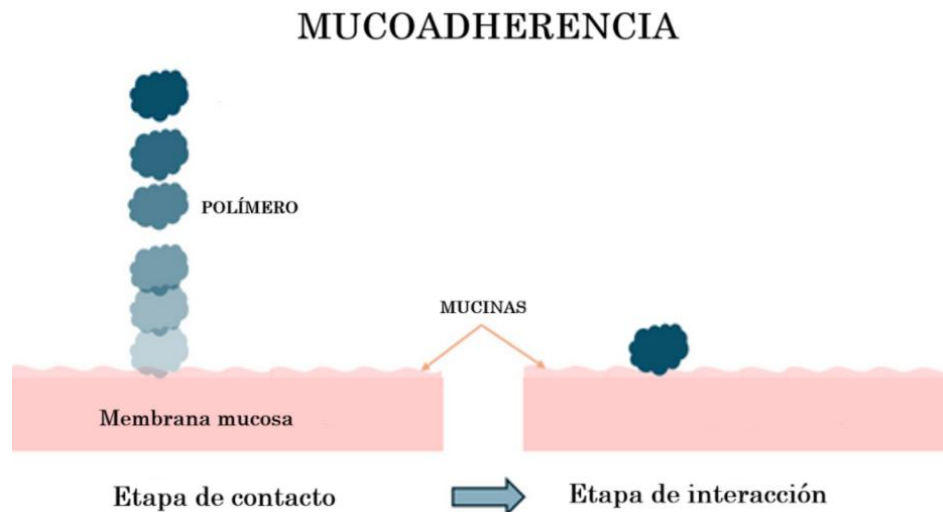


Figura 5. Representación de la mucoadhesión de los polímeros en la membrana mucosa, tomada de Velopoulos, *et al.*, 2024.

Para cuantificar la energía de adhesión de la formulación, se utilizó la ecuación de Young-Dupré, la cual establece una relación entre el ángulo de contacto y la tensión superficial del líquido. Esta ecuación se expresa de la siguiente manera:

$$W_a = \gamma_l (1 + \cos\theta)$$

donde W_a representa la energía de adhesión, γ_l es la tensión superficial del líquido en equilibrio con su vapor, y θ es el ángulo de contacto formado entre el líquido y la superficie sólida.

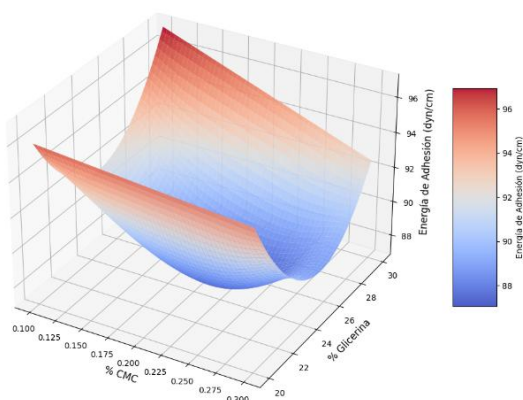
Realizar este análisis es fundamental para asegurar que la formulación cumpla con las características fisicoquímicas requeridas y los estándares de calidad establecidos. De esta manera, se garantiza que la saliva artificial posea la capacidad de adherirse eficazmente a las superficies mucosas, un aspecto crucial para prolongar su tiempo de residencia y, en consecuencia, optimizar su eficacia terapéutica.

Los valores de energía de adhesión para las formulaciones oscilaron entre 87.17 y 98.06 dyn/cm, lo que indica la presencia de una energía de adhesión significativa. Esta propiedad es esencial para lograr la mucoadhesión de la formulación en la mucosa oral, un fenómeno atribuible principalmente a la carboximetilcelulosa, un polímero conocido por su capacidad para adherirse a superficies mucosas. Según López-Polo et al. (2020), el control de parámetros fisicoquímicos como la tensión superficial, el ángulo de contacto y la energía de adhesión es clave para mejorar la humectabilidad y diseñar formulaciones con una afinidad óptima hacia las superficies que se desean recubrir.

Tabla 1. Resultados de las formulaciones elaboradas con CMC, los resultados mostrados son el promedio de tres replicas realizadas.

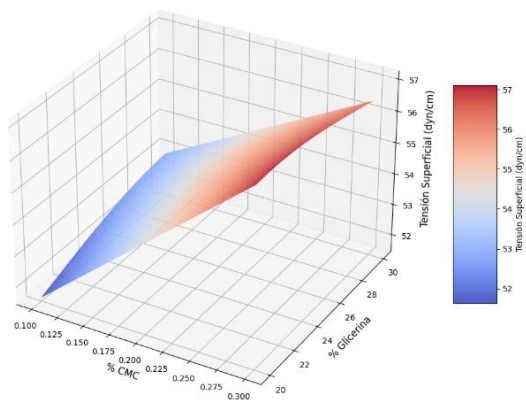
Parámetro	FÓRMULA 1	FÓRMULA 2	FÓRMULA 3	FÓRMULA 4	FÓRMULA 5	FÓRMULA 6	FÓRMULA 7	FÓRMULA 8	FÓRMULA 9
pH	6.42 ± 0.01	6.41 ± 0.01	6.43 ± 0.01	6.43 ± 0.01	6.40 ± 0.01	6.41 ± 0.01	6.41 ± 0.01	6.41 ± 0.01	6.41 ± 0.01
Tensión superficial (dyn/cm)	54.82 ± 0.89	56.43 ± 0.74	57.11 ± 0.34	52.87 ± 0.40	51.74 ± 0.25	52.11 ± 0.02	52.23 ± 0.57	54.99 ± 0.07	51.56 ± 0.47
Ángulo de contacto (°)	54.51 ± 0.45	50.87 ± 0.14	48.54 ± 0.03	34.18 ± 0.13	40.07 ± 0.03	30.33 ± 0.38	44.16 ± 0.06	31.17 ± 0.02	31.47 ± 0.20
Viscosidad (cP)	7.50 ± 0.08	15.55 ± 0.30	12.74 ± 0.10	4.32 ± 0.10	12.65 ± 0.13	4.95 ± 0.25	9.12 ± 0.16	4.91 ± 0.22	4.40 ± 0.31
Energía de adhesión (dyn/cm)	87.17 ± 1.28	92.58 ± 1.10	94.92 ± 0.57	96.00 ± 0.79	91.34 ± 0.46	97.09 ± 0.14	90.28 ± 0.99	98.06 ± 1.29	94.30 ± 0.99

Superficie 3D de Respuesta para Energía de Adhesión



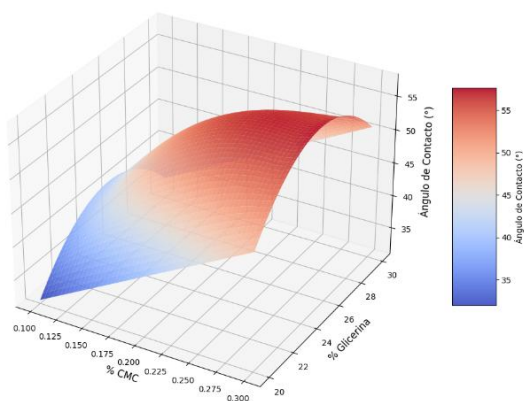
a)

Superficie 3D de Respuesta para Tensión Superficial



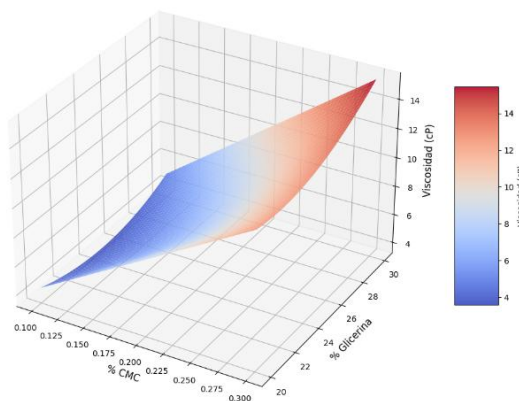
b)

Superficie 3D de Respuesta para Ángulo de Contacto



c)

Superficie 3D de Respuesta para Viscosidad



d)

Figura 6. Gráficos de superficie con las diferentes concentraciones de CMC y glicerina: a) Energía de adhesión de las formulaciones, b) Tensión superficial de las formulaciones, c) Ángulo de contacto de las formulaciones, y d) Viscosidad de las formulaciones.

10.6 Optimización de la formulación

Tras la realización de las distintas formulaciones mediante un diseño de experimentos, se observó que los componentes con mayor influencia en la calidad final del producto fueron el agente viscosante, en particular la carboximetilcelulosa (CMC) y la glicerina. Para la optimización de la formulación, se utilizó el software estadístico Statgraphics Centurion XVI, el cual permitió identificar las condiciones

óptimas para cada componente. Posteriormente, la formulación optimizada fue reevaluada para corroborar los valores previamente establecidos como óptimos. Además, se realizaron estudios de estabilidad acelerada durante un período de tres meses, en los cuales se monitorearon las propiedades fisicoquímicas y la concentración de afinina. En la Tabla 3 se presentan los resultados correspondientes a la formulación optimizada, tanto en su estado inicial como tras ser sometida a condiciones de estabilidad acelerada.

Se determinó que las concentraciones óptimas para la formulación de saliva artificial son: CMC al 0.1%, glicerina al 20% y afinina a 0.1 mg/mL. El análisis estadístico confirmó que estas concentraciones garantizan una viscosidad adecuada y una humectabilidad óptima, atributos fundamentales para la calidad de la formulación. Además, los excipientes que participan en la formulación fueron previamente seleccionados, con la finalidad de mantener las propiedades fisicoquímicas adecuadas y mejorar la efectividad de la formulación de saliva artificial (véase Tabla 2). El enfoque utilizado para el desarrollo del producto permitió identificar los excipientes más idóneos y el impacto de la concentración de estos en la funcionalidad del producto final.

Tabla 2. Concentración y propiedades de los excipientes en la formulación de saliva artificial.

Excipientes en la formulación de saliva artificial con afinina		
	CONCENTRACIÓN	PROPIEDADES
• Afinina	0.1 mg/ mL - 0.5 mg/ mL	Se emplea como ingrediente activo en enjuagues bucales. Los usos tradicionales de la afinina incluyen su aplicación como condimento, analgésico y estimulante de la salivación.
• Ácido cítrico	0.2 g - 0.4 g	En productos alimenticios, el ácido cítrico se utiliza como potenciador del sabor por su sabor ácido y ácido. El ácido cítrico monohidrato se utiliza como agente secuestrante y sinergista antioxidante
• Ácido tartárico	0.1 g - 0.4 g	Se utiliza como acidulante en bebidas, confitería, productos alimenticios y formulaciones farmacéuticas. También puede utilizarse como agente secuestrante y como sinergista antioxidante.
• Carboximetilcelulosa	0.1 g - 0.3 g	Se utiliza ampliamente en formulaciones farmacéuticas orales y tópicas, principalmente por sus propiedades modificadoras de la viscosidad.
• Citrato de sodio	1.0 g - 2.0 g	Se utiliza en productos alimenticios, principalmente para ajustar el pH de las soluciones. También se utiliza como agente secuestrante.
• Cloruro de potasio	0.01 g - 0.02 g	El cloruro de potasio también se utiliza ampliamente en la industria alimentaria como suplemento dietético, agente de control del pH, estabilizador, espesante y gelificante.
• Cloruro de sodio	0.1 g - 0.2 g	Se utiliza ampliamente en diversas formulaciones farmacéuticas parenterales y no parenterales, cuyo uso principal es la producción de soluciones isotónicas.
• Fluoruro de sodio	0.3 g - 0.5 g	Se utiliza principalmente como principio activo en productos dentales, como pastas dentales y enjuagues bucales, debido a su capacidad para prevenir la caries dental.
• Glicerina	10 g - 30 g	Se utiliza principalmente por sus propiedades humectantes y emolientes. En soluciones orales, la glicerina se utiliza como disolvente, antimicrobiano y viscosificador.
• Mentol	0.01 g - 0.02 g	El mentol se utiliza ampliamente en productos farmacéuticos como aromatizante o potenciador del olor.
• Propilparabeno	0.02 g	Se utiliza ampliamente como conservador antimicrobiano en cosméticos, productos alimenticios y formulaciones farmacéuticas
• Sorbitol	10 g - 20 g	Es particularmente útil en comprimidos masticables debido a su agradable sabor dulce y su sensación refrescante.

Tabla 3. Resultados de la formulación optimizada de saliva artificial con afinina.

Formulación optimizada	
CMC (%) 0.1	Glicerina (%) 20
Afinina (mg/mL) 0.1	
INICIO	
Viscosidad (cP)	4.41 ± 0.18
Tensión superficial (dyn/cm)	51.62 ± 0.48
Angulo de contacto	31.40 ± 0.26
Energía de adhesión (dyn/cm)	95.68 ± 0.17
pH	6.43 ± 0.01
MES 1	
Viscosidad (cP)	4.33 ± 0.21
Tensión superficial (dyn/cm)	51.57 ± 0.41
Angulo de contacto	31.61 ± 0.36
Energía de adhesión (dyn/cm)	95.49 ± 0.21
pH	6.40 ± 0.01
MES 2	
Viscosidad (cP)	4.21 ± 0.16
Tensión superficial (dyn/cm)	51.65 ± 0.43
Angulo de contacto	31.25 ± 0.46
Energía de adhesión (dyn/cm)	95.81 ± 0.17
pH	6.41 ± 0.01
MES 3	
Viscosidad (cP)	4.22 ± 0.20
Tensión superficial (dyn/cm)	51.60 ± 0.41
Angulo de contacto	31.10 ± 0.25
Energía de adhesión (dyn/cm)	95.78 ± 0.17
pH	6.40 ± 0.01

10.7 Validación del método analítico para la cuantificación de afinina en la formulación de saliva artificial por CLAR

Se diseñó y validó un método analítico basado en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación precisa de afinina en una formulación líquida oral de saliva artificial con una concentración nominal de 0.1 mg/mL. La validación se realizó siguiendo los lineamientos establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), la guía ICH Q2 (R2) y las recomendaciones del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C., considerando parámetros críticos de desempeño como adecuabilidad del sistema, precisión, linealidad, exactitud, especificidad, selectividad y estabilidad (tabla 4). El protocolo y reporte completo del desarrollo y validación del método analítico se encuentra en el anexo I.

El método se desarrolló tomando en cuenta las características fisicoquímicas de la afinina y los excipientes de la formulación, seleccionando condiciones cromatográficas óptimas. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo y agua (65:35 v/v), con una columna C18 y detección a 228 nm. Estas condiciones permitieron obtener una separación eficiente, asegurando un tiempo de retención estable y un pico simétrico para la afinina.

Tabla 4. Parámetros evaluados en el desarrollo y validación del método analítico CLAR para la cuantificación de afinina.

Pruebas efectuadas	Criterio de aceptación
Pureza de pico	
Pureza	El límite inferior es 80.0% y límite superior es 100.0 %
Linealidad del método	
Cantidad adicionada vs cantidad recuperada:	El coeficiente de determinación debe ser: >0.99 El intervalo de confianza para la pendiente debe incluir la unidad. El intervalo de confianza para la ordenada al origen debe incluir el cero. El CV del porcentaje de recobro, no debe ser mayor de 1.5 %.
Porcentaje de recobro:	El IC debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 99.0% - 101.0% si el método es cromatográfico. El CV del porcentaje de recobro: no debe ser mayor de 1.5 %.
Linealidad del sistema	
Coeficiente de determinación: >0.99 Intervalo de confianza para la pendiente: no debe incluir el cero	
Precisión del método	
CV <1.5 % para métodos cromatográficos.	
Especificidad/Selectividad	
La respuesta del método debe ser únicamente debido al analito.	
Exactitud	
Porcentaje de recobro:	El IC debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 98 - 102% El CV del porcentaje de recobro: no debe ser mayor de 1.5%.
Precisión intermedia	
CV: < 1.5% para métodos cromatográficos y volumétricos.	
Adecuabilidad del sistema	
- retención relativa (si procede, R_r) - factor de simetría (T) - número de platos teóricos (N)	CV <1.5 % para la respuesta analítica. Para cada inyección se recomienda: T<2. N >5000.
Estabilidad de la muestra	
Los resultados no deben variar significativamente. La diferencia (DI): debe ser menor al 2.0%	

10.7.1 Resultados de Validación

Adecuabilidad del Sistema: Se confirmó la confiabilidad del sistema cromatográfico mediante seis inyecciones de una solución de adecuabilidad. El número de platos teóricos superó consistentemente los 15,000, y el factor de simetría se mantuvo por debajo de 2.0, lo que garantiza una separación óptima y reproducible. El coeficiente de variación (CV) para el área del pico y el tiempo de retención fue inferior al 1.5%, cumpliendo con los criterios establecidos.

Linealidad: La evaluación de tres curvas de calibración independientes en un rango de 80% a 120% de la concentración nominal arrojó coeficientes de determinación (r^2) superiores a 0.99, demostrando una respuesta proporcional entre la concentración de afinina y el área del pico cromatográfico. El intervalo de confianza para la pendiente incluyó la unidad, y el porcentaje de recobro promedio se situó entre 99.0% y 101.0%, validando la precisión y exactitud del método en este rango.

Exactitud: El método demostró un desempeño robusto al evaluar el porcentaje de recobro en concentraciones representativas (80%, 100%, y 120% de la concentración nominal). El promedio de recobro fue del 100.21%, con un CV de 1.19%, cumpliendo ampliamente con los límites aceptables para métodos cromatográficos (99.0% - 101.0%).

Especificidad y Selectividad: Se verificó que el método es capaz de detectar exclusivamente afinina sin interferencias de excipientes ni productos de degradación. Los ensayos de especificidad mostraron que la afinina es el único compuesto detectable en el tiempo de retención establecido, incluso tras someter las muestras a estrés térmico y exposición a luz UV.

Precisión: La repetibilidad del método se evaluó mediante inyecciones replicadas de soluciones estándar y muestras problema. El CV para las mediciones fue inferior al 1.5%, confirmando la reproducibilidad de los resultados bajo condiciones controladas.

Estabilidad de la Muestra: Las pruebas de estabilidad a 24 y 48 horas demostraron que la formulación conserva su contenido de afinina bajo distintas condiciones de

almacenamiento (temperatura ambiente con y sin luz, y refrigeración). La variación absoluta fue inferior al 2%, asegurando la integridad del analito durante el periodo de evaluación.

El método desarrollado y validado para la cuantificación de afinina mediante HPLC cumplió con todos los criterios internacionales y nacionales de aceptación, asegurando precisión, exactitud, especificidad y robustez. Este procedimiento analítico representa una herramienta confiable y reproducible para el análisis de calidad de la formulación líquida de saliva artificial, contribuyendo de manera significativa al desarrollo y control de calidad de productos innovadores que incluyen afinina como componente activo. Asimismo, garantiza la capacidad de evaluar la estabilidad del producto y monitorear los niveles de afinina durante su desarrollo y almacenamiento.

10.8 Estabilidad de la formula optimizada

Los estudios de estabilidad acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\%$ HR) no revelaron diferencias significativas entre las formulaciones sometidas a estrés a lo largo de tres meses. La formulación optimizada demostró una viscosidad estable tanto al inicio como después del periodo de pruebas. La estabilidad se puede atribuir a la estructura aniónica de la CMC, que favorece una mayor solubilidad y resistencia a cambios de temperatura. Lo que la convierte en una opción más adecuada para el desarrollo de una formulación de saliva artificial estable y eficaz.

Además, el pH, la tensión superficial y el ángulo de contacto refuerzan la robustez de la formulación durante el período de estabilidad acelerada. Se observaron variaciones mínimas (Tabla 2), lo que evidencia una excelente estabilidad química y fisicoquímica. Este comportamiento es de gran relevancia, ya que previene fluctuaciones que podrían comprometer la eficacia y seguridad del producto a lo largo de su vida útil. La selección adecuada de excipientes y la estrategia de diseño basada en calidad por diseño (QbD) fueron factores determinantes para garantizar

el cumplimiento de este atributo crítico de calidad, consolidando así el potencial del producto como un sustituto salival efectivo y seguro.

La valoración del contenido de afinina en la formulación se realizó con el método validado para la cuantificación de afinina en la formulación de saliva artificial. El análisis se llevó a cabo mediante CLAR y se determinó la concentración en la formulación optimizada al inicio del estudio y durante los 3 meses del periodo de sometimiento de estrés. Como se observa en la figura 7, la formulación se mantuvo dentro del criterio de aceptación establecido (90% – 110%). A partir de los datos obtenidos en el análisis de estabilidad (Tabla 5), se estableció la tasa de degradación con la siguiente fórmula:

$$Tasa\ de\ degradación = \frac{Concentración\ inicial - Concentración\ Final}{Tiempo}$$

$$Tasa\ de\ degradación\ Saliva\ artificial = \frac{0.1007\ mg/mL - 0.0988mg/mL}{3\ meses}$$

$$Tasa\ de\ degradación\ Saliva\ artificial = 0.000633\ mg/mL\ por\ mes$$

Posteriormente, con la tasa de degradación, se realizó una proyección lineal para determinar cuándo se alcanzará el límite de aceptación establecido. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$Tiempo\ para\ alcanzar\ 0.090\ mg/mL = \frac{0.1007\ mg/mL - 0.090\ mg/mL}{0.000633mg/mL\ por\ mes}$$

$$Tiempo\ para\ alcanzar\ 0.090\ mg/mL = 16.90\ meses$$

De esta forma, se puede establecer un periodo de vida útil aproximado al de la formulación. Con los datos obtenidos se puede establecer que la duración y

estabilidad de la formulación es estable por 3 meses en condiciones de estabilidad acelerada, con una tasa de degradación aproximada 0.000633 mg/mL por mes, y un tiempo aproximado de 16.90 meses para alcanzar el límite establecido de 90% como mínimo en el contenido de afinina en la formulación de saliva artificial.

Tabla 5. Estabilidad de la formulación optimizada durante 3 meses.

Estabilidad Formulación saliva artificial		
Mes	Concentración Afinina (%)	Concentración Afinina (mg/mL)
0	100.661	0.1007
1	99.466	0.09946
2	99.064	0.09906
3	98.75	0.09887

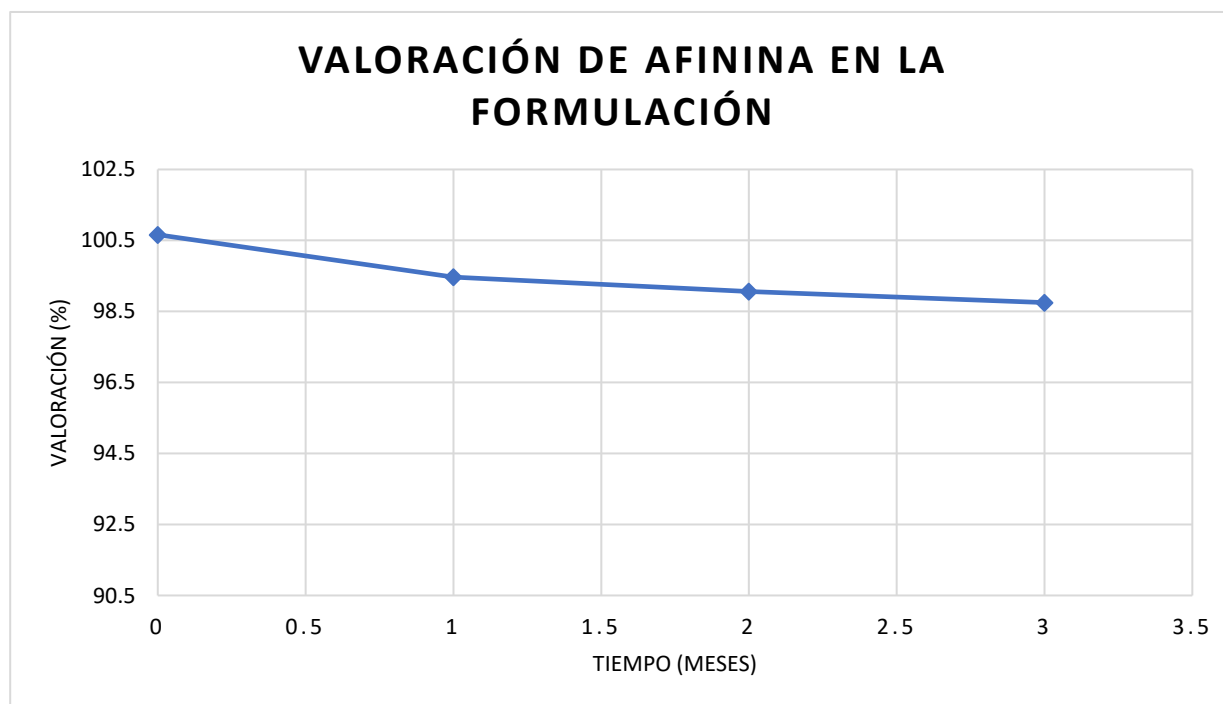


Figura 7. Valoración de la afinina en la formulación de saliva artificial por un periodo de 3 meses en condiciones de estabilidad acelerada.

11. CONCLUSIONES

La formulación desarrollada presenta propiedades fisicoquímicas óptimas que replican eficazmente las características de la saliva natural, minimizando las incompatibilidades entre los excipientes y la vía de administración. La evaluación integral de la formulación garantiza un comportamiento adecuado, lo que mejora tanto su eficacia en la administración como su efecto terapéutico. Además, los estudios de estabilidad realizados permiten definir el período de vida útil del producto, asegurando que cumpla con los estándares de calidad, seguridad y eficacia requeridos. Finalmente, el desarrollo y validación del método analítico para la formulación de saliva artificial contribuye de manera significativa al desarrollo y control de calidad de productos innovadores que incluyen afinina como componente activo. Este enfoque metodológico no solo respalda la reproducibilidad y consistencia del producto, sino que también establece un precedente para el desarrollo de futuras formulaciones farmacéuticas con objetivos similares.

12. PERSPECTIVAS

El desarrollo de esta formulación representa un avance en el diseño de sistemas terapéuticos que imitan funciones fisiológicas complejas, como las de la saliva natural. Futuros estudios podrían enfocarse en la incorporación de biomoléculas funcionales o sistemas de liberación controlada que potencien las propiedades bioadhesivas y terapéuticas del producto. Asimismo, la metodología empleada para la validación analítica puede ser extrapolada a otras formulaciones con afinina, fortaleciendo los criterios de calidad y trazabilidad en el desarrollo farmacéutico.

13. REFERENCIAS

- Aguilar, M. I., Castillo, N. E., Alvarado-López, C., Duarte-Lisci, G., Ríos-Gómez, R., & Rios, M. Y. (2016). HPLC Determination of the Alkamide Affinin in Fresh and Dry Roots of *Heliopsis longipes* (Asteraceae) and HS-SPME-GC-MS-TOF Analysis of Volatile Components. *Food Analytical Methods*, 9, 1807-1813.
- Andrews, G. P., Lavery, T. P., & Jones, D. S. (2009). Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 71(3), 505-518.
- Armstrong, M. A., & Turturro, M. A. (2013). Salivary gland emergencies. *Emergency medicine clinics of North America*, 31(2), 481–499. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2013.01.004>
- Barbosa, A. F., Carvalho, M. G. D., Smith, R. E., & Sabaa-Srur, A. U. (2016). Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 128-133.
- Basilicata, M., Pieri, M., Marrone, G., Nicolai, E., Di Lauro, M., Paolino, V., Tomassetti, F., Vivarini, I., Bollero, P., Bernardini, S., & Noce, A. (2023). Saliva as Biomarker for Oral and Chronic Degenerative Non-Communicable Diseases. *Metabolites* (2218-1989), 13(8), 889.
- Bhattarai, K.R., Lee, H.Y., Kim, S.H., Kim, H.R., & Chae, H.J. (2018). *Ixeris dentata* Extract Increases Salivary Secretion through the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress in a Diabetes Induced Xerostomia Rat Model. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1059.
- Blitzer, G. C., Rogus, P. N. M., Paz, C., Nickel, K. P., Cannaday, V. L., Kelm, N. C. A., Sudakaran, S., Chappell, R. J., Glazer, T., & Kimple, R. J. (2022). Quantification of very late xerostomia in head and neck cancer patients after irradiation. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, 7(4), 1018–1024. <https://doi.uam.elogim.com/10.1002/lio2.864>

- Boonen, J., Baert, B., Roche, N., Burvenich, C., & De Spiegeleer, B. (2010). Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 77-84.
- Bowers, L. M., Fox, P. C., & Brennan, M. T. (2015). CHAPTER 10: Salivary Gland Diseases. *Burket's Oral Medicine*, 219–262.
- Bjrn, A., La Monja, P. S. de, Karlsson, A., Ejlerstson, J., & H., B. (2012). Rheological Characterization. InTech. doi: 10.5772/32596
- Cilia-López, V. G., Juárez-Flores, B. I., Aguirre-Rivera, J. R., & Reyes-Agüero, J. A. (2010). Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. *Pharmaceutical biology*, 48(2), 195–200.
- Davies, A. N., & Thompson, J. (2015). Parasympathomimetic drugs for the treatment of salivary gland dysfunction due to radiotherapy. The Cochrane database of systematic reviews, 2015(10), CD003782. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003782.pub3>
- Dionysopoulos, D., Strakas, D., Koliniotou-Koumpia, E., & Koumpia, E. (2017). Effect of Er,Cr laser irradiation on bovine enamel surface during in-office tooth bleaching ex vivo. *Odontology*, 105(3), 320-328.
- Dubey, S., Maity, S., Singh, M., Saraf, S. A., & Saha, S. (2013). Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2013.
- Engelhart, K., Popescu, A., & Bernhardt, J. (2016). Using mid infrared technology as new method for the determination of the dwell time of salivary substitutes on three dimensional gingiva models. *BMC Ear Nose Throat Disorders*, 16, 6.
- Escobedo, A. (2021). La importancia de la homeostasis en la salud oral y sistémica. *Revista ADM*, 78(1), 48–50.
- Estévez, T., Aguilera, A., Sáez, A., & Hardy, E. (2000). Diseño y validación de una celda de difusión para estudios de liberación in vitro de biomoléculas. *Biotecnología Aplicada*, 17(3), 187-190.

Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental health perspectives*, 109 Suppl 1(Suppl 1), 69–75. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s169>

Foglio-Bonda, A., Foglio-Bonda, P. L., Bottini, M., Pezzotti, F., & Migliario, M. (2022). Chemical-physical characteristics of artificial saliva substitutes: rheological evaluation. *European review for medical and pharmacological sciences*, 26(21), 7833–7839. https://doi.org/10.26355/eurev_202211_30132

Gallardo, J. M. (2008). Xerostomía: etiología, diagnóstico y tratamiento. *Revista Médica Del IMSS*, 46(1), 109–116.

García Jerónimo, A. P., Ramírez Prado, M. I., Rodríguez Guzmán, L. M., Castañeda Felgueroso, J. A., & del Carmen Ríos Martínez, M. (2020). Hiposalivación y xerostomía en pacientes hipertensos, diabéticos y/o hipertenso-diabéticos. *Revista Mexicana de Medicina Forense y Ciencias de la Salud*, 4 (S1), 39-41.

García López, E. A. (2010). Efecto de una composición de saliva artificial con clorhidrato de pilocarpina y de un humectante, en el tratamiento de hiposalivación crónica. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.

García-Chávez A, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J. (2004). El género *Heliopsis* (*Heliantheae*; *Asteraceae*) en México y las alcamidas presentes en sus raíces. *Acta Botanica Mexicana* 69: 115-131. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm69.2004.983>

Gésime, JM, Acevedo, AM, & Lalaguna, F. (2009). Las Mucinas Salivales y sus implicaciones en la reología de la saliva humana y los sustitutos salivales. *Acta Odontológica Venezolana*, 47(2), 446-452.

González Morales, Susana, Flores López, María Liliana, Benavides Mendoza, Adalberto, & Flores Olivas, Alberto. (2011). Actividad Inhibitoria del Extracto de *Heliopsis longipes* Sobre *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*. *Revista mexicana de fitopatología*, 29(2), 146-153. Recuperado en 07 de septiembre de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000200006&lng=es&tlng=es.

Greger, H. (2015). Alkamides: a critical reconsideration of a multifunctional class of unsaturated fatty acid amides. *Phytochem Rev* 15(5):729–770. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9418-0>

Gualtero Escobar, D. F., Buitrago Ramírez, D. M., Trujillo Pérez, D. A., Calderón Robles, J., & Lafaurie Villamil, G. I. (2015). Efecto de enjuagues de ácido hipocloroso sobre el pH de la saliva: estudio in vitro. *Universitas Odontológica*, 34(72), 83–90.

Guan, J., Shetty, A., Anastasiou, T. J., Euan, D. E., Ferri, D. C., Froebe, C. L., Hoang, T. D., Joycelyn P. M. Levenson, A., Osborne, D. L., & Michaelidoa, T. A. (2013). Composiciones de goma que humectan la boca y productos que contienen las mismas (Número de patente MX2013001942A). México.

Hernández Castañeda, A., & Aranzazu Moya, G. (2012). Características y propiedades fisicoquímicas de la saliva: una revisión. *Ustasalud*, 11(2), 102 - 112.

Hernández, D. S., Díaz, D. S., Peña, I. H., & González, J. E. (2017). La xerostomía y su relación con el consumo de medicamentos, cigarro y alcohol. *MediMay*, 24(3), 1.

Huang, Peng, Hu, & Wu. (2019). Spilanthol from Traditionally Used *Spilanthes acmella* Enhances AMPK and Ameliorates Obesity in Mice Fed High-Fat Diet. *Nutrients*, 11(5), 991. MDPI AG.

Ito, K., Izumi, N., Funayama, S., Nohno, K., Katsura, K., Kaneko, N., & Inoue, M. (2023). Characteristics of medication-induced xerostomia and effect of treatment. *PLoS ONE*, 17(1), 1–14. <https://doi.uam.elogim.com/10.1371/journal.pone.0280224>

Jané Salas, E., Estrugo Devesa, A., Ayuso Montero, R., & López López, J. (2014). Tratamiento de la boca seca: nuevas tendencias. *Avances en Odontoestomatología*, 30(3), 135-138.

Kashi Raj, B., Sang Won, L., Seung Hyun, K., Hyung Ryong, K., & Han Jung, C. (2017). *Ixeris dentata* extract regulates salivary secretion through the activation of

aquaporin-5 and prevents diabetes-induced xerostomia, *Journal of Experimental Pharmacology*, 9: 81-91.

Kim, Y.-J. (2023). Xerostomia and Its Cellular Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5358.
<https://doi.uam.elogim.com/10.3390/ijms24065358>

Kimura, S., Maruyama, J., Watanabe, T., Ito, Y., Arioka, M., & Kitamoto, K. (2010). In vivo imaging of endoplasmic reticulum and distribution of mutant alpha-amylase in *Aspergillus Oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 47,1044–1054. [CrossRef] [PubMed]

Lamy, E., Capela-Silva, F., & Tvarijonaviciute, A. (2018). Research on saliva secretion and composition. *BioMed research international*, 2018.)

Lee, H. Y., Gu, M., Cheng, J., Suh, J. W., Chae, H. J. (2020). *Ixeris dentata* and *Lactobacillus gasseri* Extracts Improve Salivary Secretion Capability in Diabetes-Associated Dry Mouth Rat Model. *Nutrients*. 12, 1331.

Ley, J. P., Krammer, G., Looft, J., Reinders, G., & Bertram, H.-J. (2006). Structure-activity relationships of trigeminal effects for artificial and naturally occurring alkamides related to spilanthol. *Developments in Food Science*, 21–24.
[https://doi.org/10.1016/s0167-4501\(06\)80006-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4501(06)80006-3)

Liu, B., Dion, M. R., Jurasic, M. M., Gibson, G., & Jones, J. A. (2012). Xerostomia and salivary hypofunction in vulnerable elders: Prevalence and etiology. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 114(1), 52-60.

Lopez-Polo, J., Silva-Weiss, A., Zamorano, M., & Osorio, F. A. (2020). Humectability and physical properties of hydroxypropyl methylcellulose coatings with liposome-cellulose nanofibers: Food application. *Carbohydrate Polymers*, 231, 115702.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115702>

Mancera, N. G., Piña Libien, Y. B., Aguilar Díaz, N., & Partida Rodríguez, E. (2011). Xerostomía (hiposalivación) secundaria al tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial. *Revista ADM*, 68(6), 283–289.

Martínez Del Angel, M., Grajales Ramos, A. I., Sánchez V. A., & Espinosa Rosales, J. E. (2024). Determinación del pH salival después de la aplicación de aceite ozonizado. *Revista ADM*, 81(1), 16–20. <https://doi.uam.elogim.com/10.35366/114742>)

Martínez, L. M., Menéndez, A. M. L., Llop, M. R., Navarro, M. J. G., & García, C. B. (2021). Influencia de la saliva en la erosión dental en niños. Estudio transversal. *Avances En Odontoestomatología*, 37(3), 131–139. <https://doi.uam.elogim.com/10.4321/s0213-12852021000300004>)

May, A. J., Chatzeli, L., Proctor, G. B., & Tucker, A. S. (2015). Salivary gland dysplasia in Fgf10 heterozygous mice: a new mouse model of xerostomia. *Current molecular medicine*, 15(7), 674-682.

Mosqueda Taylor, Adalberto, Luna Ortiz, Kuauhyama, Irigoyen Camacho, María Esther, Díaz Franco, Marco Antonio, & Coll Muñoz, Angel Mario. (2004). Efecto del clorhidrato de pilocarpina como estimulante de la producción salival en pacientes sometidos a radioterapia de cabeza y cuello. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* (Ed. impresa), 9(3), 204-211.

Müller, F., Chebib, N., Maniewicz, S., & Genton, L. (2023). The Impact of Xerostomia on Food Choices—A Review with Clinical Recommendations. *Journal of Clinical Medicine*, 12(14), 4592. <https://doi.uam.elogim.com/10.3390/jcm12144592>

National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 5353001, Spilanthol. Retrieved February 17, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spilanthol>.

Nayebi, I., Rajabi, O., Chamani, J., & Izi, S. (2019). In vitro evaluation of biophysical properties of an artificial saliva produced from Aloe vera gel. *Journal of Herbal Medicine*, 19, 100307. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100307>

Nhiem, N. X., Park, J. H., Bhattarai, K. R., Chae, H. J., Kim, H. R., & Kim, S. H. (2021). Isolation of amylase regulators from the leaves of *Ixeridium dentatum*. *Natural Product Research*, 35(5), 744-749. doi:10.1080/14786419.2019.1599885

Noaiseh, G., Baker, J. F., & Vivino, F. B. (2014). Comparison of the discontinuation rates and side-effect profiles of pilocarpine and cevimeline for xerostomia in primary Sjögren's syndrome. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 32(4), 575-577.

Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. Diario Oficial de la Federación. Secretaría de salud.

Ocampo, J., Olate, S., Haidar, Z. S., & Vásquez, B. (2019). Hiposialia y Xerostomía Post Irradiación: Terapias Innovadoras en el Campo Biomolecular. *International Journal of Morphology*, 37(4), 1564–1571. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022019000401564>

Ozuna, C., García, A. C., Salazar, J. A. G., Solís, E. S., Morales, M. E. S., & Juárez, M. D. R. A. (2016). Potencial de productos alimenticios originarios de la zona noreste de Guanajuato. *Acta Universitaria*, 26(2), 83-92.

Park, S., Nhiem, N. X., Lee, T. H., Kim, N., Kim, S. Y., Chae, H.-J., & Kim, S. H. (2015). Isolation of two new bioactive sesquiterpene lactone glycosides from the roots of *Ixeris dentata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(20), 4562–4566.

Parola-Contreras, Ixchel, Guevara-González, Ramón G., Feregrino-Pérez, Ana A., Reynoso-Camacho, Rosalía, Pérez-Ramírez, Iza F., Ocampo-Velázquez, Rosalía V., Rojas-Molina, Alejandra, Luna-Vazquez, Francisco, & Tovar-Pérez, Erik G. (2021). Phenolic compounds and antioxidant activity of methanolic extracts from leaves and flowers of chilcuague (*Heliopsis longipes*, Asteraceae). *Botanical Sciences*, 99(1), 149-160. Epub 23 de febrero de 2021. <https://doi.org/10.17129/botsci.2671>

Pistone, S., Goycoolea, F. M., Young, A., Smistad, G., & Hiorth, M. (2017). Formulation of polysaccharide-based nanoparticles for local administration into the oral cavity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 381-389.

Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., & Prachayasittikul, V. (2013). High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. *EXCLI journal*, 12

Pulido, J. I. R., Sandoval, G. M., Franco, N. I. R., Arizpe, M. G. C., & Soto, J. M. S. (2017). Terapia farmacológica y avances terapéuticos en xerostomía e hiposalivación. *Revista ADM*, 74(5), 221-223.

Quinn, S., & Braxton, L. (2013). *Salivary Glands: Anatomy, Functions in Digestion and Role in Disease*. Nova Science Publishers, Inc.

Qianqian Guo, Christos Ritzoulis, Jianshe Chen, Jing Xu, & Xinmiao Wang. (2024). Saliva bubbles: How saliva foam impacts aroma release and retronasal perception during oral processing. *LWT -- Food Science and Technology*, 202, 116306. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116306>

Rebattú y. González, M. G., Nieto Munguía, A. M., García Nucamendi, M., San Juan González, C. A., Hernández Pérez, E., & Herrera Gómez, M. J. (2022). Sialolitiasis, sialoadenitis y sialoadenosis. Revisión de literatura y reporte de un caso clínico. *Revista ADM*, 79(6), 342–350. <https://doi.uam.elogim.com/10.35366/108709>

Reddy, C. S., Lee, S.-H., Lee, S. W., Hur, M., Koo, S. C., & Kim, M. R. (2017). Molecular cloning and characterization of carotenoid pathway genes and carotenoid content in *Ixeris dentata* var. *albiflora*. *Molecules*, 22(9).

Rios, M. Y., & Olivo, H. F. (2014). Natural and synthetic alkamides: applications in pain therapy. *Studies in natural products chemistry*, 43, 79-121., 291–312.

Rios, M. Y., Aguilar-Guadarrama, A. B., & del Carmen Gutiérrez, M. (2007). Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2), 364-367.

Sáenz Masís, M. F., & López, D. M. (2019). Capacidad buffer de la saliva y su relación con la prevalencia de caries, con la ingesta de diferentes bebidas comerciales. *Revista Odontología Vital*, 2(31), 59–66. <https://doi.uam.elogim.com/10.59334/rov.v2i31.330>)

Sahu, J.; Jain, K.; Jain, B.; Sahu, R.K. (2011). A review on phytopharmacology and micro propagation of *Spilanthes acmella*. *Pharmacologyonline*. 2, 1105–1110.

Satoh, K.; Narita, T., Matsuki-Fukushima, M., Okabayashi, K., Ito, T., Senpuku, H., & Sugiya, H. (2013). E2f1-deficient NOD/SCID mice have dry mouth due to a change of acinar/duct structure and the down-regulation of AQP5 in the salivary gland. *Pflugers Arch*. 465, 271–281. [CrossRef] [PubMed]

Sharma, R., Karunambigai, A., Gupta, S., & Arumugam, N. (2022). Evaluation of biologically active secondary metabolites isolated from the toothache plant *Acmella ciliata* (Asteraceae). *Advances in Traditional Medicine*, 22(4), 713–722. <https://doi.org/10.1007/s13596-021-00584-5>

Shaikh, R., Raj Singh, T. R., Garland, M. J., Woolfson, A. D., & Donnelly, R. F. (2011). Mucoadhesive drug delivery systems. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 3(1), 89–100. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76478>

Silveira, N., Saar, J., Santos, A. D. C., Barison, A., Sandjo, L. P., Kaiser, M., ... & Biavatti, M. W. (2016). A new alkamide with an endoperoxide structure from *Acmella ciliata* (Asteraceae) and its in vitro antiplasmodial activity. *Molecules*, 21(6), 765.

Singh, M., & Chaturvedi, R. (2012). Screening and quantification of an antiseptic alkylamide, spilanthol from in vitro cell and tissue cultures of *Spilanthes acmella* Murr. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 321-328.

Souder, W., & Sweeney, W. T. (1931). Is mercury poisonous in dental amalgam restorations? *Dent Cosmos*, 123, 1145-1152.

Tsibouklis, J., Middleton, A. M., Patel, N., & Pratten, J. (2013). Toward mucoadhesive hydrogel formulations for the management of xerostomia: The physicochemical, Biological, and Pharmacological Considerations. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 101(11), 3327–3338.

Ulloa, J. P., & Fredes, F. (2016). Manejo actual de la xerostomía. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 76(2), 243-248.

Veryser, L., Wynendaele, E., Taevernier, L., Verbeke, F., Joshib, T., Tatke, P., & De Spiegeleer, B. (2014). N-alkylamides: from plant to brain. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(6), 264-275.

Velopoulos, I., Dimopoulou, M., Chen, J., & Ritzoulis, C. (2024). Mucoadhesion and Mucins in Oral Processing: Their Role in Food Interaction, Texture, and Sensory Perception. *JOURNAL OF TEXTURE STUDIES*, 55(6), e70000. <https://doi.org/10.1111/jtxs.70000>

Vidal, C., Lopez-Polo, J., & Osorio, F. A. (2024). Physical properties of cellulose derivative-based edible films elaborated with liposomes encapsulating grape seed tannins. *Antioxidants*, 13(8), 989. <https://doi.org/10.3390/antiox13080989>

Voskoboynik, B., Babu, K., & Hack, J. B. (2011). Cevimeline (Evoxac®) overdose. *Journal of Medical Toxicology*, 7(1), 57-59.

Vu HT, Scarlett CJ, Vuong, QV. (2018). Compuestos fenólicos de la cáscara de plátano y sus usos potenciales: una revisión. *Revista de alimentos funcionales* 40: 238-248. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.006>

Walsh, L. (2008). Aspectos clínicos de biología salival para el clínico dental. *J Minim Interv Dent*, 1(1), 5-23.

Wang, D., Yuan, Z., Inoue, N., Cho, G., Shono, M., & Ishikawa, Y. Abnormal subcellular localization of AQP5 and downregulated AQP5 protein in parotid glands of streptozotocin-induced diabetic rats. (2011). *Biochim. Biophys.* 1810, 543–554. [CrossRef] [PubMed]

Wei Han, Lu, X., Ai, H., Wu, R., Wu, S., Cheng, Y., Yun, S., Chang, M., Cheng, F., Feng, C., & Cao, J. (2023). Rheological properties of the mixture of lentinan and saliva and its inhibitory effect on *Streptococcus mutans*. *International Journal of Food Properties*, 26(1), 1678–1697. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2225785>

Wiseman, L. R., & Faulds, D. (1995). Oral pilocarpine: a review of its pharmacological properties and clinical potential in xerostomia. *Drugs*, 49(1), 143–155.

Witsell, D. L., Stinnett, S., & Chambers, M. S. (2012). Effectiveness of cevimeline to improve oral health in patients with postradiation xerostomia. *Head & neck*, 34(8), 1136-1142.

14. ANEXOS

14.1 ANEXO I. Desarrollo y validación del método analítico para cuantificación de afinina en una formulación de saliva artificial (0.1 mg/mL).

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**“PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE
CUANTIFICACIÓN DE AFININA (0.1 mg/mL) EN UNA
FORMULACIÓN LIQUIDA ORAL POR HPLC”**

ALDO JIMÉNEZ JARAMILLO

MATRICULA: 2231801346

DICIEMBRE, 2024

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALITICOS	
Principio activo	Afinina
Tipo de método	Valoración
Método de cuantificación	CLAR
Código del protocolo	VM-001
Sustituye a	VM-000
No. Edición	001
Emisión	DIC-2024
Vigencia	NOV-2029

CUADRO DE FIRMAS		
Realizó	Revisó	Revisó
QFB. Aldo Jiménez Jaramillo		
Posición/Departamento	Posición/Departamento	Posición/Departamento
Fecha:	Fecha:	Fecha:

Revisó	Revisó	Autorizó
Nombre y firma	Nombre y firma	Nombre y firma
Jefe de aseguramiento de la calidad	Jefe de asuntos regulatorios	Responsable Sanitario
Fecha:	Fecha:	Fecha:

Índice

1. Antecedentes
2. Aplicaciones
3. Alcance
4. Objetivos
5. Responsabilidades
6. Equipos, materiales y reactivos
7. Preparación de soluciones de trabajo
8. Método analítico
9. Validación del método analítico
10. Anexos
11. Desviaciones
12. Bibliografía

Definiciones

- Afinina. Alcamida también conocida como spilanthol (N-isobutil 2E,6Z,8E decatrienamida).
- Aforar. Medir o ajustar con precisión el volumen de un líquido.
- Alícuota. Porción exacta o medida de una muestra o sustancia, especialmente cuando se trata de líquidos. Se toma con el objetivo de representar de manera precisa la composición o características de la muestra original.
- CLAR. Cromatografía líquida de alta resolución. Técnica analítica que se utiliza para separar, identificar y cuantificar componentes de una muestra líquida. Utiliza una fase estacionaria y una fase móvil líquida para lograr una separación más eficiente y una mayor resolución que la cromatografía líquida convencional.
- Desgasificar. Proceso de eliminar gases disueltos en un líquido.
- Filtrar. Proceso de separar sólidos insolubles de un líquido utilizando un filtro. Los filtros retienen las partículas sólidas, permitiendo que el líquido pase a través, resultando en una solución más clara y libre de partículas.
- Placebo. Sustancia que no tiene efectos farmacológicos específicos y se utiliza en ensayos clínicos o estudios experimentales como un control inerte. Contiene todos los excipientes de la forma farmacéutica exceptuando por el principio activo.
- Sonicar. Se refiere al uso de ultrasonidos o vibraciones de alta frecuencia para agitar, dispersar o mezclar sustancias.
- CV: coeficiente de variación
- DESV. STD o Desv. std: Desviación estándar
- STD o std: estándar

1. Antecedentes

La validación del protocolo analítico para la cuantificación de afinina es necesario para la determinación confiable en el desarrollo de un producto terminado. Para el desarrollo del método se realizó la búsqueda de las características fisicoquímicas de la afinina, los excipientes de la formulación, (tabla 1) y la revisión de métodos previamente utilizados, para la selección del método adecuado para su cuantificación en la formulación líquida oral mediante CLAR, en el anexo IX se puede encontrar el desarrollo del método analítico con más información al respecto.

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA AFININA	
Color	Color amarillo claro
Punto de fusión (°C)	23
Punto de ebullición (°C)	165
Espectro IR	Tiene los siguientes picos principales: ν_{max} (película) cm^{-1} : 3340, 3150, 3080, 3020, 1678, 1636, 1550, 1240, 1160, 987, 953 (Nakatani y Nagashima, 1992).
Peso molecular (g/mol)	221.34
Índice de refracción a 298°	1.5135
Absorción máxima UV	228 nm (Jacobson, 1957).
LogP	3.6
Solubilidad	Soluble en solventes orgánicos y aceites (acetonitrilo, etanol, metanol)
Apariencia	Líquido oleoso a temperatura ambiente
Estabilidad	Se recomienda almacenar en recipientes opacos y herméticos para protegerlo de la luz y en un lugar fresco y seco.

Excipientes en la formulación líquida oral	• Carboximetilcelulosa • Sorbitol • Cloruro de sodio • Cloruro de potasio • Fluoruro de sodio • Propilparabeno • Mentol • Glicerina
--	--

Tabla 1. Características fisicoquímicas de la afinina.

2. Aplicaciones

2.1 El protocolo de validación analítico se aplica únicamente para el producto terminado, es decir en la forma farmacéutica de saliva artificial en concentración de 0.1 mg/mL de afinina.

3. Alcance

3.1 Este protocolo aplica en la validación del método analítico para la cuantificación de afinina en una formulación de saliva artificial con afinina en concentración de 0.1 mg/mL, mediante CLAR en el laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

4. Objetivo

4.1 Realizar la validación de un método analítico destinado a la cuantificación de afinina en una formulación de saliva artificial (concentración de 0.1 mg/mL), mediante el empleo de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

5. Responsabilidades

5.1 Es Responsabilidad de los auxiliares de validaciones:

5.1.1 Elaborar los Protocolos de validación.

5.2 Es Responsabilidad del coordinador de validaciones:

5.2.1 Revisar los Protocolos y Reportes de validación.

5.3 Es Responsabilidad de los Químicos Analistas:

5.3.1 Elaborar los Reportes de validación.

5.3.2 Ejecutar el Protocolo de validación.

5.3.3 Realizar los registros correspondientes en las bitácoras de los equipos e instrumentos empleados en la validación.

5.3.4 Realizar la revisión e impresión de los resultados crudos (cromatogramas).

5.3.5 Realizar el tratamiento estadístico de cada parámetro de desempeño evaluado con los resultados obtenidos.

5.3.6 Comparar los resultados obtenidos de cada parámetro de desempeño con base al criterio de aceptación y dictaminar.

5.4 Es Responsabilidad del jefe de Control de Calidad:

5.4.1 La revisión de los Protocolos y Reportes de validación.

5.4.2 Proporcionar el personal, material y apoyo necesario durante la Validación.

6. Equipos, materiales y reactivos

6.1 Método. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

6.2 Equipos

6.3 Instrumentos

Descripción	Marca	Modelo
Balanza micro analítica Rango: 0 – 100 g Precisión: ± 0.01 mg	Ohaus	EP214C
Baño ultrasonido	Branson	Brasonic M2800
Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	JASCO	LC-4000
Detector UV/Vis	JASCO	MD-4010

6.4 Materiales

Descripción	Capacidad	Marca
Aquabuff Columna C 18	250 × 4.6 mm, 5µm	Pharmafiliates®
Matraces volumétricos	10 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL	Pyrex
Vasos precipitados	50 mL, 100 mL	Pyrex
Filtros de PVDF	0.45 µm	Durapore®
Pipetas volumétricas	1.0 mL, 5.0 mL y 10.0 mL	Pyrex
Micropipeta	10-100 µL 100-1000 µL	Biohit
Probetas	100 mL, 250 mL	Pyrex
Viales para HPLC	2 mL	Phenomenex

6.5 Reactivos

Nombre	Grado	Fabricante
Acetonitrilo	HPLC	J.T Baker
Agua	HPLC	J.T Baker

6.6 Estándar de Referencia

CARACTERÍSTICA	AFININA
Pureza	98.6%
Lote	00019300-23S
Fecha de fabricación	18/Jun/2024
Fecha de vencimiento	Nov/2028
Proveedor	Chromadex
Origen	USA
Análisis	3J04

7.0 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO

- ***Preparación de la fase móvil***

Preparar una mezcla de acetonitrilo y agua (65:35 %v/v), filtrar a través de una membrana de 0.45 µm, y desgasificar.

- ***Diluyente***

Usar fase móvil como diluyente.

Preparación de la solución placebo (SOP)

A partir de un placebo con los mismos excipientes presentes en la muestra, excepto la afinina. Se tomarán 2.0 mL del placebo con una pipeta volumétrica y se transferirán a un matraz volumétrico de 10.0 mL, agregar 5 mL de diluyente y agitar durante 5 minutos, llevar a volumen con fase móvil, filtrar con membrana de PVDF de 0.45 µm. Se desecha el primer mililitro, y el líquido restante se recogerá en un vial de muestra para HPLC.

Preparación de la solución stock de placebo cargado (0.1 mg/mL)

Pesar exactamente 1.0 mg de la sustancia de referencia afinina (Lote:00019300-23S) y transferir a un matraz volumétrico ámbar de 10.0 mL, agregar 5.0 mL de la solución placebo y sonicar durante 15 minutos, dejar a enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con el placebo.

Preparación de la solución placebo cargado con afinina 20 µg/mL (SOPc)

Transferir 2.0 mL de la solución stock de placebo cargado a un matraz volumétrico de 10.0 mL, agregar 5 mL de diluyente, sonicar durante 15 minutos y llevar a volumen con fase móvil, filtrar con membrana de PVDF de 0.45 µm. Se desecha el primer mililitro, y el líquido restante se recogerá en un vial de muestra para HPLC.

Preparación de la solución estándar de referencia A (SEA) (concentración final afinina 0.1 mg/mL)

Se preparará una solución estándar de afinina (Lote:00019300-23S) que contenga 0.1 mg/mL en acetonitrilo.

Pesar exactamente 1.0 mg de la sustancia de referencia afinina y transferir a un matraz volumétrico ámbar de 10.0 mL, agregar 5 mL de acetonitrilo y sonicar en un baño de ultrasonido durante 5 minutos, y dejar enfriar a temperatura ambiente, llevar a volumen con acetonitrilo.

Preparación de la solución estándar de referencia B (SEB) (concentración final afinina 20 µg/mL)

Transferir una alícuota de 2.0 mL de la solución **SEA** a un matraz volumétrico ámbar de 10.0 mL, llevar a volumen con fase móvil y mezclar. Filtrar a través de membrana

PVDF 0.45 µm, descartar el primer mililitro, colocar en un vial de muestra para HPLC.

Preparación de la solución de adecuabilidad (concentración final afinina 10 µg/mL)

Transferir una alícuota de 1.0 mL de la solución **SEA** a un matraz volumétrico ámbar de 10.0 mL, llevar a volumen con fase móvil y mezclar. Filtrar a través de membrana PVDF 0.45 µm, descartar el primer mililitro, colocar en un vial de muestra para HPLC.

Preparación de la solución muestra (concentración final afinina 20 µg/mL)

Transferir con una pipeta volumétrica 2.0 mL de la formulación con afinina (0.1 mg/mL) a un matraz volumétrico de 10.0 mL, agregar 5 mL de fase móvil y sonicar en baño de ultrasonido durante 15 minutos, llevar a volumen con fase móvil. Se desecha el primer mililitro, y el líquido restante se recogerá en un vial de muestra para HPLC.

Condiciones de operación

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	
Columna	Columna C 18 250 × 4.6 mm, 5µm
Temperatura de la columna	25°C
Fase móvil	Agua: acetonitrilo (35:65 % v/v)
Velocidad de flujo	1.0 mL/ min
Volumen de inyección	20 µL
Temperatura compartimento muestra	25°C
Detector	UV/Vis
Longitud de onda del detector	228 nm

8.0 MÉTODO ANALÍTICO

Procedimiento. Inyectar al por sextuplicado, volúmenes iguales (20 µL) de la solución **de adecuabilidad** y registrar los picos respuesta. La eficiencia de la columna determinada para el pico de afinina no es menor de 1,000 platos teóricos, el coeficiente de variación (CV) para los picos de afinina no es mayor de 2.0 % para el área y el tiempo de retención.

Una vez ajustados los parámetros de operación, inyectar al cromatógrafo, por separado, volúmenes iguales (20 µL) de dos preparaciones de referencia **SEB** por triplicado y la preparación de la muestra por duplicado (tabla 2). Obtener sus correspondientes cromatogramas y calcular el área bajo los picos.

Muestra	Numero de viales	Numero de inyección
Blanco (diluyente)	1	2
Solución adecuabilidad	1	6
Solución de referencia SEB 1		3
Solución de referencia SEB 2	1	3
Solución muestra	1	2

Tabla 2. Secuencia de inyección para la valoración de afinina

Calcular el porcentaje de valoración de afinina en la muestra, por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ afinina: } \frac{Amp}{Ast} \times \frac{Wstd \text{ (mg)}}{10 \text{ mL}} \times \frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times \frac{10 \text{ mL}}{0.2 \text{ mg}} \times \frac{98.6}{100} \times 100\% =$$

Amp: área bajo la curva de la muestra problema

Ast: área bajo la curva de la solución de referencia

Wstd: peso de la afinina estándar de referencia expresado en mg

Pureza: pureza o potencia del estándar de referencia

Criterio de aceptación

Valoración
Contiene entre el 90-110% de la cantidad de afinina declarada en la etiqueta.

9.0 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en función de los parámetros analíticos. Los parámetros considerados se basaron en lo descrito por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), la guía para la validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A. C. y la ICH Q2 (R2) Validation of analytical procedures, tomando en cuenta el tipo de método analítico los siguientes parámetros de desempeño son necesarios para su validación. Las fórmulas y procedimientos para los cálculos se encuentran en los Anexos II-VIII.

- **Adecuabilidad del sistema**

Se preparará una solución de adecuabilidad de afinina (Lote:00019300-23S) que contenga 10 µg/mL. Siguiendo lo indicado en **Preparación de la solución de adecuabilidad (concentración final afinina 10 µg/mL)**. Filtrar a través de membrana PVDF 0.45 µm, descartar el primer mililitro y colocar en una vial para HPLC. Se realizarán seis inyecciones de 20 µL de la solución de adecuabilidad. Calcular el coeficiente de variación (CV) de la respuesta analítica.

Muestra	Numero de viales	Numero de inyección
Blanco (diluyente)	1	2
Sol. Adecuabilidad	1	6

Tabla 3. Secuencia de inyección para la adecuabilidad del sistema

Criterio de aceptación:

Adecuabilidad del sistema
CV: < 1.5% para la respuesta analítica y el tiempo de retención de afinina. Numero de platos teóricos: No menor de 5000 Factor de simetría: < 2.0

- **Precisión del sistema**

Metodología

Se preparará una solución de referencia de afinina (Lote:00019300-23S) que contenga 0.1 mg/mL. Siguiendo lo indicado en **Preparación de la solución estándar de referencia A (SEA) (concentración final afinina 0.1 mg/mL)**. Se

tomarán 6 alícuotas de 2.0 mL de la solución estándar de referencia A (SEA) y transferir individualmente a un matraz volumétrico de 10.0 mL, llevar a volumen con acetonitrilo. Filtrar a través de membrana PVDF 0.45 µm, descartar el primer mililitro y colocar en una vial para HPLC. Se realizarán inyecciones independientes de cada solución. Calcular el coeficiente de variación (CV) de la respuesta analítica.

Muestra	Numero de viales	Numero de inyección
Blanco (diluyente)	1	2
Solución precisión del sistema 1	1	1
Solución precisión del sistema 2	1	1
Solución precisión del sistema 3	1	1
Solución precisión del sistema 4	1	1
Solución precisión del sistema 5	1	1
Solución precisión del sistema 6	1	1

Tabla 4. Secuencia de inyecciones y muestras en la determinación de la precisión del sistema

Criterio de aceptación:

Precisión del sistema
CV: < 1.5% para la respuesta analítica.

• Linealidad del sistema

Realizar tres curvas de calibración independientes. Las soluciones se prepararán a partir de una solución stock descrita en “**Preparación de la solución estándar de referencia A (SEA) (concentración final afinina 0.1 mg/mL)**”. En la tabla 5 se describe las alícuotas para la preparación de cada concentración, las soluciones finales deben filtrarse a través de membrana PVDF 0.45 µm, desechar el primer mililitro y colocar en viales de HPLC.

Concentración (µg/mL)	Concentración (%)	Volumen de SEA	Volumen final acetonitrilo (mL)
16	80%	1600 µL	10.0
18	90%	1800 µL	10.0
20	100%	2000 µL	10.0
22	110%	2200 µL	10.0

24	120%	2400 µL	10.0
----	------	---------	------

Tabla 5. Curva de calibración para la determinación de la linealidad del sistema

Determinar el coeficiente de determinación (r), el coeficiente de correlación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente.

Nota: Se puede utilizar la solución **la solución estándar de referencia A (SEA) (concentración final afinina 0.1 mg/mL)** preparada en la precisión del sistema para la preparación de las alícuotas.

Criterio de aceptación:

Linealidad del sistema
Coeficiente de determinación(r^2): >0.98 Intervalo de confianza para la pendiente: no debe incluir el cero Coeficiente de regresión (r): > 0.99

- **Especificidad**

Metodología

Se analizará por triplicado, un placebo del producto, un placebo cargado con afinina y la solución de estándar de referencia B (SEB) preparada siguiendo lo descrito en **Preparación de la solución estándar de referencia B (SEB) (concentración final afinina 20 µg/mL)**. Los placebos se prepararán según lo descrito en **Preparación de la solución placebo (SOP) y Preparación de la solución placebo cargado con afinina 20 µg/mL (SOPc)** respectivamente. Las soluciones deben ser filtradas a través de membrana PVDF 0.45 µm, descartar el primer mililitro y colocar en una vial para HPLC. Se evaluará la respuesta al método para las inyecciones descritas en la tabla 6 bajo las mismas condiciones.

Muestra	Numero de viales	Numero de inyección
Blanco (diluyente)	1	2
Placebo	1	3
Placebo cargado	1	3
SEB	1	3

Tabla 6. Secuencia de inyecciones y numero de viales para la determinación de la especificidad.

Criterio de aceptación:

Especificidad
La respuesta del método debe ser únicamente debido al analito.

- **Selectividad**

Metodología

Se prepararán soluciones por separado como indica la **Preparación de la solución placebo (SOP)**, **Preparación de la solución estándar de referencia B (SEB)**, y **Preparación de la solución muestra (concentración final afinina 20 µg/mL)**, cada solución será sometida a luz UV durante 4 h y serán calentadas a 60°C durante 1 h. Las soluciones deben ser filtradas a través de membrana PVDF 0.45 µm, descartar el primer mililitro y colocar en una vial para HPLC. Se inyectará la solución de referencia **SEB**, la solución placebo y la muestra. El tiempo de corrida debe ser 3 veces el tiempo de retención de la afinina. Serán analizadas las respuestas analíticas de cada solución. Reportar cromatogramas y espectrogramas.

Muestra	Numero de viales	Numero de inyección
Blanco (diluyente)	1	1
SEB	1	2
SEB sometida a luz UV y temperatura	1	2
Placebo sometida a luz UV y temperatura	1	2
Muestra sometida a luz UV y temperatura	1	3

Tabla 7. Inyecciones y numero de viales para la determinación de la selectividad

Nota: Se puede utilizar la solución **la solución placebo (SOP)** preparada en la especificidad para el análisis de selectividad.

Criterio de aceptación:

Selectividad
La respuesta del método debe ser únicamente debido al analito.

- **Exactitud del método**

Metodología

A partir de la **Preparación de la solución stock de placebo cargado (0.1 mg/mL)**, se tomarán 3 alícuotas de 1600 μ L, 2000 μ L y 2400 μ L, transferirlas individualmente a matraces de 10 mL, llevar a volumen con diluyente, concentraciones del 80, 100 y 120% respectivamente. Preparar dos soluciones independientes de referencia según se indica en **Preparación de la solución estándar de referencia B (SEB) (concentración final afinina 20 μ g/mL)**. Filtrar las soluciones a través de membrana PVDF 0.45 μ m, descartar el primer mililitro y colocar en un vial para HPLC. Se realizarán inyecciones independientes de la solución de referencia 1 y la solución de referencia 2 por triplicado, y las soluciones de placebo cargado por duplicado. Calcular el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro.

Muestra	Numero de viales	Numero de inyección
Blanco (diluyente)	1	2
Sol. Referencia SEB 1	1	3
Sol. Referencia SEB 2	1	3
Placebo cargado 80%	1	2
Placebo cargado 100%	1	2
Placebo cargado 120%	1	2

Tabla 8. Inyecciones y numero de viales para la determinación de la exactitud del método.

Criterio de aceptación:

Exactitud	
Porcentaje de recobro:	El promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 99.0 – 101.0% El CV del porcentaje de recobro: no debe ser mayor de 1.5%.

- **Linealidad del método**

Metodología

Realizar tres curvas de calibración independientes. Las soluciones se prepararán a según lo descrito en **Preparación de la solución stock de placebo cargado (0.1 mg/mL)**. En la tabla 9 se describen los niveles y las alícuotas para la preparación de cada solución para la curva de calibración. Las soluciones finales deben filtrarse a través de membrana PVDF 0.45 µm, desechar el primer mililitro y colocar en viales de HPLC. Calcular el coeficiente de determinación, el intervalo de confianza de la pendiente y de la ordenada al origen, además del coeficiente de variación de la regresión.

Concentración (µg/mL)	Concentración (%)	Volumen de Stock placebo cargado	Volumen final acetonitrilo (mL)
16	80%	1600 µL	10.0
18	90%	1800 µL	10.0
20	100%	2000 µL	10.0
22	110%	2200 µL	10.0
24	120%	2400 µL	10.0

Tabla 9. Niveles y concentraciones para la curva de calibración en la determinación de la linealidad del método.

Criterio de aceptación:

Linealidad del método	
Cantidad adicionada vs cantidad recuperada:	El coeficiente de determinación debe ser: >0.99 El intervalo de confianza para la pendiente debe incluir la unidad. El intervalo de confianza para la ordenada al origen debe incluir el cero.
Porcentaje de recobro:	El IC debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 99.0% - 101.0% El CV del porcentaje de recobro: no debe ser mayor de 1.5%.

- **Precisión del método**

Preparar seis soluciones como se indica en **Preparación de la solución muestra (concentración final afinina 20 µg/mL)** y una solución de referencia según lo indicado en **Preparación de la solución estándar de referencia B (SEB) (concentración final afinina 20 µg/mL)**. Analizar la respuesta analítica y calcular el coeficiente de variación, en la tabla 10 se describe la secuencia de inyección para determinar la precisión del método.

Muestra	Numero de viales	Numero de inyección
Blanco (diluyente)	1	2
SEB	1	6
Sol. muestra 1	1	2
Sol. muestra 2	1	2
Sol. muestra 3	1	2
Sol. muestra 4	1	2
Sol. muestra 5	1	2
Sol. muestra 6	1	2

Tabla 10. Inyecciones y numero de viales para determinar la precisión del método.

Criterio de aceptación:

Precisión del método
CV: < 1.5% para métodos cromatográficos y volumétricos.

- **Precisión intermedia**

Preparar tres soluciones como se indica en **Preparación de la solución muestra (concentración final afinina 20 µg/mL)** y dos soluciones de referencia según lo indicado en **Preparación de la solución estándar de referencia B (SEB) (concentración final afinina 20 µg/mL)**. El análisis debe ser realizado por dos analistas en dos días distintos, utilizando los mismos instrumentos, equipos y sustancias de referencia. Calcular el coeficiente de variación de los resultados obtenidos.

Muestra	Numero de viales	Numero de inyección
Blanco (diluyente)	1	2
Sol. Estándar Ref (SEB) 1	1	3
Sol. Estándar Ref (SEB) 2	1	3
Sol. muestra 1	1	2
Sol. muestra 2	1	2
Sol. muestra 3	1	2

Tabla 11. Inyecciones y numero de viales para determinar la precisión intermedia.

Criterio de aceptación:

Precisión intermedia
CV: < 2.0% para métodos cromatográficos y volumétricos.

- **Estabilidad de la muestra**

Preparar 8 muestras como se indica en la **Preparación de la solución muestra (concentración final afinina 20 µg/mL)**, y fraccionar como se indica en la tabla 12. Se analizarán las muestras al inicio de la preparación, a las 24 h y 48 h. Se debe preparar una solución de referencia en cada tiempo de almacenaje, siguiendo lo indicado en **Preparación de la solución estándar de referencia B (SEB) (concentración final afinina 20 µg/mL)**. Analizar la respuesta analítica y reportar el contenido de cada muestra en las diferentes condiciones de almacenaje en los tiempos establecidos.

Muestra	Numero de muestras	Condición de almacenaje
Sol. muestra 1	2	(inicio) Después de la preparación
Sol. muestra 2	2	Temperatura ambiente y luz
Sol. muestra 3	2	Temperatura ambiente y oscuridad
Sol. muestra 4	2	Refrigeración (4 – 8°C) y oscuridad

Tabla 12. Fraccionamiento y condiciones de almacenaje de las muestras

Criterio de aceptación:

Estabilidad de la muestra
Los resultados no deben variar significativamente. La diferencia (DI): debe ser menor al 2.0%

10. DESVIACIONES

Registrar todas las modificaciones efectuadas al Protocolo de validación de métodos analíticos es un requisito esencial. En situaciones donde se presente una desviación, adjuntar el documento correspondiente a la documentación final del Reporte de validación de métodos analíticos.

11. ANEXOS

11.1 ANEXO I. REPORTE DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

- Adecuabilidad del sistema**

Se preparo una solución de adecuabilidad de afinina (Lote:00019300-23S) que contenía 10 µg/mL. Siguiendo lo indicado en **Preparación de la solución de adecuabilidad (concentración final afinina 10 µg/mL)**. La solución se filtró través de membrana PVDF 0.45 µm, se descartó el primer mililitro y se colocó en un vial para HPLC. Se realizaron seis inyecciones de 20 µL de la solución de adecuabilidad y se calculó el coeficiente de variación para la respuesta analítica y el tiempo de retención de la afinina. En el anexo X se pueden observar los cromatogramas correspondientes a la adecuabilidad del sistema.

ADECUABILIDAD				
INYECCION	AREA	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	PLATOS TEORICOS	FACTOR DE SIMETRIA
1	185406	6.77	15671	1.08
2	186041	6.77	15808	1.07
3	185112	6.78	16212	1.07
4	185406	6.77	15680	1.08
5	186456	6.77	15783	1.07
6	187166	6.77	16130	1.08
PROMEDIO	185931	6.77	15881	1.08
DESV. STD	779.10	0.00	232.81	0.01
C.V	0.42	0.04	1.47	0.51

Criterio de aceptación:

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Coeficiente de variación (CV) Respuesta analítica	Menor a 1.5%	0.42
Coeficiente de variación (CV) Tiempo de Retención	Menor a 1.5%	0.04
Factor de simetría	Menor o Igual a 2.0	1.08
Platos teóricos	No menor a 5000	15881

El sistema cumple con los criterios establecidos y demuestra ser confiable y repetible al mantener un CV menor al 1.5% de la respuesta analítica y el tiempo de retención.

- **Precisión del sistema**

Metodología

Se preparó una solución de referencia de afinina (Lote:00019300-23S) que contenía 0.1 mg/mL. Siguiendo lo indicado en **Preparación de la solución estándar de referencia A (SEA) (concentración final afinina 0.1 mg/mL)**. Se tomaron 6 alícuotas de 2.0 mL de la solución estándar de referencia A (SEA) y se transfirieron individualmente a un matraz volumétrico de 10.0 mL, se llevaron a volumen con diluyente. Las soluciones se filtraron a través de membrana PVDF 0.45 µm, se descartó el primer mililitro y se colocaron en viales para HPLC. Se realizaron inyecciones independientes de cada solución. Se calculó el coeficiente de variación (CV) de la respuesta analítica.

INYECCION	AREA	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
1	344153	6.737
2	341312	6.737
3	341080	6.737
4	340763	6.74
5	350451	6.74
6	343772	6.743
PROMEDIO	343588.5	6.739
DESV. STD	3658.00	0.00
C.V	1.06	0.04

Criterio de aceptación:

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Coeficiente de variación (CV) Respuesta analítica	Menor a 1.5 %	0.04

El sistema cumple con los criterios establecidos para la precisión del sistema, al mantener un CV menor al 1.5%.

- **Linealidad del sistema**

Se realizaron tres curvas de calibración independientes. Las soluciones se prepararon a partir de una solución stock descrita en “**Preparación de la solución estándar de referencia A (SEA) (concentración final afinina 0.1 mg/mL)**”. Se utilizaron los niveles 80%,90%,100%,110% y 120% para la curva de calibración. Las soluciones finales se filtraron a través de membrana PVDF 0.45 µm, se descartó primer mililitro y se colocó en viales de HPLC. Se determinó el coeficiente de

determinación (r), el coeficiente de correlación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente de las tres curvas.

CURVA	NIVEL	concentracion ($\mu\text{g/mL}$)	AREA mUA	PROMEDIO AREA	DESV. STD AREA	C.V AREA	promedio Nivel	DE Nivel	CV Nivel
A	80	16.00	260816 262824	261820	1420	0.54	262000	1477.38	0.56
B	80	16.00	263189 261234	262212	1382	0.53			
C	80	16.00	260816 263121	261969	1630	0.62			
A	90	18.00	302739 305730	304235	2115	0.70	302304	1545.03	0.51
B	90	18.00	299157 300730	299944	1112	0.37			
C	90	18.00	301739 303730	302735	1408	0.47			
A	100	20.00	356951 358075	357513	795	0.22	348526	3197.77	0.92
B	100	20.00	340763 350133	345448	6626	1.92			
C	100	20.00	344153 341080	342617	2173	0.63			
A	110	22.00	377864 378145	378005	199	0.05	380641	919.71	0.24
B	110	22.00	377864 381045	379455	2249	0.59			
C	110	22.00	384685 384245	384465	311	0.08			
A	120	24.00	404170 406720	405445	1803	0.44	415434	1978.96	0.48
B	120	24.00	427356 423763	425560	2541	0.60			
C	120	24.00	414170 416423	415297	1593	0.38			

Criterio de aceptación:

CRITERIO POR EVALUAR	ESPECIFICACIÓN	RESULTADOS
Coeficiente de determinación (r^2)	Mayor o igual a 0.99	0.99
Coeficiente de regresión (r)	Mayor o igual a 0.98	0.99

Intervalo de confianza para la pendiente (IC b ₁)	No debe incluir el cero	IC(b ₁) (inferior) 0.0023		IC(b ₁) (superior) 0.0029
Coeficiente de variación por nivel	Menor a 1.5 %	Menor a 1.0%		

La linealidad del sistema cumple con los criterios establecidos y mantener un CV menor al 1.5%. La curva correspondiente a la linealidad del sistema se encuentra en el anexo X.

- **Especificidad**

Metodología

Se analizaron por triplicado, un placebo del producto, un placebo cargado con afinina y la solución de estándar de referencia B (SEB). Los placebos se prepararon según lo descrito en ***Preparación de la solución placebo (SOP) y Preparación de la solución placebo cargado con afinina 0.1 mg/mL (SOPc)*** respectivamente. Se evaluó la respuesta al método para las inyecciones descritas en la tabla 6 bajo las mismas condiciones. En el anexo X se pueden observar los cromatogramas correspondientes a las inyecciones realizadas.

Criterio de aceptación:

CRITERIO POR EVALUAR	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Respuesta del método	La respuesta del método debe ser únicamente por la afinina	La respuesta del método se debe únicamente por la afinina en el tiempo de retención y longitud de onda establecidos.

El método cumplió con lo establecido, ya que se demuestra que la respuesta del método se debe únicamente a la afinina en el tiempo de retención y condiciones previamente establecidas, los cromatogramas correspondientes se pueden observar en el anexo X.

- **Selectividad**

Metodología

Se prepararon soluciones por separado como indica la ***Preparación de la solución placebo (SOP), Preparación de la solución estándar de referencia B (SEB) (concentración final afinina 20 µg/mL)*** y ***Preparación de la solución muestra (concentración final afinina 20 µg/mL)***, cada solución se sometió a luz UV durante 4 h y posteriormente se calentaron a 60°C durante 1 h. Las soluciones se filtraron a

través de membrana PVDF 0.45 µm, se descartó el primer mililitro y colocar en una vial para HPLC. Se inyectó la solución de referencia **SEB**, la solución placebo y la muestra. El tiempo de corrida fue 3 veces el tiempo de retención de la afinina. Se analizaron las respuestas analíticas de cada solución y se reportaron los cromatogramas de las inyecciones. En el anexo X se pueden observar los cromatogramas correspondientes a las inyecciones realizadas.

Criterio de aceptación:

CRITERIO POR EVALUAR	ESPECIFICACION	RESULTADOS
Respuesta del método	La respuesta del método debe ser únicamente por la afinina	La respuesta del método se debe únicamente al analito en el tiempo de retención y longitud de onda definidas.

El método cumplió con lo establecido, ya que se demuestra que la respuesta del método se debe únicamente a la afinina en el tiempo de retención y condiciones previamente establecidas, los cromatogramas correspondientes se pueden observar en el anexo X.

- **Exactitud del método**

Metodología

Se prepararán dos soluciones de referencia como indica ***Preparación de la solución estándar de referencia B (SEB) (concentración final afinina 20 µg/mL) y una solución stock de placebo cargado (0.1 mg/mL)***. A partir de la solución stock de placebo cargado (0.1 mg/mL), se prepararon alícuotas de 1600, 1800 y 2000 µL, correspondientes a concentraciones de 80, 100 y 120% respectivamente, se transfirieron individualmente a matraces de 10 mL, y se llevó a volumen con diluyente. Las soluciones se filtraron a través de membrana PVDF 0.45 µm, se descartó el primer mililitro y se colocaron viales para HPLC. Se realizaron inyecciones independientes de cada solución por duplicado y se calculó el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro.

	Peso std 1=	1.00 mg		Peso std 2=	1.00 mg
	Pureza	98.6 %		Pureza	98.6 %
	Conc. STD 1=	19.72000 µg/mL		Conc.STD 2=	19.72000 µg/mL
	STD 1			STD 2	
	AREAS			AREAS	
	370482			370096	
	369314			370648	
	370249			371262	
Promedio	370015			370669	
Factor	18787			18768	
	18728			18796	
	18775			18827	
FACTOR PROMEDIO		18780			
DESV. STD		32.75080786			
C.V		0.17 %			

Criterio de aceptación:

CRITERIO POR EVALUAR	ESPECIFICACIÓN	RESULTADOS		
Intervalo de confianza	Promedio aritmético del % obtenido 99.0% - 101.0%	IC(b ₁) (inferior) 99.44%	Promedio % obtenido 100.21	IC(b ₁) (superior) 100.99%
Coefficiente de variación del porcentaje de recobro	Menor a 1.5%	1.19		

El método demostró ser exacto, al cumplir con el criterio establecido y mantener un CV menor al 1.5% y el promedio aritmético dentro del intervalo de confianza.

- Linealidad del método**

Metodología

Se realizaron tres curvas de calibración independientes. Las soluciones se prepararon a según lo descrito en **Preparación de la solución stock de placebo cargado (0.1 mg/mL)**. Se utilizaron los niveles 80%,90%,100%,110% y 120% para la curva de calibración. Las soluciones finales se filtraron a través de membrana PVDF 0.45 µm, se descartó primer mililitro y se colocó en viales de HPLC. Se calculó el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza de la pendiente (IC β_1) y de la ordenada al origen (IC β_0), además del coeficiente de variación de la regresión.

	Peso std 1=	1.00 mg	Peso std 2=	1.00 mg
	Ensayo =	99.8 %	Ensayo=	99.8 %
	Conc. STD 1=	19.72000 µg/mL	Conc.STD 2=	19.72000 µg/mL
	STD 1		STD 2	
	AREAS		AREAS	
	370482		370096	
	369314		370648	
	370249		371262	
FACTOR	18787		18768	
	18728		18796	
	18775		18827	
FACTOR PROMEDIO	18780			
DESV. STD	32.75			
C.V	0.17	%		

NIVEL %	areas	promedio de areas	desv. Std	C.V de las inyecciones	µg adicionados	µg recuperados	% Obtenido
80	304245 303201	303723	738.2195	0.2431	16.00	16.17	101.079
80	309013 303233	306123	4087.0772	1.3351	16.00	16.30	101.878
80	303510 307322	305416	2695.4910	0.8826	16.00	16.26	101.643
90	335747 336711	336229	681.6509	0.2027	18.00	17.90	99.464
90	337091 335378	336235	1211.2739	0.3602	18.00	17.90	99.466
90	337244 339545	338395	1627.0527	0.4808	18.00	18.02	100.105
100	377556 378611	378084	745.9977	0.1973	20.00	20.13	100.661
100	370431 371523	370977	772.1606	0.2081	20.00	19.75	98.769
100	375599 378124	376862	1785.4446	0.4738	20.00	20.07	100.336
110	409403 407555	408479	1306.7333	0.3199	22.00	21.75	98.867
110	409761 409635	409698	89.0955	0.0217	22.00	21.82	99.162
110	407112 408905	408009	1267.8425	0.3107	22.00	21.73	98.753
120	445113 447893	446503	1965.7569	0.4403	24.00	23.78	99.064
120	448089 443539	445814	3217.3359	0.7217	24.00	23.74	98.911
120	447964 449633	448799	1180.1612	0.2630	24.00	23.90	99.574
						Promedio	99.85
						DE	1.05
						CV	1.05

Criterio de aceptación:

CRITERIO POR EVALUAR	ESPECIFICACIÓN	RESULTADOS		
Coeficiente de determinación (r^2)	Mayor o igual a 0.98	0.99		
Coeficiente de regresión (r)	Mayor o igual a 0.99	0.99		
Intervalo de confianza para la pendiente ($IC\beta_1$)	No debe incluir el cero	IC (inferior) 0.89	-	IC (superior) 0.99
Intervalo de confianza para la ordenada ($IC\beta_0$)	Debe incluir el cero	IC (inferior) -0.03	-	IC (superior) 2.05
Coeficiente de variación por nivel	Menor a 1.5%	0.17		
Intervalo de confianza para la media	Debe incluir el promedio aritmético del porcentaje de recobro	100.74		
Promedio del porcentaje de recobro	No menor al 99.0%-101.0%	99.85%		

El método demostró ser lineal y cumple con los criterios establecidos para la linealidad del método, la curva de calibración correspondiente a la linealidad del método se encuentra en el anexo X.

- **Precisión del método**

Se prepararon seis soluciones como se indica en ***Preparación de la solución muestra (concentración final afinina 20 µg/mL)*** y dos soluciones de referencia según lo indicado en ***Preparación de la solución estándar de referencia B (SEB) (concentración final afinina 20 µg/mL)***. Las soluciones finales se filtraron a través de membrana PVDF 0.45 µm, se desechó el primer mililitro y se colocaron en viales de HPLC. Se analizó la respuesta analítica y se calculó el coeficiente de variación.

	Peso std 1=	1.00 mg		Peso std 2=	1.00 mg
	Pureza	98.6 %		Pureza	98.6 %
	Conc. STD 1=	19.72000 µg/mL		Conc.STD 2=	19.72000 µg/mL
	STD 1			STD 2	
	AREAS			AREAS	
	370482			370096	
	369314			370648	
	370249			371262	
Promedio	370015			370669	
Factor	18787			18768	
	18728			18796	
	18775			18827	
FACTOR PROMEDIO	18780				
DESV. STD	32.75080786				
C.V	0.17 %				

Criterio de aceptación:

CRITERIO POR EVALUAR	ESPECIFICACIÓN	RESULTADOS
Coefficiente de variación	Menor a 1.5%	0.39

Analista 1 Día 2

MUESTRA	AREAS	concentración µg	Recobro %	promedio %	PROMEDIO DESV. STD. CV%	
1	369110	20.00	19.71	98.54		
2	368621	20.00	19.68	98.41		
3	368703	20.00	19.69	98.44		
4	371703	20.00	19.85	99.24		
5	371052	20.00	19.81	99.06		
6	369317	20.00	19.72	98.60		
					PROMEDIO	98.72 %
					DESV. STD.	0.35 %
					CV%	0.35 %

El método cumple con el criterio establecido para la precisión del sistema al mantener un CV menor al 1.5%.

- **Precisión intermedia**

Se prepararon tres soluciones independientes como se indica en **Preparación de la solución muestra (concentración final afinina 20 µg/mL)** y dos soluciones de referencia independientes según lo indicado en **Preparación de la solución estándar de referencia B (SEB) (concentración final afinina 20 µg/mL)**. El análisis se realizó por dos analistas en dos días distintos, los mismos instrumentos, equipos y sustancias de referencia. Se calculó el coeficiente de variación de los resultados obtenidos.

Analista 1 Día 1

MUESTRA	AREAS	concentración µg	Recobro %	promedio %	PROMEDIO DESV. STD. CV%	
1	362507	20.00	19.74	98.71		
2	361560	20.00	19.69	98.45		
3	360583	20.00	19.64	98.19		
4	361477	20.00	19.69	98.43		
5	363966	20.00	19.82	99.11		
6	361693	20.00	19.70	98.49		
					PROMEDIO	98.56 %
					DESV. STD.	0.31 %
					CV%	0.32 %

Analista 2 Día 1

MUESTRA	AREAS	concentración µg	Recobro %	promedio %
1	374324	20.00	19.67	98.35
2	374795	20.00	19.70	98.48
3	373800	20.00	19.64	98.22
4	374222	20.00	19.67	98.33
5	374616	20.00	19.69	98.43
6	373519	20.00	19.63	98.14

PROMEDIO 98.33 %
DESV. STD. 0.1268707 %
CV% 0.13 %

Analista 2 Día 2

MUESTRA	AREAS	concentración µg	Recobro %	promedio %
1	384120	20.00	19.67	98.37
2	385883	20.00	19.76	98.82
3	385738	20.00	19.76	98.78
4	387540	20.00	19.85	99.25
5	385233	20.00	19.73	98.66
6	385150	20.00	19.73	98.63

PROMEDIO 98.75 %
DESV. STD. 0.29 %
CV% 0.29 %

Criterio de aceptación:

CRITERIO POR EVALUAR	ESPECIFICACIÓN	RESULTADOS
Coeficiente de variación	Menor a 1.5%	0.31

El método demostró ser preciso y cumple con los criterios establecidos para la precisión intermedia, el coeficiente de variación fue menor al 1.5 %.

- Estabilidad de la muestra**

Se prepararon 8 muestras como se indica en la **Preparación de la solución muestra (concentración final afinina 20 µg/mL)**, y se fraccionaron como se indica en la tabla 12. Se analizaron las muestras al inicio de la preparación, a las 24 h y 48 h. Se preparó una solución de referencia en cada tiempo de almacenaje, siguiendo

lo indicado en **Preparación de la solución estándar de referencia B (SEB) (concentración final afinina 20 µg/mL)**. Se inyectó cada muestra en las diferentes condiciones de almacenaje a los diferentes tiempos establecidos y se calculó el contenido de cada muestra.

Inicio							
Muestra	Numero de viales	Número de inyecciones	AREA	PROMEDIO AREA	DESV. EST	CV	PROMEDIO (%)
			(mUA)			AREA	
SEB	1	6	370482	370519	694.91	0.19	-
			369314				
			370249				
			371313				
			370880				
			370876				
Sol. Muestra T° ambiente y luz	2	2	369034	370247	1714.73	0.46	98.53
			371459				
Sol. MuestraT° ambiente y obscuridad	2	2	370164	370810	912.87	0.25	98.68
			371455				
Sol. Muestra Refrigeración (4-6°C) y obscuridad	2	2	370142	371027	1250.87	0.34	98.74
			371911				
24 HORAS							
Muestra	Numero de viales	Número de inyecciones	AREA	PROMEDIO AREA	DESV. EST	CV	PROMEDIO (%)
			(mUA)			AREA	
SEB	1	6	370148	371166	903.25	0.24	-
			371047				
			372325				
			372148				
			370991				
			370335				

Sol. Muestra T° ambiente y luz	2	2	371344	370191	1630.59	0.44	98.34
			369038				
Sol. MuestraT° ambiente y oscuridad	2	2	373093	371728	1930.40	0.52	98.75
			370363				
Sol. Muestra Refrigeración (4-6°C) y oscuridad	2	2	373139	372416	1022.48	0.27	98.93
			371693				
48 HORAS							
Muestra	Numero de viales	Número de inyecciones	AREA	PROMEDIO AREA	DESV. EST	CV	PROMEDIO (%)
			(mUA)			AREA	
SEB	1	6	370879	370394	998.43	0.27	-
			370959				
			368517				
			370096				
			370648				
			371262				
Sol. Muestra T° ambiente y luz	2	2	370357	370473	164.05	0.04	98.62
			370589				
Sol. MuestraT° ambiente y oscuridad	2	2	371505	371165	480.83	0.13	98.81
			370825				
Sol. Muestra Refrigeración (4-6°C) y oscuridad	2	2	371803	371258	771.45	0.21	98.83
			370712				

Criterio de aceptación:

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Diferencia absoluta (DI)	Menor a 2.0 %	0.34

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que la muestra permanece estable en las tres condiciones analizadas y en el periodo establecido de 48 horas. No existe una diferencia absoluta mayor al 2.0%.

11.2 ANEXO II. FORMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA LA PRECISION DEL SISTEMA.

Media aritmética:

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

Coeficiente de variación:

$$CV = \left(\frac{s}{\bar{y}} \right) \times 100$$

Donde:

$\bar{Y}$ = media aritmética

s= desviación estándar

y= medición individual

n= número total de mediciones

El procedimiento para el cálculo de los parámetros en la precisión del sistema se encuentra descrito en la figura 1.

B) PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO.

1) Tabular los resultados:

PROPIEDAD MEDIDA (ABSORBANCIA)
DE LA SOLUCIÓN DE REFERENCIA
(y)

1.0520
1.0462
1.0566
1.0568
1.0554
1.0498

2) Calcular Σy , Σy^2 y determinar n.

$$\Sigma y = 1.0520 + 1.0462 + \dots + 1.0498 = 6.3168$$

$$\Sigma y^2 = 1.0520^2 + 1.0462^2 + \dots + 1.0498^2 = 6.650417$$

$$n = 6$$

3) Calcular $\bar{y}$ y S:

$$\bar{y} = \frac{6.3168}{6} = 1.0528$$

$$S = \sqrt{\frac{6 \times 6.650417 - 6.3168^2}{6 \times (6 - 1)}} = 0.004252$$

4) Calcular el CV:

$$CV = \frac{0.004252}{1.0528} \times 100 = 0.4039\%$$

El CV no excede el 1.5%.

Figura 1. Procedimiento para el cálculo de la desviación estándar y el coeficiente de variación en la determinación de la precisión del sistema

11.2.1 ANEXO III. FORMULAS PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA

Pendiente:

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen:

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación:

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

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} s_{b1}$$

$$s_{b1} = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

11.2.2 ANEXO IV. FORMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA LA ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

Media aritmética:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

n= para número de mediciones

El procedimiento para el cálculo de los parámetros en la precisión del sistema se encuentra descrito en la figura 2.

1) Tabular los resultados:

**RESPUESTA ANALÍTICA (ÁREA DE PICO)
DE LAS INYECCIONES DE LA SOLUCIÓN DE REFERENCIA.**

Inyección	Área (mAu*s)
1	1131.6
2	1134.1
3	1162.8
4	1132.9
5	1136.2

2) Calcular Σy , Σy^2 y determinar n.
 $\Sigma y = 1131.6 + 1134.1 + \dots + 1136.2 = 5697.6$
 $\Sigma y^2 = 1131.6^2 + 1134.1^2 + \dots + 1136.2^2 = 6493218.06$
 $n = 5$

3) Calcular $\bar{y}$ y S.

$$\bar{y} = \frac{5697.6}{5} = 1139.52$$

$$S = \sqrt{\frac{5 \times 6493218.06 - 5697.6^2}{5 \times (5 - 1)}} = 13.124$$

4) Calcular el CV.

$$CV = \frac{13.124}{1139.52} \times 100 = 1.15\%$$

El CV no excede el 1.5%.

Figura 2. Ejemplo de procedimiento para el cálculo de parámetros para la adecuabilidad del sistema.

11.2.3 ANEXO V. FORMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA EXACTITUD DEL MÉTODO

Media aritmética:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional:

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n= número de recobros

El procedimiento para el cálculo de los parámetros en la precisión del sistema se encuentra descrito en la figura 3 y 3.1.

B) PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO.

1) Tabular los resultados:

CANTIDAD ADICIONADA – CANTIDAD RECUPERADA - % DE RECOBRO
PARA UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

PLACEBO ANALÍTICO ADICIONADO	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO (y)
1	50.00	50.04	100.08
2	50.10	50.39	100.58
3	50.00	50.11	100.22
4	49.90	49.89	99.98
5	50.00	50.23	100.46
6	50.00	49.93	99.86

y = Es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada.

Figura 3. Ejemplo de procedimiento para el cálculo de parámetros en la exactitud del método.

2) Calcular Σy , Σy^2 y determinar n,

$$\Sigma y = 100.08 + 100.58 + \dots + 99.86 = 601.1788$$

$$\Sigma y^2 = 100.08^2 + 100.58^2 + \dots + 99.86^2 = 60236.3819$$

$$n = 6$$

3) Calcular $\bar{y}$ y S:

$$\bar{y} = \frac{601.1788}{6} = 100.1965$$

$$S = \sqrt{\frac{6 \times 60236.3819 - 601.1788^2}{6 \times (6 - 1)}} = 0.2792$$

4) Calcular el CV:

$$CV = \frac{0.2792}{100.1965} \times 100 = 0.28 \%$$

El CV no es mayor de 2%.

5) Determinar en el Anexo 20 $t_{0.975, n-1}$ y calcular IC(μ).

$$t_{0.975, 5} = 2.571$$

$$IC(\mu) = 100.1965 \pm 2.571 \times \frac{0.2792}{\sqrt{6}} = 99.90, 100.49$$

El intervalo incluye el valor de 100%.

Figura 3.1. Ejemplo de procedimiento para el cálculo de parámetros en la exactitud del método.

11.2.4 ANEXO VI. FORMULAS DE CALCULO PARA LINEALIDAD DEL MÉTODO

- Cantidad adicionada vs cantidad recuperada.

Pendiente:

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n= número de mediciones

Ordenada al origen:

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación:

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

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b0}$$

$$S_{b0} = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Coefficiente de variación de la regresión:

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

- Porcentaje de recobro
- Media aritmética:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional:

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n= número de recobros

11.2.5 ANEXO VII. FORMULAS DE CALCULO PARA LA PRESICIÓN DEL MÉTODO

Media aritmética:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

n= número de muestras de valoración.

11.8 ANEXO VIII. FORMULAS DE CALCULO PARA LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Media aritmética de la condición normal (inicial) de operación:

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

n_0 = número de muestras en la condición normal de operación (almacenaje)

Media aritmética de cada condición:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

n_i = número de muestras en la i-ésima condición de operación (almacenaje)

Diferencia absoluta (DI) de cada condición de operación (almacenaje), respecto a la condición normal de operación:

$$DI = \bar{y}_i - \bar{y}_0$$

11.2.6 ANEXO IX. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Información de la afinina

La alcanida llamada afinina, también conocida como spilanthol (N-isobutil 2E,6Z,8E decatrienamida), presente en las raíces y semillas de la planta. Se han reportado sus actividades como anticonvulsivo, afrodisíaco, inhibidor de la lipasa pancreática, agente antimicrobiano, diurético, vasorrelajante, alivio del dolor de muelas y como agente antiinflamatorio (Dubey *et al.*, 2013). Las partes de la afinina que son importantes para su actividad analgésica (ver figura 4), efectos de hormigueo y salivación (farmacóforos) son la amida y el acilo graso insaturado (alquenilo) (Ley *et al.*, 2006, Rios y Olivo, 2014; Prachayasittikul *et al.*, 2013).

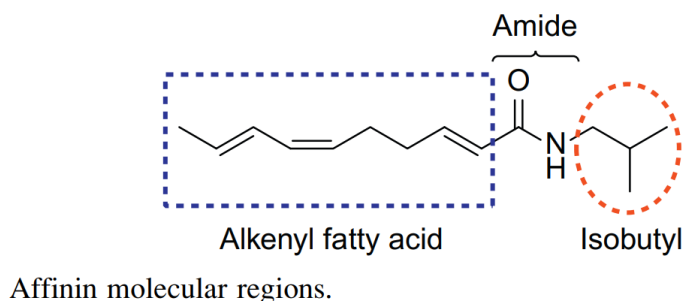
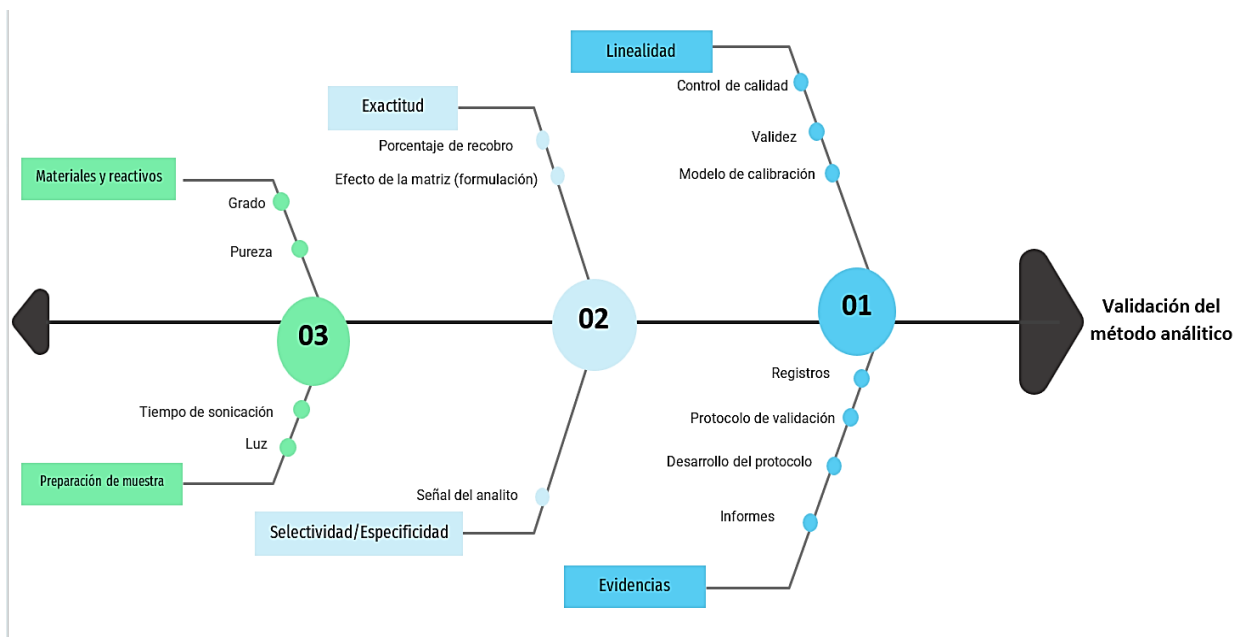


Figura 4. Estructura y regiones moleculares de la afinina

La validación del protocolo analítico destinado a la cuantificación de afinina resulta esencial para asegurar una determinación fiable durante el proceso de desarrollo de un producto final. En la elaboración de este método, se llevó a cabo una exhaustiva investigación de las propiedades fisicoquímicas de la afinina, así como de los excipientes presentes en la formulación. Además, mediante una revisión bibliográfica para seleccionar el tipo de método más apropiado para cuantificar la formulación líquida oral mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Los parámetros por desempeñar en la validación del método analítico se basaron en lo descrito por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), la guía para la validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A. C. y la ICH Q2 (R2) Validation of analytical procedures.

Diagrama de Ishikawa



Estos parámetros desempeñan un papel crítico en asegurar que el método analítico cumpla con los criterios de calidad establecidos. Todos estos elementos son fundamentales para el adecuado desarrollo y validación del método analítico. Es imperativo tomar precauciones desde el inicio del proceso de validación con el fin de obtener resultados confiables y reproducibles en la evaluación de la afinina en la formulación líquida oral.

11.2.7 ANEXO X. CROMATOGRAMAS Y CURVAS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

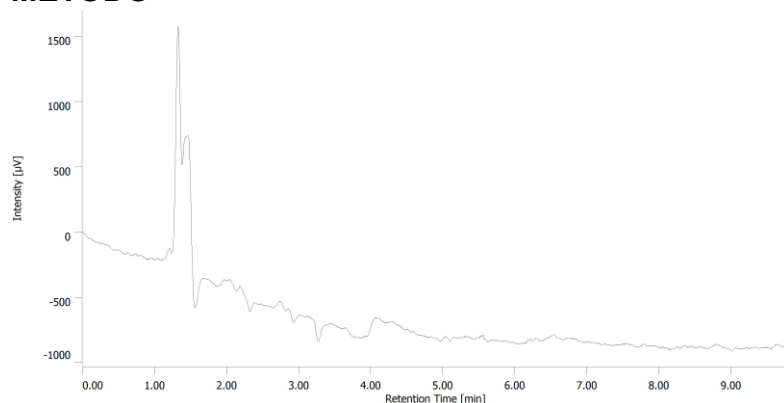


Figura 5. Cromatograma del blanco, prueba de especificidad/selectividad/adecuabilidad.

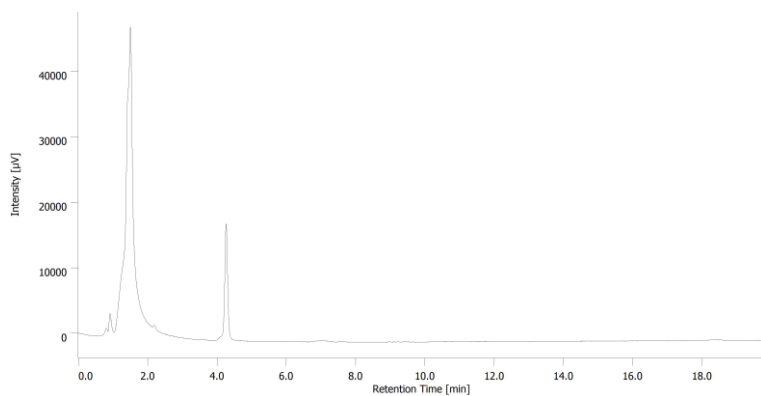


Figura 6. Cromatograma del placebo, prueba de especificidad/selectividad.

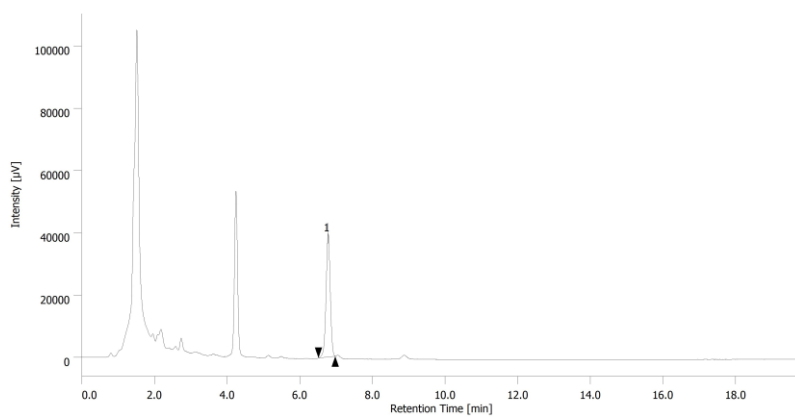


Figura 7. Cromatograma de una muestra de placebo cargado con afinina, prueba de especificidad/selectividad.

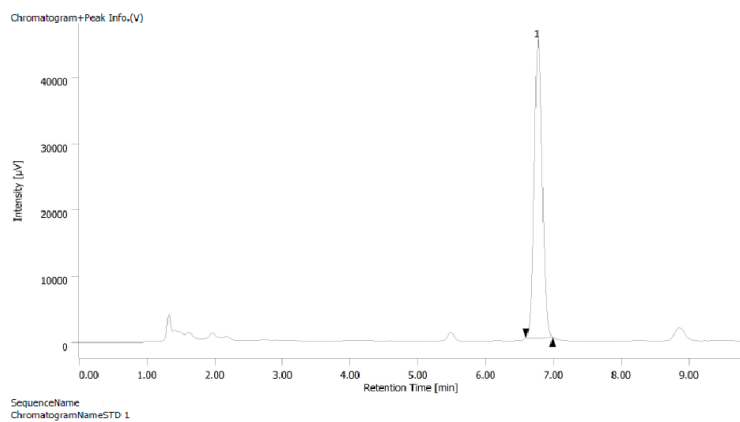


Figura 8. Cromatograma del estándar de afinina, prueba de especificidad/selectividad/adecuabilidad.

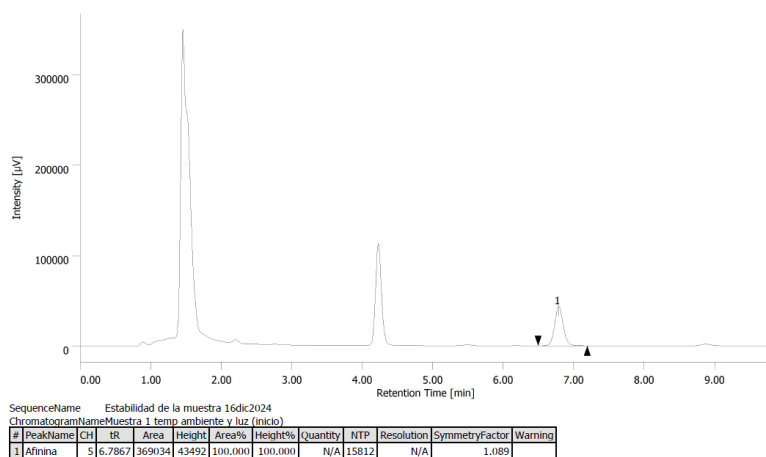


Figura 9. Cromatograma de la muestra sometida a condiciones de estabilidad (inicio).

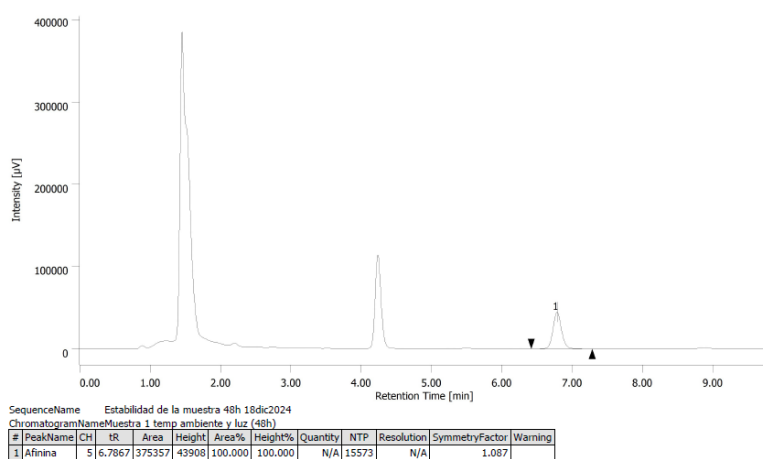


Figura 10. Cromatograma de la muestra en condición de temperatura ambiente y luz en prueba de estabilidad de la muestra (48 horas).

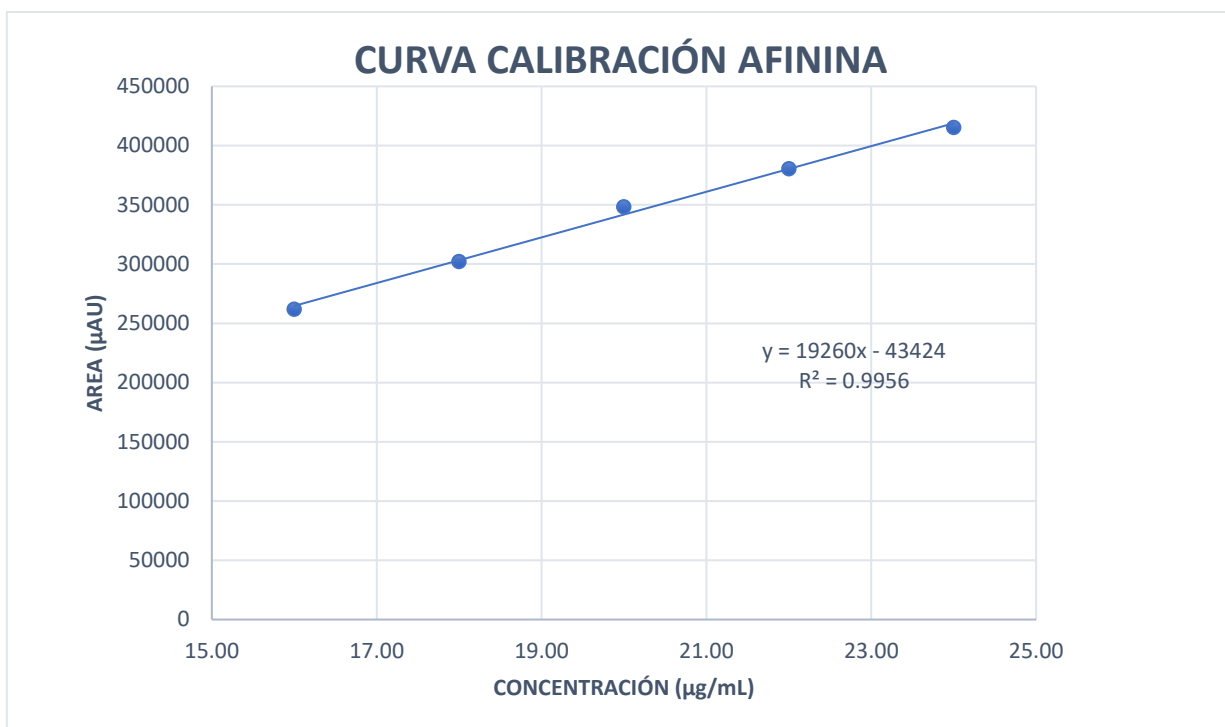


Figura 11. Curva de calibración en la linealidad del sistema.

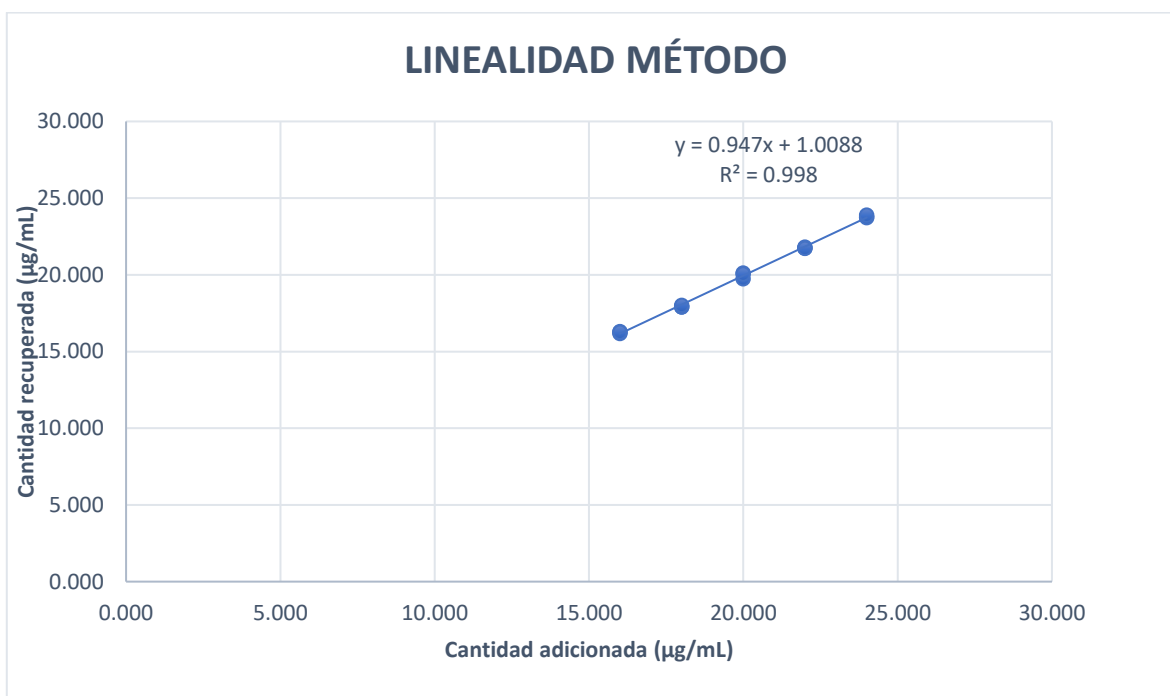


Figura 12. Curva calibración de la linealidad del método.

12. Bibliografía

- Aguilar, M. I., Castillo, N. E., Alvarado-López, C., Duarte-Lisci, G., Ríos-Gómez, R., & Rios, M. Y. (2016). HPLC Determination of the Alkamide Affinin in Fresh and Dry Roots of *Heliopsis longipes* (Asteraceae) and HS-SPME-GC-MS-TOF Analysis of Volatile Components. *Food Analytical Methods*, 9, 1807-1813.
- Barbosa, A. F., Carvalho, M. G. D., Smith, R. E., & Sabaa-Srur, A. U. (2016). Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry, and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 128-133.
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A. C. (2002). *Guía de Validación de Métodos Analíticos*.
- Dubey, S., Maity, S., Singh, M., Saraf, S. A., & Saha, S. (2013). Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2013.
- FEUM, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11ª edición. Vol.: 1 y 2. 2014. pp.: 289-303, 2787-2800.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2005). ICH Q2 (R2) Validation of Analytical Procedures.
- Ley, J. P., Krammer, G., Looft, J., Reinders, G., & Bertram, H.-J. (2006). Structure-activity relationships of trigeminal effects for artificial and naturally occurring alkamides related to spilanthol. *Developments in Food Science*, 21–24.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-059-SSA1-2015, Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos. Numeral 9.12.1.
- Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., & Prachayasittikul, V. (2013). High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. *EXCLI journal*, 12
- Rios, M. Y., & Olivo, H. F. (2014). Natural and synthetic alkamides: applications in pain therapy. *Studies in natural products chemistry*, 43, 79-121., 291–312.
- Singh, M., & Chaturvedi, R. (2012). Screening and quantification of an antiseptic alkylamide, spilanthol from in vitro cell and tissue cultures of *Spilanthes acmella* Murr. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 321-328.

14.2 ANEXO II. Constancia de participación en el Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas 2024.

