

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA CUANTIFICAR FURVINA® EN EL ENSAYO DE DISOLUCIÓN DEL VITROFURAL®

VALIDATION OF THE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD TO QUANTIFY FURVINA® IN THE VITROFURAL® DISSOLUTION TEST

Diana L. García-Treto^{1*} <http://orcid.org/0000-0002-8774-5974>
Amalia M. Calvo-Alonso¹ <http://orcid.org/0000-0003-2339-5239>
Sergio Morales-Fernández² <https://orcid.org/0000-0001-8395-0084>
Yaidel A. Quiñones-García¹ <https://orcid.org/0000-0003-2709-6447>
Osvaldo Norman-Montenegro¹ <https://orcid.org/0000-0001-5132-4556>

¹Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), Universidad Central “Marta Abreu”, Las Villas, Cuba

²Departamento de Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu”, Las Villas, Cuba

*Autor para correspondencia: dlgtreto@uclv.cu

Recibido: 3 de mayo de 2024

Aprobado: 1 de junio de 2024

RESUMEN

En el presente trabajo se validó la técnica espectrofotométrica utilizada para la determinación de la Furvina® en el ensayo de disolución del Vitrofur®. Se realizó una validación exhaustiva, y los parámetros a evaluar fueron: linealidad, especificidad, precisión, exactitud, estabilidad de las disoluciones analíticas y evaluación del efecto del filtro. El método de ensayo resultó ser lineal en el intervalo de concentraciones de 9 µg/mL a 14 µg/mL, específico, preciso y exacto. Las disoluciones analíticas, protegidas de la luz y a temperatura ambiente, son estables por un período de una hora después de su preparación. La filtración con papel (tamaño de poro: 5 µm-11 µm) resultó ser una alternativa efectiva. Atendiendo a los resultados, se concluye que el método de ensayo es adecuado para los fines previstos.

Palabras clave: Vitrofur®; espectrofotometría UV/Vis; validación.

ABSTRACT

In this work, the spectrophotometric technique used for the determination of Furvina® in the Vitrofur® dissolution test was validated. A thorough validation was carried out, where the parameters to be evaluated were: linearity, specificity, precision, accuracy, stability of the analytical solutions and evaluation of the filter effect. The test method proved to be linear in the concentration range of 9 µg/mL to 14 µg/mL, specific, precise and accurate. The analytical solutions, protected from light and at room temperature, are stable for a period of one hour after their preparation. Filtration with paper (pore size: 5 µm-11 µm) proved to be an effective alternative. Based on the results, it is concluded that the test method is suitable for the intended purposes.

Keywords: Vitrofur®; UV/Vis spectrophotometry; validation.

INTRODUCCIÓN

El Vitrofur®[®], dispersión sólida de Furvina® al 30 % en Polietilenglicol 6000, es producido en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, bajo un sistema de gestión integrado. Se emplea como inhibidor de la contaminación microbiana para medios de cultivo utilizados en la producción de vitroplantas, sustituyendo el proceso convencional de esterilización por autoclave. Su acción está dada por la actividad antimicrobiana del ingrediente farmacéutico activo Furvina®, que posee propiedades bactericida y fungicida de amplio espectro.⁽¹⁾

Debido a la relación existente entre la disolución de un producto y su posterior desempeño, el ensayo de disolución constituye uno de los estudios más importantes en el desarrollo de una forma sólida. Este ensayo permite evaluar los procesos de fabricación, así como la uniformidad entre lotes. En muchos casos, los resultados proporcionan información útil sobre propiedades claves como la estabilidad, equivalencia, entre otras.^(2,3,4)

Se han utilizado numerosas técnicas para la cuantificación de la Furvina®, entre ellas cromatográficas y espectrofotométricas.

Calvo y colaboradores, determinaron Furvina® en plasma humano, utilizando extracción mediante Dispersión de Matriz en Fase Sólida y cromatografía de gases con detector de captura electrónica. El proceso de extracción y cuantificación fue validado según la metodología ICH (*International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*).⁽⁵⁾

Pérez y colaboradores, desarrollaron y validaron una técnica analítica espectrofotométrica para la determinación de Furvina® en diferentes lacas. La validación del método, según guías internacionales, mostró excelentes resultados de especificidad, linealidad, precisión (coeficientes de variación (CV) inferiores a 5 %), veracidad (97-103 %) y sensibilidad (límite de detección (LD) y de cuantificación (LQ) igual a 0,038 y 0,156 µg/mL, respectivamente).⁽⁶⁾

La sencillez y rapidez de la espectrofotometría UV/Vis, lo convierte en un método de elección para realizar ensayos de disolución, siendo uno de los métodos más recomendados en las monografías oficiales para estos propósitos.^(7,8,9,10,11,12)

En la actualidad, autores como Arias y Castañeda-Alarcón emplean este método para la cuantificación de un analito en disolución.^(13,14)

El fundamento de la espectroscopía en la determinación de la Furvina® se debe, a la capacidad de esta molécula para absorber radiaciones dentro del espectro UV/Vis.

El Laboratorio de Control de la Calidad del CBQ garantiza el cumplimiento de las especificaciones de calidad de materias primas, productos intermedios, productos terminados y material de envase. Para ello, se diseñó un sistema de gestión basado en la Regulación No. 37 del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED): “Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Medicamentos”. El sistema también tiene en cuenta las “Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de productos farmacéuticos”, Regulación No. 16 del CECMED y su Anexo No. 09: “Buenas Prácticas para la Fabricación de Ingredientes Farmacéuticos Activos”.^(15,16,17)

El cumplimiento de las Buenas Prácticas garantiza que los productos del CBQ sean desarrollados, producidos, controlados y distribuidos, de acuerdo con estándares de calidad, que permiten certificar su seguridad, eficacia y calidad.^(15,16,17)

En este sentido, debe demostrarse que los métodos de ensayo de control de la calidad que se aplican, aseguran la confiabilidad de los resultados analíticos obtenidos, y que son adecuados para los fines previstos. Por ello, el objetivo de este trabajo es validar la técnica espectrofotométrica utilizada para la determinación de la Furvina® en el ensayo de disolución del Vitrofur®.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales, equipos, reactivos, patrones y muestras de ensayo

El equipamiento utilizado para desarrollar la técnica, así como la cristalería empleada, fueron debidamente calibrados y/o verificados por la Oficina Territorial de Normalización (OTN), y por la Empresa de Servicios Ingenieros Especializados (ESINES). Los reactivos utilizados también poseen la calidad requerida, avalados por los certificados de calidad de los proveedores ([Tabla 1](#)).

Tabla 1- Reactivos y muestras de ensayo utilizados

Reactivos	Muestras de ensayo
Agua purificada, conforme a la NC-ISO 3696	Furvina® (G-1) material de referencia (lote 12-3-2; 99,87 % de pureza)
Dimetilformamida p.a. (Merck, lote: K45660958)	Vitrofur® con 30 % de Furvina (G-1) (lote: 22-4-20)
Polietilenglicol 6000 (MERCK, lote: SG977791)	

Método de ensayo para validar

Debido a la presencia de grupos cromóforos y la conjugación presente en la molécula de Furvina® (figura 1), el Vitrofur® exhibe un máximo de absorción a 389 nm en la zona visible del espectro. Haciendo uso de la Ley de Lambert-Bouguer-Beer, se puede cuantificar qué cantidad de Furvina® se ha disuelto en el medio de disolución en las condiciones descritas.⁽¹⁸⁾

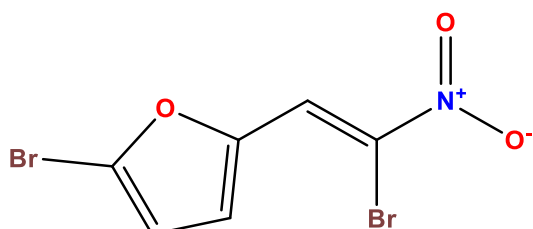


Fig. 1- Molécula de Furvina®

Curva de calibración

Para el cálculo de la Furvina® disuelta, se confeccionó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones de 9 µg/mL a 14 µg/mL, con los puntos intermedios 10 µg/mL, 11 µg/mL y 13 µg/mL.

Determinación de la Furvina® disuelta en el ensayo de disolución del Vitrofur®

Se pesó alrededor de 0,180 0 g de Vitrofur®, y se transfirió a un beaker de 1 L, protegido de la luz, con 500 mL de agua purificada, a 37 °C. El beaker se colocó en un baño de agua a la misma temperatura, durante treinta minutos, con agitación constante a 300 s⁻¹ (agitador electrónico IKA). Transcurrido ese tiempo, se tomó una alícuota de 10 mL, y se filtró a vacío a través de vidrio glomerado G4. Se transfirió, un volumen de 5 mL del filtrado, a un matraz de 10 mL (protegido de la luz); se enrasó, y se determinó la absorbancia a 389 nm, empleando como blanco agua purificada.

Validación del método de ensayo

Se aplicó el Anexo 1 de la Regulación 37/2012 del CECMED,⁽¹⁹⁾ y se evaluaron los parámetros: linealidad, especificidad, precisión, exactitud,

estabilidad de las disoluciones analíticas y evaluación del efecto del filtro.

Linealidad

La linealidad del sistema se evaluó analizando por triplicado, en tres días diferentes, cinco concentraciones de Furvina®, material de referencia, en el intervalo de concentración de 90 % a 140 %, es decir desde 9 µg/mL hasta 14 µg/mL.

Con los resultados obtenidos de absorbancia a la λ máxima (389 nm) (y) vs concentración de analito en µg/mL (x), se construyó la curva de calibración correspondiente.

Criterios de aceptación:

Coefficiente de correlación lineal: $r \geq 0,99$.

Coefficiente de determinación: $r^2 \geq 0,98$.

Test de linealidad: coeficiente de variación de los factores de respuesta: $CV_f \leq 5 \%$. El intervalo de confianza de la pendiente ($b \pm t S_b$); no debe incluir el cero para $P = 0,05$.

Test de proporcionalidad: el intervalo de confianza del intercepto ($a \pm t S_a$); se debe incluir el cero para $P = 0,05$.

Especificidad

Se registraron los espectros, de 250 nm-460 nm, de diferentes disoluciones de Furvina®, material de referencia, a 11 µg/mL, recién preparada, después de 4 y 24 h, sin proteger de la luz. Además, se registró el espectro de una disolución de Polietilenglicol 6000, que se preparó disolviendo 0,002 52 g con agua purificada en un matraz de 10 mL. En todos los casos se observó si existe alguna banda de absorción que interfiera en la determinación de la Furvina® a 389 nm.

Precisión

La determinación de la precisión se realizó a dos niveles: intraensayo (repetibilidad), e interensayo (precisión intermedia).

Repetibilidad instrumental

Para esta determinación, se hicieron diez lecturas a la disolución del punto medio del intervalo de linealidad

del sistema (11 µg/mL). Se calculó la media, la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV), utilizando un criterio de aceptación de $CV \leq 3 \%$.

Repetibilidad del método

Se realizaron seis determinaciones del ensayo de disolución. Para los resultados de concentración obtenidos se calculó: la media, la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV), con criterio de aceptación de $CV \leq 3 \%$.

Precisión intermedia

Se efectuaron tres réplicas del ensayo de disolución en dos días diferentes, por dos analistas, en dos instrumentos y el mismo laboratorio. Se calculó la media, la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) para cada grupo de análisis y el global. Además, se realizó un análisis de varianza multifactorial, empleando el programa STATGRAPHICS Centurion XV, para analizar la influencia de los factores concentración, día, analista y equipo en la variabilidad de los resultados. Se aplicó criterios de aceptación de $CV \leq 3 \%$ y si $P > 0,05$ (nivel de confianza 95 %); ninguno de los factores (analista, instrumento y día), ni sus interacciones, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta.

Exactitud

La determinación de la exactitud se realizó por el método de análisis repetidos de muestras diferentes de concentraciones conocidas. Se utilizaron tres niveles de concentración del intervalo de linealidad del sistema (9 µg/mL, 11 µg/mL y 13 µg/mL). Se construyó la curva de recuperación de concentración real vs concentración teórica. Los resultados fueron procesados estadísticamente de igual forma que la curva de calibración de la linealidad del sistema (ver epígrafe Linealidad).

Además, se calcularon los por cientos de recobro, y se determinaron los valores de recobrado medio y los coeficientes de variación. Se realizó la prueba G de Cochran, para determinar si el factor concentración tuvo alguna influencia en los resultados. Por último, se aplicó la prueba t de Student para evaluar si existieron diferencias significativas entre el valor medio de recobrado obtenido y el 100 %.

Criterios de aceptación:

En la evaluación de la linealidad de la relación entre las concentraciones reales y las estimadas, el intervalo

de confianza de la pendiente ($b \pm t S_b$) debe incluir el 1,0. Además, se deben cumplir con los criterios del test de linealidad y de proporcionalidad.

Recobrado medio: 97 % - 103 %⁽¹⁰⁾

$CV \leq 3 \%$ ⁽¹⁰⁾

Si $G_{exp} < G_{tab}$ las varianzas de las tres concentraciones fueron equivalentes, o lo que es igual, el factor concentración no influyó en la variabilidad de los resultados.

Si $t_{exp} < t_{tab}$, no existieron diferencias significativas entre el recobrado medio y el 100 %.

Estabilidad de las disoluciones analíticas

Se midieron por triplicado las absorbancias de disoluciones recién preparadas, utilizando el procedimiento establecido para el ensayo de disolución; posteriormente, se almacenaron protegidas de la luz a temperatura ambiente, por un período de tres horas, y se realizaron mediciones de absorbancia cada sesenta minutos. Los resultados se utilizaron para calcular las concentraciones a los distintos tiempos de análisis, las cuales se compararon con la concentración a tiempo cero. Se aplicó la prueba t de Student, para evaluar si existieron diferencias significativas entre las medias de las concentraciones a los diferentes tiempos y la determinada a tiempo cero. A partir de los resultados obtenidos, se definió el período máximo de conservación de las disoluciones.

Criterios de aceptación:

Las disoluciones se consideraron estables, si en el intervalo de tiempo analizado, las respuestas analíticas no mostraron variaciones superiores al 2 %, respecto a los valores iniciales (disoluciones recién preparadas) y se mantuvieron en el intervalo de 98 % a 102 %.

Si $t_{exp} < t_{tab}$, no existieran diferencias significativas entre las medias de las concentraciones, a los diferentes tiempos de análisis y la determinada a tiempo cero.

Evaluación del efecto del filtro

Se prepararon por triplicado, siguiendo el procedimiento descrito del método de ensayo, disoluciones de analito filtradas con vidrio glomerado G4 (tamaño de poro: 4 µm-7 µm) y filtradas con papel de filtro (tamaño de poro: 5 µm-11 µm). Para ambos medios filtrantes se calcularon las medias, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación de las concentraciones obtenidas. El efecto del filtro se determinó comparando las medias de las concentraciones de las muestras filtradas con vidrio

glomerado G4 y con papel de filtro, por medio de la prueba t de Student. El criterio de aceptación fue: si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$, no existen diferencias significativas entre las muestras filtradas con vidrio glomerado G4 y las muestras filtradas con papel de filtro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ensayo de disolución del Vitrofur®[®], con determinación espectrofotométrica, es desarrollado por el laboratorio de control de la calidad del CBQ, adaptándose a las condiciones de uso del producto en las biofábricas, por lo que se requiere de la realización de una validación exhaustiva. Por eso, se analizaron todos los parámetros exigidos para métodos clasificados como “de contenido o potencia” en el Anexo 1 de la Regulación 37/2012 del CECMED,⁽¹⁹⁾ ya especificados.

Linealidad

En la [tabla 2](#) se resume el procesamiento estadístico de la curva de calibración obtenida en el ensayo de

linealidad ([figura 2](#)). La ecuación de regresión tuvo elevados coeficientes de correlación lineal y de determinación, muy próximos a la unidad, acorde con los criterios establecidos. El factor respuesta presenta una variación permisible, con valor inferior al 5 %, lo cual indica que existe una relación lineal entre la respuesta (absorbancia) y la concentración del analito. La pendiente es estadísticamente diferente de cero para n-2 grados de libertad y nivel de significación $\alpha = 0,05$; mientras que la ordenada en el origen no difiere, significativamente de cero, para la misma significación.

Los resultados del procesamiento estadístico de la linealidad del sistema, avalaron la proporcionalidad existente entre la respuesta y la concentración del analito en el intervalo analizado. La obtención de elevados valores de r y r^2 , junto a los resultados de los test de linealidad y proporcionalidad, demostraron la relación lineal existente entre las variables.

El cumplimiento de todos los criterios permitió afirmar, que el método es lineal en el intervalo de concentraciones de 9 µg/mL a 14 µg/mL.

Tabla 2- Análisis estadístico de la linealidad del sistema

	Parámetros	Resultados
Regresión	Ecuación de la recta $y = b x + a$	$y = 0,059\ 9\ x + 0,01$
	Coeficiente de correlación $r \geq 0,99$	0,997 7
	Coeficiente de determinación $r^2 \geq 0,98$	0,995 5
	Coeficiente de variación de los factores de respuesta $CV_f \leq 5\ %$	1,103 1 %
Linealidad	$t_{\text{exp}}(b): t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$ para $\alpha = 0,05$ y n-2 grados de libertad $t_{\text{tab}} = 2,16$	$t_{\text{exp}} = 53,642\ 1$
	Intervalos de confianza de b ($\pm b$) No incluye al cero	Límite superior: 0,062 3 Límite inferior: 0,057 5
	$t_{\text{exp}}(a): t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$ para $\alpha = 0,05$ y n-2 grados de libertad $t_{\text{tab}} = 2,16$	$t_{\text{exp}} = 0,798\ 0$
Proporcionalidad	Intervalos de confianza de a ($\pm a$) Incluye al cero	Límite superior: 0,038 2 Límite inferior: - 0,017 6

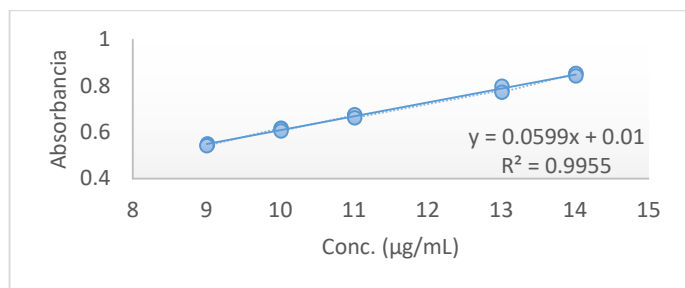


Fig. 2- Curva de calibración del ensayo de linealidad

Especificidad

La [figura 3](#) muestra los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método. En el espectro correspondiente al Polietilenglicol 6000 (PEG) no aparece ninguna banda de absorción en la zona de interés, al ser comparado con el espectro obtenido para la disolución de Furvina[®], a la concentración del punto medio de la curva de calibración (11 µg/mL); lo que indica, que el excipiente o sustancia auxiliar del producto, no interfiere en la determinación de la Furvina[®]. En cuanto a las disoluciones sometidas a condiciones de estrés (expuestas a la acción de la luz), se detectó una disminución de la banda de absorción a 389 nm, con la aparición de una banda secundaria a 290 nm, que no interfiere en el análisis.

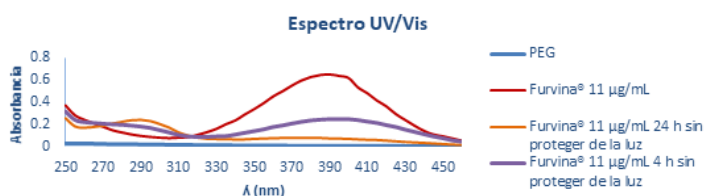


Fig. 3- Resultados del estudio de especificidad del método.

Fuente: elaboración propia.

En todos los casos se comprobó, que no hay ninguna banda de absorción que interfiera en la determinación de Furvina[®] a 389 nm, por lo que se concluye que el método, en las condiciones estudiadas y de uso del Vitrofur[®], es específico.

Precisión

Repetibilidad instrumental

La variabilidad de las respuestas obtenidas para las lecturas repetidas, expresada como coeficiente de variación, fue menor del 1 % ([Tabla 3](#)). Dicho resultado demostró, que con este procedimiento es posible minimizar los errores potenciales asociados a la lectura de las muestras, y con ello, conseguir la precisión instrumental requerida.

Tabla 3- Resultados del estudio de repetibilidad instrumental

Parámetros estadísticos	Absorbancia
Media = 0,663 S = 0,0008 CV = 0,12 %	0,662
	0,662
	0,662
	0,662
	0,662
	0,662
	0,662
	0,664
	0,663
	0,663
	0,664

Repetibilidad del método

En el estudio realizado por el mismo analista, el mismo día, a través de seis réplicas, se alcanzó un coeficiente de variación dentro de los límites establecidos para los métodos espectrofotométricos ($CV \leq 3 \%$), lo que demuestra que el método es repetible ([Tabla 4](#)).

Tabla 4- Resultados del estudio de repetibilidad del método

Parámetros estadísticos	Absorbancia	Concentración (µg/mL)
Media = 23,41 S = 0,0933 CV = 0,4 %	0,736	23,48
	0,735	23,44
	0,731	23,31
	0,738	23,54
	0,730	23,27
	0,734	23,41

Precisión intermedia

En el estudio de precisión intermedia realizado por dos analistas, en instrumentos y días diferentes, se obtienen, en todos los casos, coeficientes de variación dentro de los límites admisibles para métodos espectrofotométricos, en los que se aceptan valores que no excedan el 3 %.

En la [tabla 5](#) se presentan los resultados del análisis de varianza multifactorial, para analizar la influencia de los factores analista, instrumento y día en la variabilidad de los resultados.

Dado que los valores P son superiores a 0,05; ninguno de los factores (analista, instrumento y día) ni sus interacciones tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta concentración, con un nivel de confianza del 95,0 %.

Tabla 5- Resultados del análisis de varianza multifactorial

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: Analista	0,041 666 7	1	0,041 666 7	1,56	0,228 0
B: Equipo	0,002 4	1	0,002 4	0,09	0,767 7
C: Día	0,018 15	1	0,018 15	0,68	0,420 5
INTERACTIONS					
AB	0,001 066 67	1	0,001 066 67	0,04	0,843 8
AC	0,010 416 7	1	0,010 416 7	0,39	0,540 0
BC	0,006 016 67	1	0,006 016 67	0,23	0,640 6
RESIDUAL	0,452 817	17	0,026 636 3		
TOTAL (CORRECTED)	0,532 533	23			

El cumplimiento de los criterios de aceptación evidenció la precisión del método para cuantificar la

Furvina[®] disuelta en el ensayo de disolución, por lo que puede ser aplicado con este propósito sin influencia significativa de los errores aleatorios.

Exactitud

Para evaluar el parámetro exactitud, se determinó el por ciento de recobro a tres niveles de concentración, y se construyó la curva de calibración correspondiente (tablas 6 y 7).

El coeficiente de recobro medio se encuentra dentro del límite permitido para métodos espectrofotométricos (97 %-103 %), y el coeficiente de variación total es inferior al 3 % establecido.

En la prueba de Cochran se obtuvo, que la $G_{exp} < G_{tab}$ para una probabilidad de 0,05, $k = 3$ y $n = 3$; por tanto, las varianzas a los tres niveles de concentración son equivalentes, lo que indica que el nivel de concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Tabla 6- Resultados de la determinación de la exactitud

Ensayos	Nivel bajo 10 µg/mL	Nivel medio 11 µg/mL	Nivel alto 13 µg/mL
1	9,81	10,84	13,10
2	9,89	10,76	12,75
3	10,12	11,03	12,95
% Recobro	99,40	98,88	99,49
% Recobro medio		99,26	
S		1,2578	
% CV		1,27	
Prueba de Cochran		$G_{exp} = 0,41$	
$G_{tab} = 0,871$			
t de Student (comparación con el 100 %)	$t_{exp} = 1,76$		
$t_{tab} = 2,306$			

Tabla 7- Evaluación estadística por regresión lineal de la curva de recuperación

	Parámetros	Resultados
Regresión	Ecuación de la recta $y = b x + a$	$y = 1,002 1x - 0,107 6$
	Coeficiente de correlación $r \geq 0,99$	0,994 4
	Coeficiente de determinación $r^2 \geq 0,98$	0,988 8
	Coeficiente de variación de los factores de respuesta $CV_f \leq 5 \%$	1,27
Linealidad	$t_{exp} (b): t_{exp} > t_{tab}$	
	para $\alpha = 0,05$ y n-2 grados de libertad	$t_{exp} = 24,86$
	$t_{tab} = 2,36$	
	Intervalos de confianza de b ($\pm b$)	Límite superior: 1,097 4
Proporcionalidad	No incluye al cero	Límite inferior: 0,906 8
	$t_{exp} (a): t_{exp} < t_{tab}$	
	para $\alpha = 0,05$ y n-2 grados de libertad	$t_{exp} = 0,2341$
	$t_{tab} = 2,36$	
	Intervalos de confianza de a ($\pm a$)	Límite superior: 0,979 2
	Incluye al cero	Límite inferior: -1,194 4

Al realizar la prueba de t de Student, se obtuvo una $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$, lo que indica que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100 %, confirmando la buena exactitud del método.

Como se observa en esta tabla, de la curva de concentraciones estimadas contra concentraciones reales, se obtuvo que el valor de la pendiente es cercano a 1,0, y el resto de los criterios del test de linealidad y el test de proporcionalidad se cumplen, lo que demuestra la relación lineal existente entre las variables. El cumplimiento de los criterios de aceptación evidenció que el método es exacto en las condiciones estudiadas.

Estabilidad de las disoluciones analíticas

Los resultados del estudio de estabilidad de la Furvina® en el medio de disolución, describen una tendencia a la disminución de la concentración en el tiempo, con valores de concentración fuera del intervalo recomendado (98 %-102 %), a partir de la primera hora de almacenamiento (Tabla 8).

En la primera hora de almacenamiento, la variación de la concentración no superó el 2 %, respecto al valor

inicial, y no fue significativa desde el punto de vista estadístico, ya que la t experimental resultó menor que la t tabulada, para $\alpha = 0,05$ y 2 grados de libertad.

Según los resultados alcanzados, las disoluciones analíticas son estables, protegidas de la luz y a temperatura ambiente, por un período de una hora después de su preparación.

Evaluación del efecto del filtro

El efecto del filtro constituye, también, parte de los ensayos intrínsecos de los métodos utilizados en ensayos de disolución, según se recomienda en las regulaciones vigentes. En la tabla 9 se resumen los resultados obtenidos para las disoluciones analíticas filtradas con vidrio glomerado G4 (tamaño de poro: 4-7 μm) y con papel de filtro (tamaño de poro: 5-11 μm).

Los resultados de la evaluación del efecto del filtro demostraron, que no existieron diferencias significativas entre las muestras filtradas con vidrio glomerado G4 y con papel de filtro, atendiendo a que el valor de la t experimental resultó ser menor que la t tabulada.

Tabla 8- Resultados del ensayo de estabilidad

Ensayos	Concentración de Furvina® disuelta ($\mu\text{g/mL}$)			
	0 h	1 h	2 h	3 h
1	23,71 (100 %)	23,61 (99,58 %)	22,90 (96,58 %)	22,36 (94,31 %)
2	23,51 (100 %)	23,27 (98,98 %)	22,60 (96,13 %)	22,23 (94,56 %)
3	23,44 (100 %)	23,44 (100 %)	22,80 (97,27 %)	22,50 (95,99 %)
Parámetros estadísticos				
Media	23,55 (100 %)	23,44 (99,52 %)	22,77 (96,66 %)	22,36 (94,95 %)
S	0,14	0,17	-	-
% CV	0,59	0,73	-	-
t_{exp}	-	0,27	-	-
$t_{\text{tab}} = 4,303$ ($\alpha = 0,05$ y 2 grados de libertad) $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$				

Tabla 9- Resultados de la evaluación del efecto del filtro

Ensayos	Concentración de Furvina® disuelta ($\mu\text{g/mL}$)	
	Vidrio glomerado G4	Papel de filtro
1	23,69	23,72
2	23,35	22,59
3	23,50	22,94
Parámetros estadísticos		
Media	23,51	23,08
S	0,1704	0,5785
% CV	0,7247	2,5060
$t_{\text{exp}} = 0,297$		
$t_{\text{tab}} = 4,303$ ($\alpha = 0,05$ y 2 grados de libertad)	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$	

Esto permitió asegurar, que durante el proceso de filtración, el agente filtrante no retiene al ingrediente farmacéutico activo, ni le aporta interferencias al filtrado, por lo que el papel de filtro puede ser considerado como un medio de filtración alternativo al vidrio glomerado.

CONCLUSIONES

El método espectrofotométrico para la determinación de la Furvina® en el ensayo de disolución en lotes de Vitrofur® resultó ser lineal en el intervalo de concentraciones de 9 µg/mL a 14 µg/mL, específico, preciso y exacto. Las disoluciones analíticas son estables, protegidas de la luz y a temperatura ambiente, por un período de una hora. Además, se demostró que el papel de filtro (tamaño de poro 5 µm-11 µm) constituye una alternativa viable como medio de filtración. Los resultados del estudio de validación mostraron, que el método de ensayo es adecuado para los fines previstos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARTÍNEZ-RIVERO, A.; MOSQUEDA-FRÓMETA, O.; DAQUINTA, M.; ESCALONA-MORGADO, M. M. "Efecto del Vitrofur® en la calidad morfofisiológica de brotes de caña de azúcar var. C 1051-73 propagados en Biorreactores de Inmersión Temporal", *Revista Biotecnología Vegetal*. 2018, **18**(2), 87-95. ISSN: 2074-8647.
2. BARSAGADE, P. *et al.* "Review Article of Dissolution Test Method Development and Validation of Dosage Form by Using RP-HPLC". *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2021, **70**(1), 28-38. DOI: <https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2021.v70i01.005>
3. MHETRE, M. N.; KALSHETTI, M. S. "Development and Validation of UV-VIS Spectrophotometric Method for Estimation of Methylprednisolone from Dissolution Media". *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*. 2024, **11**(3), 437-441. DOI: <https://doi.org/10.32628/IJSRST24113116>
4. ANIK, H.; RAHMAN, S.; SARKER, S. "Development of a Dissolution Method Validation Technique Using UV-spectrophotometry for Bosutinib 500 mg Tablet". *Oriental Journal of Chemistry*. 2022, **38**(6), 1483-1488. DOI: <https://doi.org/10.13005/ojc/380621>
5. CALVO, A. M.; NIETO, L.; QUINTANA, A.; MORALES, S. "Determinación de furvina en plasma humano utilizando extracción mediante Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (MSPD) y cromatografía de gases". *Afinidad LXIX*. 2012, **69**(560). 278-282. ISSN 0001-9704.
6. PÉREZ RODRÍGUEZ, Z. Técnicas analíticas para la caracterización químico-farmacéutica de lacas para el tratamiento de la oncomicosis. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, España, 2024. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10201/146786>
7. PASSOS, M. L. C.; SARAIVA, M. L. M. F. S. "Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies". *Measurement*. 2019, **135**, 896-904. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.12.045>
8. ABEYSEKERA, M. C.; HERATH, M. B.; BASNAGODA, S. H.; JAYASUNDARA, U. K. "Development, validation, and concentration determination of losartan potassium using 1D UV Visible spectrophotometry". *Sys Rev Pharm*. 2022, **13**(2), 116-121. DOI: <https://doi.org/10.31858/0975-8453.13.2.116-121>
9. JAYASUNDARA, U. K.; HERATH, H. M. M. B.; KAUSHALYA, P. V. N. "Method development, validation, and concentration determination of metformin hydrochloride and atorvastatin calcium using UV-Visible spectrophotometry". *J Anal Bioanal Tech*. 2021, **12**(2), 1-7. ISSN: 2155-9872.
10. MALDONADO, Y. E.; SUÁREZ, Y.; ESTRADA, M.P.; PONCE, H. "Evaluación del desempeño de métodos para ensayos de disolución de metronidazol, propanolol y ranitidina tabletas". *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*. 2020, **6**(2). ISSN: 2411-927X.
11. BROWN, B.; WARD, A.; FAZILI, Z.; OSTERGAARD, J. "Application of UV dissolution imaging to pharmaceutical systems". *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021, **177**, 113949. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113949>
12. SUN, Q.; YANG, Y.; WANG, S.; LIANG, P. "Using real-time UV-visible spectrophotometer to assess an Al-Zn-Mg-Cu alloy's dissolution in acidic solution". *Royal Society*. 2020, **7**, 200461. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsos.200461>
13. ARIAS RIVAS, K.; GARCÍA LEMUS, R. C.; CAVAZOS GARDUÑO, A.; CORTEZ ÁLVAREZ, C. R.; ABUD GONZÁLEZ, M. "Desarrollo y validación de un método analítico por

espectrofotometría Uv/Vis para la determinación del porcentaje disuelto de tabletas de paracetamol”. *Ciencia Latina*. 2024, **8**(5), 7713-7727. DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i5.14185

14. CASTAÑEDA-ALARCÓN, M.; GARCÍA-MONTOYA, E.; RODRÍGUEZ-CALZADO, J. “Evaluación comparativa de perfiles de disolución del medicamento genérico lamivudina tableta 150 mg comercializado en Perú frente al innovador Epivir”. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2024, **41**(1), 27. DOI: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2024.411.12821>

15. CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE MEDICAMENTOS, EQUIPOS Y DISPOSITIVOS MEDICOS. *Buenas Prácticas de Laboratorio para el control de medicamentos*. Regulación No. 37. 2 Edición. La Habana, 2012. [fecha de consulta: 22 de Octubre de 2022] Disponible en: <https://www.cecmed.cu/>

16. CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE MEDICAMENTOS, EQUIPOS Y DISPOSITIVOS MEDICOS. *Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de productos farmacéuticos*. Regulación

No. 16. 2 Edición. La Habana, 2012. [fecha de consulta: 22 de Octubre de 2022] Disponible en: <https://www.cecmed.cu/>

17. CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE MEDICAMENTOS, EQUIPOS Y DISPOSITIVOS MEDICOS. *Buenas Prácticas para la Fabricación de Ingredientes Farmacéuticos Activos*. Anexo No. 09. 2 Edición. La Habana, 2012. [fecha de consulta: 22 de Octubre de 2022] Disponible en: <https://www.cecmed.cu/>

18. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. *Inhibidor de la contaminación microbiana en medios de cultivo para la producción de vitroplantas-Vitrofur*. *Requisitos y métodos de ensayo*. NC 1090:2015. 1 Edición. La Habana, 2015.

19. CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE MEDICAMENTOS, EQUIPOS Y DISPOSITIVOS MEDICOS. “Validación de métodos analíticos”. Anexo No. I de las *Buenas Prácticas para Laboratorio de Control de Medicamentos*. 2 Edición. La Habana, 2012. [fecha de consulta: 22 de Octubre de 2022] Disponible en: <https://www.cecmed.cu/>

DECLARACIÓN CONFLICTO DE INTERESES

No se declaran conflictos entre los autores

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Diana Leydis García Treto: realización de los experimentos de laboratorio, el procesamiento de los resultados y la escritura del artículo.

Amalia María Calvo Alonso: ejecución de los experimentos de laboratorio, el procesamiento de los resultados y la escritura del artículo.

Sergio Morales Fernández: realización del análisis de los resultados y la escritura del artículo.

Yaidel Alcides Quiñones García: participación en el procesamiento estadístico de los resultados.

Osvaldo Norman Montenegro: participación en el procesamiento estadístico de los resultados.