



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE FARMACIA

Desarrollo y validación de un método analítico para la estandarización del desempeño de una formulación de Itraconazol cápsulas basadas en un sistema autoemulsificable en el Laboratorio de Química de la UIA durante el primer cuatrimestre del 2023

Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Farmacia

Nombre de la sustentante:

María Fernanda González Prado

Tutor:

Brayan Murillo Castillo

2023

I. Resumen

Los métodos de validación analíticos son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica para la identificación y cuantificación de los componentes activos, impurezas y productos de degradación, entre otros, para garantizar que los análisis se realicen con la exactitud y precisión requerida. No obstante, tanto la variación de los excipientes utilizados en formas terminadas específicas como la introducción de una nueva sustancia activa conduce necesariamente a la validación del método analítico. Este proceso permite, además, la detección de puntos débiles en el método, lo que posibilita su desarrollo y puesta a punto.

Para poder validar un método analítico, este se debe someter a pruebas evaluadas por medio de los parámetros de linealidad, exactitud y precisión, selectividad, especificidad y límite de detección y cuantificación; los mismos deben cumplir con criterios de aceptación de acuerdo con las guías de validación.

La biodisponibilidad de las cápsulas de itraconazol son dependientes de un pH bajo, por lo que requiere acidez gástrica para la disolución del fármaco, lo que quiere decir que deben administrarse inmediatamente después de una comida para cumplir con los estándares de absorción; siendo su baja solubilidad la principal limitante para la formulación de este tipo de fármacos debido a que, para ser absorbidos, deben presentarse en su forma disuelta y no ionizada.

La disolución es un proceso mediante el cual un sólido se disuelve en un solvente y forma una solución. La prueba de esta consiste en determinar la cantidad de principio activo que se disuelve mediante la velocidad de agitación (de las paletas o canastas en revoluciones por minuto) y el tiempo de disolución.

Es por ello que para aumentar la biodisponibilidad oral de los fármacos poco solubles en agua, las formulaciones basadas en lípidos son una valiosa alternativa que ha probado ser eficiente y es por ello que los Sistemas de administración de fármacos autoemulsificables (SEDDS, por sus siglas en inglés) son capaces de formar emulsiones finas de aceite en agua cuando se introducen en medio acuoso bajo agitación suave.

Objetivo general: Desarrollar un método analítico de validación para la evaluación del desempeño de una formulación de itraconazol cápsulas basadas en un sistema autoemulsificable.

Metodología: Se realizó una investigación de tipo experimental para desarrollar la validación de un método analítico a un SEDDS de itraconazol donde se manipulan las variables. Esta posee un enfoque cuantitativo experimental, a través de los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite cuantificación, especificidad y perfiles de disolución, tanto al sistema como al método, con el fin de estandarizar el desempeño de cápsulas de itraconazol basadas en un sistema autoemulsificable.

Resultados: Los parámetros evaluados se dan en respuesta del área del estándar (itraconazol), en donde se demuestra que existe linealidad, tanto del sistema como del método, por lo que está conforme a los criterios de aceptación; en cuanto a exactitud y precisión evaluadas en repetibilidad y precisión intermedia, para el sistema y el método, también cumplen con los criterios de aceptación; el límite de detección y cuantificación también cumplen con los criterios en linealidad y, para el método, el parámetro de especificidad no se logró evaluar por no contar con la fórmula cuali-cuantitativa del medicamento de referencia.

Conclusiones: Se valida el método por medio de parámetros de cuantificación. Pese a que la formulación de itraconazol basada en un sistema autoemulsificable no fue la esperada en cuanto al porcentaje liberado de fármaco, no se logró estandarizar el desempeño de esta formulación; sin embargo, se demostró que el método propuesto es lineal, preciso y exacto tomando como base las guías internacionales de validación de métodos analíticos para la validación del método propuesto para la cuantificación de itraconazol, obteniendo resultados conformes según las especificaciones establecidas.

IV. Tabla de contenidos

I. Resumen	II
II. Agradecimientos.....	IV
III. Dedicatoria.....	V
IV. Tabla de contenidos.....	VI
V. Lista de tablas.....	XIV
VI. Lista de figuras.....	XVI
VII. Lista de gráficos.....	XVII
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Introducción.....	2
1.2 Planteamiento del Problema	3
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
1.4 Justificación	6
1.5 Antecedentes.....	10
1.5.1 Antecedentes Históricos	10
1.5.2 Antecedentes Internacionales	12
1.5.3 Antecedentes Nacionales.....	15
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1 Solubilidad y la influencia en la Biodisponibilidad de un Fármaco.....	18
2.2 Itraconazol.....	18

2.2.1 Biodisponibilidad del Itraconazol.....	20
2.2.2 Solubilidad del itraconazol.....	20
2.2.3 Propiedades farmacológicas del Itraconazol	21
2.2.3.1 Uso de Itraconazol en infecciones fúngicas.....	21
2.2.3.2 Interacciones de Itraconazol	22
2.2.3.3 Cmax de Itraconazol.....	22
2.2.3.4 Unión a proteínas e Itraconazol.....	22
2.2.3.5 Eliminación de Itraconazol.....	23
2.1. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.....	2
2.2 Desempeño de una formulación.....	24
2.2.1 Ensayo de disolución.....	24
2.2.2 Ensayo de potencia.....	24
2.2.3 Ensayo de uniformidad de unidades de dosificación.....	25
2.2.4 Estabilidad.....	26
2.2.5 Incertidumbre de la medición.....	26
2.2.6 Materia Prima.....	27
2.2.7 Calidad del producto farmacéutico.....	27
2.2.8 Impurezas Orgánicas Farmacéuticas.....	28
2.3. Producto de referencia.....	28
2.3.1 Estándar de referencia.....	28
2.4 Sistema autoemulsificable.....	29
2.4.1 Formulaciones a base de lípidos.....	29
2.4.1.1 Clasificación de Sistemas de lípidos.....	29
2.4.2 Sistemas de dispersión.....	30

2.4.3 Escala HLB.....	32
2.4.4 Agentes tensioactivos.....	33
2.4.4.1 Propiedades de los tensioactivos.....	33
2.4.4.2 Surfactantes catiónicos.....	35
2.4.4.3 Tensioactivos no iónicos naturales.....	35
2.4.4.4 Tensioactivos no iónicos sintéticos.....	35
2.4.4.5 Surfactantes anfóteros.....	35
2.4.5 Sistema de administración de Fármacos Autoemulsificables.....	36
2.4.5.1 Mecanismo de SEDDS.....	37
2.4.6 Importancia de los SEDDS en una emulsión.....	39
2.4.6.1 Aumento de la permeabilidad del fármaco	39
2.4.6.2 Mejora en la solubilidad a nivel intestinal.....	39
2.4.7 Optimización de la formulación de los SEDDS.....	40
2.4.8 Factores que afecta los SEDDS.....	40
2.5 Desarrollo de un método analítico.....	41
2.6 Procedimiento analítico.....	42
2.7 Validación de un método analítico.....	44
2.7.1 Parámetros estadísticos	45
2.7.1.1 Linealidad	45
2.7.1.1.1 Coeficiente de Correlación (r).....	45
2.7.1.1.2 Pendiente.....	46
2.7.1.1.3 Intercepto.....	46

2.7.1.2	Precisión	47
2.7.1.2.1	Precisión Intermedia	47
2.7.1.2.2	Repetibilidad.....	47
2.7.1.2.3	Repetibilidad Instrumental.....	48
2.7.1.2.4	Repetibilidad del Método.....	48
2.7.1.3	Exactitud.....	48
2.7.1.4	Reproducibilidad.....	49
2.7.1.5	Limite de detección y cuantificación.....	49
2.7.1.5.1	El Rango Dinámico Lineal (RDL).....	50
2.7.1.6	Especificidad.....	50
2.7.1.7	Idoneidad del Sistema.....	51
2.7.1.8	Sensibilidad analítica.....	52
2.7.1.9	Coefficiente de Variación.....	52
2.7.2	Tipos de Validación.....	52
2.7.2.1	Validación prospectiva.....	52
2.7.2.2	Validación Retrospectiva.....	53
2.7.2.3	Validación Simultánea.....	53
2.2.1.1	Revalidación.....	53
2.7.3	¿Dónde se aplica una validación?.....	53
2.7.3.1	Términos relacionados con la validación de técnicas analíticas.....	54

2.7.3.1.1	Sistema de calidad.....	54
2.7.3.1.2	Garantía de la calidad.....	55
2.7.3.1.3	Control de calidad.....	55
2.7.3.1.4	Buenas prácticas de manufactura (BPM).....	56
2.7.3.2	Farmacopea.....	56
2.8	Importancia de Validar Métodos Analíticos.....	57
2.9	Guías de Validación en Costa Rica.....	58
2.9.1	Guía de EMA.....	58
2.9.2	Guía FDA.....	59
2.9.3	Guía MINSA.....	59
2.10	Condiciones de operación del cromatógrafo líquido de alta resolución.....	60
2.10.1	Filtración.....	60
2.10.2	Aspectos que se deben tomar en cuenta para la validación analítica por medio de cromatografía de alta resolución HPLC.....	61
2.10.2.1	Curva de calibración.....	61
2.10.2.2	Sensibilidad.....	61
2.10.2.3	Intervalo.....	61
2.10.2.4	Especificación.....	61
2.10.2.5	Aptitud del sistema.....	62
2.10.3	Calibración de equipos.....	63
2.10.3.1	Calibración del equipo HPLC.....	63
2.10.4.1	Componentes del Sistema Cromatográfico.....	64
2.10.4.1	Fase estacionaria.....	65

2.10.4.2	Columna cromatográfica.....	65
2.10.4.3	Fase Móvil.....	65
2.10.4.4	Aparato.....	66
2.10.5	Problemas más comunes encontrados en HPLC.....	68
2.10.5.1	Presión Alta Posible causa.....	68
2.10.5.2	Pérdida de la Resolución.....	68
2.10.5.3	Picos Hendidos.....	68
2.10.5.4	Variación en los Tiempos de Retención.....	69
2.10.5.5	Variaciones de la Línea Base.....	69
2.10.6	Parámetros cromatográficos para técnicas propias.....	69
2.10.5.1	Coefficiente de variación (CV).....	69
2.10.5.2	Número de platos teóricos.....	70
2.10.5.3	Factor de asimetría o Cola.....	70
2.10.6	Regente farmacéutico a cargo de la validación.....	70
2.10.7	Importancia del ensayo de disolución.....	71
2.10.8	Criterios de aceptación.....	72
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....		73
3.1	Tipo de investigación.....	74
3.2	Fuentes de información.....	74
3.3	Criterios de búsqueda.....	75
3.4	Criterios de inclusión y exclusión.....	76
3.5	Análisis de la información.....	77
3.7	Población y muestra.....	79

3.8 Descripción del procedimiento de recolección y análisis de datos.....	79
3.8.1 Validación del sistema.....	79
3.8.1.1 Linealidad e intervalo del sistema.....	79
3.8.1.2 Precisión y exactitud del sistema.....	81
3.8.1.4 Límite de detección (LOD) y Limite de cuantificación (LOQ) (Ministerio de Salud [MINSa] 2005a).....	83
3.8.2 Validación del método.....	83
3.8.2.1 Linealidad del método.....	84
3.8.2.2 Exactitud del método.....	85
3.8.2.3 Precisión del método.....	87
3.8.3 Especificidad.....	88
3.8.4 Perfiles de disolución comparativo (PDC).....	89
3.8.5 Criterios de evaluación.....	90
3.8.6 Evaluación de correlación entre ensayo de disolución y PDC.....	90
3.8.7 Metodología para el Estudio de Disolución.....	91
3.8.7.1 Descripción del estudio de disolución.....	91
3.9 Condiciones.....	91
3.10 Descripción de instrumentos y técnicas.....	92
3.10.2 Técnica.....	93
3.11 Materiales, equipos y condiciones	94
3.11.1 Materiales.....	94
3.11.2 Equipos.....	94
3.11.3 Condiciones.....	94

3.13 Diseño de Experimentos.....	95
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	96
4.1 Validación del Sistema.....	97
4.1.1 Linealidad del sistema.....	98
4.1.2 Exactitud y Precisión.....	99
4.1.2.1 Evaluada en Repetibilidad.....	99
4.1.2.2 Evaluada en Precisión Intermedia.....	100
4.1.3 Límite de detección (LOD) y Limite de cuantificación (LOQ).....	101
4.2 Validación del Método Analítico.....	101
4.2.1 Selectividad.....	101
4.2.2 Linealidad del Método.....	102
4.2.3 Exactitud y Precisión.....	105
4.2.3.1 Evaluada en Repetibilidad.....	105
4.2.4 Especificidad.....	107
4.2.5 Perfiles de disolución comparativo (PDC).....	108
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	110
5.1 Conclusiones.....	111
5.2 Recomendaciones.....	112
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
6.1 Referencias Bibliográficas.....	115
CAPÍTULO VII. ANEXOS.....	128
7.1 Anexo 1.....	129
7.2 Anexo 2. Validación del sistema analítico.....	137

7.3 Anexo 3. Validación del método analítico.....	143
---	-----

V. Lista de tablas

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los distintos sistemas de liberación de fármacos.....	31
Tabla 2. Características físicas de distintos sistemas de liberación de fármacos.....	32
Tabla 3. Parámetros requeridos para la validación.....	43
Tabla 4. Parámetros para evaluar en un Sistema HPLC.....	64
Tabla 5. Criterios de búsqueda	75
Tabla 6. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de artículos	76
Tabla 7. Diluciones del estándar para elaborar la curva de calibración	80
Tabla 8. Diluciones de la preparación de valoración con adición de solución madre estándar para elaborar la curva de calibración	84
Tabla 9. Diluciones de la preparación de valoración con adición de solución madre estándar para elaborar la curva de calibración	86
Tabla 10. Condiciones del ensayo de disolución para itraconazol de referencia en medio agua destilada.....	91
Tabla 11. Resultados del análisis de varianza de la regresión lineal del sistema para el itraconazol	98
Tabla 12. Resumen de los datos de repetibilidad para el sistema analítico del itraconazol	100
Tabla 13. Resumen de los datos de precisión intermedia para el sistema analítico de itraconazol	100
Tabla 14. Resumen de los datos de LOD y LOQ para el sistema analítico de itraconazol	101
Tabla 15. Resultados del análisis de varianza de la regresión lineal del método analítico para el itraconazol.....	104
Tabla 16. Resumen de los datos de repetibilidad para el método analítico del itraconazol	106
Tabla 17. Resumen de los datos de precisión intermedia del método analítico del itraconazol	106
Tabla 18. Ensayo de disolución.....	108
Tabla 19. Niveles de evidencia.....	130
Tabla 20. Datos de linealidad del sistema para el itraconazol.....	136
Tabla 21. Datos obtenidos para el análisis de la homocedasticidad para el itraconazol ...	138
Tabla 22. Datos de exactitud y precisión del sistema evaluado en repetibilidad para la evaluación de los parámetros a validar del itraconazol	141
Tabla 23. Datos de exactitud y precisión del sistema evaluado en precisión intermedia para la evaluación de los parámetros a validar del itraconazol	142

Tabla 24. Datos de linealidad del método analítico para el itraconazol.....	144
Tabla 25. Datos obtenidos para el análisis de la homocedasticidad del método analítico del itraconazol	145
Tabla 26. Datos de exactitud y precisión del método analítico evaluado en repetibilidad para la evaluación de las cápsulas de itraconazol.....	146
Tabla 27. Datos de exactitud y precisión del método analítico evaluado en precisión intermedia para la evaluación del itraconazol	148

VI. Lista de figuras

Figura 1. Mecanismo de acción del itraconazol	19
Figura 2. Digestión de lípidos en el tracto gastrointestinal	38
Figura 3. Esquema de un cromatógrafo de líquidos	¡Error! Marcador no definido.
Figura 4. Cromatograma de unas muestras de itraconazol a una concentración cercana a 1 $\mu\text{g/mL}$	102
Figura 5. Espectro del blanco libre de interferencias	107
Figura 6. Estándar de itraconazol, pureza 101,2 %	149
Figura 7. HPLC modelo YL9100 y YL9150 utilizado en el método de validación.....	150
Figura 8. HPLC modelo YL9100 y YL9150 utilizado en el método de validación.....	150
Figura 9. Disolutor a los 10 min de haber iniciado con las cápsulas de itraconazol	151
Figura 10. Cápsula de itraconazol ya disuelta en un medio de ácido clorhídrico 1M con lauril sulfato	152
Figura 11. Acetonitrilo utilizado para la fase móvil, grado HPLC.....	152

VII. Lista de gráficos

Gráfico 1. Linealidad de las tres curvas del Itraconazol.....	97
Gráfico 2. Representación de residuales de la linealidad del sistema del itraconazol.....	99
Gráfico 3. Linealidad de las tres curvas de las cápsulas de itraconazol	103
Gráfico 4. Representación de residuales de la linealidad del método analítico de itraconazol	105

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

En la presente investigación se pretende desarrollar un método analítico que permita evaluar el desempeño de una formulación de itraconazol cápsulas basadas en un sistema autoemulsificable, el cual es un antifúngico triazólico, dirigido al desarrollo de un agente antifúngico de amplio espectro con actividad in vivo documentada contra dermatofitos. Los métodos analíticos que se emplean en el control de la calidad y los estudios de estabilidad de medicamentos deben ser previamente validados para obtener pruebas documentales de la confiabilidad de estos para su posterior empleo. Constituye, además, una exigencia por parte del ente regulador en Costa Rica, el Ministerio de Salud, la evaluación del desempeño del método aplicado en la valoración del principio activo, así como la evaluación del método aplicado en el ensayo de disolución de las tabletas¹.

Con este método se pretende optimizar las condiciones cromatográficas que permitan la evaluación del desempeño de las cápsulas de itraconazol con un sistema autoemulsificable con el fin de mejorar las condiciones de operación del cromatógrafo líquido de alta resolución; además, validar la metodología para la evaluación del desempeño de las cápsulas de itraconazol con un sistema autoemulsificable por medio de los siguientes parámetros estadísticos: linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación. Asimismo, utilizar el método de análisis desarrollado y validado para realizar la comparación del rendimiento y calidad de la formulación contra el producto de referencia¹.

Las cápsulas de itraconazol son la única forma farmacéutica en la actualidad; sin embargo, su velocidad de disolución por vía oral es crítica. En fármacos poco solubles, esta situación ha supuesto un gran problema, ya que al disminuir la velocidad de disolución, disminuye también la biodisponibilidad del fármaco².

Para que los fármacos sean absorbidos, deben estar previamente disueltos. De esta forma, una vez disueltos se produce su paso al sistema sanguíneo. Por lo tanto, se formuló itraconazol por medio de un sistema autoemulsificable³.

1.2 Planteamiento del problema

El aumento de la población en riesgo de padecer infecciones fúngicas invasoras han contribuido al notable incremento de su incidencia en los últimos años, constituyendo un problema de salud pública en todo el mundo. Las infecciones fúngicas pueden propagarse a través de la sangre, causando enfermedad diseminada con afectación frecuente de la piel. La resistencia a los antifúngicos puede ser definida tanto desde un punto de vista microbiológico como clínico. En función de las características particulares de cada microorganismo, la resistencia microbiológica y la resistencia antifúngica clínica es aquella que ocurre cuando hay crecimiento o ausencia de inhibición de un hongo en el foco de infección del paciente, aunque en el mismo existan concentraciones terapéuticas de un fármaco con actividad in vitro frente al agente etiológico de la infección. La resistencia microbiológica de un hongo está asociada a la baja sensibilidad in vitro de este frente a un antifúngico y se determina mediante los puntos de corte establecidos para cada patógeno fúngico. En este caso, la resistencia depende del antifúngico, de los factores relacionados con el paciente o de ambos, más que del microorganismo que produce la infección⁴.

En este caso, la investigación se basa en el itraconazol, el cual es un antifúngico fungicida de amplio espectro que actúa frente a dermatofitos, candidas y pitiriasis. Su administración sistémica es exclusivamente oral. Se metaboliza en el hígado y su excreción se produce principalmente a nivel cutáneo. La biodisponibilidad de las cápsulas de itraconazol que actualmente se encuentran en venta a nivel del mercado de Costa Rica está disminuida por la baja disolución del principio activo. Siendo el proceso de absorción el componente fundamental sobre el que se cimienta este sistema, es necesario considerar lo que le sucede al medicamento cuando es administrado por vía oral. La biodisponibilidad sistémica de un fármaco depende de la fracción absorbida y del metabolismo intestinal o hepático que pueda darse. Esta fracción absorbida corresponde a la cantidad de fármaco que pasa del lumen intestinal al torrente sanguíneo y que puede ser obtenida a partir de las concentraciones plasmáticas o estimadas a partir de valores de permeabilidad. Este paso del fármaco del sitio de administración a la sangre involucra su absorción, definida a su vez por los procesos de disolución y permeación de este⁴.

Existen muchos factores del tracto genital inferior (TGI) que limitan tanto la velocidad de disolución de un fármaco como su velocidad de permeación. Esto es especialmente crítico para fármacos poco solubles en agua, para los cuales la solubilidad puede verse influida por variables como el volumen de los fluidos gastrointestinales, el pH y la presencia de sales biliares y alimentos. Por lo tanto, mejorar la absorción de los fármacos administrados oralmente es el punto clave para resolver el problema de la baja biodisponibilidad, en este caso, del itraconazol, por cual se elabora una nueva formulación basada en un sistema autoemulsificable. Este proceso de emulsión automicrométrica está relacionado con la energía libre; es decir, la energía libre de la emulsión convencional es una función directa de la energía esencial para crear una nueva superficie entre las fases de aceite y agua⁵.

El fenómeno de la disolución implica convertir el fármaco en un soluto, que, hasta aquel momento, era un sólido contenido en una forma agregada. La prueba de disolución de medicamentos se realiza bajo condiciones controladas y medidas de temperatura, velocidad de agitación, método de agitación, tiempo de disolución, volumen y tipo de medio de disolución⁶. La prueba de disolución se aplica a tabletas y cápsulas con cualquier potencia, y se realiza en un equipo de disolución especial, diseñado exclusivamente para disolución de medicamentos; además, los métodos para llevar a cabo la prueba son establecidos por la US Pharmacopeia (USP) u otra farmacopea en el caso de los productos oficiales, y por las propias casas fabricantes en el caso de productos no oficiales³.

De este modo, la principal problemática que atañe a la presente investigación recae sobre la siguiente interrogante: ¿Cuáles especificaciones de calidad y desempeño debe cumplir la formulación de itraconazol autoemulsificable para demostrar ser mejor en cuanto a la cantidad de principio activo disuelto en comparación con la forma farmacéutica original en cápsula?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Desarrollar un método analítico de validación para la evaluación del desempeño de una formulación de itraconazol cápsulas basadas en un sistema autoemulsificable.

1.3.2 Objetivos Específicos

Optimizar las condiciones de operación del cromatógrafo líquido de alta resolución para la evaluación del desempeño de las cápsulas de itraconazol con un sistema autoemulsificable.

Validar la metodología para la evaluación del desempeño de las cápsulas de itraconazol con un sistema autoemulsificable por medio de los siguientes parámetros estadísticos: linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación.

Aplicar el método de análisis desarrollado y validado en el de desempeño de la formulación de cápsulas de itraconazol de un sistema autoemulsificable para su comparación contra el producto de referencia.

1.4 Justificación

La baja solubilidad y velocidad de disolución de los fármacos es una limitación para el transporte y la absorción oral, por lo tanto, presentan una baja biodisponibilidad. Por lo que los sistemas autoemulsificables son una clase importante de materiales farmacéuticos que pueden mejorar las propiedades fisicoquímicas de un fármaco mejorando su solubilidad y la velocidad de disolución, los cuales son los parámetros clave para el efecto terapéutico de un fármaco. Se sabe que la solubilidad es uno de los parámetros más importantes para alcanzar la concentración deseada del fármaco en la circulación sistémica de la respuesta farmacológica, más de 92% de los fármacos enumerados en la Farmacopea de los Estados Unidos presentan mala solubilidad. Además, se reconoce que, en general, en la industria farmacéutica, más del 40% de las drogas recién descubiertas muestran la misma desventaja⁶.

Dentro de los enfoques explorados para aumentar la biodisponibilidad oral de los fármacos poco solubles en agua, las formulaciones basadas en lípidos son una valiosa alternativa que ha probado ser eficiente, por lo cual ha recibido mucha atención en el campo de la investigación. Estas formulaciones han sido investigadas desde hace aproximadamente 50 años. Existen formulaciones lipídicas y emulsiones de sulfonamidas que fueron descritas en la década de 1950 y en la década de 1970 se realizaron estudios más detallados relacionados al uso de lípidos para mejorar la absorción de los fármacos. El interés por el uso de los lípidos fue motivado por los efectos positivos (dilución, solubilidad, transporte y biodisponibilidad de los compuestos ingeridos por vía oral) mostrados en la administración concomitante de los medicamentos con alimentos ricos en grasas. Las formulaciones basadas en lípidos abarcan una amplia gama de composiciones que van desde formulaciones liposomales, depósitos lipídicos subcutáneos, emulsiones, soluciones micelares, microemulsiones, sistemas autoemulsificables, hasta cremas o lociones tópicas⁶.

Los sistemas autoemulsificables se pueden definir como mezclas isotrópicas de aceites naturales o sintéticos ya sea tensioactivos en algunas ocasiones cosolventes y un principio activo, que son capaces de formar emulsiones finas de aceite en agua cuando se introducen en medio acuoso bajo agitación suave. La motilidad del tracto gastrointestinal proporciona la agitación necesaria para la autoemulsificación, por lo cual estos sistemas emulsionan espontáneamente al exponerse a los fluidos gastrointestinales. Las potenciales

ventajas que ofrecen estos sistemas incluyen: una biodisponibilidad oral aumentada, posibilidad de reducción en la dosis, perfiles de absorción del fármaco más reproducibles, evitar el metabolismo de primer paso hepático, orientación selectiva del fármaco a sitios de absorción específica en el tracto gastrointestinal, control en los perfiles de entrega, variabilidad reducida, protección del fármaco (ambiente hostil en el tracto gastrointestinal y fármacos sensibles), mayor capacidad de carga del fármaco y, finalmente, selección de formas de dosificación sólidas y líquidas⁷.

Los sistemas autoemulsificables sólidos (S-SEDDS, por sus siglas en inglés) además son formas de dosificación sólidas con propiedades autoemulsificables resultantes de la transformación de formulaciones líquidas o semisólidas en partículas sólidas. Los S-SEDDS combinan las ventajas de los SEDDS, es decir, solubilidad y biodisponibilidad mejorada con las ventajas de las formas de dosificación sólidas como lo son: mejor estabilidad, costos de producción relativamente bajos, facilidad en el manejo y almacenamiento, dosificación más precisa, y mejor control en el proceso de producción. Entre las técnicas más utilizadas de solidificación de SEDDS se encuentran: secado por atomización, granulación por fusión, extrusión por esferonización y adsorción a carriers sólidos, entre otras⁷.

El presente trabajo de investigación se va a realizar mediante una prueba de disolución in vitro, la cual es la prueba que se realiza a los medicamentos sólidos orales (tabletas y cápsulas), por medio de condiciones creadas en el laboratorio. La disolución es una práctica que consiste en dispersar una sustancia en el seno de un líquido hasta nivel molecular o iónico” o en términos más simples, es el proceso mediante el cual un sólido se disuelve en un solvente y forma una solución. La prueba, generalmente requiere de una sola medición y sus resultados se expresan en términos del tiempo requerido para que una fracción específica del medicamento presente se disuelva. Este fenómeno de la disolución implica convertir el fármaco en un soluto, que, hasta aquel momento, era un sólido contenido en una forma agregada. La prueba de disolución de medicamentos se realiza bajo condiciones controladas y medidas de temperatura, velocidad de agitación, método de agitación, tiempo de disolución, volumen y tipo de medio de disolución. La naturaleza del medio de disolución debe ser considerado de manera que este disuelva bien la droga y el tipo de medio de disolución ya ha sido establecido para cada forma farmacéutica (tabletas o cápsulas) que haya sido incluida

dentro de la farmacopea oficial, pero es bueno mencionar que este se selecciona luego de realizar los estudios y las pruebas pertinentes que indiquen cuál es el medio de disolución que mejor se ajusta a la solubilidad de la droga y cuál proporciona, en determinado momento, las condiciones similares a las del estómago en cuanto a acidez u otras variables. Esta prueba se realiza con el fin de verificar que el principio activo se disuelva a lo menos, el mínimo permisible según las especificaciones de la monografía individual de cada medicamento, que encontramos en la farmacopea oficial⁷.

La prueba de disolución se aplica a tabletas y cápsulas con cualquier potencia, y se realiza en un equipo de disolución especial, diseñado exclusivamente para disolución de medicamentos; además, los métodos para llevar a cabo la prueba son establecidos por la USP u otra farmacopea en el caso de los productos oficiales y por las propias casas fabricantes, en el caso de productos no oficiales. La prueba consiste en determinar la cantidad de principio activo que se disuelve, velocidad de agitación (de las paletas o canastas en revoluciones por minuto) y el tiempo de disolución. Al finalizar el tiempo de prueba, se toma determinado volumen de muestra de cada uno de los vasos de disolución, se filtra, se ajusta la concentración a la indicada en la farmacopea y se comparan con un estándar a una concentración similar a la de las muestras, utilizando alguna técnica instrumental cuantitativa que sea aplicable⁸.

Los métodos analíticos son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica para la identificación y cuantificación de los componentes activos, impurezas y productos de degradación en materias primas y formas terminadas, así como para la determinación de propiedades específicas que influyen en la acción del producto, como la disolución y la velocidad de liberación. Para garantizar que los análisis se realicen con la exactitud y precisión requeridas, los métodos descritos en las farmacopeas se encuentran validados⁸.

No obstante, tanto la variación de los excipientes utilizados en formas terminadas específicas como la introducción de una nueva sustancia activa conduce necesariamente a la validación del método analítico. Este proceso permite, además, la detección de puntos débiles en el método, lo que posibilita su desarrollo y puesta a punto⁹.

Por otro lado, los azoles, atendiendo a su estructura química, pueden agruparse en dos subgrupos: el formado por el itraconazol y el posaconazol. Los azoles se eliminan a través del metabolismo en el que intervienen, de forma decisiva, algunas de las isoenzimas del CYP450. El itraconazol se transforma en tres metabolitos: el hidroxí-itraconazol, el keto-itraconazol y el N-desalquil-itraconazol, todos ellos provistos de capacidad para inhibir la actividad de la CYP3A4. El itraconazol tiene una semivida de 34 a 48 horas; este no muestra en su farmacocinética cambios dependientes de la presencia de alteraciones de la función renal, por lo que no precisa ajuste de la dosis. La formulación intravenosa contiene hidroxipropil- β -ciclodextrina, solubilizante que se elimina a través de la filtración glomerular, que potencialmente podría producir alteraciones renales¹⁰.

1.5 Antecedentes

5.1 Antecedentes Históricos

Rojas et al.,¹¹ en su estudio experimental, desarrollaron y validaron un método analítico (HPLC-RP) para la determinación de levamisol. Una vez optimizado el proceso de separación, se procedió a validar el método analítico propuesto, para lo cual se estudiaron los siguientes parámetros: selectividad, linealidad del sistema y del método, precisión, exactitud, límites de detección y de cuantificación y solidez. Los cromatogramas obtenidos con las fases móviles que contenían ácido hexano sulfónico 0.005 M presentaban asimetría, mientras que con la fase móvil No.2 el tiempo de retención del levamisol era muy próximo al del solvente. La fase móvil No.5 produjo los mejores resultados, presentando el levamisol un tiempo de retención de 2.52 minutos y un factor de asimetría de 1.31. Un método de análisis preciso, exacto, sólido y reproducible fue desarrollado y validado para la determinación cuantitativa de levamisol en productos para uso veterinario como parte de su control de calidad. El método es selectivo frente a los auxiliares de formulación y productos de descomposición, pero no discrimina entre levamisol y dexamisol, isómero dextro del primero.

Montoya et al.,¹² en su estudio experimental, Validaron un método cromatográfico y determinaron sulfatos en productos de corrosión atmosférica del zinc expuesto en ambientes de SO₂ y NO₂. Se emplearon como técnicas instrumentales la microscopía electrónica de barrido con microsonda de rayos X (SEM/EDX) para establecer la morfología y la determinación cualitativa elemental de los productos de corrosión, y la cromatografía de intercambio iónico (IC) para cuantificar los sulfatos. Antes de efectuar los análisis cromatográficos se evaluaron una serie de parámetros para validar el método y tener la certeza estadística de su utilidad en la cuantificación de sulfatos: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y límite de detección. Los resultados obtenidos muestran que cuando el metal se expone en un ambiente de SO₂ y NO₂, la formación de sulfatos tiene tendencia creciente con relación al tiempo de exposición, reflejándose un efecto sinérgico de ambos contaminantes sobre el proceso de formación de sulfatos en la superficie metálica si se compara con los resultados obtenidos en atmósferas de solo SO₂. Una vez validado el método cromatográfico para determinar sulfatos en productos de corrosión del zinc, se obtuvo evidencia estadística suficiente para comprobar que el método desarrollado

es apto para cuantificar este analito de una manera confiable en los niveles de concentración encontrado.

Grant et al.,¹³ en su estudio de revisión bibliográfica, realizaron una revisión de las propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas y uso terapéutico en micosis superficiales y sistémicas del itraconazol. En ensayos clínicos no comparativos, se demostró que el itraconazol es extremadamente eficaz en una amplia gama de infecciones fúngicas superficiales y más graves, "profundas", cuando se administra una o dos veces al día. Los resultados preliminares también indican que el itraconazol puede resultar prometedor para la profilaxis de las infecciones fúngicas oportunistas en pacientes de riesgo. En los estudios realizados hasta la fecha, el itraconazol ha sido muy bien tolerado. Se produjeron cambios transitorios en los índices de función hepática en 1 a 2% de los pacientes; sin embargo, no se ha informado disfunción hepática sintomática. Por lo tanto, aunque varios aspectos del perfil del fármaco requieren más investigación, el itraconazol es un nuevo tratamiento oral prometedor para la enfermedad fúngica.

Haría et al.,¹⁴ en su estudio de referencias bibliográficas, reevaluaron las propiedades farmacológicas y uso terapéutico en el manejo de infecciones fúngicas superficiales del itraconazol. Los regímenes más nuevos de itraconazol intermitentes y de corta duración con dosis más altas no se han evaluado en estudios comparativos. Los estudios disponibles muestran que la eficacia del itraconazol parece ser mayor que la de la griseofulvina, pero similar o menor que la de la terbinafina en pacientes con onicomicosis por dermatofitos o infecciones fúngicas cutáneas. Los resultados de estudios comparativos indican que itraconazol 100 mg/día administrado durante 2 a 4 semanas parece tener mayor eficacia que griseofulvina 500 mg/día en varias infecciones de tiña. Los resultados preliminares también muestran que la eficacia de itraconazol 100 mg/día puede ser similar o inferior a la de terbinafina 250 mg/día o fluconazol 50 a 100 mg/día cuando se administran hasta por 1 mes. Se requieren estudios futuros que utilicen regímenes de dosificación comparables (incluidos esquemas de dosificación más altos a corto plazo) para confirmar estas tendencias. Además, la eficacia del itraconazol puede ser similar o inferior a la del fluconazol en el tratamiento de las micosis cutáneas. Los datos comparativos de pacientes con candidiasis

vaginal aguda sugieren que el itraconazol es, al menos, tan efectivo como el clotrimazol intravaginal y el fluconazol oral, y superior al econazol intravaginal.

Contreras et al.,¹⁵ en su estudio experimental, validaron un método analítico por HPLC para la cuantificación del principio activo en tabletas de Controfilina-200. Teofilina monohidratada (estándar referencia del Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos, Ciudad de La Habana) y acetaminofén (empleado como estándar interno) (estándar referencia del Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos. Teofilina monohidratada (materia prima valorada). Acetaminofén (materia prima valorada). Tabletillas Controfilina-200 (lote industrial, Laboratorios Medsol, Ciudad de La Habana). Acetonitrilo, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, peróxido de hidrógeno y sulfato de cobre (reactivo, BDH). Agua destilada. Metanol comercial (bidestilado).¹⁵ Los resultados en la evaluación de la especificidad del método permiten afirmar que el analítico evaluado es específico para la teofilina, ya sea para muestras sin degradar como para muestras degradadas. Por lo tanto, puede emplearse para la valoración de las tabletas de Controfilina-200, así como en los estudios de estabilidad. El método analítico propuesto para la cuantificación del principio activo en las tabletas de teofilina de acción sostenida (Controfilina-200) puede ser empleado para la valoración del principio activo en las tabletas de Controfilina-200, así como en los estudios de estabilidad de las tabletas. Es lineal, preciso y exacto en los intervalos de concentración evaluados y cumple con los criterios de aceptación establecidos para estos parámetros.

1.5.2 Antecedentes Internacionales

Hernández et al.,¹⁶ en su estudio experimental, validaron un método analítico de determinación de dopamina por cromatografía líquida de alta resolución. Este método consistió en el procedimiento para la determinación de dopamina por CLAR, que fue validado teniendo en cuenta los parámetros de linealidad, precisión (repetibilidad, reproducibilidad, robustez), exactitud y selectividad. En los resultados de este se puede observar un máximo de absorción a 280 nm, por lo que los análisis empleando CLAR se realizaron a esta longitud de onda. La absorbancia fue mínima en el intervalo de los 300-600 nm. El cromatograma obtenido para la misma muestra se presenta. El tiempo de retención, ancho y altura del pico cromatográfico son adecuados para realizar la determinación de DA

con el método propuesto, por lo que el método estudiado resulta lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones analizado, lo que permite la determinación de dopamina en solución acuosa.

Huertas et al.,¹⁷ en su estudio experimental, desarrollaron un método analítico con el fin de determinar la concentración sérica de iohexol, el cual es un marcador de filtración glomerular. Las muestras para analizar (suero) fueron obtenidas de pacientes diagnosticados con daño renal a los cuales se les administró 5 mL de Ominipaque en una presentación de 350 mg de yodo por mililitro y que se encontraban hospitalizados en el Hospital Juárez, Ciudad de México. En los datos obtenidos de las muestras de suero durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 semanas a una temperatura de -20°C, con las concentraciones baja, media y alta de los puntos control, se obtuvo una cantidad de iohexol dentro del $\pm 15\%$ de la concentración establecida durante estos días de almacenamiento, por lo que el análisis de las muestras es confiable después de este tiempo y bajo estas condiciones. El método desarrollado y validado para la cuantificación de iohexol en suero de humano presentó las ventajas de ser sencillo, económico y permite analizar un mayor número de muestras en un periodo de tiempo corto con respecto a otros métodos reportados en la bibliografía. Este método es capaz de cuantificar el iohexol con precisión y exactitud en muestras séricas de humano de 100 μL . Este método demostró su aplicabilidad en la clínica, ya que cuantifica de forma confiable a un buen marcador de funcionamiento renal.

Sharma et al.,³ en su estudio de referencias bibliográficas, desarrollaron un sistema de administración de fármacos autoemulsionante como estrategia para mejorar la biodisponibilidad oral. A partir de los sitios web de PubMed, HCAplus, Thomson, y sus registros, utilizaron estas como fuentes principales para llevar a cabo la búsqueda de los artículos de investigación más importantes publicados sobre el tema; esta información fue analizada cuidadosamente, poniendo de relieve los resultados más importantes en la formulación y desarrollo de sistemas de administración de fármacos autoemulsionante micro, así como su actividad terapéutica. Esto demostró que el sistema de administración de fármacos autoemulsionante (SMEDDS) ha ganado más atención debido a la mejora que permite la reducción de la biodisponibilidad oral en dosis, perfiles temporales más consistentes de la absorción del fármaco, la orientación selectiva de fármaco o fármacos hacia

la ventana de absorción específica en el tracto gastrointestinal, y la protección del fármaco o de los fármacos desde el entorno poco receptivo en el intestino. Por lo tanto, este proporciona una visión completa de SMEDDS como un enfoque prometedor para abordar eficazmente el problema de moléculas poco solubles.

Según Cáceres et al.,¹⁸ en su estudio experimental, validaron y estandarizaron en Colombia una metodología basada en HPLC para la determinación de la concentración sérica de posaconazol. Se usó un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia, Agilent, con detector ultravioleta de matriz de diodos y columna analítica Eclipse-XDB-C18. Como estándar primario, se utilizó posaconazol SCH56592 (lote IRQ-PAZ-10-X-103), y como control interno, itraconazol (lote ZR051211PUC921). La validación se hizo teniendo en cuenta los parámetros: selectividad, curvas de calibración, recuperación, exactitud, precisión, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad de la muestra) para este tipo de métodos. Los resultados arrojaron un porcentaje de error relativo en la exactitud, así como el porcentaje del coeficiente de variación en la precisión; estos fueron inferiores al 15%, cumpliendo así con los criterios de aceptación recomendados por la *Food and Drug Administration*. Por ello, se concluye que la selectividad y pureza de la señal cromatográfica obtenida, así como los límites de detección y cuantificación estandarizados, hacen de esta metodología una excelente herramienta para el seguimiento terapéutico de los pacientes bajo tratamiento con posaconazol.

Py-Daniel et al.,¹⁹ realizaron un estudio experimental, en donde desarrollaron un método HPLC-FLD para la cuantificación de itraconazol en nanopartículas de ácido poliláctico-co-glicólico, plasma y tejido. Se preparó una solución madre (1 mg mL⁻¹) de ITZ en tetrahidrofurano y se preparó patrón interno (IS) de itraconazol (1 mg mL⁻¹) en MeOH. Se prepararon soluciones de ITZ (500, 100, 25, 5 y 1 µg mL⁻¹) y IS (20 µg mL⁻¹) como estándares y muestras de control de calidad (QC) para cuantificación en matrices biológicas. Los estándares de la curva de calibración se prepararon en fase móvil y en matrices biológicas. La curva de calibración en fase móvil se obtuvo por el método de dilución en serie a partir de la solución madre y se utilizaron las áreas de ITZ observadas en los cromatogramas. El tiempo de retención de ITZ e IS fue decisivo para la definición de la fase móvil isocrática; el volumen de inyección se definió por factores óptimos de rango de

señal/sensibilidad y se estableció en 10 µL, ya que este volumen resultó en un amplio rango de concentraciones detectables en el mismo método (10-0.01 µg mL⁻¹) con alta sensibilidad. Utilizando el método analítico desarrollado, el tiempo de retención ITZ fue de 7,6 min y el tiempo de retención del estándar interno fue de 9,1 min con 11 min para cada ejecución. El método validado permite la identificación y cuantificación de ITZ en prácticamente todas las etapas de preparación de nanopartículas con una precisión y recuperación adecuadas. La biodistribución preliminar de itraconazol mostró una buena aplicabilidad para los estudios de biodistribución y farmacocinética.

1.5.3 Antecedentes Nacionales

Pérez et al.,²⁰ en su estudio experimental, validaron un método analítico para la cuantificación de acetaminofén en tabletas de 500 mg por espectrofotometría ultravioleta para la prueba de uniformidad de contenido. Para aplicar a la prueba de uniformidad de contenido a tabletas de 500 mg, por la técnica de espectroscopia ultravioleta a una longitud de onda de trabajo de 242 nm, empleando como disolvente ácido clorhídrico a una concentración de 0,1 M, los parámetros evaluados fueron la linealidad, exactitud, repetitividad y precisión intermedia, siguiendo estrictamente la guía y política de validación del Ente Costarricense de Acreditación (ECA), para un método normalizado modificado. Todos los parámetros evaluados arrojaron resultados satisfactorios, por lo que se considera que el método es lineal, preciso y exacto para el fin que se desarrolló; en este caso, para la prueba de uniformidad de contenido en su primera etapa donde la especificación es que el valor de aceptación (AV) calculado no sea mayor a $L1 = 15$, analizando 10 dosis individualmente según la USP 38. Es importante destacar que las pruebas de validación aplicadas fueron superadas con respecto a estrictos criterios de aceptación en comparación con el método oficial de la USP por HPLC para la determinación de contenido u otros métodos por UV con distintas características; se obtuvieron resultados confiables y satisfactorios, y existe suficiente evidencia estadística para indicar que el método validado es adecuado, por lo que se considera lineal, preciso y exacto para la determinación de acetaminofén en la prueba de uniformidad de contenido en tabletas de 500 mg.

Ulate et al.,²¹ en su estudio experimental, validaron un método de detección mediante cromatografía líquida (HPLC-DAD) para la determinación de aloína en productos alimenticios elaborados a partir de sábila (aloe vera). El método de análisis seleccionado para la validación se basó en el descrito por Metcalfe (2002), con modificaciones implementadas en él. Los resultados de los parámetros evaluados durante la validación del método de análisis de aloína muestran la selectividad del método, el cual se determinó con la inyección de los blancos en diferentes días. En total, se inyectaron 40 blancos por triplicado durante el transcurso del experimento, los cuales no dieron señal alguna con el tiempo de retención del analito y no se encontraron datos reportados en las referencias consultadas para este parámetro. Se implementó satisfactoriamente un método de extracción y análisis de la aloína en productos alimenticios por HPLC, tanto para sólidos como para líquidos elaborados a partir de sábila. La evaluación de la calidad analítica del método demostró valores aceptables, tomando como referencia los reportados por otros autores.

Después de una exhaustiva búsqueda, se determinó que no hay mucha información a nivel nacional sobre la validación de métodos analíticos de fármacos antifúngicos y tampoco en relación con los sistemas autoemulsificantes, por lo que aquí se determina la importancia de esta investigación para poder dar a conocer a nivel nacional la importancia de estos.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

2.1 Solubilidad y la influencia en la biodisponibilidad de un fármaco

La mayoría de los fármacos que se comercializan en el mercado farmacéutico tienen en común el problema de deficiente solubilidad, por lo que la mayoría de ellos se encuentran con una biodisponibilidad disminuida cuando se formulan en formas farmacéuticas orales²³.

La solubilidad de estos en agua juega un papel importante, ya que es una propiedad del fármaco presente en su absorción después de la administración oral. La solubilidad del fármaco es una medida de equilibrio, pero también la velocidad de disolución a la que el fármaco sólido o el fármaco de la forma de dosificación pasa a la solución es de vital importancia cuando el tiempo de disolución es limitado ²³.

La escasa solubilidad del fármaco en agua conduce a una escasa biodisponibilidad con amplias variaciones entre sujetos e intra sujetos, por lo que presenta un desafío formular los medicamentos o formas farmacéuticas como vía oral. Estas moléculas poco solubles se pueden clasificar de acuerdo con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), ya sea como clase II o clase IV, sobre lo cual se detallará más adelante ²⁴.

La biodisponibilidad oral de un fármaco depende de la solubilidad acuosa, así como de la permeabilidad de este, la velocidad de disolución, el metabolismo de primer paso y la susceptibilidad a los mecanismos de eflujo. La solubilidad acuosa y la permeabilidad del fármaco también son parámetros importantes atribuidos a la biodisponibilidad oral. Las diminutas gotas formadas de los fármacos solubilizados exhiben una gran superficie interfacial para la absorción del fármaco. El método de sobresaturación y el fenómeno de autoemulsificación se aplican en el sistema de administración de medicamentos ²².

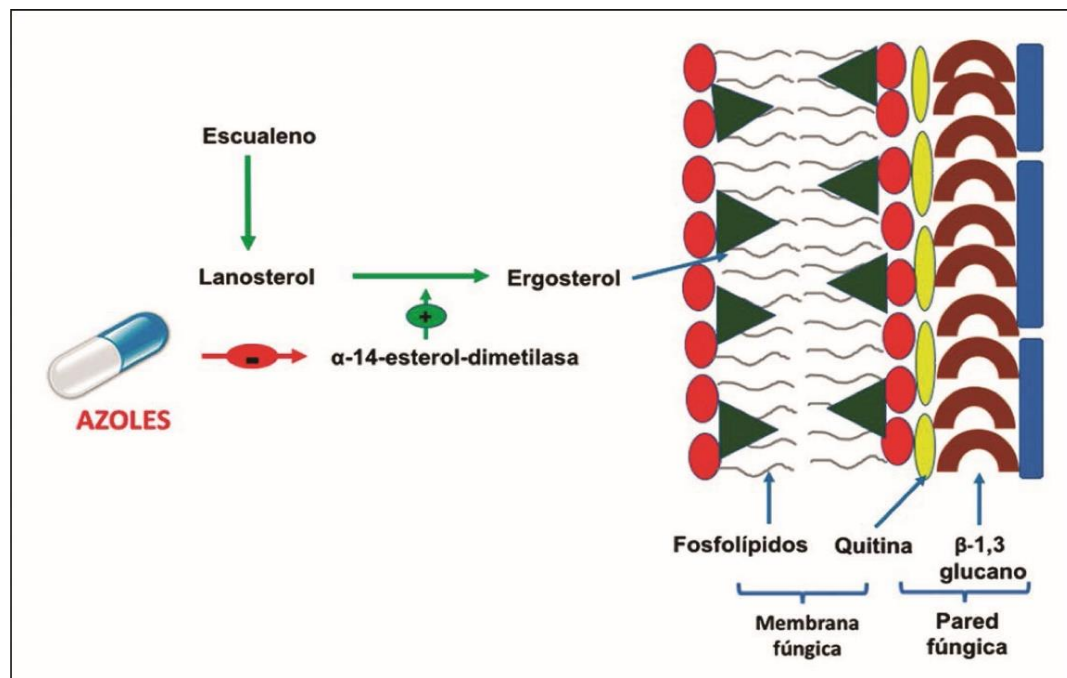
2.2 Itraconazol

Como otros triazoles, este tiene cinco estructuras de anillo que contienen tres átomos de nitrógeno. El itraconazol es un compuesto lipofílico que se distribuye en tejidos grasos y su penetración en fluidos acuosos es limitada. Este fármaco pudiera asociarse con sitios activos de la enzima a través de asociaciones Van der Waals CH_3 del fármaco y CH_3 de la enzima. También, se usa en el tratamiento de infecciones debido a la mayoría de las

levaduras. Su ventaja es su actividad contra la mayoría de los *Aspergillus* y un subconjunto de *Cándida* ²⁵.

Además, posee un mecanismo de acción, como se muestra en la Figura 1, al igual que otros imidazoles antifúngicos, ejerciendo su efecto al alterar la membrana celular del hongo. El itraconazol actúa inhibiendo la síntesis del ergosterol interaccionando con la 14- α -desmetilasa, una enzima del citocromo P450 que es necesaria para la conversión del lanosterol a ergosterol. Por otro lado, se da la reducción de la síntesis de ergosterol, la acumulación de esteroides 14-metilados, los cuales ejercen un efecto perjudicial sobre las propiedades de la membrana y la actividad enzimática unida a la membrana con desregulación de la síntesis de quitina ²⁶.

Figura 1. Mecanismo de acción del itraconazol



Fuente: Elaboración propia con base en la referencia ²⁷.

Esta serie de eventos causan múltiples alteraciones en la célula fúngica como por ejemplo: afecta la permeabilidad celular produciendo pérdida de elementos intracelulares esenciales, así como de electrolitos; altera la estructura y función de los organelos intracelulares; inhiben la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos, además de la actividad

enzimática oxidativa y peroxidativa, dando como resultado un cúmulo intracelular de concentraciones tóxicas de peróxido de hidrógeno, lo cual puede contribuir al deterioro de órganos subcelulares y necrosis celular ²⁸.

2.2.1 Biodisponibilidad del itraconazol

La biodisponibilidad es una cualidad de la forma farmacéutica que en términos absolutos implica la medición de la velocidad y de la cantidad total (extensión) del principio activo que se absorbe en el organismo para llegar a la circulación sistémica a partir de la forma farmacéutica administrada. Este se expresa en porcentaje (%) y se calcula a partir de un gráfico experimental, el cual se confecciona midiendo sus concentraciones plasmáticas en diferentes tiempos transcurridos desde su administración hasta su eliminación; esto con el fin de poder manejar adecuadamente diferentes formulaciones de un mismo fármaco y así conocer las características de la BD de cada formulación y ajustar la dosis en función de esta, a fin de obtener una respuesta farmacológica equivalente ²⁹.

Es por ello que en el caso del itraconazol una de las soluciones a considerar para solubilizar sus compuestos lipófilos es el uso de hidroxipropil- β -ciclodextrina (ciclodextrina). Esta es una ciclodextrina que contiene un anillo de moléculas de glucosa sustituidas que forman una estructura cilíndrica hidrófila por fuera e hidrófoba por dentro. Esta cavidad hidrófoba forma una cámara ideal para moléculas lipofílicas, mejorando así su solubilidad y, por ende, su biodisponibilidad ²⁶.

2.2.2 Solubilidad del itraconazol

La baja solubilidad y velocidad de disolución del itraconazol es una limitación para el transporte y la absorción oral, por lo tanto, presenta una baja biodisponibilidad. Los cocrystalos son una clase importante de materiales farmacéuticos que pueden mejorar las propiedades fisicoquímicas de un fármaco, por lo que el uso de los cocrystalos farmacéuticos para mejorar estas

propiedades se evidencia con un aumento en solubilidad y velocidad de disolución ³⁰.

Además, la solubilidad, disolución y permeabilidad equivalen a la eficacia terapéutica en la formulación de sistemas de administración de fármacos autoemulsificables (SEDDS), los cuales se han destacado en los últimos años como un enfoque alternativo para administrar un fármaco poco soluble en agua a la circulación sistémica, a través de la vía oral. Este nuevo enfoque, basado en lípidos, forma una emulsión del tipo aceite en agua cuando entra en contacto con el fluido gastrointestinal, solubilizando el fármaco lipofílico ³¹.

2.2.3 Propiedades farmacológicas del itraconazol

En referencia a la forma farmacéutica de investigación, cada cápsula de itraconazol contiene 100 mg del principio activo recubiertos sobre pellets. El itraconazol es una base débil y solo se ioniza a un pH bajo; por lo tanto, se requiere acidez gástrica para la disolución del fármaco y la absorción adecuada. En consecuencia, las cápsulas de itraconazol deben tomarse inmediatamente después de una comida completa para una absorción óptima y la absorción disminuye en casos de aclorhidria ³².

A su vez, el itraconazol es lipofílico y se une ampliamente (99,8%) a las proteínas plasmáticas. Su concentración unida a proteínas o tejidos de itraconazol es clínicamente más relevante que la concentración libre del fármaco. A pesar de la alta unión a proteínas plasmáticas, las concentraciones de itraconazol en tejidos como el riñón, el hígado, los huesos, el estómago, el bazo y el músculo son altas. Por otro lado, el itraconazol también se acumula en los tejidos que son propensos a las infecciones por hongos, como la piel, las uñas, los pulmones y el tracto genital femenino. Por lo tanto, la unión extensa a proteínas de itraconazol asegura que su concentración en el sitio de la infección permanezca más alta que la concentración plasmática correspondiente durante varios días ³².

2.2.3.1 Uso de itraconazol en infecciones fúngicas

Las infecciones de tipo fúngicas pueden ser superficiales, subcutáneas y sistémicas, y causan problemas graves en las personas que las padecen. Debido a dicha problemática, se requieren tratamientos para este tipo de infecciones y, por ende, es preferible que la terapia antifúngica se pueda adaptar a las necesidades precisas del paciente individual. Dentro de la gama de medicamentos antifúngicos se encuentra el itraconazol, el cual está disponible en tres formulaciones: cápsulas, solución oral e intravenosa, lo que permite un enfoque flexible para el tratamiento de infecciones causadas por hongos. A su vez, las cápsulas se han utilizado con éxito durante muchos años, especialmente para el tratamiento de infecciones fúngicas superficiales y subcutáneas. Sin embargo, el itraconazol se absorbe de forma inconsistente desde la presentación en cápsulas ²⁶.

2.2.3.2 Interacciones del itraconazol

El itraconazol también puede actuar aumentando la concentración de algunos medicamentos: los antagonistas del calcio (como los derivados de la dihidropiridina), quinidina, midazolam, sirolimus, felodipino, pimozida, sildenafil y otros como ciclosporina; astemizol, cisaprida, simvastatina, atorvastatina, lovastatina, triazolam, warfarina, tracolimus, verapamilo y terfenadina. Cabe señalar que el itraconazol también afecta a los inhibidores de la proteasa del VIH como lo son el ritonavir e indinavir, que incrementan su concentración plasmática. Asimismo, el itraconazol reduce la eficacia de los anticonceptivos orales. Otros fármacos que también se ven afectados son los hipoglucemiantes orales, digoxina, diazepam, busulfano, carbamazepina, alprazolam, docetaxel, buspirona, rifabutina, metilprednisolona, alcaloides de la vinca y trimetrexano. Debido al riesgo de que se presente arritmia cardíaca, se debe evitar la administración concomitante de itraconazol con cisaprida, terfenadina, dofetilida, astemizol, pimozida y quinidina³³.

2.2.3.3 Cmax de itraconazol

Las concentraciones plasmáticas máximas de 100-200 ng/ml se alcanzan de 2 a 4 horas después de una dosis única de 100 mg. Con una biodisponibilidad absoluta del 55%, el itraconazol muestra una farmacocinética dependiente de la dosis después de la administración oral ³⁴.

2.2.3.4 Unión a proteínas e itraconazol

El itraconazol se une en un 99,8% a las proteínas plasmáticas y el 0,2% está disponible libremente para su distribución por el organismo. Como consecuencia, el líquido cefalorraquídeo (LCR), el líquido ocular y la saliva contienen solo cantidades insignificantes de itraconazol. Sin embargo, en fluidos que contienen materia orgánica, como esputo y exudado bronquial, las concentraciones de itraconazol alcanzan los 400 ng/ml, obteniéndose 1000-3000 ng/ml ³⁴.

2.2.3.5 Eliminación de itraconazol

La eliminación de itraconazol es bifásica, con una $t_{1/2}$ de aproximadamente 20 a 24 horas después de una sola dosis. En estado estacionario, el tiempo de vida media aumenta a las 30 horas, lo que indica que el mecanismo de excreción de itraconazol está saturado a dosis clínicas. La mayoría de los metabolitos se eliminan a través de la bilis y la orina, pero el itraconazol no metabolizado no se detecta en la orina. Solo del 3% al 18% de la dosis se detecta en las heces ³⁵.

2.1 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) clasifica los fármacos en función de los parámetros de solubilidad y permeabilidad. Estos dos factores están directamente relacionados con el proceso de absorción. Además, el SCB plantea la posibilidad de sustituir los ensayos in vivo por ensayos de disolución in vitro, de acuerdo con la clasificación obtenida para el fármaco. Es por esto

que esta proyección se dirige hacia su implantación como herramienta en el desarrollo y diseño de nuevos fármacos ³⁶.

En dicho sistema, el itraconazol se describe como clase II, específicamente; esto quiere decir pobre solubilidad y alta permeabilidad. Es probable que la biodisponibilidad de los fármacos de clase II de BCS esté limitada por la tasa de disolución. Sin embargo, debido a su alta permeabilidad, los fármacos BCS de clase II han estado en el centro de las investigaciones de mejora de la solubilidad en los últimos tiempos y se han desarrollado varios enfoques de formulación para esta clase de compuestos ³⁶.

2.2 Desempeño de una formulación

Esta comprende la adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado por medio de la validación de un método analítico, el cual es un procedimiento útil para establecer por medio de pruebas documentadas y mediante estudios sistemáticos, demostrativos de laboratorio, que el método analítico tiene las características de desempeño (exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad) adecuadas para cumplir con los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Un método analítico validado permite el conocimiento de las características de funcionamiento, proporcionando un alto grado de confianza al aplicarlo, siendo lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto a intervalos definidos ³⁷.

2.2.2 Ensayo de disolución

El ensayo de disolución “in vitro” de medicamentos es la prueba que se realiza a los medicamentos sólidos orales como las tabletas y cápsulas, por medio de condiciones creadas en el laboratorio. Esta prueba se realiza con el fin de verificar que el principio activo se disuelva a lo menos, el mínimo permisible según las especificaciones de la monografía individual de cada medicamento, que encontramos en la farmacopea oficial. Es por esto que al finalizar el tiempo

de prueba, se toma determinado volumen de muestra de cada uno de los vasos de disolución, se filtra, se ajusta la concentración a la indicada en la farmacopea y se comparan con un estándar a una concentración similar a la de las muestras, utilizando alguna técnica instrumental cuantitativa que sea aplicable ⁶.

2.2.3 Ensayo de potencia

Se emplea en control de calidad del producto terminado como un criterio de liberación lote a lote. La OMS plantea que los estudios preclínicos (ensayos de potencia, estudios de toxicidad) son herramientas de gran valor para identificar posibles riesgos de la vacunación y establecer posibles protocolos de estudios clínicos, por lo que el ensayo de potencia en ratones, como técnica de control de calidad, debe cumplir con las buenas prácticas de laboratorio y con las regulaciones nacionales e internacionales. Los aspectos fundamentales para el establecimiento del ensayo de potencia en animales son los siguientes: el animal que incluye información sobre la línea y el sexo, el ensayo analítico para la detección de anticuerpos y el valor del corte del sistema para el análisis de la seroconversión ³⁸.

2.2.4 Ensayo de uniformidad de unidades dosificación

Esta prueba se refiere al examen para determinar la variabilidad en la cantidad del principio activo presente en unidades que sirven de muestra de un determinado lote. Según USP 38 (2015), la prueba de uniformidad de contenido consiste en analizar diez dosis individuales del fármaco y determinar el porcentaje de principio activo presente en cada dosis ensayada, para lo cual la especificación establece que el valor de aceptación (AV) calculado no debe ser mayor a $L1 = 15,0$; donde L1 hace referencia a la primera etapa del análisis donde se aplica el criterio de cumplimiento con diez dosis ensayadas. Si las primeras diez dosis no cumplen con el criterio de aceptación, se ensayan veinte dosis más y al final se procede con la estimación del valor de aceptación según se indica en el capítulo general 905 de la USP 38, en donde para el total de las treinta dosis analizadas el valor de aceptación (AV) calculado no debe ser mayor

a $L1 = 15,0$ y ninguna unidad debe estar fuera del rango calculado con $L2 = 25,0$ ³⁹.

2.2.5 Estabilidad

Para validar un método debe demostrarse en qué medida los analitos se mantienen estables durante todo el procedimiento de análisis, incluido su almacenamiento antes y después de este. En general, la medición se hace comparando patrones recién preparados con una concentración conocida con patrones similares almacenados durante diferentes períodos de tiempo y en diferentes condiciones. Además, existen potenciales mejoras en la calidad asistencial derivadas de los estudios de estabilidad cuando los resultados, en términos de eficacia clínica, son positivos (mezclas analgésicas que mejoran el control del dolor, cambios de vías de administración, etc.)⁴⁰.

2.2.6 Incertidumbre de la medición

La incertidumbre se puede definir como la probabilidad o el nivel de confianza. Cualquier medición que se realice aportará un cierto grado de incertidumbre, por lo que el intervalo de incertidumbre que se fije será el rango dentro del cual se situará el valor real con un determinado grado de confianza. Normalmente se utiliza un grado de confianza del 95%. La incertidumbre se calcula estimando los errores que se producen en las distintas etapas del análisis, por ejemplo, la etapa preanalítica, la homogeneización, el pesaje, el pipeteado, la inyección, la extracción, la derivación, la recuperación y las curvas de calibración.⁴¹

Esta también provee una estructura de estimación con limitaciones en su implementación, como son: cálculo de derivadas parciales, suposición de linealidad de los modelos e identificación de las fuentes de incertidumbre y sus distribuciones de probabilidad. Los datos exigidos para la validación, por ejemplo, la exactitud y precisión en condiciones de repetibilidad/reproducibilidad, reflejan ya muchos de estos factores y deben ser utilizados⁴¹.

2.2.7 Materia prima

Para la industria farmacéutica, la materia prima es uno de los elementos indispensables para la elaboración de los medicamentos, por lo que existe una gran demanda por este tipo de materiales, ya que contienen una serie de químicos que son necesarios para poder llevar a cabo los procesos que favorecen a que las personas o pacientes puedan encontrar alivio a las diversas afecciones. Debido a la gran cantidad de sustancias activas conocidas, existen muchas vías para la síntesis de estos compuestos, por lo tanto, existen muchas materias primas para la industria farmacéutica y sustancias auxiliares que se utilizan para estas síntesis⁴².

La farmacopea es quien provee información de los ensayos aplicables a los medicamentos que pueden comercializarse en un país o territorio determinado, también contiene una lista de materias primas para la industria farmacéutica que pueden usarse para preparar medicamentos recetados. Para llevar adelante este proceso se requiere un plan coordinado e integrado con los proveedores, el cual se desarrollará de acuerdo con una planificación y previa programación cuando se reporte el saldo mínimo de materia prima en almacén⁴².

2.2.8 Calidad del producto farmacéutico

La calidad de las materias primas se debe certificar rutinariamente mediante la información analítica suministrada por los proveedores, pues actualmente solo es obligatoria la realización de un control de calidad completo de las mismas, según Real Farmacopea Española (RFE), cuando se adquieren a proveedores no autorizados. No obstante, la legislación vigente recomienda que el farmacéutico responsable realice al menos una prueba de identificación, aunque estas provengan de centros autorizados y cumplan las especificaciones de la RFE. Es necesario disponer de normas y procedimientos de trabajo para la manipulación, conservación, gestión de riesgos y revisión de materias primas, así como contar con personal adecuadamente capacitado que permita detectar cualquier cambio

o alteración en sus propiedades organolépticas y fisicoquímicas y facilitar así una posible retirada o cuarentena ⁴³.

2.2.9 Impurezas orgánicas farmacéuticas

Se le da el término de impureza orgánica a cualquier componente de una materia prima farmacéutica (MPF) que no sea la entidad química definida, o cualquier componente que no sea un ingrediente de la formulación de un medicamento (MED). Este tipo de impurezas pueden surgir durante el proceso de fabricación y almacenamiento de los medicamentos y pueden ser identificadas o no identificadas, volátiles o no volátiles. Es por ello que el contenido de impurezas es crítico para asegurar la eficacia y seguridad del producto, por lo tanto, la presencia de un contenido anormal de subproductos tiene impacto en diversas áreas como la seguridad, la manufactura o la biodisponibilidad. Una de las mejores herramientas que se dispone es el análisis y el conocimiento del proceso ya que en base a estos se pueden definir las estrategias para minimizar y controlar las impurezas ⁴⁴.

2.3 Producto de referencia

Generalmente es aquel que fue autorizado por primera vez sobre la base de documentación de calidad, seguridad y eficacia. Por tanto, este producto o especialidad medicinal contiene una nueva molécula, no comercializada hasta ese momento y que ha pasado por todas las fases del desarrollo de una nueva formulación-nuevo principio activo (fases preclínicas y fases clínicas I, II, III). Puede ser el producto que cuente con el registro más antiguo ante la autoridad sanitaria ⁴⁵.

2.3.1 Estándar de Referencia

Los Estándares de Referencia de USP consisten en una cantidad exactamente conocida de una sustancia química o ingrediente, desarrollada de acuerdo con las especificaciones establecidas por las normas documentales. Estas son

sustancias altamente purificadas que son específicamente para el uso en métodos de pruebas oficiales de las diferentes monografías de farmacopea. Cuando se utilice como parte de la monografía oficial relevante, los medios proporcionados para verificar el cumplimiento de un material con los estándares de identidad, concentración, calidad y pureza dictados en la monografía. Además, están especificados para la realización de pruebas y valoraciones oficiales de USP–NF. La USP proporciona también Estándares de Referencia especificados en el Códice de Sustancias Químicas para Alimentos (Food Chemicals Codex), así como sustancias auténticas (muestras de sustancias químicas de gran calidad) a modo de servicio para los laboratorios analíticos, clínicos, farmacéuticos y de investigación ⁴⁶.

2.4 Sistema autoemulsificable

El sistema de administración de fármacos autoemulsionantes (SEDDS) es uno entre los métodos utilizados para mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos poco solubles presentando y manteniendo la droga en estado disuelto, en pequeñas gotitas de aceite, por todo su tránsito a través del tracto gastrointestinal (GIT). Los SEDD están compuestos por una mezcla de aceite, surfactante y cosurfactante, que son capaces de formar emulsiones de aceite en agua sobre agitación suave proporcionada por el movimiento GIT²⁴ ⁴⁸.

2.4.1 Formulaciones a base de lípidos

Los sistemas de administración de fármacos basados en lípidos (LBDDS, por sus siglas en inglés), se definen como mezclas isotrópicas de aceites naturales o sintéticos, tensioactivos sólidos o líquidos, o alternativamente, uno o más disolventes hidrófilos y cosolventes o tensioactivos ⁴⁴.

Además, estos constituyen un gran grupo de sustancias ampliamente utilizada en la industria farmacéutica debido a sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas (amplia diversidad, favorable biocompatibilidad, ruta de absorción diferente, biodegradabilidad, funcionalidad específica, etc.), lo cual le

otorga su potencial para mejorar los sistemas de entrega de fármacos autoemulsificables basados en solubilización y absorción gastrointestinal de los fármacos. Algunos criterios para la selección de los lípidos incluyen la pureza, estabilidad química, capacidad solvente, miscibilidad, digestibilidad y seguridad ⁴⁷.

2.4.1.1 Clasificación de sistemas de lípidos

Pese a la gran cantidad de posibles combinaciones de excipientes que pueden usarse para ensamblar formulaciones basadas en lípidos y sistemas autoemulsionantes en particular, Pouton & Porter establecieron un sistema de clasificación (Lipid Formulation Classification System-LFCS) en el año 2000, y se actualizó unos años atrás (2006), para ayudar a estratificar las formulaciones en aquellas con componentes similares. La LFCS clasifica las formulaciones a base de lípidos en cuatro tipos, según su composición y el posible efecto de la dilución y la digestión sobre su capacidad para prevenir la precipitación del fármaco ⁴⁷.

2.4.2 Sistemas de dispersión

Existe una gran cantidad de fármacos, entre los cuales algunos destacan por presentar sistemas dispersos líquido-líquido no miscibles y estabilizados por un surfactante. Todos ellos se engloban bajo el término genérico de emulsión, tal como macro, micro, mini o nano (tabla 4). Se utiliza el término micro emulsión o simplemente emulsión para designar sistemas dispersos inestables, constituidos por dos fases líquidas inmiscibles [agua (W) y aceite (O)], siendo su tamaño de gota superior a 1000 nm ⁴⁸.

Por ello, si el tamaño se encuentra por debajo de 100 nm, se habla de mini o nanoemulsiones, siendo ambos sistemas bifásicos y cualquiera que sea la dimensión de sus gotas, todas estas emulsiones son sistemas

termodinámicamente inestables que se separan, más o menos, rápidamente, en dos fases ⁴⁸.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los distintos sistemas de liberación de fármacos

SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Micelas	Baja viscosidad, pequeño tamaño de partícula, fácil preparación y muy estables.	Baja solubilización y toxicidad potencial de los tensioactivos
Micro emulsiones	Alta solubilidad de fármacos, pequeño tamaño de partícula, fácil preparación y muy estables.	Porcentaje elevado de tensioactivos, toxicidad potencial de los tensioactivos y la solubilidad de fármacos está influenciada por condiciones ambientales.
Emulsiones	Pequeña cantidad de tensioactivos y alta solubilidad del fármaco.	Alta viscosidad, inestabilidad y tamaño de partícula grande.
Liposomas	Formados por lecitina y colesterol, presentes en el organismo.	Alta viscosidad, dificultad de preparación, a menudo se degradan tras ser administrados.
Nanopartículas	Estabilidad muy alta, y degradación lenta en el organismo por lo que se usan en vacunas	Solubilidad limitada de fármacos, dificultad de preparación, dificultad para controlar el tamaño de partícula.

Fuente: elaboración propia con base en la referencia ⁴⁹.

Tabla 2. Características físicas de distintos sistemas de liberación de fármacos.

CARACTERÍSTICAS	MICELAS	MICROEMULSIONES	EMULSIONES	LIPOSOMAS
Obtención Espontánea	Sí	Sí	No	No
Estabilidad Termodinámica	Sí	Sí	No	No
Turbidez	Transparente	Transparente	Turbio	Turbio
Tamaño de partícula	< 0.01 micras	< 0.01 micras	0.5-5 micras	0.025-25 micras
Uso de Cotensoactivo	Sí	Sí	No	No
Concentración de tensioactivo	< 5%	>10%	1-20%	0.5-20%
Concentración de fase dispersa	< 1%	1-30%	1-30%	1-30%

Fuente: elaboración propia con base en la referencia ⁴⁹.

2.4.3 Escala HLB

Los agentes tensioactivos son moléculas que poseen una parte lipófila y otra hidrófila, la escala más utilizada para medir la relación entre la parte hidrófila y la lipófila de un tensioactivo es el HLB (hydrophilic-lipophilic balance) o equilibrio hidrófilo-lipófilo ⁵⁰. Los aceites y ceras, que constituyen la fase oleosa de las emulsiones, tienen diferentes requerimientos de HLB para formar una

emulsión O/A o A/O. Estos valores se conocen como HLB requerido (HLBR) por la fase oleosa y sirven como criterio de selección del emulgente⁵⁰.

2.4.4 Agentes tensioactivos

Los agentes tensioactivos pueden ser compuestos orgánicos que poseen una estructura anfifílica, en donde sus moléculas contienen grupos polares (hidrofílicos) y no polares (hidrofóbicos), siendo esta característica muy importante para la interacción en sistemas que presentan nula miscibilidad. Esto se atribuye a su capacidad para formar complejos moleculares denominados micelas, de alta estabilidad química y con una infinidad de aplicaciones en el ámbito industrial. La concentración micelar crítica (CMC) es definida como el punto de saturación del agente tensioactivo en el sistema, o la concentración en la que se forman micelas termodinámicamente estables⁵².

2.4.4.1 Propiedades de los tensioactivos

Así como la concentración micelar crítica (CMC), hay tres propiedades importantes a mencionar que son: el balance lipófilo/hidrófilo (HBL), el número de agregación (n_a) y el punto de nube (PN). En primer lugar, el balance lipófilo/hidrófilo (HBL) indica la capacidad que tiene un tensioactivo para formar emulsiones, tanto sistemas agua-aceite (W-O) como sistemas aceite agua (O-W) estables. El valor del HBL indica qué tipo de emulsión estable forma. Es decir, cuanto más se aproxime el valor del HBL a 1, el tensioactivo tiende a emulsiones estables agua-aceite y, por el contrario, si es más próximo a 20, formará emulsiones estables aceite-agua⁵³.

En segundo lugar, el número de agregación (n_a) da información sobre el número promedio de moléculas de tensioactivo que se pueden encontrar en una micela. Generalmente presentan una estructura esférica y « n_a » es constante. Por último, el punto de nube (PN) es un valor que depende de la temperatura y afecta de

manera directa a la solubilidad de los tensioactivos, normalmente no iónicos, en soluciones acuosas. Por tanto, a cierta temperatura el tensioactivo pierde la solubilidad presentando una turbidez en la disolución acuosa⁵³.

Otras propiedades que poseen los tensioactivos y que son de gran interés por su utilidad práctica, son las siguientes ⁵⁴:

- Poder detergente: se trata de la aplicación más conocida. Las moléculas de tensioactivos son capaces de estabilizar la grasa dentro de las micelas. Tras un proceso mecánico o de agitación, la grasa que se encuentra adherida a una superficie sólida queda liberada y puede ser atrapada por las micelas y arrastrada con el agua ⁵⁴.
- Solubilización: se trata de una característica muy importante, ya que los tensioactivos permiten la solubilización en un medio líquido de compuestos de diferente naturaleza, mediante interacciones de carácter polar o apolar con las diferentes partes de las estructuras agregadas de los tensioactivos presentes en dicho medio ⁵⁴.
- Formación de emulsiones: la presencia de tensioactivos reduce la tensión interfacial entre los líquidos inmiscibles y facilita la formación y la estabilidad de pequeñas gotas de la fase dispersa en el medio continuo ⁵⁴.
- Poder humectante: la capacidad de los tensioactivos de disminuir la tensión superficial promueve que el líquido se extienda por las superficies y las moje ⁵⁴.
- Poder emulgente y dispersante: se refiere a la capacidad de los tensioactivos de estabilizar las emulsiones, evitando la coalescencia de las gotas ⁵⁴.
- Poder espumante: es la capacidad de formar espuma. Al disminuir la tensión superficial de la interfaz aire/agua, se facilita la formación de burbujas de aire ⁵⁴.

2.4.4.2 Surfactantes catiónicos

Incluyen el cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y cloruro de cetilpiridinio. Son muy hidrófilos y son muy solubles en agua ⁵⁴.

2.4.4.3 Tensioactivos no iónicos naturales

Estos incluyen alcoholes de ácidos grasos, como alcohol estearílico y alcohol cetílico, grasa de lana o cera de lana y sus derivados, alcoholes de lana y colesterol, y derivados de otras ceras naturales, como espermaceti y cera de ésteres cetílicos (espermaceti sintético) ⁵⁴.

2.4.4.4 Tensioactivos no iónicos sintéticos

Aunque se les da una designación química basada en el componente principal, en realidad son mezclas complejas de derivados estrechamente relacionados. Por ejemplo, el monooleato de sorbitán, también conocido como Span 80, es una mezcla, pero el componente principal es el monooleato de sorbitán. El polisorbato 80 (Tween 80) es monooleato de sorbitán polioxietileno 20; el 20 indica que hay aproximadamente 20 moles de óxido de etileno por cada mol de sorbitol y anhídrido de sorbitol. Los tensioactivos no iónicos de uso común incluyen varios Spans, Tweens, Arlacels y Myrjs ⁵⁴.

2.4.4.5 Surfactantes anfóteros

Estos tensioactivos pueden ser aniónicos, catiónicos o no iónicos en solución, según la acidez o el pH del agua. Suelen ser suaves, lo que hace que algunos de ellos sean especialmente adecuados para su uso en productos y preparados farmacéuticos²⁸. Un tensioactivo anfótero que se utiliza con frecuencia en las formas farmacéuticas es la lecitina NF, una mezcla compleja de fosfátidos, principalmente fosfatidilcolina. Las lecitinas se utilizan principalmente como

agentes dispersantes, emulsionantes y estabilizantes. La lecitina a menudo se incluye en productos inyectables, especialmente en soluciones de nutrición parenteral⁵⁴.

2.4.5 Sistema de administración de fármacos autoemulsificables

La vía de administración oral ha sido la ruta de elección por la mayoría de los formuladores y ha predominado sobre otras vías de administración. El mayor problema en las formulaciones de medicamentos administrados por vía oral es la baja y errática biodisponibilidad que presentan los fármacos, la cual resulta principalmente de la pobre solubilidad. En este sentido, es necesario incluir el ingrediente farmacéutico activo en un sistema de formulación adecuado de tal manera que se pueda modificar su velocidad de disolución y alcanzar el objetivo terapéutico. Entre las diversas estrategias de formulación empleadas se incluyen la formación de sales, la complejación con ciclodextrinas, la micronización, las HLBs sólidas y las formulaciones basadas en lípidos. Los enfoques de este tipo de formulaciones, particularmente el sistema de entrega de fármacos autoemulsificables SEDDS⁵⁵.

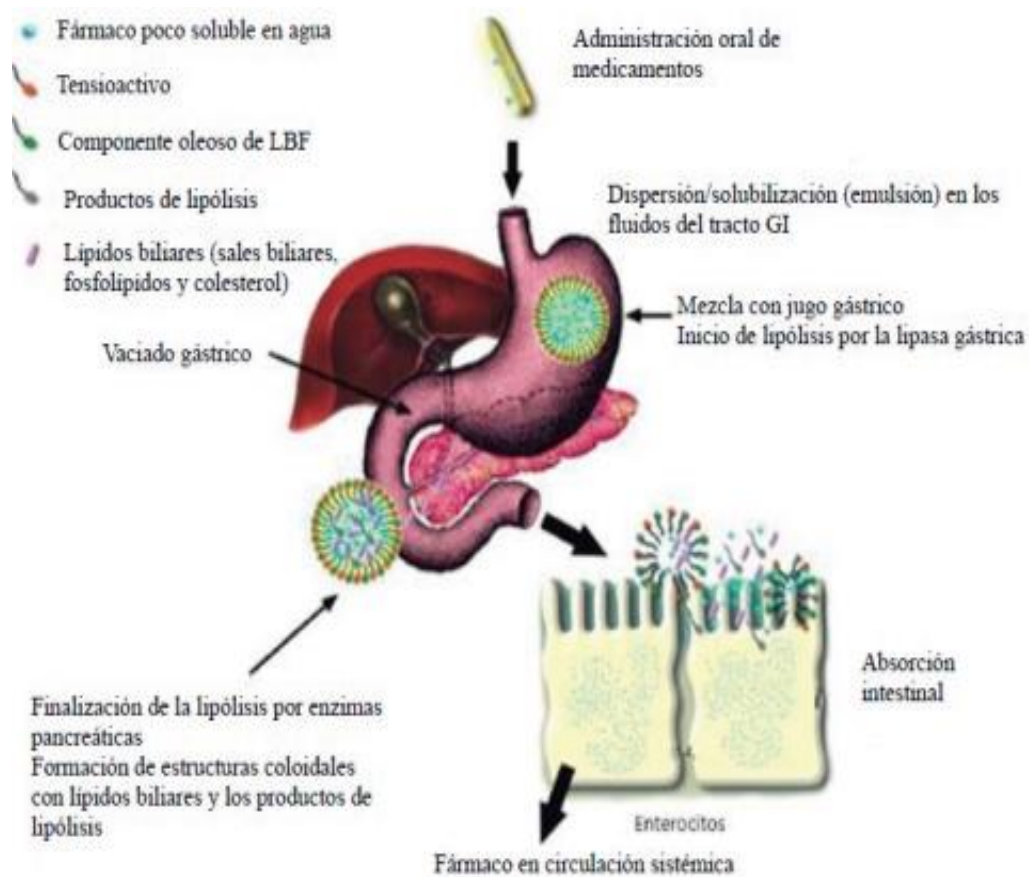
Los fármacos poco solubles, así como los pares de iones hidrofóbicos de fármacos, como los líquidos iónicos, pueden disolverse en las gotitas oleosas para alcanzar una biodisponibilidad lo suficientemente alta después de la administración en la mucosa. Asimismo, los fármacos como los péptidos terapéuticos y los oligonucleótidos que se degradan en las membranas mucosas por las peptidasas y las nucleasas pueden protegerse frente a estas enzimas en las gotas oleosas. Además, como la gran mayoría de los SEDDS contienen tensioactivos PEG-ilados que forman una corona de PEG muco-inerte alrededor de las gotas oleosas, pueden penetrar la barrera de gel mucoso de una manera comparativamente eficiente, lo que permite el transporte de fármacos incorporados a la absorción subyacente membrana⁵⁶.

Sin embargo, a pesar de estas ventajas, los SEDDS se enfrentan al problema de una liberación incontrolable del fármaco. Los fármacos lipofílicos y poco solubles en agua que exhiben una solubilidad mucho mayor en el núcleo oleoso de las gotitas formadas por SEDDS no se liberan en absoluto. Por el contrario, los fármacos hidrofílicos y fácilmente solubles en agua se liberan casi instantáneamente, ya que el coeficiente de difusión incluso de los fármacos hidrofílicos grandes, como las proteínas, es relativamente alto y la distancia desde el centro de las gotas oleosas hasta la superficie es del orden de los nanómetros ⁵⁶.

2.4.5.1 Mecanismo de SEDDS

Los sistemas de entrega de fármacos autoemulsificables (*self-emulsifying drug delivery systems*, SEDDS) son una mezcla isotrópica de lípidos, tensioactivos y a algunas veces cosolventes que fácilmente pueden producir finas emulsiones O/W luego de agitación suave como la producida por la motilidad digestiva en el tracto gastrointestinal. Algunas de las ventajas de los SEDDS son: estos proporcionan una gran área interfacial para la absorción del fármaco, una estabilidad aumentada de las moléculas del fármaco y la posibilidad de administrar el producto final en diferentes formas farmacéuticas, tales como: cápsulas de gelatina; blanda o dura y sistemas sólidos, por lo cual se vislumbran como una alternativa prometedora para asegurar la entrega de fármacos poco solubles o con poca permeabilidad ⁷.

Figura 2. Digestión de lípidos en el tracto gastrointestinal



Fuente: Elaboración propia con base en la referencia.⁷

Con base en la Figura 2, un aspecto importante a considerar al desarrollar sistemas de entregas de fármacos es el medio al cual estará expuesto y las barreras fisiológicas (fluidos intestinales, mucosas, el epitelio intestinal etc.) que deben superar luego de la ingestión. “Algunos excipientes utilizados en los sistemas lipídicos son susceptibles a los procesos de degradación enzimática que tienen lugar en el tracto gastrointestinal, por lo cual recientemente ha existido un interés por una mejor comprensión de los complejos procesos”⁷.

2.4.6 Importancia de los SEDDS en una emulsión

Se consideran de fácil fabricación con el instrumento básico en lugar del alto costo y el equipo especializado requerido por la suspensión y la emulsión para el monitoreo de los procedimientos analíticos que incluyen la velocidad, la intensidad y la duración de la mezcla. Además, el tamaño de las partículas juega un papel importante, ya que con el aumento del tamaño de las partículas, va a existir un aumento de la solubilidad del producto, debido a que tiene la capacidad de emulsionar cuando el fármaco se libera en el sitio de acción. Esto es mejor en comparación con la emulsión convencional, que no se emulsiona al llegar al sitio de acción⁵⁷.

2.4.6.1 Aumento de la permeabilidad del fármaco

Los polímeros mucoadhesivos y el quitosano se utilizan para fabricar SEDDS con el fin de mejorar la permeabilidad de los medicamentos a través del epitelio intestinal. Los estudios han demostrado que la unión de silicatos con SEDDS líquidos mejora la permeación intestinal de los fármacos, lo que indica la capacidad de los SEDDS sólidos para tener el potencial de administrar compuestos farmacológicos de clase IV ⁵⁷.

2.4.6.2 Mejora en la solubilidad a nivel Intestinal

Las nanopartículas poliméricas se pueden utilizar como inhibidores de precipitadores poliméricos (PPI) para retener el estado sobresaturado de las moléculas solubilizadas del fármaco. También altera el funcionamiento de las enzimas digestivas al alterar la química y la nanoestructura de la superficie del material portador. Como resultado, la acción inhibidora de la precipitación y el mecanismo de solubilización de los productos de lipólisis aumentan la solubilidad intestinal de las moléculas medicinales encapsuladas ⁵⁷.

2.4.7 Optimización de la formulación de los SEDDS

Los estudios de optimización de formulaciones farmacéuticas son esenciales para desarrollar una formulación robusta que no cause ningún tipo de fracaso o mínimo error. Sin este tipo de estudios, es más probable que una formulación sea de alto riesgo, ya que se desconoce si cualquier cambio en la formulación en sí o en las propiedades de la materia prima va a afectar significativamente la calidad y el rendimiento del producto farmacéutico ⁵⁸.

Como es de esperarse estos estudios proporcionan información importante sobre la robustez de la formulación, estableciendo relaciones funcionales entre atributos críticos de calidad (CQA) y atributos de materiales críticos (CMA), los cuales son conceptos de los cuales se hablará más adelante; la identificación de CMA de sustancias farmacológicas, excipientes, y materiales en proceso, el desarrollo de estrategias de control de sustancias estupefacientes y excipientes ⁵⁸.

2.4.8 Factores que afectan los SEDDS

Uno de los principales problemas es la falta de métodos apropiados para determinar la liberación de drogas de SEDDS in vitro, ya que el proceso es particularmente problemático. Para la cuantificación del fármaco en el medio de liberación, las gotas aceitosas deben separarse. En la mayoría de los estudios, esto se logra utilizando una membrana de separación, como membranas de diálisis o filtros, que tiene un gran impacto en el perfil de liberación obtenido ⁵⁹.

Además, como la liberación del fármaco de SEDDS se basa en un proceso de difusión simple de una fase líquida lipofílica a una fase líquida acuosa, una forma

probablemente más significativa de caracterizar el comportamiento de liberación podría ser simplemente la determinación del coeficiente de distribución (log D) del fármaco entre el preconcentrado SEDDS y el medio de liberación (RM). Como log D es simplemente la medida de la diferencia en solubilidad de un compuesto en dos fases, se puede determinar midiendo la solubilidad del fármaco o complejo farmacológico en el preconcentrado SEDDS y en el medio de liberación de manera separada. Se discute el impacto del log D en el comportamiento de liberación de drogas in vivo, incluidos varios estudios de casos ⁵⁹.

2.5 Desarrollo de un método analítico

No existe una guía oficial que indique la secuencia de experimentos analíticos necesarios para el desarrollo de un método, ya que esto depende del método en sí mismo. No obstante, el desarrollo lógico de un método analítico transcurre en diferentes fases ⁶⁰.

a) Características de Practicabilidad

Han de evaluarse los parámetros de practicabilidad del método analítico: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, costo, tamaño de la muestra, cualificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.

b) Características de Idoneidad

La puesta a punto del método analítico incluye desde los primeros estudios de tanteo con patrones, hasta la utilización del método en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis.

c) Características de Fiabilidad

Esta última etapa permitirá conocer las características de fiabilidad del método para su aplicación rutinaria. Dichas características son las que

demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación ⁶⁰.

2.6 Procedimiento analítico

Es la forma de realizar el análisis, donde se describe los pasos necesarios detallados para realizar cada prueba. Dicho procedimiento debe estar completo, conteniendo los parámetros a evaluar, límites y valores obtenidos en cada caso; debe estar actualizado de forma tal que pueda ser reproducible. Los procedimientos analíticos se clasifican de la siguiente manera ⁶¹.

- a) Categoría I: Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos, a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes), en productos farmacéuticos terminados.
- b) Categoría II: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.
- c) Categoría III: Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (disolución, liberación de fármacos).
- d) Categoría IV: Pruebas de identificación, el único parámetro exigido en esta categoría es que el método sea específico al analito que se desee identificar⁶¹.

Tabla 3. Parámetros requeridos para la validación

Características del desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Prueba de limite cuantitativa	Prueba de limite cualitativa		
Exactitud	SÍ	SÍ	*	*	NO
Precisión	SÍ	SÍ	NO	SÍ	NO
Especificidad	SÍ	SÍ	SÍ	*	SÍ
Límite de detección	NO	NO	SÍ	*	NO
Límite de Cuantificación	NO	SÍ	NO	*	NO
Linealidad	SÍ	SÍ	NO	*	NO
Intervalo	SÍ	SÍ	*	*	NO

* No aplica

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia⁶¹.

2.7 Validación de un método analítico

La validación es la acción documentada que demuestra que cualquier procedimiento, proceso o actividad conducirá consistentemente a los resultados esperados. Esto incluye la calificación de sistemas y equipamiento, es un tema de considerable interés ⁶².

Además, esta se realiza por medio de un proceso establecido para la obtención de pruebas demostrativas de que un método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos; además, proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que el método propuesto hace lo que tiene que hacer. Es necesario señalar que los métodos descritos en farmacopeas u otros textos oficiales se consideran validados, aunque debe aclararse que ellos se refieren solamente a métodos generales y a materias primas. Estos no precisan de validación, aunque deben ser comprobados antes de su utilización rutinaria con la verificación de la idoneidad en las condiciones de laboratorio ²¹.

En lo referente a los productos farmacéuticos codificados en la USP, se consideran validados y el único requerimiento es el cumplimiento del test de adecuación indicado en cada monografía: en general se inyecta una sustancia definida y se verifica que la resolución entre el pico del analito y dicha sustancia sea superior a cierto valor indicado; además se mide y controla la precisión, asimetría del pico y eficiencia y se permite ajustar la fuerza de la fase móvil para cumplir con los requerimientos mínimos. Es importante destacar que la validez de estos métodos es ampliamente discutible. Diferencia entre distintas formas farmacéuticas, tipos y calidad de las materias primas empleadas por cada fabricante, hacen necesario validar la metodología para cada producto en particular, elaborado o semielaborado ⁶².

2.7.1 Parámetros estadísticos

Este se basa en un método analítico el cual prevé la necesidad de demostrar que este se pueda aplicar con resultados satisfactorios, con el fin de crear confianza en los resultados analíticos reportados por un laboratorio, además el método utilizado debe cumplir ciertos requisitos de calidad, los cuales se determinan mediante el proceso de validación con parámetros estadísticos tales como: linealidad, exactitud, precisión, entre otros, para así poder determinar si el fármaco cumple con el desempeño de forma correcta⁶³.

2.7.1.1 Linealidad

La linealidad de un método analítico se define como la capacidad que este tiene para producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito, dentro de un rango dado. Están descritos los rangos dinámico y lineal para técnicas analíticas. Usualmente, cuando se cuantifica por interpolación en una curva patrón, los rangos de trabajo son acotados al rango lineal del método, definido como el rango de concentraciones para el cual la pendiente es constante en el intervalo de tolerancia que se defina. Puede ser expresada en términos de varianza alrededor de la pendiente de la curva de regresión calculada por el Método de los Mínimos Cuadrados (MMC), pero es el cálculo del coeficiente de determinación de la regresión, r^2 , el método más frecuentemente usado en el chequeo de la linealidad⁶⁴.

2.7.1.1.1 Coeficiente de correlación (r)

Además de señalar la dirección de la asociación lineal entre las variables, el coeficiente de correlación de Pearson es un indicador de la fuerza con que estas se vinculan. Se ha establecido con suficiencia en la teoría estadística, que factores como el tamaño muestral, la falta de linealidad o la variabilidad en las características de interés pueden alterar considerablemente la magnitud de esta medida⁵⁹.

Se plantea que para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor que 0,999. Sin embargo, consideran que la mejor forma de indicar la linealidad del método estudiado será realizar una prueba estadística de t (t de Student), en la cual se calculará la correlación lineal significativa (t_r) a partir de la hipótesis nula de no correlación entre las magnitudes estudiadas ("x" y "y")⁶⁵.

2.7.1.1.2 Pendiente

Conocida también como coeficiente de regresión. Indica la sensibilidad de calibración o del método y se expresa en unidades de respuesta sobre unidades de concentración o cantidad del analito. La sensibilidad analítica relaciona la aleatoriedad de la respuesta con la aleatoriedad debida a la variación de la concentración, es inversamente proporcional a la capacidad de detectar pequeñas diferencias en la concentración del analito, y se obtiene dividiendo la pendiente de la curva de calibración por la desviación estándar de las respuestas en cada punto o concentración. Se considera que, a mayor pendiente, mayor sensibilidad y que mientras más pequeño sea el coeficiente de variación de la pendiente, mayor será la linealidad (coeficientes de variación de la pendiente mayores que el 5,0 % indican falta de linealidad)⁶⁶.

2.7.1.1.3 Intercepto

Es el estimador que se relaciona con la presencia de interferencias o errores sistemáticos. El intervalo de confianza del intercepto debe incluir al cero para cumplir con el requisito de proporcionalidad (como se exige para el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer en los métodos espectrofotométricos). Esta se determinará por medio de la prueba de proporcionalidad mediante una prueba t considerando como hipótesis nula que el intercepto tiene que ser cero⁶⁶.

2.7.1.2 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas de muestras múltiples de la misma muestra homogénea bajo las condiciones prescritas. Por lo que esta corresponde al grado en que los puntajes de una medición se encuentran libres de error de medida en diferentes momentos del tiempo; teniendo en cuenta esto, los abordajes estadísticos para evaluación de la concordancia deben incluir en sus fórmulas, medidas de precisión y exactitud para hacer que una prueba diagnóstica pueda ser considerada válida. La precisión se puede considerar a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad⁶⁷.

2.7.1.2.1 Precisión intermedia

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio⁶⁸.

2.7.1.2.2 Repetibilidad

Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método, en ítems de análisis idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo. La repetibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de la dispersión característica de los resultados. La misma se define, de acuerdo con el VIM (Vocabulario Internacional de Metrología), como la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo las mismas condiciones de medición⁶⁹.

2.7.1.2.3 Repetibilidad instrumental

Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces ⁶⁸.

2.7.1.2.4 Repetibilidad del método

La repetibilidad del método, en donde se evaluará la variabilidad en la medición de una serie de tomas obtenidas a partir de una muestra homogénea, que se analiza independientemente, desde el principio hasta el final, por el mismo instrumento y analista ⁶⁸.

Estadísticamente, el parámetro de repetibilidad, expresado como precisión del sistema, se caracteriza por tener una prueba de estudio desarrollada en 1899 por el químico inglés William Sealey Gosset, la cual es empleada para contrastar la hipótesis sobre medias en poblaciones pequeñas con distribución normal para que el estadístico en el que está basada la inferencia esté normalmente distribuido, utilizando una estimación de la desviación típica en lugar del valor real ⁶⁸.

Todo lo anterior se determina con unos intervalos de confianza superior e inferior al 95,0% de confianza para el promedio sucesivo de una serie de muestras o estándares analizados varias veces, en la cual el objetivo es rechazar la hipótesis nula y que el método analítico validado es sensible a una concentración de mg/ml específico con un RSD menor al 2,0% ⁷⁰.

2.7.1.3 Exactitud

Corresponde al grado en que una medición refleja la realidad de un fenómeno, capacidad de medición o clasificación de un método o instrumento para aquello que originalmente fue propuesto, para hacer que una prueba diagnóstica pueda ser considerada en su contexto válida. De acuerdo con el Ministerio de Salud de

Costa Rica (2005), se considera que este parámetro puede evaluarse mediante la comparación entre métodos (contra un método oficial, validado o estandarizado), por adición de un estándar de referencia, comparando curvas de regresión lineal de estándar contra placebos enriquecidos o comparando los resultados de un estándar o material de referencia certificado (Ministerio de Salud [MINSA] 2005a)⁷⁰.

La exactitud debe establecerse en todo su intervalo. En el análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse en muestras (del fármaco o del producto farmacéutico) a las que se hayan agregado cantidades conocidas de impurezas, cuando no sea posible obtener muestras de algunas impurezas o productos de degradación, los resultados deben compararse con los obtenidos mediante un procedimiento independiente ⁷⁰.

2.7.1.4 Reproducibilidad

Estudia la variabilidad de los resultados inter-laboratorio. El objetivo de este estudio es verificar que el método de análisis proporciona los mismos resultados en diferentes laboratorios. El coeficiente de variación en el estudio de la reproducibilidad debe ser igual o mayor que el obtenido en el estudio de repetibilidad para la misma cantidad o concentración debido a la mayor fuente de error que existe en la reproducibilidad ⁶⁸.

2.7.1.5 Límite de detección y cuantificación

La determinación de los límites de detección y cuantificación de un instrumento requiere realizar una serie de medidas del blanco para conocer la respuesta instrumental cuando no hay analito en la muestra. Sin embargo, la recta de calibración ya contiene esta información que, aunque no es tan precisa, puede

ser suficiente para utilizarla en la práctica sin tener que realizar medidas repetidas del blanco ⁷¹.

El límite de detección (LD) es la mínima concentración detectable de manera confiable por la técnica. Para la determinación de dicho parámetro se ha calculado en función de la desviación estándar de la concentración predicha para una muestra en blanco (S_0). Se considera que el límite de detección es la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y_B , más dos veces la desviación estándar del blanco, s_B .⁶⁴

Mientras que el límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de receptibilidad y veracidad. También se define por diversas convenciones, como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco de muestra más 5, 6 o 10 desviaciones estándar de la media del blanco. Algunas veces también se conoce como “límite de determinación”⁷¹.

2.7.1.5.1 El Rango Dinámico Lineal (RDL)

Fue establecida como el intervalo de concentraciones que comprende entre el límite de cuantificación de los métodos y el límite superior del intervalo de concentraciones en el que se ha aplicado a los métodos estudiados ⁷².

2.7.1.6 Especificidad

El análisis de la selectividad de un método se investiga mediante el estudio de su capacidad para medir el analito de interés en porciones de prueba a las cuales deliberadamente se han introducido interferencias específicas (aquellas que se cree probablemente estén presentes en las muestras). Si no se está seguro de que las interferencias están presentes, la selectividad de un método se puede investigar estudiando su capacidad de medir el analito comparado con otros métodos o técnicas independientes ⁶⁸.

Aunque, la prueba de especificidad puede diseñarse de distintas maneras para procedimientos analíticos categoría I y III, se implementa la comparación del comportamiento de la matriz con respecto al comportamiento del estándar, cuando se cuente con disponibilidad de la matriz. Para esta prueba en particular, se esperaría que en la matriz (o blanco) no exista ninguna señal que interfiera con la longitud de onda en la que se cuantifica el analito en el ensayo respectivo ⁶⁸.

Para las pruebas que se indican a continuación, la definición anterior tiene las siguientes implicancias: pruebas de identificación que garantizan la identidad del analito, pruebas de pureza que garantizan que todos los procedimientos analíticos efectuados permiten declarar con exactitud el contenido de impurezas de un analito (por ejemplo, prueba de sustancias relacionadas, límite de metales pesados, impurezas orgánicas volátiles) y valoraciones que proporcionan un resultado exacto, que permite una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra. La importancia de este requisito de validación es demostrar la ausencia de interferencia con referencia al estándar y/o interferencia menor al 2% ⁶⁹.

2.7.1.7 Idoneidad del sistema

El test de idoneidad del sistema (system suitability test) consiste en un conjunto de ensayos que permitan comprobar en el momento de la utilización del método, que el sistema (analista, reactivos e instrumentos) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por lo tanto, la prueba de idoneidad del sistema se ha de entender como parte integrante del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización ⁷³.

2.7.1.8 Sensibilidad analítica

La sensibilidad de un método analítico o sensibilidad de la calibración mide la relación entre la señal instrumental y la concentración del analito, y viene dada por la pendiente de la recta de calibración.⁶⁵

Es una característica del método que depende solo del proceso de medida. Así definida, la sensibilidad no es otra cosa que el factor de respuesta, o lo que es lo mismo, el cociente entre la variación de señal asociada a un determinado analito y la variación de su concentración o cantidad. Sin embargo, cuando se presentan las características de un método analítico en publicaciones académicas y científicas se opta normalmente por usar el límite de detección. Pocos autores hablan de sensibilidad dando el valor de la pendiente de calibración ⁷⁴.

2.7.1.9 Coeficiente de variación

El concepto de variación indica que no existen dos productos o características que sean exactamente iguales, debido a la existencia de fuentes de variabilidad. Desde el punto de vista de requerimientos mínimos, el asunto de la variación a menudo es simplificado, ya que las partes dentro de las tolerancias de especificación son aceptables, partes fuera de especificaciones son no aceptables. Desde el punto de vista estadístico, se utiliza para comparar la dispersión (variación) de conjuntos de datos de medidas diferentes o con medias aritméticas diferentes⁷⁵.

2.7.2 Tipos de Validación

2.7.2.1 Validación Prospectiva

Es la que se realiza sobre un proceso antes de que sea implementado, el cual puede darse para la fabricación de nuevos productos, cuando hay cambios fundamentales en un proceso o cuando se incorpora un equipo o sistema para uso ⁷⁴.

2.7.2.2 Validación Retrospectiva

Es la que se realiza sobre el análisis de ensayos ya elaborados, en la cual se revisa y analiza con métodos estadísticos los parámetros físicos y los resultados analíticos de por lo menos 10 a 30 consecutivos, no debiendo existir cambios en la formulación, modificaciones sustanciales de equipo o instalaciones, ni cambios en el método de ensayo ⁷⁴.

2.7.2.3 Validación Simultánea

Es la que se produce cuando es imposible completar la validación antes de la puesta en el mercado del producto farmacéutico. Se da si sólo se ha producido un limitado número de lotes o si los lotes no se producen frecuentemente o tal vez si la fabricación se ha producido con modificaciones y las pruebas demuestran que los parámetros estén conformes ⁷⁴.

2.7.2.4 Revalidación

Se realiza cuando un método validado ha sido modificado en alguno de los pasos del procedimiento establecido, o se ha variado alguno de los instrumentos, reactivo o material empleado originalmente, y se realiza en periodos establecidos ⁷³.

2.7.3 ¿Dónde se aplica una validación?

Las actividades relacionadas con la verificación y validación de métodos analíticos han cobrado gran importancia, debido, por un lado, al continuo desarrollo y actualización de técnicas y equipos analíticos cada vez más complejos y, por otro lado, al interés de los profesionales en garantizar la calidad de sus procesos y resultados ⁷⁶. La validación se aplica de:

- De analista a analista
- De laboratorio a laboratorio
- De instrumento a instrumento
- De reactivos
- Inestabilidad de los reactivos analíticos

2.7.3.1 Términos relacionados a la validación de técnicas analíticas

Es importante mencionar que los laboratorios farmacéuticos deben contar con sistemas que garanticen la calidad de los productos que fabrican, algunas de estas medidas y términos relacionados a ellas se describen a continuación:

2.7.3.1.1 Sistema de calidad

Se entiende por sistema de calidad el conjunto de actividades del laboratorio dirigidas a la producción de un trabajo de precisión y productos de alta calidad. Un laboratorio de análisis debe tener como uno de sus propósitos principales la producción de datos analíticos de alta calidad por medio del uso de mediciones analíticas que sean precisas, confiables y adecuadas para tal fin. Este propósito puede alcanzarse de una manera eficaz si se cuenta con un sistema planificado y documentado de la calidad de las actividades, la gerencia del laboratorio debe asegurar que sus políticas, sistemas, programas, procedimientos e instrucciones se describan con la extensión necesaria para que permita al laboratorio garantizar la calidad de los resultados que genera. Para alcanzar este nivel de distinción (que el laboratorio necesita para poder acreditarse y así obtener contratos de análisis), el laboratorio necesitará operar bajo un sistema de garantía de calidad que incluya una extensa documentación de sus actividades ⁷⁷.

2.7.3.1.2 Garantía de la calidad

Es el conjunto de medidas que se adoptan para asegurar que los productos farmacéuticos sean de la calidad requerida para el uso al que están destinados. Por lo tanto, la garantía de calidad incorpora las BPM y otros conceptos, incluyendo aquellos que van más allá del alcance de estos lineamientos, tales como el diseño y el desarrollo del producto.

El sistema de garantía de la calidad que es apropiado para la fabricación de productos farmacéuticos debe asegurar⁷⁸.

- Que los productos farmacéuticos estén diseñados y elaborados de tal forma que se tengan en cuenta los requisitos de las BPM y otros códigos relacionados, tales como la Buena Práctica de laboratorio (BPL) y la Buena Práctica clínica (BPC), incluyendo el diseño y el desarrollo del producto.
- Que las operaciones de producción y control estén claramente especificadas por escrito, y que se adapten a los requisitos de las BPM.
- Que las responsabilidades administrativas estén claramente especificadas en las descripciones de trabajo.
- Que se tomen las medidas necesarias para la fabricación, suministro y uso de materias primas y materiales de empaque adecuados.

2.7.3.1.3 Control de calidad

Conjunto de procedimientos, técnicos y actividades operativas, destinados a medir, confrontar y verificar que un producto cumpla con las características y especificaciones planificadas. El control de calidad es parte de las BPM y comprende el muestreo, especificaciones y ensayos, como también a los procedimientos de organización, documentación y autorización que aseguren que los ensayos necesarios y pertinentes realmente se efectúen, y que no se permita liberación de materiales, ni se autorice la venta o suministro de los productos, hasta que su calidad haya sido aprobada como satisfactoria, el control

de calidad no se limita a las operaciones de laboratorio, sino que debe estar presente en todas las decisiones concernientes a la calidad del producto⁷⁹.

2.7.3.1.4 Buenas prácticas de manufactura (BPM)

Son, en general, un conjunto de normas que cada laboratorio farmacéutico debe poner en práctica con el fin de asegurar la calidad de los productos que fabrique, debiendo para ello tomar todas las medidas oportunas para garantizar que los medicamentos posean la calidad necesaria según el uso al que se destine⁷⁹.

Este conjunto de medidas es muy amplio, abarcando las normas que deben afectar al personal, locales, maquinarias, instalaciones, materias primas, producto terminado, fabricación, control de calidad, documentación y expedición de las especialidades, la normativa establece que todas las operaciones, proceso, métodos o técnicas, deben estar reguladas o escritas y deben ser cumplidas y supervisadas⁸⁰.

Las buenas prácticas de manufactura constituyen el factor que asegura que los productos se fabriquen en forma uniforme y controlada, de acuerdo con las normas de calidad adecuadas al uso que se pretende dar a los productos, y conforme los requerimientos del registro sanitario⁷⁹.

2.7.3.2 Farmacopea

Esta abarca la presencia de métodos analíticos, los cuales se utilizan para la identificación y cuantificación de compuestos, farmacológicamente activos, en los diferentes ensayos propuestos en la valoración de muy diversas moléculas o en la identificación de impurezas; en definitiva, en cada una de las partes que conforman la monografía de una sustancia o producto surgen variadas técnicas instrumentales de análisis, estos se denominan Métodos Físicos y Fisicoquímicos, y en el que se agrupan la mayor parte de métodos instrumentales de análisis, se observa una gran disparidad, tanto en el tratamiento de los métodos como en la propia presencia de alguno de ellos.

Además, en este estudio, se comparan los métodos de la Farmacopea Europea con otros empleados en farmacopeas de países relevantes, tales como Estados Unidos, Japón y México ⁸¹.

2.8 Importancia de validar métodos analíticos

La validación de un método de análisis permite garantizar que el resultado obtenido sea lo más cercano posible al valor de referencia real de una muestra. Todos los métodos que sean utilizados en un laboratorio de análisis deben ser evaluados y sometidos a pruebas para asegurarse que proporcionan resultados válidos y confiables, es decir, tienen que ser validados y verificados. Por lo que es importante que el método que se desea estandarizar sea compatible con las condiciones del laboratorio de trabajo, además de ser documentado y permitir que todos los analistas reciban la capacitación adecuada acerca del uso del método ya validado; de igual forma, resulta indispensable atender a las condiciones recomendadas por el fabricante ⁸².

Además, la validación de un método es un requisito importante en la práctica del análisis químico ya que este es un proceso basado en establecer las características de desempeño y limitaciones del método y la identificación de los aspectos influyentes que puedan cambiar estas características, así como hasta qué punto se puede cambiar. Por otro lado, es un proceso basado en la confirmación del desempeño o de que el mismo es consistente con los requerimientos de su aplicación. Por lo que en los laboratorios su personal tiene una clara responsabilidad, la confianza de los pacientes, proporcionando la respuesta correcta a la parte analítica del problema en otras palabras debe demostrarse que los resultados son adecuados para el propósito para esto será suficiente que cualquier decisión que se tome basada en el sea confiable. De manera que, el desempeño del método debe ser válido, y de igual manera, deberá estimarse la incertidumbre del resultado y analizar las muestras adecuadas ⁷³.

2.9 Guías de validación en Costa Rica

Las guías se centran en la validación de métodos cuantitativos. Sin embargo, algunos de los principios descritos en ella son aplicables también para determinar la presencia de uno o más analitos en los métodos cualitativos. Adicionalmente, estas guías evitan hacer hincapié en el uso de la estadística, aunque es indudable que el conocimiento práctico de estadística elemental facilita la comprensión y aplicación del proceso de validación. Por otro lado, la comprensión de la validación de métodos por los analistas se ve frenada porque los términos metrológicos y técnicos utilizados para describir los procesos de evaluación de métodos varían en los diferentes sectores de las mediciones analíticas. Estas guías no dicen cuando un término se usa correcta o incorrectamente, pero sí proporcionan alguna aclaración ⁸³.

2.9.1 Guía de EMA

La Agencia Europea de Medicamentos (conocida por sus siglas EMA) garantiza la evaluación científica, la supervisión y el seguimiento de la seguridad de los medicamentos de uso humano y veterinario en la Unión Europea. A su vez los principales cometidos de la Agencia consisten en la autorización y el seguimiento de los medicamentos en la UE. Por lo que para poder comercializar sus productos, las empresas deben solicitar la autorización de cada uno de ellos, que es emitida, en su caso, por la Comisión Europea. Además, la autorización les permite comercializar el medicamento en cuestión en toda la UE y el Espacio Económico Europeo (EEE). Dado el amplio alcance del procedimiento centralizado, la mayoría de los medicamentos verdaderamente innovadores que se comercializan en Europa son autorizados por la EMA ⁸⁴.

Para ello la Agencia debe cumplir sus cometidos, los cuales abarcan:

- Facilidad en el desarrollo de los medicamentos y su acceso a ellos evaluando las solicitudes de autorizaciones de comercialización.
- Haciendo el seguimiento de la seguridad de los medicamentos a lo largo de todo su ciclo de vida.

- Y, finalmente, proporcionando información a los profesionales sanitarios y a los pacientes ⁷⁶.

2.9.2 Guía FDA

En esta guía nos centramos en las formas de dosificación de liberación inmediata (IR) y tiene el propósito de proveer recomendaciones generales para las pruebas de disolución; además, establece enfoques sobre especificaciones de disolución relacionadas con las características biofarmacéuticas de la sustancia medicinal y métodos estadísticos para comparar los perfiles de disolución. A su vez, es un proceso para ayudar a determinar cuando las pruebas de disolución bastan para otorgar una exención de un estudio de bioequivalencia in vivo. Por otro lado, este documento también provee recomendaciones para pruebas de disolución para ayudar a asegurar calidad y rendimiento continuos del producto medicinal después de ciertos cambios de fabricación posteriores a la aprobación.⁷²

Se provee información sumaria sobre la metodología de disolución, los aparatos y las condiciones operativas para las pruebas de disolución de productos de IR en forma resumida en el Apéndice A. Principalmente esta guía tiene el propósito de complementar la guía de SUPAC-IR para la industria: formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata; aumentos en escala y cambios posteriores a la aprobación: química, fabricación y controles, pruebas de disolución in vitro y documentación de bioequivalencia in vivo, con referencia específica a la generación de perfiles de disolución con fines comparativos ⁸⁵.

2.9.3 Guía MINSA

Esta guía define los lineamientos generales para los estudios de perfiles de disolución comparativos aportados durante el proceso de inscripción, renovación, o bien, cambios post registro que lo requieran. Además de establecer las condiciones experimentales estándar para los estudios de perfiles de disolución comparativos, como parte de los requisitos de la normativa en materia

de equivalencia terapéutica. Por otro lado, establece aspectos metodológicos y criterios estadísticos estandarizados para el análisis de los datos experimentales de los estudios de perfiles de disolución comparativos. Y, finalmente, detalla los lineamientos para la presentación de los resultados de los estudios de perfiles de disolución comparativos como respaldo para demostrar la similitud de la disolución de los medicamentos ⁹¹.

2.10 Condiciones de operación del cromatógrafo líquido de alta resolución

Se debe contar con ciertas condiciones para emplear el cromatógrafo, ya que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se basa en una técnica utilizada para separar los componentes presentes en una mezcla; esta consiste en una fase estacionaria y una fase móvil. La fase móvil es la que va a actuar de portador de la muestra; además, esta continúa siendo una técnica eficaz para disolver adecuadamente mezclas de compuestos naturales o sintéticos, con fines de identificación y cuantificación ⁸⁷.

2.10.1 Filtración

Mediante las operaciones de filtración se separan sólidos y líquidos. Los filtros cuentan con distintos diseños y características, variando el confinamiento y el control de líquidos y vapores. Es por ello por lo que cuando se utilizan filtros abiertos para materiales peligrosos, los trabajadores pueden estar expuestos a líquidos, sólidos húmedos, vapores y aerosoles durante las operaciones de carga y descarga. Se puede utilizar equipo cerrado de procesamiento para filtrar materiales altamente peligrosos, reducir las emisiones de vapor y prevenir las exposiciones. Y la filtración se debe realizar en áreas con control de vertidos y buena dilución y VAL, y se pueden eliminar los vapores de disolventes volátiles mediante salidas en los equipos cerrados, controlados mediante dispositivos de emisión de aire (condensadores, purificadores, adsorbentes)⁹².

2.10.2 Aspectos que se deben tomar en cuenta para la validación analítica por medio de cromatografía de alta resolución HPLC

2.10.2.1 Curva de calibración

Es la representación gráfica bidimensional, que demuestra la variación de la señal analítica con la concentración del analito. Esta última se obtiene al graficar el valor obtenido de la señal analítica (valor absoluto, altura, área, etc.) versus las concentraciones de los estándares de referencia respectivos ⁶¹.

2.10.2.2 Sensibilidad

Es la propiedad analítica que se define como la capacidad de un método para discriminar entre concentraciones (cantidades) semejantes de analito. La sensibilidad de un método analítico corresponde a la pendiente de la curva de calibración, algunas veces se expresa informando la razón entre el valor de la señal obtenida a una concentración dada de estándar.⁵⁴

2.10.2.3 Intervalo

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito, en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito. Se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (porcentaje, partes por millón) obtenidos mediante el procedimiento analítico ⁶¹.

2.10.2.4 Especificación

Se entiende como una lista de requisitos detallados (criterios de aceptación para los procedimientos de ensayo establecidos) con los que sustancia o producto farmacéutico tiene que cumplir para asegurar una calidad adecuada.⁵⁴ Los

criterios de aceptación tienen límites numéricos, rangos u otros criterios para los ensayos descritos. La Digemid establece que el conjunto de criterios con los cuales los ingredientes farmacéuticos activos (IFAS), excipientes, producto terminado y material de empaque deben tener conformidad para ser considerado aceptable para su uso previsto. Son estándares de calidad que son propuestas justificadas por el fabricante y aprobadas por la Autoridad Nacional de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios ⁶¹.

2.10.2.5 Aptitud del sistema

También conocida como idoneidad del sistema, si las mediciones son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas, estas deben controlarse adecuadamente o debe incluirse una advertencia en el procedimiento. Una consecuencia de la evaluación de la tolerancia y la robustez debería ser que se establezca una serie de parámetros de aptitud del sistema para asegurar que la validez del procedimiento analítico se mantiene cada vez que se usa. Variaciones típicas son la estabilidad de soluciones analíticas, diferentes equipos y diferentes analistas ⁶¹.

En la cromatografía de líquidos, las variaciones habituales son el pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo. En el caso de cromatografía de gases, son variaciones típicas los diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo. Las pruebas de aptitud del sistema se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Los parámetros de prueba de la aptitud del sistema que deben establecerse para un procedimiento específico dependen del tipo de procedimiento que se está evaluando y son especialmente importantes en el caso de procedimientos cromatográficos ⁸⁹.

2.10.3 Calibración de equipos

Los instrumentos de medida deben aportar datos fiables; la calibración de los instrumentos de control se establece frente a estándares oficiales o de carácter privado de solvencia reconocida. Los datos de calibración deben reflejar la precisión y exactitud del aparato de medida, incluyendo, además, los factores de corrección adecuados ⁹⁰.

2.10.3.1 Calibración del equipo HPLC

Para la verificación del equipo HPLC, se debe evaluar cada módulo que compone el aparato. Además, los instrumentos de medida deben aportar datos fiables, la calibración de los instrumentos de control se establece frente a estándares oficiales o de carácter privado de solvencia reconocida. Los datos de calibración deben reflejar la precisión y exactitud del aparato de medida, incluyendo además los factores de corrección adecuados ⁹¹.

El objetivo es verificar que el equipo cumple con las especificaciones del fabricante, por lo que es adecuado su uso para realizar análisis de metodologías en los laboratorios de control de calidad ⁹¹.

Tabla 4. Parámetros para evaluar en un Sistema HPLC

Módulo	Parámetro	Importante para
Bomba	Reproducibilidad de flujo	Reproducibilidad Transferencia del método
Inyector	Reproducibilidad Residuo de muestra	Precisión de resultados Exactitud de precisión de resultados
Horno	Reproducibilidad de T°	Forma de pico
Detector	Ruido Energía de lámpara Relación señal/ruido Precisión de longitud de onda Linealidad	Sensibilidad Sensibilidad Sensibilidad Sensibilidad Transferencia de datos Precisión de resultados
Columna	Forma de pico, Asimetría de pico, TR, resolución, platos teóricos.	Proceso de datos, identificación, reproducibilidad.

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia ⁹².

2.10.4 Componentes del Sistema Cromatográfico

2.10.4.1 Fase estacionaria

Las fases estacionarias más comúnmente usadas son la sílice modificada o las microperlas de polímero. Las microperlas se modifican agregando hidrocarburos de cadena larga. El tipo de relleno específico necesario para completar un análisis se indica mediante la designación “L” en la monografía individual de la sustancia a analizar. A menudo, el tamaño de las microperlas también se describe en la monografía ⁶¹.

2.10.4.2 Columna cromatográfica

La columna es el elemento fundamental de un cromatógrafo de líquido, puesto que es en ella donde tiene lugar la separación; por lo tanto, resulta fundamental una correcta elección de la columna adecuada para cada separación, ya que con una columna inadecuada o de mala calidad, no se obtendrán resultados, aunque se disponga del mejor instrumental. El término columna incluye columnas de acero inoxidable con recubrimiento interno y poliméricas, rellenas con una fase estacionaria. La longitud y el diámetro interno de la columna afectan la separación y, por lo tanto, las dimensiones típicas de la columna se incluyen en la monografía individual de cada sustancia ^{61, 91}.

2.10.4.3 Fase móvil

La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes, según se defina en la monografía individual de cada sustancia. Los componentes de la fase móvil se filtran generalmente para eliminar partículas mayores de 0,45 μm . Las fases móviles de componentes múltiples se preparan midiendo y mezclando los volúmenes requeridos de los componentes individuales, los disolventes se desgasifican normalmente antes de bombear burbujeando con helio, sonicación

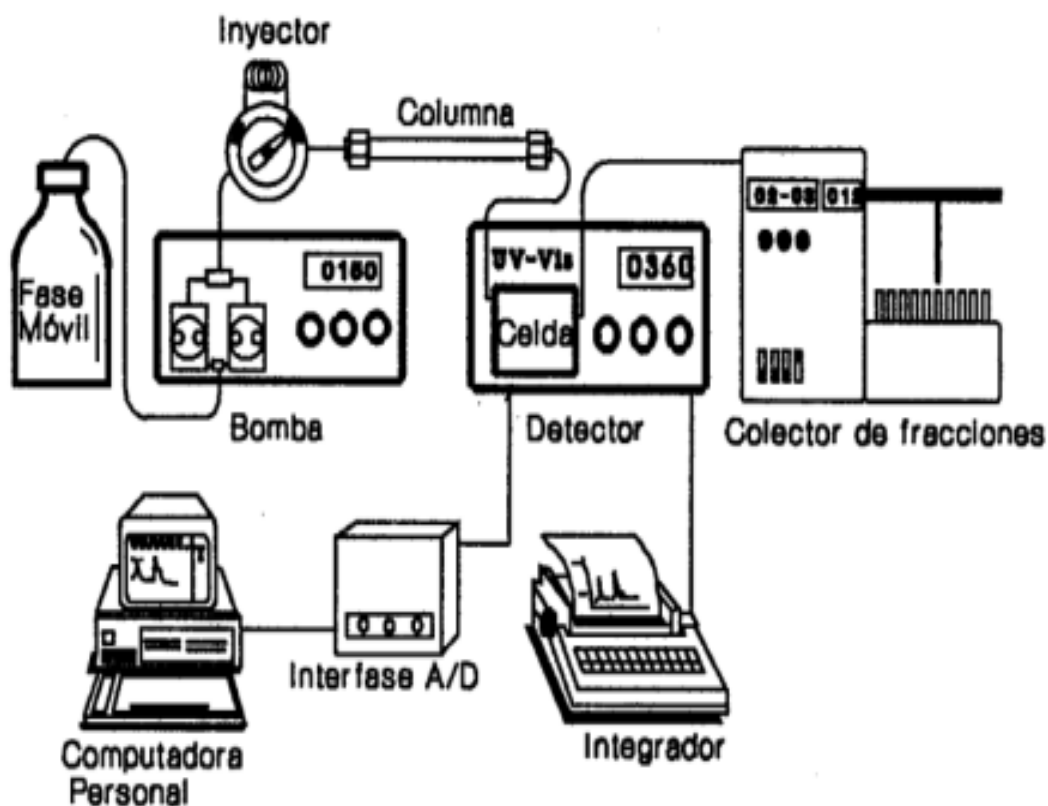
o utilizando módulos de membrana al vacío para evitar la creación de burbujas de gas en la celda del detector ⁸⁹.

2.10.4.4 Aparato

Una instalación de cromatógrafo de líquidos HPLC está compuesta de varias unidades especializadas las cuales pueden ser encontradas como entidades separadas o ser integradas dentro de un marco de trabajo común. Un sistema de tuberías de diámetros internos muy pequeños (0.1 mm) asegura la circulación de la fase móvil entre los módulos. Estos tubos de transferencia están hechos de acero inoxidable o de PEEK (Polyether-etherketone), un polímero coloreado y flexible, capaz de resistir los solventes comunes bajo presiones altas ⁷³.

Un cromatógrafo de líquidos o equipo HPLC consta de una serie de partes instrumentales necesarias para su funcionamiento, según se observa en la Figura 3, las cuales son necesarias para obtener los resultados de un análisis de identificación, detección y cuantificación según se requiera ⁹¹.

Figura 3. Esquema de un cromatógrafo de líquidos



Fuente: Figura extraída del artículo ⁹¹.

Un sistema modular permite a los usuarios adaptar la instalación de acuerdo con las aplicaciones que serán llevadas a cabo. El ensamble vertical de los diferentes módulos permite una economía de espacio. Aquí el Cromatógrafo, comprende una columna controlada termostáticamente para mejorar la reproducibilidad de las separaciones ⁷³.

2.10.5 Problemas más comunes encontrados en HPLC

2.10.5.1 Presión Alta Posible causa

Usualmente ocurre por obstrucción de la Columna de HPLC o Guarda Columna por partículas. Este se puede solucionar invirtiendo la columna y se enjuaga con solvente, teniendo la columna desconectada del detector. Si esto no funciona se reemplaza el fritado a la entrada de la columna. Y si la presión sigue alta se reemplaza la columna, como solución a largo plazo: se debe asegurar que todas las fases móviles se filtren apropiadamente antes que entren a la bomba de HPLC. También filtrar todas las muestras antes de inyectarlas ¹⁰⁴.

2.10.5.2 Pérdida de la Resolución

Esta se da por la obstrucción de la Columna de HPLC ó del Guarda Columna por partículas, por lo que se debe ver la sección de presión alta y como solución a largo plazo se debe filtrar todo antes que se introduzcan las fases móviles en el sistema de HPLC ¹⁰⁴.

2.10.5.3 Picos Hendididos

Una posible causa es también la obstrucción de la Columna de HPLC o del Guarda Columna por partículas, para mejorar se debe dar marcha atrás a la columna roja con presión baja que se encuentra al lado de abrir. Si es necesario reemplazar el filtro de la entrada a la columna. Como solución a largo plazo: es necesario filtrar todo antes que se introduzcan las fases móviles en el sistema de HPLC ¹⁰⁴.

2.10.5.4 Variación en los Tiempos de Retención

Se puede dar por el atrapado en la bomba debido a gases disueltos en fase móvil. Por lo que hay que asegurarse que la fase móvil este apropiada y adecuadamente desgasificada ¹⁰⁴.

2.10.5.5 Variaciones de la Línea Base

Generalmente ocurre por burbujas del aire atrapados en la celda del detector debido a una mala desgasificación de los solventes de la fase móvil, como solución al problema se asegura que todas las fases móviles estén debidamente desgasificadas y considerar el uso de un restrictor de la presión a toma de corriente del detector ¹⁰⁴.

2.10.6 Parámetros cromatográficos para técnicas propias

Un método preliminar debe optimizarse para mejorar al máximo la separación cromatográfica. La calidad de un cromatograma puede ser juzgada de manera visual; sin embargo, la evaluación cuantitativa de la calidad de separación es indudablemente menos subjetiva y permite aplicar evaluaciones globales y diseños de optimización ¹⁰⁴.

2.10.6.1 Coeficiente de variación (CV)

El coeficiente de variación es la desviación estándar dividida por la media. También es conocida como desviación estándar relativa (RSD). El coeficiente de variación se expresa en porcentaje ⁶⁵.

2.10.6.2 Número de platos teóricos

Es una medida de la eficacia del sistema cromatográfico que expresa el número de picos que pueden aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo; mide la capacidad del sistema de proporcionar bandas de elución estrechas ⁶¹.

2.10.6.3 Factor de asimetría o factor de cola

Es una medida de la asimetría de la señal generada por el analito, las señales simétricas son preferibles porque minimizan las imprecisiones en la detección del inicio y el final del pico por parte de los sistemas de integración. Por lo tanto, permiten una mejor y más precisa cuantificación del área bajo la curva ⁶¹.

2.10.7 Regente farmacéutico a cargo de la validación

Este profesional cuenta con muchas funciones en cuanto a medicamentos y su principal función es proporcionar medicamentos a la población que prevengan o combaten distintas afecciones patológicas. Como resultado, a lo largo de su historia, ha ejercido el papel de científico, investigador, sanitarista y empresario. De igual forma, otras investigaciones han examinado las aportaciones de este gremio a la salubridad nacional. Sin embargo, una característica poco estudiada es la faceta del farmacéutico como fabricante por el desarrollo de una industria farmacéutica local. Actualmente, la industria farmacéutica es una de las ramas productivas más importantes que participa activamente en la economía nacional ⁹³.

De este modo, el laboratorio y su personal tienen una clara responsabilidad de corresponder a la confianza proporcionando la respuesta correcta a la parte analítica del problema y proporcionando resultados que han demostrado ser adecuados a su propósito. Esto lleva implícito que las pruebas realizadas son

apropiadas para la parte analítica del problema que el cliente desea resolver y que el informe final presenta los datos analíticos de tal manera que el cliente pueda entenderlos fácilmente y sacar conclusiones apropiadas. La validación del método permite a los químicos demostrar que el método es adecuado ¹⁰⁵.

Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, el desempeño del método debe validarse y debe estimarse la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza dado. La incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente de forma interna y fácil de interpretar. La mayor parte de la información requerida para evaluarla se puede obtener durante la validación del método ¹⁰⁵.

2.10.8 Importancia del ensayo de disolución

El ensayo de disolución permite conocer la cantidad real de droga que se libera en un medio, por lo que es un ensayo que debe establecerse durante el proceso de desarrollo de las formas sólidas y mantenerse como parte del control de la calidad y estudio de estabilidad del medicamento. Es por ello que, durante el desarrollo de una metodología para ensayo de disolución, el medio de disolución, el aparato y la velocidad de agitación deben ser evaluadas como parámetros necesarios para garantizar un ensayo que cumpla los requisitos establecidos para el buen funcionamiento del mismo ⁹⁴.

Además, el medio de disolución es uno de los aspectos más importantes, pues este debe garantizar la solubilidad y recuperación de droga. Por otro lado, la velocidad de agitación también tiene un rol importante, pues esta debe garantizar un flujo adecuado que permita que la disolución sea gradual y no demasiado rápida. Se plantea que un perfil de disolución que presente los tres primeros puntos por debajo del 85 % de droga liberada es el ideal ⁹⁴.

2.10.9 Criterios de aceptación

Son las características que se van a evaluar y van a depender del tipo del ensayo. Los criterios de aceptación indicados en una monografía de la farmacopea contemplan: el error analítico, las inevitables variaciones en los procesos de fabricación y las desviaciones aceptables en las condiciones de almacenamiento

95.

CAPÍTULO III
MARCO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo experimental, ya que es un estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes (supuestas causas-antecedentes), para analizar así las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables. Además, comprende un alcance exploratorio ya que esta se realiza cuando la investigación tiene como objetivo examinar un tema que no se ha abordado antes, aunado a que se desea plantear nuevas perspectivas, tal como el caso de las cápsulas de itraconazol nanoemulsificables. Asimismo, esta posee un enfoque cuantitativo experimental debido a que se fundamenta en un esquema deductivo y lógico que busca formular preguntas de investigación e hipótesis para posteriormente probarlas.⁸⁷

3.2 Fuentes de información

Para sustentar esta investigación, se utilizaron artículos científicos y tesis validadas basadas en estudios sobre formas farmacéuticas de itraconazol, farmacología de itraconazol, propiedades fisicoquímicas de itraconazol, la biodisponibilidad de un fármaco, sistemas autoemulsificables, parámetros estadísticos y validación de métodos analíticos; estos fueron tomados de bases de datos tales como: Pubmed, Scielo, Google académico, Redalyc y Elsevier.

3.3 Criterios de búsqueda

Tabla 5. Criterios de búsqueda

Objetivo	Descriptores	Motores de búsqueda	Período de estudio	Idioma
Optimizar las condiciones de operación del cromatógrafo líquido de alta resolución para la evaluación del desempeño de las cápsulas de itraconazol con un sistema autoemulsificable.	Condiciones de operación del HPLC.	Google académico, Scielo, Pubmed, Elsevier, Redalyc	2017-2022	Español/Inglés
	Biodisponibilidad de itraconazol.	Google académico, Scielo, Pubmed, Elsevier, Redalyc	2017-2022	Español/Inglés
	Sistema Autoemulsificable.	Google académico, Scielo, Pubmed, Elsevier, Redalyc	2017-2022	Español/Inglés
Validar la metodología para la evaluación del desempeño de las cápsulas de itraconazol con un sistema autoemulsificable por medio de los siguientes	Validación de métodos analíticos.	Google académico, Scielo, Pubmed, Elsevier, Redalyc	2017-2022	Español/Inglés

parámetros estadísticos: linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación.	Parámetros estadísticos.	Google académico, Scielo, Pubmed, Elsevier, Redalyc	2017-2022	Español/Inglés
---	--------------------------	---	-----------	----------------

Fuente: Elaboración propia, 2023.

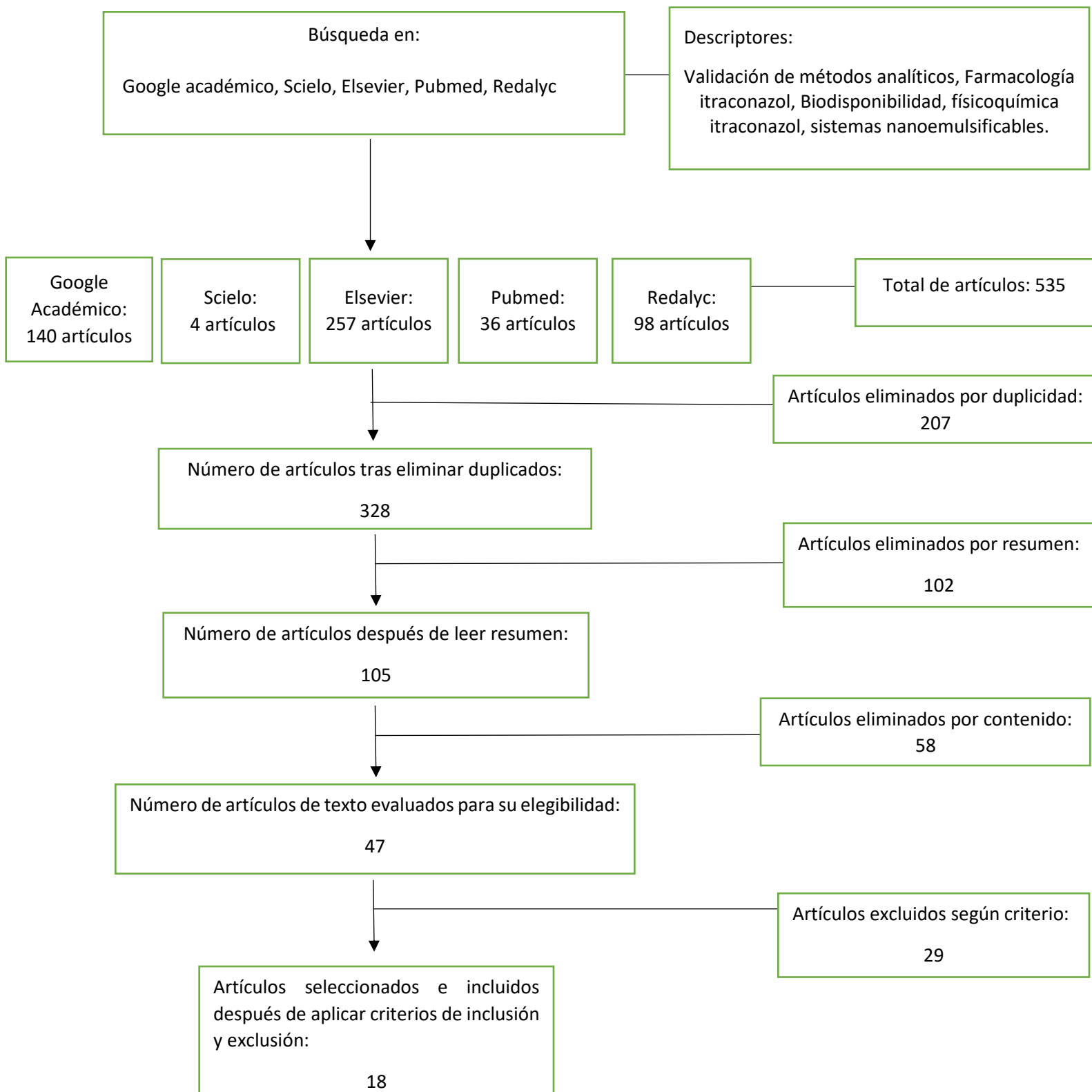
3.4 Criterios de inclusión y exclusión

Tabla 6. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de artículos

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Artículos sobre validación de métodos analíticos por medio de HPLC.	Artículos sobre validación de un método por espectrofotometría.
Artículos sobre parámetros estadísticos: linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación.	Artículos sobre estadística aplicada a otros campos que no son de Salud.
Artículos sobre itraconazol propiedades fisicoquímicas y farmacoterapéuticas.	Artículos sobre resistencia de itraconazol.
Artículos sobre sistemas autoemulsificables.	Artículos sobre estudios de dispersiones de un sistema.

Fuente: Elaboración propia, 2023.

3.5 Análisis de la información



Como se puede observar en el esquema anterior, en la búsqueda de información se obtuvieron 535 artículos, entre el año 2017 y el 2022, en los idiomas inglés y español. Sin embargo, al aplicar los criterios de inclusión y exclusión mediante revisión del título y resumen o *abstract* de cada artículo, se redujo el número de artículos a 328. Se excluyeron aquellos que no cumplían con el objetivo del tema al ser artículos que hablan sobre validación de un método por espectrofotometría, estadística aplicada a otros campos de salud, resistencia a itraconazol y dispersiones de un sistema, así como también aquellos que, dentro de su contenido, no mencionaban al itraconazol o un método analítico validado, logrando así reducir el número a un total de 18. Estos se utilizaron por ser artículos con mayor nivel de evidencia y ser estudios recientes; además, fueron seleccionados de acuerdo con su contenido y el objetivo de la investigación, ya que hablan sobre parámetros estadísticos aplicados a un método analítico de validación, así como sobre sistemas autoemulsificables y mencionan propiedades fisicoquímicas y farmacológicas del itraconazol.

3.6 Clasificación de la información según niveles de evidencia

Ver Anexo 1.

3.7 Población y muestra

Población: Antimicóticos

La muestra utilizada para la validación de este método consistió en cápsulas de itraconazol 100 mg de una marca comercial distribuida en Costa Rica y cápsulas de itraconazol de 100 mg con un sistema autoemulsificable realizadas en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas.

3.8 Descripción del procedimiento de recolección y análisis de datos

En primer lugar, se realiza la validación del método analítico el cual se realizó siguiendo los lineamientos establecidos en el capítulo general <1225> de la USP 384e ICH Q2 (R1) 5. Los parámetros evaluados corresponden a: especificidad, linealidad, precisión (precisión del sistema cromatográfico, repetibilidad y precisión intermedia) y exactitud.

3.8.1 Validación del sistema

3.8.1.1 Linealidad e intervalo del sistema

Procedimiento:

- a) Preparar tres soluciones madre del estándar de itraconazol de forma independiente con una concentración cercana a 0,56 mg/mL.
- b) Preparar los patrones del estándar a partir de la solución madre del estándar según Tabla 5, usando como diluyente el amortiguadora fase móvil (ACN:Agua 90:10).

Tabla 7. Diluciones del estándar para elaborar la curva de calibración

Concentración nominal (ug/mL)	Volumen de solución madre de concentración de 0,56 mg/mL (mL)	Volumen final de la disolución (mL)
12,0	1	50
34,0	3	50
56,0	5	50
78,0	7	50
100,0	9	50
123,0	11	50

Fuente: Elaboración propia, 2023.

- c) Verificar la longitud de onda de máxima absorción realizando un espectro de absorción con la solución patrón media de la curva en un rango de 200 a 400 nm.
- d) Medir la absorbancia de las soluciones patrones a la longitud de onda de máxima absorción (263 nm) utilizando una celda de flujo de cuarzo 1 cm.
- e) Graficar las absorbancias contra la concentración de cada uno de los patrones de itraconazol.
- f) Realizar un análisis de varianza de la regresión lineal.
- g) Calcular el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación.
- h) Calcular y graficar los residuos (resta del valor real de la concentración menos el cálculo por la ecuación de regresión lineal para cada valor de concentración, versus el valor real de la concentración).

Criterios de aceptación (Ministerio de Salud [MINSA] 2005a)

Se confirma la linealidad si se cumplen los siguientes criterios:

- Homocedasticidad (la varianza es constante para todas las concentraciones). Debe cumplir con la prueba F-máx. de Hartley.

- El análisis de varianza de la regresión lineal debe demostrar:
 - ✓ Paso del intercepto por cero, mediante una prueba de t con un nivel de probabilidad del 5%.
 - ✓ Desviación no significativa con respecto a la regresión, mediante una prueba de t con un nivel de probabilidad del 5%.
- El coeficiente de correlación (R) de la regresión lineal debe estar entre 0,98 y 1,00 y el coeficiente de determinación (R²) de cada una de las curvas debe ser mayor de 0,995.
- Distribución aleatoria de los residuos, sin tendencias sistemáticas indicativas de no linealidad.

3.8.1.2 Precisión y exactitud del sistema

I. Repetibilidad del sistema

Procedimiento:

- a. Preparar los patrones del 10% (0,011 mg/mL), 50% (0,055 mg/mL) y 110% (0,12 mg/mL), por triplicado cada uno, para obtener un total de 9 soluciones independientes.
- b. Medir la absorbancia de los patrones anteriores según las condiciones del apartado 3.8.1 de linealidad.
- c. Calcular el promedio, la desviación estándar, la desviación estándar relativa y el porcentaje de error relativo de cada medición.

Criterio de aceptación (Ministerio de Salud [MINSAL] 2005a).

El porcentaje de error relativo (ER%) a cada nivel de concentración no debe ser mayor que el 2% y la desviación estándar relativa (DSR%) debe ser menor o igual al 2%.

II. Precisión intermedia del sistema

Procedimiento:

- a) Tomar las soluciones patrones descritas en el inciso a de la repetibilidad intermedia (soluciones a concentración 10% (0,011 mg/mL), 50% (0,055 mg/mL) y 110% (0,12 mg/mL), y realizar tres lecturas de absorbancia individuales para cada una de las diluciones; durante tres días consecutivos, en condiciones de entre 23 y 24°C.
- b) Una vez terminadas las lecturas de cada día, se deberá almacenar las muestras y el medio, según el siguiente procedimiento:
 - Sellar los balones aforados utilizando papel de parafina.
 - Envolver por completo cada balón aforado con papel de aluminio y el beaker que contiene el medio cubriendo la boca de este.
 - Almacenar los balones aforados protegidos de la luz bajo condiciones de refrigeración (entre 2 a 8 °C). Antes de hacer las lecturas para los días posteriores, se deberá permitir que las soluciones patrón alcancen una temperatura ambiente (aproximadamente 24°C).
 - Calcular el promedio de las mediciones a cada uno de los niveles del patrón (bajo, medio y alto), la desviación estándar relativa y el porcentaje de error relativo de cada concentración.

Criterio de aceptación

Para los datos obtenidos cada día, el porcentaje de error relativo a cada concentración (%ER) no debe ser mayor que el 2%. Además, la desviación estándar relativa (DSR) debe ser menor o igual al 2% (Ministerio de Salud [MINSa] 2005a).

3.8.1.4 Límite de detección (LOD) y Limite de cuantificación (LOQ) (Ministerio de Salud [MINSa] 2005a)

Procedimiento:

- a) Utilizar el valor de la pendiente (m) y del error estándar para el eje y ($S_{Y/X}$), obtenidos con el análisis de regresión lineal realizada de los datos obtenidos, para calcular el LOD y el LOQ del sistema.

$$LoD = 3,3 \times \frac{S_d}{b}$$

$$LoD = 10 \times \frac{S_c}{b}$$

Donde: b es la pendiente y S_d y S_c es la desviación estándar blanco y calculada.

- b) Expresar ambos resultados en términos de concentración de itraconazol (($\mu\text{g/mL}$)).

Criterio de aceptación

El límite de detección debe ser menor al límite de cuantificación y, a su vez, este último debe ser menor a la concentración menor utilizada en el intervalo de la curva de calibración (Ministerio de Salud [MINSa] 2005a).

3.8.2 Validación del método

3.8.2.1 Linealidad del método

Procedimiento:

- a) Pesar exactamente y en forma independiente 10 tabletas del Itraconazol Cápsulas del lote 930321 de Laboratorio Calox.
- b) Sacar el polvo de las cápsulas y homogenizar.

- c) Realizar tres pesadas independientes de polvo de cápsulas equivalentes a 28 mg de itraconazol base y transferir cada porción de polvo a un balón aforado de 50,0 mL; agregar 25 mL de diluyente y someter cada uno a un baño ultrasonido durante unos 20 minutos.
- d) Enfriar a temperatura ambiente y llevar a la marca de aforo con el diluyente, hacerlo por triplicado a una concentración equivalente a 0,56 mg/mL itraconazol.
- e) Filtrar una porción de cada solución a través de un filtro de 0,45 μm , descartar los primeros mililitros y recolectar el resto del filtrado.
- f) Preparar las soluciones, según la siguiente tabla:

Tabla 8. Diluciones de la preparación de valoración con adición de solución madre estándar para elaborar la curva de calibración

Porcentaje del estándar con respecto al etiquetado (%)	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de solución muestra (mL)	Volumen final de la disolución (mL)
10	12,0	1	50
30	34,0	3	50
50	56,0	5	50
70	78,0	7	50
90	100,0	9	50
110	123,0	11	50

Fuente: Elaboración propia, 2023.

- g) Realizar un espectro de absorción con una solución de concentración media para verificar la longitud de onda de máxima absorción.
- h) Medir las soluciones a la longitud de 263 nm.

- i) Graficar la respuesta de la medición contra la cantidad adicionada del estándar de itraconazol en cada una de las soluciones. Se verifican datos con comportamiento atípico mediante mediciones adicionales.
- j) Realizar un análisis de varianza de la regresión lineal.
- k) Calcular el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación.
- l) Calcular y graficar los residuos (valor real de la cantidad adicionada menos el cálculo por la ecuación de regresión lineal para cada valor de cantidad adicionada, versus el valor real de la cantidad adicionada)

Criterios de aceptación (Ministerio de Salud [MINSAL] 2005a)

Se confirma la linealidad si se cumplen los siguientes criterios:

- Homocedasticidad (la varianza es constante para todas las concentraciones). Debe cumplir con la prueba F-Max de Hartley.
- El análisis de varianza de la regresión lineal debe demostrar:
 - ✓ Paso del intercepto por cero, mediante una prueba de t con un nivel de probabilidad del 5%.
 - ✓ Desviación no significativa con respecto a la regresión, mediante una prueba de t con un nivel de probabilidad del 5%.
- El coeficiente de correlación (R) de la regresión lineal debe estar entre 0,98 y 1,00, el coeficiente de determinación (R²) de cada una de las curvas debe ser mayor de 0,995.
- Distribución aleatoria de los residuos, sin presencia de tendencias sistemáticas indicativas de no linealidad.

3.8.2.2 Exactitud del método

Procedimiento:

- a) Realizar tres pesadas independientes de polvo de cápsulas equivalentes a 28 mg de itraconazol base y transferir cada porción de polvo a un balón aforado de 50,0 mL; agregar 25 mL de diluyente y someter cada uno a un baño ultrasonido durante unos 20 minutos.

- b) Enfriar a temperatura ambiente y llevar a la marca de aforo con el diluyente, hacerlo por triplicado a una concentración equivalente a 0,56 mg/mL itraconazol.
- c) Filtrar una porción de cada solución a través de un filtro de 0,45 μm , descartar los primeros mililitros y recolectar el resto del filtrado.
- d) Preparar las soluciones según la Tabla 9.

Tabla 9. Diluciones de la preparación de valoración con adición de solución madre estándar para elaborar la curva de calibración

Porcentaje del estándar con respecto al etiquetado (%)	Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de solución muestra (mL)	Volumen final de la disolución (mL)
10	12,0	1	50
30	34,0	3	50
50	56,0	5	50
70	78,0	7	50
90	100,0	9	50
110	123,0	11	50

Fuente: Elaboración propia, 2023.

- e) Realizar un espectro de absorción entre 200-400 nm, con una solución de concentración media para verificar la longitud de onda de máxima absorción.
- f) Medir las soluciones a la longitud de 263 nm.
- g) Graficar la respuesta de la medición contra la cantidad adicionada del estándar de itraconazol en cada una de las soluciones. Se verifican datos con comportamiento atípico mediante mediciones adicionales.

- h) Realizar un análisis de varianza de la regresión lineal.
- i) Calcular el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación.
- j) Calcular y graficar los residuos (valor real de la cantidad adicionada menos el cálculo por la ecuación de regresión lineal para cada valor de cantidad adicionada, versus el valor real de la cantidad adicionada).

Criterio de aceptación (Ministerio de Salud [MINSa] 2005a)

Los porcentajes de recuperación obtenidos deben encontrarse entre 98 y 102%, además la desviación estándar relativa del porcentaje de recuperación debe ser menor o igual al 3%.

3.8.2.3 Precisión del método (Ministerio de Salud [MINSa] 2005a).

I. Repetibilidad del método

Procedimiento:

- a) Preparar en forma independiente, tres soluciones que contienen Itraconazol, a tres niveles de concentración bajo, medio y alto (0,011; 0,055 y 0,122 ug/mL) en balones aforados de 50,0 mL, a partir de una solución muestra (de polvo de capsulas). Diluir y llevar a la marca de aforo con el diluyente.
- b) Medir en el HPLC de las muestras enriquecidas a la longitud de onda de máxima absorción (263 nm).
- c) Calcular con la pendiente y el intercepto de la curva de calibración, la concentración ajustada para cada medición y obtener el promedio, la desviación estándar, la desviación estándar relativa correspondiente.

Criterio de aceptación

La desviación estándar relativa (DSR%) a cada nivel de concentración debe ser menor o igual al 3%.

II. Precisión intermedia del método (se evalúa el efecto día)

Procedimiento:

- a) Preparar, en forma independiente, una solución que contenga itraconazol a tres niveles de concentración: bajo, medio y alto (12,0; 56,0 y 123,0 $\mu\text{g/mL}$), en balones aforados de 50,0 mL, a partir de una misma solución madre de 560 $\mu\text{g/mL}$ del estándar de itraconazol, y de una misma solución madre de polvo de cápsulas. Diluir y llevar a la marca de aforo con el diluyente.
- b) Medir en el HPLC de las muestras a la longitud de onda de máxima absorción (263 nm).
- c) Calcular con la pendiente y el intercepto de la curva de calibración, la concentración ajustada para cada medición y obtener el promedio, la desviación estándar, la desviación estándar relativa correspondiente.
- d) Preparar los dos días siguientes, por parte del mismo analista, una solución que contenga itraconazol, a tres niveles de concentración: bajo, medio y alto (12,0; 56,0 y 123,0), en balones aforados de 50,0 mL, a partir de una misma solución madre de 560 $\mu\text{g/mL}$ del estándar de itraconazol, y de una misma solución madre de polvo de capsulas. Diluir y llevar a la marca de aforo con el diluyente.
- e) Medir en el HPLC de las muestras a la longitud de onda de máxima absorción.
- f) Calcular con la pendiente y el intercepto de la curva de calibración, la concentración ajustada para cada medición y obtener el promedio, la desviación estándar, la desviación estándar relativa correspondiente. Criterio de aceptación: Para los datos obtenidos en ambos días, la desviación estándar relativa (DSR%) de cada una de las concentraciones debe ser menor o igual al 3%.

Especificidad (Instituto de Salud Pública de Chile 2010; International Conference on Harmonization 2005; Ministerio de Salud [MINSAL] 2005a).

Procedimiento:

- a) Preparar una solución de la matriz del Itraconazol del Laboratorio Calox, calculando el contenido equivalente de los excipientes de una cápsula en 900 mL de medio.
- b) Realizar lecturas por triplicado y comparar con las lecturas de la disolución de 100% del punto a de repetibilidad del método.

Criterio de aceptación

La matriz no debe presentar ningún tipo de señal que interfiera con la señal de itraconazol. Para calcular el porcentaje de señal equivalente al principio activo en la matriz, se realizará siguiente ecuación:

Ecuación 1. Porcentaje de interferencia de otras señales

$$\%PA = \frac{A - b/a}{m\ etiq} * 100$$

Donde:

A es el promedio de Unidades de absorbancia de las soluciones placebo a 244 nm.

$m\ etiq$ es la masa de principio activo etiquetada en el producto analizado.

b es el intercepto de la curva del estándar.

a es la pendiente de la curva del estándar.

3.8.4 Perfiles de disolución comparativo (PDC)

- a) Colocar 900 mL del medio de disolución (amortiguadora fosfatos pH 6.8) en cada uno de los vasos del equipo de disolución.
- b) Una vez que el medio alcance la temperatura en cada vaso, colocar cada cápsula de itraconazol en la canasta respectiva.
- c) Programar el equipo para que los ejes de las paletas giren a 75 revoluciones por minuto.
- d) Ajustar el automuestreador para tomar alícuotas de 10 mL utilizando filtros de 10 μ m; a los 15, 20, 30, 45, 60, 90, 100 y 110 minutos. No se deberá realizar reposición del medio de forma manual, debido a que la bomba en línea hace la reposición de forma automática.
- e) Medir la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro en una longitud de onda de 263 nm.

- f) Realizar diariamente un análisis de soluciones patrones de 60, 80, 130, 160 y 220 µg/mL de itraconazol base para establecer la curva de calibración con la cual se puede calcular la concentración de Itraconazol en cada una de las muestras.
- g) Repetir el procedimiento hasta completar la evaluación de las doce unidades de cada lote del producto y del de referencia, en medio amortiguadora fosfatos pH $6,8 \pm 0,1$. Comparar los perfiles de disolución por medio de la prueba la prueba f2 y f1.
- h) Determinar el porcentaje de fármaco disuelto (%Q) se calculó de la siguiente manera:

$$\%Q = \frac{(\text{Respuesta UA-ordenada/pendiente}) * V * Pot}{\text{Etiquetado de la dosis}}$$

Ecuación 2 Cálculo
de %Q,
según la USP38- NF33

Donde:

V es el volumen por vaso (900 ml)

Pot es la potencia de itraconazol obtenida en la valoración por lote y el etiquetado de la dosis es equivalente a 100 mg.

3.8.5 Criterios de evaluación

1. Un valor del factor de similitud (f2) de 50 o mayor (50-100) refleja la similitud de las dos curvas y así la equivalencia del desempeño in vitro de los dos productos.
2. Un valor del factor de diferencia (f1) de 0 a 15 indica que no hay diferencia significativa entre las dos curvas (US Food and Drug Administration [FDA] 2000^a).

3.8.6 Evaluación de correlación entre ensayo de disolución y PDC.

- Realizar una gráfica X-Y con los valores de f1 y f2 en el eje X y los valores de Q (del ensayo de disolución) en el eje Y, correspondientes para cada lote seleccionado.
- Comparar e identificar si existe alguna correlación entre ambos valores (obtener valor R² y R² ajustado).

3.8.7 Metodología para el estudio de disolución

La cinética de disolución se debe evaluar mediante el método analítico de la USP, empleando un disolutor tipo 2, aplicado en un tiempo establecido para determinar la velocidad y cantidad de fármaco liberado en el simulado sitio de absorción y, por ende, se analiza si su solubilidad ha sido mejorada o no.

3.8.7.1 Descripción del estudio de disolución

- Se evalúa una cantidad total de 16 formulaciones autoemulsificables mediante el aparato de disolución 2 de la USP, en 900 mL de medio a emplear, a una temperatura de 37°C y a una velocidad de 75 rpm (revoluciones por minuto).
- Se analiza el ensayo de disolución a un tiempo óptimo de 45 minutos.
- Se obtienen alícuotas de 3 mL de cada muestra.
- Filtrar las alícuotas mediante un filtro de Nylon Millipore de 0,45 mm.
- Analizar las diluciones mediante los métodos analíticos anteriormente mencionados, ya sea mediante un cromatograma HPLC o espectrofotometría UV-Visible.

3.9 Condiciones

Tabla 10. Condiciones del ensayo de disolución para itraconazol de referencia en medio agua destilada

Disolutor tipo 2 USP	
Medio de disolución	Agua destilada
Volumen	900 mL
Temperatura	37°C
Aparato 2 (paletas)	(paletas)
Velocidad 75 rpm	75 rpm
Tiempos de muestreo	45 min

Fuente: Elaboración propia, 2023.

3.10 Descripción de instrumentos y técnicas

3.10.1 Instrumentos:

- Balones aforados de 50, 100 y 400 mL
- Beakers de 50 mL, 100 mL, 200 mL y 400 mL
- Pipetas clase A de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5mL, 6mL y 7mL
- Probeta graduada clase A de 100 mL
- Tubos de ensayo
- Cubetas de cuarzo 1 cm
- Pastilla de agitación magnética
- Mortero y pistilo
- Gradillas para tubos de ensayo
- Goteros
- Piseta
- Espátula
- Papel aluminio
- Jeringas
- Filtros de nylon de 0,45 μm
- Papel de parafina
- Mortero y pistilo

3.10.2 Técnica

El experimento se basa en una técnica experimental analítica instrumental.

3.10.2.1 Preparación de soluciones y medios

- **Solución madre del estándar:**

Se pesaron con precisión 28 mg de ITZ y se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 ml y el volumen se completó hasta 50 ml con metanol. La solución de trabajo se preparó a partir de la solución estándar y se completó el volumen con la fase móvil.

- **Selección de longitud de onda de detección**

El espectro de absorción UV para una solución de 56 ppm de ITZ se obtuvo escaneando en el rango de 200-400 nm.

- **Optimización de las condiciones cromatográficas**

Se llevaron a cabo muchos ensayos preliminares para la selección y optimización de la fase móvil, la tasa de flujo, el volumen de muestra a ser temperatura inyectada y de la columna.

- **Parámetros cromatográficos y adecuación del sistema.**

Las muestras fueron leídas en un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) marca YL modelo 9100, en dilución isocrática con fase móvil compuesta por acetonitrilo y agua destilada a una composición de 90% y 10% respectivamente. Se utilizó un flujo de 1,2 mL por minuto y una detección por espectrofotometría ultravioleta a una longitud de onda de 263 nm. Las inyecciones de muestra fueron de 20 μ L utilizando un automuestreador. La fase estacionaria estaba compuesta por una Columna Marca Waters C18 con una longitud de 150 mm y 4,5 mm de diámetro, y un tamaño de partícula de 5 μ m.

- **Validación de métodos analíticos**

Las características de rendimiento del método HPLC analítico se validaron estadísticamente de acuerdo con la ICH directrices para la validación de métodos analíticos.

3.11 Materiales, equipos y condiciones

3.11.1 Materiales:

- Filtros de nylon
- Filtros de 0.45 μm
- Filtros de papel cuantitativo
- Filtros de pesado
- Viales 2 ml
- Jeringas plásticas 10 CC

3.11.2 Equipos:

- Cromatógrafo líquido de alta eficacia con detector de longitud de onda variable (HPLC)
- Baño ultrasonido
- Balanza analítica

3.11.3 Condiciones: Comprende condiciones óptimas y temperaturas adecuadas.

3.12 Componentes reactivos

- Agua destilada
- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Estándar primario de itraconazol
- Ácido acético
- Acetato de sodio
- Fosfato de sodio

3.13 Diseño de Experimentos

La presente investigación comprende un diseño de análisis cuantitativo basado en el contenido y cantidad disuelta del principio activo de itraconazol un medio de disolución

establecido con el propósito de comprobar el desempeño de la formulación elaborada en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas respecto a la formulación comercial.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

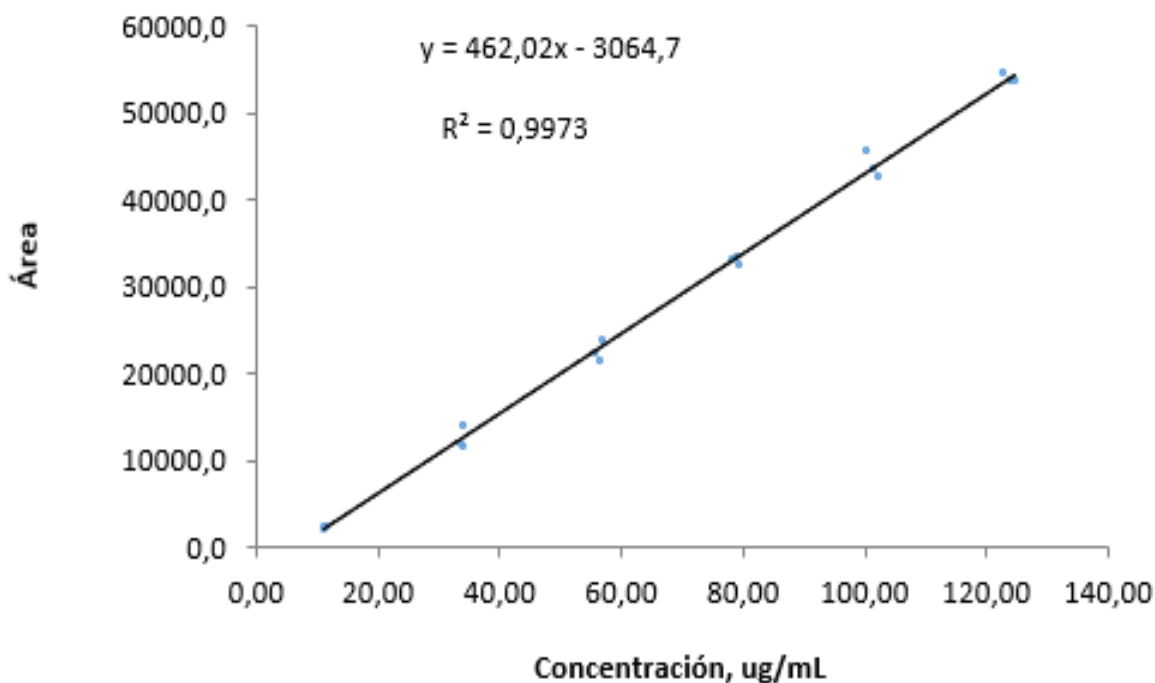
4.1 Validación del sistema

4.1.1 Linealidad del sistema

La evaluación de los parámetros se realiza con la relación de la respuesta del área del estándar (itraconazol).

En el Grafico 1 se muestra el comportamiento de los resultados de linealidad obtenidos para el estándar de Itraconazol, en donde se observa el comportamiento para las tres curvas realizadas independientemente al largo del intervalo de concentración planteada (de 12,0 µg/mL a 123,0 µg/mL).

Gráfico 1. Linealidad de las tres curvas del Itraconazol



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Analizando los resultados y evaluando contra los criterios de aceptación, el coeficiente de determinación, al ser mayor a 0.995 (en este caso 0.9973), cumple con la especificación planteada. Haciendo uso del programa Microsoft Office Excel 2007, se realizó el análisis de varianza para los datos obtenidos de la regresión lineal. Previo a este análisis de las varianzas se aplicó una prueba de Hartley y el resultado muestra que existe homocedasticidad, por lo que se demuestra que la varianza es constante en los diferentes niveles del factor (ver Anexo 2).

Tabla 11. Resultados del análisis de varianza de la regresión lineal del sistema para el itraconazol

Parámetro evaluado	Valor obtenido
Pendiente (m)	462,02000
Intercepto (b)	-3064, 68105
Coefficiente de correlación (r)	0,998654
Coefficiente de determinación (r ²)	0,997311
Desviación estándar para la pendiente	5,99694359
Desviación estándar para el intercepto	465,6643928
Número de puntos (N)	18

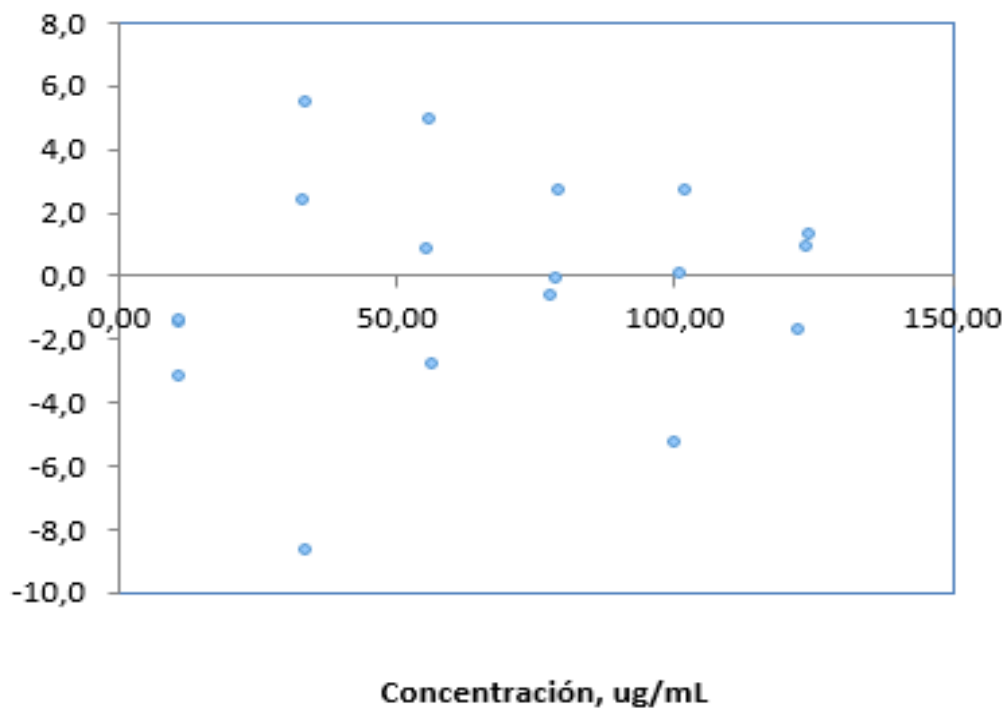
Fuente: Elaboración propia, 2023.

Haciendo uso de una prueba F de Fisher para el análisis de varianza (con $p=0.05$ y $n=18$) se demuestra que no existe desviación estadísticamente significativa con respecto a la regresión lineal para los datos nominales ni ajustados (ver Anexo 2).

Realizando una prueba t (con $p=0.05$ y $n=18$) se determina que el intercepto es estadísticamente distinto de cero para los datos nominales. Y el intercepto es estadísticamente igual a cero y la pendiente estadísticamente igual a uno para los datos ajustados (ver Anexo 2).

Dentro del análisis de la linealidad y revisando la distribución de los residuos para cada muestra a las distintas concentraciones en el Grafico 2, se puede notar que se encuentran dentro de los valores 1 y -1. También muestran una aleatoriedad sin tendencias sistemáticas entre los datos.

Gráfico 2. Representación de residuales de la linealidad del sistema del itraconazol



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Por su parte, demuestra que existe linealidad en todo el intervalo de concentración analizado. Por lo tanto, está conforme con los criterios de aceptación establecidos.

4.1.2 Exactitud y precisión

4.1.2.1 Evaluada en repetibilidad:

Para evaluar el parámetro de repetibilidad, se analizó seis estándares independientes a los tres niveles de concentración de control del itraconazol. El resumen de los resultados se refleja en la Tabla 12.

Tabla 12. Resumen de los datos de repetibilidad para el sistema analítico del itraconazol

Concentración (µg/mL) Para n=6	Exactitud Evaluada en el porcentaje de error relativo (%)	Precisión Evaluada en la desviación estándar relativa.
12,0	1,6489974	0,44398452
56,0	0,98607932	1,23968267
123,0	0,52681854	0,71525593

Fuente: Elaboración propia, 2023.

4.1.2.2 Evaluada en precisión intermedia:

Para evaluar el parámetro de precisión intermedia se analizó un estándar de los tres niveles de concentración de control de itraconazol durante tres días. El resumen de los resultados se refleja en la Tabla 13.

Tabla 13. Resumen de los datos de precisión intermedia para el sistema analítico de itraconazol

Concentración (µg/mL) Para n=6	Exactitud Evaluada en el porcentaje de error relativo (%)	Precisión Evaluada en la desviación estándar relativa
12,0	1,3207161	0,52844302
56,0	0,9374411	1,0515689
123,0	0,7442988	0,7649817

Fuente: Elaboración propia, 2023.

Con los datos mostrados en las tablas 12 y 13, se puede ver que la exactitud evaluada por medio del error relativo es menor al 2% para los tres niveles de concentración. Además,

la precisión de los datos evaluada con los valores de desviación estándar es menor al 2% a los tres niveles de concentración.

Con estos datos se puede establecer que el sistema analítico para la cuantificación de itraconazol es preciso y exacto en todo el rango de concentraciones evaluada. Por lo tanto, está conforme con los criterios de aceptación establecidos.

4.1.3 Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ)

Tabla 14. Resumen de los datos de LOD y LOQ para el sistema analítico de itraconazol

Límite de detección:	0,0428334
Límite de cuantificación:	0,129798

Fuente: Elaboración propia, 2023.

En relación con la Tabla 14, se ve como el límite de detección es menor al límite de cuantificación y, a su vez, el límite de cuantificación es menor a la concentración más baja de la curva de calibración la cual era igual a 12,0 ug/ml, por lo que está conforme a los criterios de aceptación establecidos cumpliendo así con ambos parámetros.

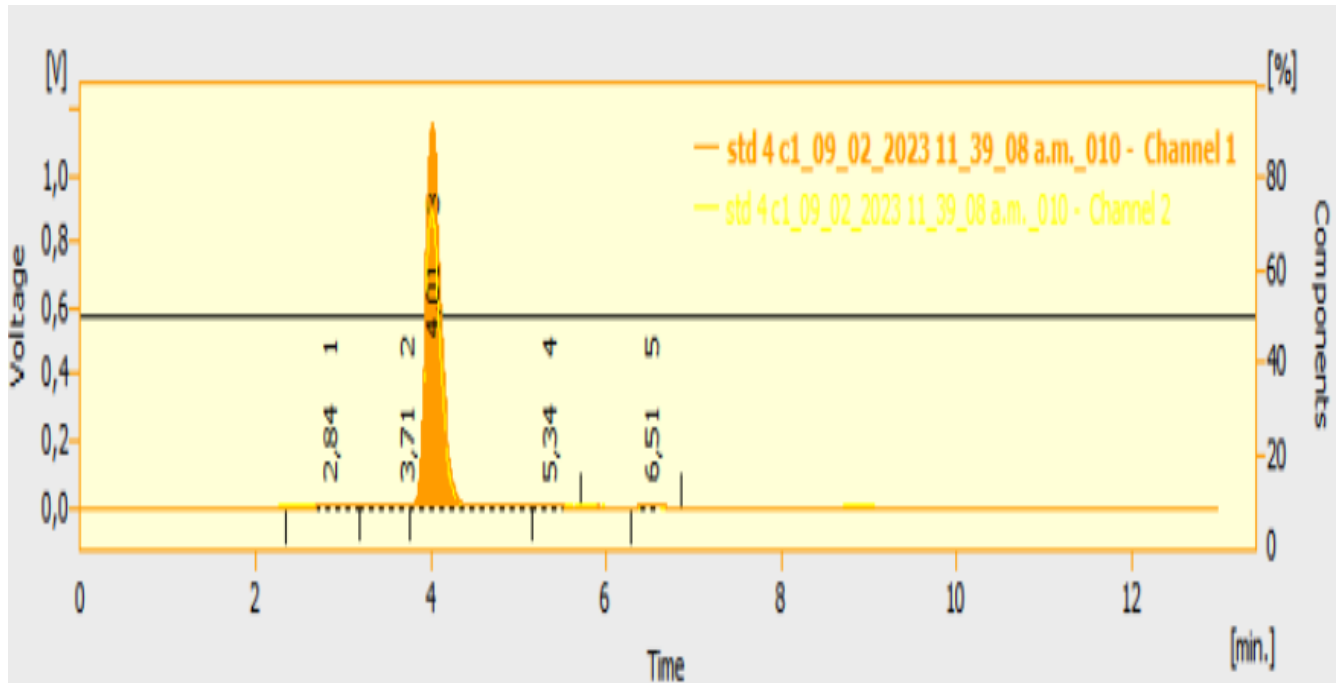
4.2 Validación del método analítico

La evaluación de los parámetros se realiza con la relación de la respuesta del área del estándar (itraconazol).

4.2.1 Selectividad

En la Figura 4 se muestra el cromatograma de un estándar de itraconazol a una concentración cercana a 1.0 µg/mL.

Figura 4. Cromatograma de unas muestras de itraconazol a una concentración cercana a 1 µg/mL



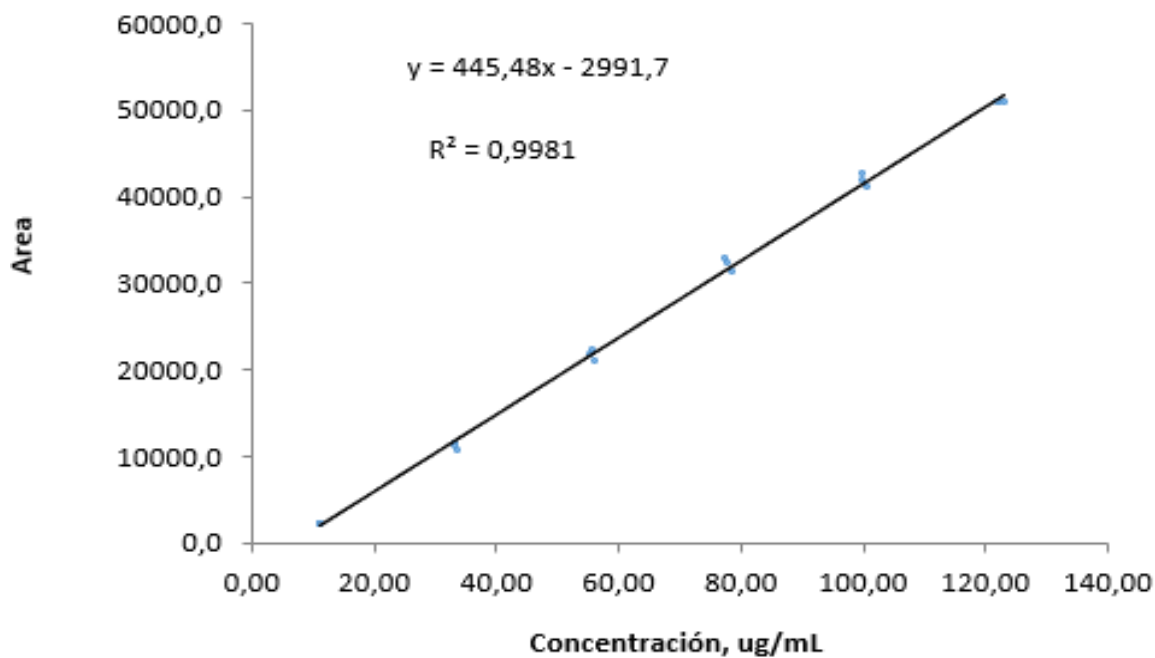
Fuente: Elaboración propia, tomado del HPLC.

Se extrae de la figura anterior que el tiempo de retención del itraconazol corresponde a 4.1 min.

4.2.2 Linealidad del método

Observando el Gráfico 3, se muestra el comportamiento de los resultados de linealidad del método analítico obtenidos para el estándar de itraconazol. Se observa el comportamiento para las tres curvas realizadas independientemente al largo del intervalo de concentración planteada (de 12,0 µg/mL a 123.0 µg/mL).

Gráfico 3. Linealidad de las tres curvas de las cápsulas de itraconazol



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Analizando los resultados y evaluando contra los criterios de aceptación, el coeficiente de determinación al ser mayor a 0.995 (en este caso 0.9981) cumple con la especificación planteada.

Haciendo uso del programa Microsoft Office Excel 2007, se realizó el análisis de varianza para los datos obtenidos de la regresión lineal. Previo a este análisis de las varianzas, se aplicó una prueba de Hartley y el resultado muestra que existe homocedasticidad, por lo que se demuestra que la varianza es constante en los diferentes niveles del factor (ver Anexo 3).

Tabla 15. Resultados del análisis de varianza de la regresión lineal del método analítico para el itraconazol

Parámetro evaluado	Valor obtenido
Pendiente (m)	445,48128
Intercepto (b)	-2991, 67747
Coefficiente de correlación (r)	0,998088565
Coefficiente de determinación (r ²)	0,999043825
Desviación estándar para la pendiente	4,873766544
Desviación estándar para el intercepto	374,3604788
Número de puntos (N)	18

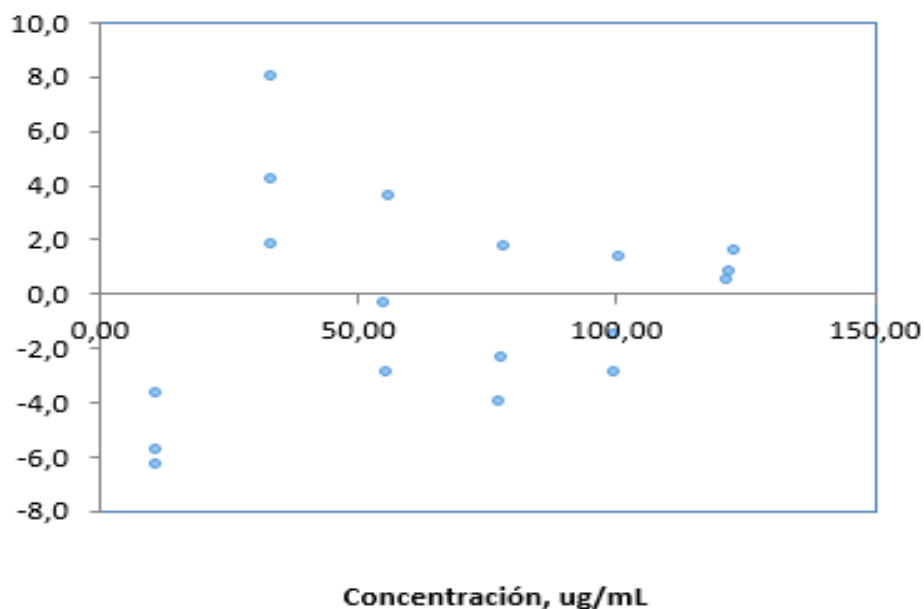
Fuente: Elaboración propia, 2023.

Haciendo uso de una prueba F de Fisher para el análisis de varianza (con $p=0.05$ y $n=18$) se demuestra que no existe desviación estadísticamente significativa con respecto a la regresión lineal para los datos nominales ni ajustados (ver Anexo 3).

Realizando una prueba t (con $p=0.05$ y $n=18$) se determina que el intercepto es estadísticamente distinto de cero para los datos nominales. Y el intercepto es estadísticamente igual a cero y la pendiente estadísticamente igual a uno para los datos ajustados (ver Anexo 3).

Dentro del análisis de la linealidad y revisando la distribución de los residuos para cada muestra a las distintas concentraciones en la Figura 8, se puede notar que se encuentran dentro de los valores 10 y -10. También muestran una aleatoriedad sin tendencias sistemáticas entre los datos.

Gráfico 4. Representación de residuales de la linealidad del método analítico de itraconazol



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Tomando en cuenta los datos anteriormente reportados para el método analítico del itraconazol, se demuestra que existe linealidad en todo el intervalo de concentración analizado. Por lo tanto, está conforme con los criterios de aceptación establecidos.

4.2.3 Exactitud y precisión

4.2.3.1 Evaluada en repetibilidad:

Para evaluar el parámetro de repetibilidad, se analizó seis estándares independientes a los tres niveles de concentración de control de las cápsulas de itraconazol. El resumen de los resultados se refleja en la Tabla 16.

Tabla 16. Resumen de los datos de repetibilidad para el método analítico del itraconazol

Concentración ($\mu\text{g/mL}$) Para n=6	Exactitud Evaluada en el porcentaje de error relativo (%)	Precisión Evaluada en la desviación estándar relativa
12,0	1,25297436	0,64260931
56,0	0,95830514	0,7315665
123,0	0,47836857	0,55871901

Fuente: Elaboración propia, 2023.

Para evaluar el parámetro de precisión intermedia se analizó tres estándares independientes a los tres niveles de concentración itraconazol durante tres días. El resumen de los resultados se refleja en la Tabla 17.

Tabla 17. Resumen de los datos de precisión intermedia del método analítico del itraconazol

Concentración ($\mu\text{g/mL}$) Para n=6	Exactitud Evaluada en el porcentaje de error relativo (%)	Precisión Evaluada en la desviación estándar relativa.
12,0	1,20452345	0,601851
56,0	0,83644423	0,96918368
123,0	0,52120756	0,51359358

Fuente: Elaboración propia, 2023.

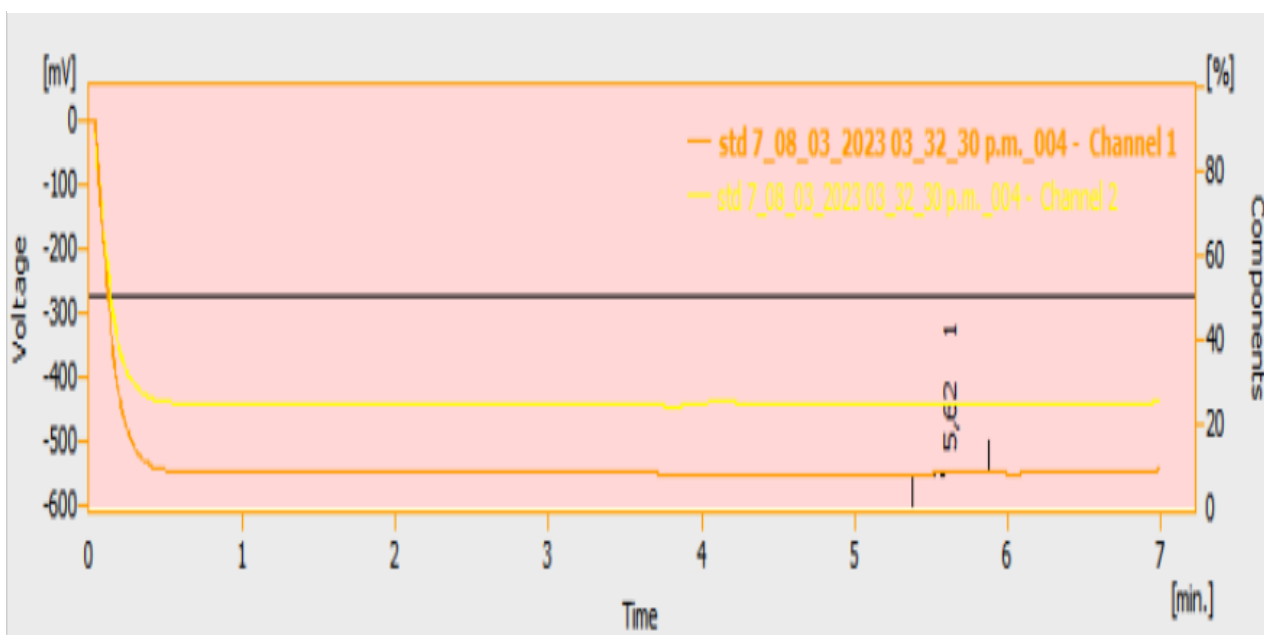
Con los datos mostrados en las tablas 16 y 17, se puede ver que la exactitud, evaluada por medio del error relativo, es menor al 15% para los tres niveles de concentración evaluada. Además, la precisión de los datos, evaluada con los valores de desviación estándar, es menor al 15% a los tres niveles de concentración evaluada.

Con estos datos se puede establecer el método analítico para la cuantificación de itraconazol y demostrar que este es preciso y exacto en todo el rango de concentraciones evaluada. Por lo tanto, está conforme con los criterios de aceptación establecidos.

4.2.4 Especificidad

Al no contar con la fórmula cuali-cuantitativa de la formulación del medicamento de referencia y al no tener una fórmula cuali-cuantitativa que cumpliera las expectativas de la formulación autoemulsificable, el parámetro de especificidad no se logró evaluar; sin embargo, se determina la selectividad del método verificando que los calibradores en blanco estén libres de interferencias en los tiempos de retención del analito.

Figura 5. Espectro del blanco libre de interferencias



Fuente: Elaboración propia, generada por el HPLC.

4.2.5 Perfiles de disolución comparativo (PDC)

Como no se obtuvo, de un trabajo de tesis anterior, una formulación que cumpliera con las características adecuadas de entrega del principio activo, no se contó, al momento de realizar este trabajo de tesis, con un prototipo de formulación para realizar los perfiles comparativos.

No obstante, para poder comprobar la aplicabilidad del método analítico validado, se procedió a realizar un ensayo de disolución para demostrar la confiabilidad de los datos que se pueden obtener al aplicar el método propuesto.

4.2.6 Ensayo de disolución

Para el ensayo de disolución se siguió los parámetros sugeridos por la USP 2023 con la modificación del método de análisis, en el cual se utilizó el propuesto en este trabajo. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 18. Ensayo de disolución

Vaso	Cantidad disuelta (% Q)
1	96
2	95
3	96
4	91
5	95
6	93

Fuente: Elaboración propia, 2023.

Se pretendía con el prototipo de la formulación del sistema autoemulsificable realizar un perfil de disolución comparativo donde se evaluaban doce unidades del medicamento de referencia contra doce unidades del prototipo utilizando F1 y F2 para así determinar si realmente existía un beneficio en cuanto a la mejora de la solubilidad sin embargo al no obtener los resultados esperados de la misma se optó por realizar un ensayo de disolución para el método en las capsulas originales.

Según la especificación de la USP, para una primera etapa (S1), al evaluar seis unidades, la cantidad disuelta de ninguna unidad evaluada debe estar por debajo de $Q + 5\%$ de la cantidad etiquetada de Itraconazol ($C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$). Considerando que la tolerancia reportada en la monografía de las cápsulas de itraconazol es 80%, ninguna unidad evaluada está por debajo del 85%. Por lo tanto, el ensayo está en conformidad con este criterio y el método propuesto es útil y confiable para la cuantificación de este principio activo en ensayos de disolución y su aplicación en posibles perfiles de disolución comparativos.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se lograron optimizar las condiciones de análisis con HPLC utilizando una fase móvil con una composición de acetonitrilo 90% y agua destilada 10% con una columna tipo C18, longitud de onda de 263 nm, flujo de 1,2 ml/min, por lo que se logra cuantificar adecuadamente el analito a un tiempo de retención de 4,5 min.
- Se logra concluir que el método propuesto es lineal en el intervalo de 12,0 µg/mL a 123,0 µg/mL con el coeficiente de determinación igual a 0.995 para el itraconazol. Presentando, además, resultados de homocedasticidad en el rango de concentración analizado.
- El método propuesto es exacto y preciso en todo el rango de concentración analizado de 12,0 µg/mL a 123,0 µg/mL, reportando datos de desviación estándar y error relativo menores a 2,0 % para el nivel bajo, medio y alto de concentración.
- En cuanto al parámetro de especificidad, al no contar con la fórmula cuali-cuantitativa de la formulación del itraconazol que cumpliera las expectativas de la formulación autoemulsificable el parámetro de especificidad, no se logró evaluar; sin embargo, se determina la selectividad del método verificando que los calibradores en blanco estén libres de interferencias en los tiempos de retención del analito.
- Tomando como base las guías internacionales de validación de métodos analíticos para la validación del método propuesto para la cuantificación de itraconazol, se obtienen resultados en conformidad con las especificaciones establecidas. Esto para el intervalo de concentración analizado de 12,0 µg/mL a 123,0 µg/mL.
- No se logró realizar el perfil de disolución comparativo al no contar con el prototipo sin embargo se realizó el ensayo de disolución, en donde se determinó que el método propuesto es adecuado para la cuantificación de la cantidad de principio activo disuelto, lo cual se verifica por la conformidad del ensayo de disolución (ninguna unidad por debajo de $Q + 5\%$), lo que es conveniente para ejecutar perfiles de disolución comparativos.
- Con respecto al sistema autoemulsificable de las cápsulas itraconazol, al no tener los resultados esperados, no fue posible aplicarle el método desarrollado y validado para

obtener el desempeño de esta formulación, por lo que no fue posible compararla con el fármaco de referencia.

5.2 Recomendaciones

- Para el cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC, se sugiere leer previamente el manual de uso para seguir a cabalidad con las condiciones de operación de este, tales como filtrar cada muestra que se vaya a analizar mediante un filtro Millipore de 0,20-0,45 micras, así como la fase móvil por medio de filtración al vacío con filtros Nylon. Esto con el fin de cuidar el equipo y evitar interferencias en los resultados obtenidos.
- Por otro lado, antes de poner a correr las muestras, se debe estabilizar el equipo; primeramente, colocarle fase móvil, purgarlo por unos 15 min y seguidamente poner a correr fase móvil para estabilizar la presión a la que se requiera trabajar por lo menos de 1 a 2 horas.
- Se sugiere cambiar las columnas del equipo y darle el mantenimiento que requiere más seguido, ya que en varias ocasiones se tuvieron problemas técnicos con este, lo que imposibilitaba la lectura correcta de las muestras.
- Para realizar las soluciones madre, es necesario siempre llevar a baño ultrasonido para garantizar una buena disolución del principio activo en el caso del estándar y para el polvo de las cápsulas; además del baño ultrasonido, seguidamente se filtra por gravedad para aumentar la pureza de la disolución.
- Se recomienda previo a añadir las diferentes concentraciones a los viales, realizar enjuagues con la misma solución para eliminar impurezas.
- En el caso del medio (ácido clorhídrico al 1N con lauril sulfato de sodio) utilizado para el disolutor, se recomienda añadir 1 o 2 gotas de etanol para eliminar la espuma y burbujas que generaba el medio impidiendo su correcta medición.
- Se sugiere la compra de *Sinker* para el disolutor, para que permita que el fármaco se mantenga siempre en la posición correcta, ya que en la ausencia de estas se innovaron unas a base de clips, pero al no ser estos del material adecuado podrían influir en los resultados obtenidos.

- Un factor para considerar son las balanzas, ya que pueden afectar los resultados de los pesos en las muestras por las condiciones del ambiente, por lo que se aconseja que en el cuarto de balanzas no existan temperaturas por debajo ni por encima de los 25°C, además de que el estante sea completamente hermético y estas estén calibradas.
- Considerar ampliar esta investigación con una formulación de itraconazol autoemulsificable a una menor concentración a la propuesta en este análisis, o bien, desarrollar experimentos secuenciales que permitan obtener más resultados.
- Considerar aplicar esta metodología para otros medicamentos clase II de baja potencia (menores a 50 mg por unidad de dosificación) donde la solubilidad pueda ser mejorada con un sistema autoemulsificante.

CAPÍTULO VI
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.1 Referencias bibliográficas

1. García C, García L, Robaina M, Fariñas O, Diaz I, Cataño J. Evaluación del desempeño de los métodos analíticos aplicados en el diclofenaco sódico 100 mg *retard* de producción nacional. Rev cubana Farm. 2016; 50(1): 25-26. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v50n1/far03116.pdf>
2. Jimenez Gracia A. Recursos tecnológicos para mejorar la solubilidad de comprimidos. [Tesis de licenciatura en farmacia]. Madrid, España: Universidad Complutense; 2016. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/55461/>
3. Sharma V, Koka A, Yadav J, Sharma A, Keservani R. Sistema de administración de fármacos autoemulsionante: una estrategia para mejorar la biodisponibilidad oral. Ars Pharm. 2016; 57(3): 2-7. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2340-98942016000300001
4. Carrasco J, Navarrete C, Bonifaz A, Fich F, Vial V, Berroeta D. Compromiso cutáneo en las micosis profundas: una revisión. Afectación cutánea en las micosis profundas: una revisión de la literatura. Parte II. Micosis sistémicas. Actas Dermo-Sifiliográficas. 2016; 107(6): 816-822. Disponible en: <https://www.actasdermo.org/es-afectacion-cutanea-micosis-profundas-una-articulo-S0001731016301831>
5. Baena Y, Ponce D' León L. Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia *in vivo*. Rev. colomb. cienc. quim. farm. 2008; 37(1): 3-8. Disponible en:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-74182008000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=es

6. Alvarado López K. Uso de cocristales para mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de los fármacos. *Rev. Pens. actual.* 2015; 15(25): 2017-215.
7. Cueto Y, Ortega W, Sotomayor R. Sistemas de entrega de fármacos autoemulsificables: una plataforma de desarrollo alternativa para la industria farmacéutica colombiana. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2019; 48(2): 260-313. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/82696>
8. Perez López E. Prueba de disolución “in vitro” de tabletas de acetaminofén, cuantificando en hplc con detector electroquímico. *InterSedes.* 2015; 16(33): 26-37. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2215-24582015000100002
9. Marrero D, Gonzalez V. Acercamiento a la validación de métodos analíticos en la industria farmacéutica cubana. *Rev. CENIC Cienc. Quim.* 2005; 36(1): 21-23. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1816/181620586005.pdf>
10. Asanza J, Sabada B, Gomez A. Farmacología de los antifúngicos en el tratamiento de la aspergilosis. *Rev. Iber. Mico.* 2014; 31(4): 255-261. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-farmacologia-antifungicos-el-tratamiento-aspergilosis-S1130140614000448>
11. Rojas J, Guevara R, Leiva L, Rodriguez G. Desarrollo y Validacion de un método analítico (HPLC-RP) para la determinación de Levamisol. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 1997; 26: 27-31. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8112199>

12. Montoya P, Castaño J. Validación de un método cromatográfico y determinación de sulfatos en productos de corrosión atmosférica del zinc expuesto en ambientes de SO₂ y NO₂. Rev. Facult. Ing. 2004; 33: 84-96. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43003308>
13. Grant S, Clissold S. Itraconazol. Una revisión de sus propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas y uso terapéutico en micosis superficiales y sistémicas. 1989; 37(3): 310-344.
14. Haría M, Bryson H, Goa K. Reevaluación de sus propiedades farmacológicas y uso terapéutico en el manejo de infecciones fúngicas superficiales itraconazol. Drogas. 1996; 51: 585-620.
15. Contreras R, Leyva J, Fonseca Y, Águila M. Validación de un método analítico por HPLC para la cuantificación del principio activo en tabletas de Controfilina-200. Rev. CENIC Cienc. Quim. 2005; 36(2): 74-81. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181620581002>
16. Hernández F, Fernández G, Ledea L, Validación de un método analítico de determinación de dopamina por cromatografía líquida de alta resolución. Rev. Cub. Gran. 2014; 48(3): 1-5.
17. Huertas O, Gonzalez L, Treviño A, Meza A, Castañeda C. Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de la concentración sérica de iohexol, un marcador de filtración glomerular. Rev. mex. cienc. Farm. 2012; 43(2): 10-20. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000200005
18. Cáceres D, Zapata J, Granada S, Cano L, Naranjo T. Estandarización y validación en Colombia de una metodología basada en HPLC para la determinación de la

concentración sérica de posaconazol. Rev Iber de Mico.2016; 33(4): 230-236. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-estandarizacion-validacion-colombia-una-metodologia-S1130140616300080>

19. Py-Daniel K, Junior O, Cordova C, Fascineli M, Tedesco A, Acevedo R. Método HPLC-FLD para la cuantificación de itraconazol en nanopartículas de ácido poliláctico-co-glicólico, plasma y tejido. Chem. Soc. 2014; 25(4): 5-16. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/QZnvmkBh3HyhRBwkzjhrL5y/?lang=en>
20. Perez E, Rojas A. Validación de un método para cuantificación de acetaminofén. Intersides. 2016; 17(35): 3-15. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/is/v17n35/2215-2458-is-17-35-00044.pdf>
21. Ulate R, Sibaja J, Arguedas M, Borbon H, Vega I. Validación de un método de detección mediante cromatografía líquida (HPLC-DAD) para la determinación de aloína en productos alimenticios elaborados a partir de sábila (Aloe vera). Uniciencia. 2018; 33(2): 13-26. Disponible en: <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/21061>
22. Rani S, Rana R, Saraogi GK, Kumar V, Gupta U. Sistemas de administración de fármacos de lípidos orales autoemulsionantes: avances y desafíos. AAPS PharmSciTech. 2019; 20(3): 1-12. doi:10.1208/s12249-019-1335-x
23. Khadka P, Ro J, Kim H, Kim I, Kim JT, Kim H, Lee J. Tecnologías de partículas farmacéuticas: un enfoque para mejorar la solubilidad, disolución y biodisponibilidad de fármacos. Revista Asiática de Ciencias Farmacéuticas. 2014; 9(6): 304- 316. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.05.005
24. Khan AW, Kotta S, Ansari SH, Sharma RK, Ali J. Potentials and challenges in self-nanoemulsifying drug delivery systems. Expert Opinion on Drug Delivery [Internet].

2012 [citado el 16 de marzo de 2023]; 9(10): 1305–1317.
DOI:10.1517/17425247.2012.719870

25. Fica A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Rev. chil. infectol.* 2004; 21 (1): 26-38. Disponible en: https://scielo.cl/scielo.php?pid=s0716-10182004000100004&script=sci_arttext
26. Beule K, Van J. Farmacología del Itraconazol. *Rev. Drogas.* 2001; 61 (1): 27-37.
27. Nocua L, Uribe P, Tarazona L, Robles R, Cortes J. Azoles de antes y ahora: una revisión. *Rev. chil. infectol.* 2020; 37 (3): 1.
28. Landa C. Comparación de la farmacocinética oral de Fluconazol e Itraconazol en mexicanos [Tesis de Maestría en Ciencias de Investigación Clínica]. México, DF.: Instituto Politécnico Nacional; 2010.
29. Saavedra Q. Estudios de biodisponibilidad para establecer bioequivalencia de medicamentos. *Cuad Méd Soc.* 2010; 50 (1): 11-23.
30. Alvarado K. Uso de cocrystalos para mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de los fármacos. *Rev Pensamiento actual.* 2015; 15 (25): 207-215.
31. Rani S, Rana R, Saraogi GK, Kumar V, Gupta U. Sistemas de administración de fármacos de lípidos orales autoemulsionantes: avances y desafíos. *AAPS PharmSciTech.* 2019; 20(3): 1-12. doi:10.1208/s12249-019-1335-x
32. Acosta A, Viquez D. Actividad combinada de itraconazol y terbinafina sobre aislamientos clínicos de *Neoscytalidium dimidiatum*. *Acta méd. Costarric.* 2021; 63 (1): 5-23.
33. Vázquez T, Campos R. Itraconazol e interacciones farmacológicas. *Rev Enfer Infec Pediatr.* 2010;23.24(93):9-10.

34. Piérard G, Arrese J, Piérard F. Itraconazole. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* [Internet]. 2000 [citado el 15 de marzo de 2023]; 1(2): 287–304. doi:10.1517/14656566.1.2.287.
35. De BK, Van GJ. Pharmacology of Itraconazole. *Drugs*, 61 (Supplement 1), 2001 [citado el 15 de marzo de 2023]; 27–37. doi:10.2165/00003495-200161001-00003
36. Ochoa S. Sistema de clasificación biofarmacéutica en la solicitud de una bioexención. [Tesis de licenciatura en farmacia]. Madrid, España: Universidad Complutense; 2018.
37. Velandia C, Peña V, Arias J. Validación del método analítico para la cuantificación de bacitracina. *Rev Cubana Farm*. 2011; 45 (2): 2-5.
38. Izquierdo M, Cosme K, García G, Núñez Z, Martínez Y, Vega M, Costa L, Quintana M, Rosales I, Mosqueda O. Establecimiento de un ensayo de potencia in vivo para el antígeno de superficie recombinante del virus de la Hepatitis B, en vacunas monovalentes y combinadas. *Rev. Vaccimonitor*. 2014; 23 (3): 10-16.
39. Perez E, Rojas A. Estudio de uniformidad de contenido en tabletas de acetaminofén de 500 mg en nueve marcas de consumo en Costa Rica. *Rev Inter Sides*. 2017; 38: 15-26.
40. Barrueco N, Escobar I, García B, Gil, López E, Ventura G, Estabilidad de medicamentos en la práctica clínica. De la seguridad a la eficiencia. *Farm Hosp*. 2013; 37 (3): 12-16.
41. Cardenas J, Ramirez A, Delgado E. Evaluación y aplicación de la incertidumbre de medición en la determinación de las emisiones de fuentes fijas: una revisión. *Rev. Tecnológicas*. 2018; 21 (42): 231-244

42. Apaza J, Chávez L, Herrera V. Logística de almacenamiento de materia prima en la industria farmacéutica. *Rev.Cs.Farm.* 2015; 3 (1): 1-12.
43. Ramos B, Alonso J, Martín A. La importancia del control de calidad de las materias primas empleadas en la formulación magistral. *Farm Hosp.* 2020; 44 (1): 2-8.
44. Ortiz J, Flores S, Contreras I, Díaz A. Impurezas orgánicas observadas en el proceso de manufactura de las Sustancias Activas. *Rev. Mex. Ciencias Farmacéuticas.* 2016; 47 (1): 7-24.
45. Rodríguez L, Cruz L, Cruz C, Placencia P. Calidad biofarmacéutica e intercambiabilidad de medicamentos. *Ars Pharm.* 2021; 62(3): 3-20.
46. Llipo Miñano A. Gestión de estándares de referencia en el área de fisicoquímica del laboratorio de control de calidad Hypatia s.a. [Tesis de licenciatura en farmacia]. Universidad Nacional de Trujillo; 2016.
47. Rahman MA, Hussain A, Hussain MS, Mirza MA, Iqbal Z. Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS). *Drug Development and Industrial Pharmacy* [Internet]. 2013 [citado el 16 de marzo del 2023]; 39(1): 1–19. DOI:10.3109/03639045.2012.660949
48. Martínez Martínez, C. Desarrollo de micro y nanoemulsiones de liberación sostenida [Tesis de (Licenciatura en Farmacia)]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2016.
49. Brime B. "Desarrollo y caracterización farmacotécnica y farmacológica de nuevas formulaciones parenterales de anfotericina B." [Tesis de (Licenciatura en Farmacia)] Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2002.

50. . Lillini G, Pasquali R, Pedemonte C, Bregni C, Lavaselli S. Estudio de la estabilidad de emulsiones con estructuras líquido-cristalinas, y su aplicación farmacéutica mediante el agregado de un principio activo liposoluble: Econazol. *Rev Colomb Ciencias Quim Farm.* 2016; 45(1): 5-20.
51. Bhandari V, Avachat A. Formulación y caracterización de pellets autoemulsionantes de carvedilol. *Rev. Bras. Cienc. Farmac.* 2015; 51(3):1-10.
52. Lara A, Gallardo N, Páramo U, Martínez R. Determinación electroquímica de la concentración micelar crítica de agentes tensoactivos con base imidazol. *Congreso de la Soc. Mex de electroquímica.* 2020; 80-81
53. Cáceres C. Tensioactivos. presencia en formulaciones de utilidad en farmacia. *Propiedades y Relación con aditivos [Tesis de licenciatura en farmacia]. Universidad de la Laguna.* 2020.
54. Villiers, M. Surfactantes y agentes emulsionantes. En: JE Thompson, editor, Lippincott W, Wilkins. *Una guía práctica para la práctica farmacéutica contemporánea.* 3era ed. Filadelfia: 2009. 251-256.
55. Lopez A, Herazo K, Sotomayor R. Diseño y desarrollo de un sistema de entrega de fármaco autoemulsificable líquido de ibuprofeno incorporado por el método de adsorción por portador en una forma farmacéutica sólida (comprimidos). *Rev. colomb. cienc. quim. farm.* 2020; 48 (3): 1-7.
56. Malkawi A, Jalil A, Nazir I, Matuszczak B, Kennedy R, Bernkop-Schnürch A. SelfEmulsifying Drug Delivery Systems: Hydrophobic Drug Polymer Complexes Provide a Sustained Release in Vitro. *Mol Pharm [Internet].* 2020 [citado el 5 de septiembre del 2022]; 17(10): 3709-3719. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00389

57. Salawi A. Self-emulsifying drug delivery systems: a novel approach to deliver drugs. Drug delivery [Internet]. 2022 [citado el 13 marzo del 2023]; 29(1):1811–1823. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2083724>
58. Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, Woodcock J. Understanding pharmaceutical quality by design. AAPS J [Internet]. 2014 [citado el 5 de septiembre del 2022]; 16(4): 771-83. DOI: 10.1208/s12248-014-9598-3.
59. Bernkop A, Aamir J. ¿Tienen sentido los estudios de liberación de fármacos de SEDDS?. Diario de Liberación Controlada. 2018; 271: 55-59.
60. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos Analíticos, Comisión de Normas de la Correcta Fabricación y Control de Calidad, Sección Catalana, España, 2001.
61. Farmacopea de los Estados Unidos de América; USP 40. Cromatografía. EEUU 2017
62. Badillo Arlene M. “Validación de Procesos” Diplomado de Buenas Prácticas de Manufactura 2005.
63. Coureaux M, Arada M, Suarez Y, Marin J. Desarrollo y validación del método para control de calidad de clorhidrato de tiamina en tabletas. BioCubaFarma. 2014;1-7.
64. González I, Quintana A. Linealidad, algo más que r^2 : un ejemplo práctico. Rev. CENIC. Ciencias Biológicas. 2006; 37 (2): 87-92
65. Hernandez J, Espinoza F, Rodriguez J, Chacon J, Tolaza C, Arenas M, Carrillo S, Bermudez V. Sobre el uso adecuado del coeficiente de correlación de Pearson: definición, propiedades y suposiciones. Arch. Venez de Farm y Terap. 2018; 37 (5): 3-12.
66. Castillo B, Gonzalez R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Rev Cubana Farm. 2011; 30 (1): 7-9

67. Trigo M, Aban E. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución. 2020; 8 (2): 1-20.
68. Rodriguez S, Pellerano R, Romero C, Acevedo H, Vasquez F. Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de Citrus reticulata. Rev. Tumbaga. 2012; 7: 55-71.
69. Portuondo Y, Portuondo J. La repetibilidad y reproducibilidad en el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición. Rev. Tecnología química. 2010; 2: 117-121.
70. Simancas M, Arevalo S. Desempeño de cuatro métodos estadísticos para evaluación de una concordancia prueba-reprueba de variables continuas en una muestra. Rev. Biosalud. 2017; 16(1): 5-16.
71. Condori W. Validación de un método para la determinación de cobre, cromo, manganeso y Níquel en el suelo por absorción atómica de flama. [Tesis de licenciatura en Química]. Lima, Perú. Universidad Nacional Federico Villarreal. 2016
72. Boqué R. El límite de detección de un método analítico. [Tesis de licenciatura en farmacia]. Universidad Rovira i Virgili. 2004.
73. Faife A. Validación del Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión para la cuantificación de Mupirocina 2 % ungüento en Laboratorio Ceguel en el periodo comprendido de Mayo a Noviembre 2009. [Tesis de licenciatura en farmacia]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 2009.
74. Benitez J, Grau M, Cristaldo M, Bogado A, Arrua L, Villalba N. Validación de dos métodos analíticos para la determinación y cuantificación de la cafeína en yerba mate (Ilex paraguariensis St. Hil) comercial, UV-visible y HPLC. Rep. cient. FACEN. 2021; 12 (1): 1-10

75. Mares A, Dominguez J. Evaluación estadística de índices de desempeño para el proceso de división de rollos de EVA. *Ing. invest. y tecnol.* 2022; 23 (2): 1-8.
76. Camaro M, Martinez R, Olmoz P, Catala V, Ocete M. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enf. Infecciones y Microbiología clínica.* 2017; 33 (17): 31-36.
77. Pan American Health Organization. Buenas Prácticas de la OMS para Laboratorios de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos, Guía de Autoevaluación de BPL.2017.
78. Swartz M, Krull I. Validation of Chromatographic Methods Pharm. Reviewer Guidance. USA. 1998: 104-118
79. Ministerio de salud. Digemid Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. pág. 20-21. Perú 2000.
80. Benites E. La gestión Técnica en la Fabricación de Medicamentos. Centro de estudios superiores de la industria Farmacéutica. Madrid – España 2000
81. Castillo B, Castillo C. Nuevos métodos de análisis de medicamentos en la Farmacopea Europea. *Rev. O.F.I.L.* 2010; 20 (3): 115-1120.
82. Ocaña M, López M, Castro V, Hernández M. Importancia de la validación y verificación de los métodos analíticos para determinación de TGO, TGP, proteínas totales y albúmina por método espectrofotométrico semiautomatizado en un laboratorio de investigación farmacológica preclínica. [Maestría en Neuroetología]. Xalapa, Veracruz. Universidad Veracruzana. 2011.
83. Magnusson B, Örnemark U. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Primera edición española. 2014.

84. Cooke E. Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Rev. Unión Europea. 1995: 897.
85. Centro de Evaluación e Investigación de Drogas (CDER). Guía para la Industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata. BP1.1997.
86. Ministerio de Salud. Guía técnica para la presentación y evaluación de estudios de perfiles de disolución comparativos. 2009: 1-8.
87. Vega C, Camargo R. Determinación por cromatografía Líquida (HPLC) el contenido de ácido fólico y hierro en una bebida láctea fermentada tipo yogurt enriquecida a partir de materias primas naturales. Rev. de la Fac. de Cienc. Básic. 2007; 5(2): 42-48
88. Tait K, Efectos de los estrógenos sintéticos sobre los trabajadores de la industria farmacéutica: un ejemplo de Estados Unidos. Rev. Industrias Químicas. 2015: 79.2-79.6
89. European pharmacopoeia (Ph. Eur). Liquid Chromatography – method 2.2.29 Europe 2016
90. Contenido del Certificado de Material de Referencia Simposio de metrología, IV simposio de metrología en el Perú, disponible en: http://www.inacal.gob.pe/inacal/files/metrologia/EVENTOS/SIMPOSIOS/2013/Galia_Ticona.pdf, visitado en Julio – 2017
91. Quattrocchi, O, Abelaira,S, Laba, R. “Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica”. 1992; capítulo 2 : nstrumental (Pag. 9), Argentina
92. Morales C. Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg tabletas recubiertas. [Tesis de licenciatura en farmacia]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2004

93. Godínez R, Aceves P, Schifter L. La Industria Nacional Químico-Farmacéutico, S.A. Un modelo sobresaliente de organización científica y empresarial. *Rev. Educación Química*. 2019; 30 (1): 149-160
94. Rodríguez J, Gil J. Ensayo de disolución para las tabletas de Tilo elaboradas con extracto seco de Justicia pectoralis Jacq. *Rev Cubana Farm*. 2013; 47 (1): 8-12
95. Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos Méx A.C. 1ª edición, 2002
96. Hernández R, Méndez S, Mendoza C, Cuevas A. *Fundamentos de Investigación*. 1a ed. México: Mc Graw Hill; 2017.
97. European pharmacopoeia (Ph. Eur). *Liquid Chromatography – method 2.2.29* Europe. 2016
98. Quattrocchi, O, Abelaira S, Laba, R. *Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica*, capítulo 12 – Validación de Métodos. 2002; 9-287.
99. Acosta V, Viquez D. El fármaco antimicótico con licencia clínica itraconazol inhibe el virus de la gripe in vitro e in vivo. *Acta medica costarricense*. 2021; 63 (1): 1-12.
100. Trejos P, Montero E. Validación de un método analítico para la determinación del contenido de sodio en los alimentos. *Revista Tecnología En Marcha*. 2012; 25 (2): 41-49.
101. Lopez Y, Rodríguez J, Jiménez T. Estudio de la sensibilidad in vitro de aislamientos clínicos de mohos y levaduras a itraconazol y voriconazol. *Rev Iber Mic*. 2005; 22 (2). 105-109.
102. Acevedo E. Caracterización físico-química de nanoemulsiones O/W de fitoesteroles formuladas con emulsificantes modificados. Instituto Tecnológico de Veracruz. 2020.

103. Salawi A. Self-emulsifying drug delivery systems: a novel approach to deliver drugs. *Drug delivery* [Internet]. 2022 [citado el 27 de septiembre del 2022]; 29(1): 1811–1823. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2083724>
104. Rouessac F, Rouessac A. *Chemical Analysis, Modern Instrumentation and Techniques*, Second edition, John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
105. Arias M, Validación de un método analítico para la cuantificación de vitamina en alimentos, por cromatografía líquida de alta resolución y su determinación en Guayaba, fresa. [Tesis de licenciatura en Ingeniería Química Industrial]. Guatemala. Universidad Rafael Landívar. 2014.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

7.1 Anexo 1

Tabla 19. Niveles de evidencia

Autor/Revisita/año	Re	Título del artículo	Tipo de estudio	Nivel de evidencia	Población	Metodología	Resultados y Conclusiones
Schloer S, Goretzko J, Kuhn A, Brunnote L, Ludwig S, Rescher U.	90	El fármaco antimicótico con licencia clínica itraconazol inhibe el virus de la gripe <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Estudios Cuasi experimentales	5	Modelo de Raton	Se utilizó un análisis de poder a priori (G*Power 3.1, Faul et al., 2007) para estimar los tamaños de muestra requeridos. Los datos se analizaron con Prism 6.00 (GraphPad). Para	Medición de la relación entre la dosis del fármaco y el resultado de la infección después de la infección por IAV en la línea celular epitelial de pulmón humano A549, una línea celular comúnmente utilizada para la propagación de IAV. Ambos antifúngicos son inhibidores de NPC1.

					<p>las curvas de dosis-respuesta, los títulos de virus se normalizaron a porcentajes de los títulos detectados en las células de control y las concentraciones de fármaco se transformaron logarítmicamente. Los valores de IC se calcularon a partir de los ajustes de la curva sigmoidea. Para el análisis estadístico, las diferencias significativas se</p>	
--	--	--	--	--	---	--

						<p>evaluaron utilizando ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett.</p>	
Valverde E, Silva P	⁹¹	Validación de un método analítico para la determinación del contenido de sodio en los alimentos	Estudios Cuasi experimentales	5	N/A	<p>Determinación de sodio en alimentos mediante espectroscopía de absorción atómica de llama. Las muestras de 0,5 g se digirieron en un horno de microondas con</p>	<p>El ámbito de linealidad óptimo que se obtuvo fue de 0,043 mg/L a 0,70 mg/L con un coeficiente de correlación de 0,998. Los límites de detección y cuantificación reportados fueron de 0,025 mg/L y 0,043 mg/L, respectivamente; con una sensibilidad de calibración de 0,805 Lmg-1, una sensibilidad analítica de 44</p>

						5,0 mL de HNO ₃ al 65 % en masa.	Lmg-1. La precisión se evaluó en condiciones de repetibilidad y se obtuvo un valor para RDSr igual a 2,9%; Se obtuvieron sesgos de entre (-0,010 a 0,009) mg/L.
Morera Y, Torres J, Jiménez T.	⁹²	Estudio de la sensibilidad in vitro de aislamientos clínicos de mohos y levaduras a itraconazol y voriconazol	Estudios Cuasi experimentales	5	N/A	El método utilizado ha sido el de microdilución en placa siguiendo los documentos M38-A y M27-A2 del National Committee for Clinical Laboratory Standards.	La CMI ₉₀ de itraconazol y voriconazol para <i>Aspergillus fumigatus</i> fue de 0,125 µg/ml. Destaca la elevada sensibilidad de la fase miceliar de <i>Sporothrix schenckii</i> al itraconazol (p = 0,001). Voriconazol resultó más activo sobre <i>Scedosporium apiospermium</i> mientras que <i>Scedosporium prolificans</i> fue resistente a los dos antifúngicos. In vitro

							itraconazol y voriconazol presentan una actividad antifúngica similar excepto sobre <i>S. shenckii</i> . No obstante, existen diferencias entre los aislamientos de una misma especie.
Acevedo M.	⁹³	Caracterización fisicoquímica de nano emulsiones O/W de fitoesteroles formuladas con emulsificantes modificados	Estudios Cuasi experimentales	5	N/A	Las emulsiones se formularon con una relación 10:1 de emulsificante: fitoesteroles libres, 4% de triglicéridos de cadena media y 30% de glicerol y agua. La estabilidad fisicoquímica de estas emulsiones	Durante el almacenamiento, el PV fue estable en las emulsiones con LPC-AGCM en comparación con PC, en la cual se observó una ligera susceptibilidad a la oxidación. En cuanto a los POFs, sólo se detectaron óxidos de β - sitosterol en ambos sistemas, excepto los derivados epoxi que no se detectaron en las preparadas con LPC-AGCM. La evaluación a 4 y 37°C de PC

						se evaluó a 37°C durante 14 días	y LPC evidenció la aceleración de las inestabilidades físicas y la oxidación con la temperatura y la dependencia de la oxidación con el grado de insaturaciones de los ácidos grasos del emulsificante.
Bahloul B, Lassoued MA, Sfar S/ Int J of Pharm/ 2014.	⁹⁴	A novel approach for the development and optimization of self-emulsifying drug delivery system	Metaanálisis	1	N/A	Se operó una selección rápida de excipientes con referencia a su toxicidad y capacidad para solubilizar el fármaco. Se utilizó un diseño Box-Behnken de tres niveles. Las variables	El objetivo de este trabajo fue elaborar un enfoque novedoso para el desarrollo y la optimización del sistema de administración de fármacos autoemulsionantes (SEDDS), utilizando la

		<p>using HLB and response surface methodology: Application to fenofibrate encapsulation</p>				<p>independientes fueron (X1) surfactantes/aceite, (X2) cosurfactante/surfactante y (X3) porcentaje de cosolvente. Los niveles alto y bajo de estos factores se seleccionaron con referencia al dominio experimental que cubre un intervalo de HLB de 7,8 a 15. Se construyeron varios gráficos</p>	<p>metodología de superficie de respuesta y el balance hidrofílico lipofílico (HLB). El estudio experimental tuvo como resultado que SEDDS optimizado mostró un aumento significativo en la velocidad de disolución en comparación con las cápsulas de gelatina</p>
--	--	---	--	--	--	---	---

						de superficie de respuesta para comprender los efectos de las diferentes combinaciones de niveles de factores.	preparadas convencionales. En conclusión, este documento demostró la confiabilidad, rapidez y solidez del enfoque.
--	--	--	--	--	--	--	--

Fuente: Elaboración propia, 2023.

7.2 Anexo 2. Validación del Sistema Analítico

7.2.1 Linealidad del Sistema Analítico

Tabla 20. Datos de linealidad del sistema para el itraconazol

	Concentración (µg/mL)	Área Itraconazol (mV. s)
1	11,33	2251,513
2	11,14	2158,104
3	11,26	2304,809
4	34,00	11795,102
5	33,43	12009,483
6	33,79	13902,293
7	56,67	23866,930
8	55,71	22470,220
9	56,32	21668,575
10	79,34	32625,927
11	77,99	33206,646
12	78,84	33416,287
13	102,01	42821,176
14	100,28	45707,900
15	101,37	43764,538
16	124,68	53804,296
17	122,56	54566,069
18	123,90	53685,183

Fuente: Elaboración propia, 2023.

7.2.1.1 Prueba de Hartley.

$$F_{\text{experimental}} = s_{2\text{max}} / s_{2\text{min}}$$

$$F_{\text{experimental}} = 39,11546561$$

$$F_{\text{crítico}} (P=0.05) (k=6, v=2) = 266.00$$

Tabla 21. Datos obtenidos para el análisis de la homocedasticidad para el itraconazol

Desviación Estándar	Varianza
74,26065	29.988932
1159,66510	1173,031020
1112,51953	331,038256
409,44105	62,370305
1471,94674	336,837519
477,92035	55,263270

Fuente: Elaboración propia, 2023.

Haciendo uso de la herramienta de Microsoft Office Excel 2007, se reportan los datos del análisis de varianza de la regresión lineal realizado:

7.2.1.2 Prueba t para los valores nominales.

$$T_{\text{experimental}} = 6,581308561$$

$$T_{\text{crítica bilateral}} (p = 0.05; n-2=16) = 2,119905299$$

Intercepto es estadísticamente diferente de 0, ya que t experimental es mayor que t crítica bilateral.

7.2.1.3 Prueba F para los valores nominales.

$$F_{\text{experimental}} = 0,00016846$$

$$F_{\text{crítica}} (p = 0.05; n-2=16) = 19.43329253$$

Como F experimental es mayor que F crítica, se puede concluir que no existe desviación estadísticamente significativa con respecto a la regresión lineal.

7.2.1.4 Prueba t para los datos nominales y corregidos.

T experimental = $2.81993E-14$ (para intercepto igual a 0).

T crítica bilateral ($p = 0.05$; $n-2=16$) = 2.119905299

Intercepto es estadísticamente igual a 0, ya que t experimental es menor que t crítica bilateral.

T experimental = 77,04257958 (para pendiente igual a 1).

T crítica bilateral ($p = 0.05$; $n-2=16$) = 2.119905299

Pendiente es estadísticamente igual a 1, ya que t experimental es mayor que t crítica bilateral.

7.2.1.5 Prueba F para los datos nominales y corregidos.

F experimental = 0,00016846

F crítica = ($p = 0.05$; $n-2=16$) = 19.43

Como F experimental es mayor que F crítica, se puede concluir que no existe desviación estadísticamente significativa con respecto a la regresión lineal.

7.2.2 Exactitud y precisión del sistema.

Tabla 22. Datos de exactitud y precisión del sistema evaluado en repetibilidad para la evaluación de los parámetros a validar del itraconazol

Concentración (µg/mL)	Área Itraconazol (mV.s)	Porcentaje de Error Relativo (%)
11,55540466	2275,196	1,94985759
11,51328533	2256,106	1,57825142
11,54488696	2270,429	1,85706311
11,42630417	2216,683	0,81084283
11,51899979	2258,696	1,62866839
11,56894286	2281,332	2,06930104
Promedio:		1,6489974
Desviación estándar		0,05115281
Desviación estándar Relativa		0,44398452
57,27986876	22999,173	2,06930104
57,16697175	22948,004	1,07260863
56,45344295	22624,607	0,87339736
55,6298192	22251,311	0,38565262
56,64247909	22710,285	1,83896951
55,71211406	22288,61	0,05209083
Promedio		0,98607932
Desviación estándar		0,70018247
Desviación estándar relativa		1,23968267
53685,48	124,9847827	0,2457384
53648,03	124,9021569	0,1794673
53756,82	125,1421753	0,3119773
53584,86	124,7627616	0,0676634

52847,87	123,1367061	1,2365364
52947,89	123,3573969	1,0595285
Promedio		0,5268185
Desviación estándar		0,8896425
Desviación estándar relativa		0,7152559

Fuente: Elaboración propia, 2023.

Tabla 23. Datos de exactitud y precisión del sistema evaluado en precisión intermedia para la evaluación de los parámetros a validar del itraconazol

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área Itraconazol (mV.s)	Porcentaje de Error Relativo (%)
11,55540466	2275,196	1,9498576
11,51328533	2256,106	1,5782514
11,54488696	2270,429	1,8570631
11,4934193	2247,102	1,4029794
11,41605123	2212,036	0,7203843
11,40039493	2204,94	0,5822534
11,51409506	2256,473	1,5853954
11,51448779	2256,651	1,5888604
11,40483192	2206,951	0,6213996
Promedio:		1,3207161
Desviación estándar		0,0606854
Desviación estándar Relativa		0,5284302
57,27986876	22999,173	1,0726086
57,16697175	22948,004	0,8733974
56,45344295	22624,607	0,3856526
55,58502136	22231,007	1,9180171
55,53882689	22210,07	1,9995291

56,23517259	22525,679	0,7707993
56,49968154	22645,564	0,3040628
56,32164408	22564,871	0,618217
56,39165175	22596,601	0,4946856
Promedio		0,9374411
Desviación estándar		0,5929357
Desviación estándar relativa		1,0515689
53685,483	124,9847827	0,2457384
53648,034	124,9021569	0,1794673
53756,819	125,1421753	0,3719773
52820,708	123,0767815	1,2845998
52904,879	123,2624927	1,1356476
52999,282	123,4707793	0,8685886
52756,021	122,934059	1,3990723
53753,954	125,1358541	0,3669073
53124,674	123,7474386	0,7466902
Promedio		0,7442988
Desviación estándar		0,9491354
Desviación estándar relativa		0,7649817

Fuente: Elaboración propia, 2023.

7.3 Anexo 3. Validación del método analítico.

7.3.1 Linealidad del método analítico

Tabla 24. Datos de linealidad del método analítico para el itraconazol

	Concentración (µg/mL)	Área Itraconazol (mV. s)
1	11,20	2179,765
2	11,11	2271,057
3	11,07	2225,411
4	33,59	10778.295
5	33,33	11589,075
6	33,21	11183,685
7	55,98	21045,795
8	55,55	22476,443
9	55.35	21761,119
10	78,37	31308.748
11	77,77	32484,834
12	77,49	32896,791
13	100,76	41282,301
14	99,99	42846,390
15	99,63	42064,346
16	123,16	51013,894
17	122,21	50997,804
18	121,77	51005,849

Fuente: Elaboración propia, 2023.

7.3.1.1 Prueba de Hartley

$$F_{\text{experimental}} = s_{2\text{max}} / s_{2\text{min}}$$

$$F_{\text{experimental}} = 37,23637436$$

$$F_{\text{crítico}} (P=0.05) (k=6, v=2) = 266.00$$

Tabla 25. Datos obtenidos para el análisis de la homocedasticidad del método analítico del itraconazol

Desviación Estándar	Varianza
45,64600	24,367327
405,39000	181,699777
715,32400	208,158686
824,09217	167,567148
782,04450	91,704973
8,04500	5,590197

Fuente: Elaboración propia, 2023.

Haciendo uso de la herramienta de Microsoft Office Excel 2007, se reportan los datos del análisis de varianza de la regresión lineal realizado:

7.3.1.2 Prueba t

$$T_{\text{experimental}} = 5,07319\text{E-}14 \text{ (para intercepto igual a 0).}$$

$$T_{\text{crítica bilateral}} (p = 0.05; n-2=16) = 2,119905299$$

Intercepto es estadísticamente igual a 0, ya que t experimental es menor que t crítica bilateral.

$$T_{\text{experimental}} = 91,40390223 \text{ (para pendiente igual a 1).}$$

$$T_{\text{crítica bilateral}} (p = 0.05; n-2=16) = 2,119905299$$

Pendiente es estadísticamente igual a 1, ya que t experimental es mayor que t crítica bilateral.

7.3.1.3 Prueba F

F experimental = 0,000119685

F crítica = (p = 0.05; n-2=16) = 19.43329253

Como F experimental es mayor que F crítica, se puede concluir que no existe desviación estadísticamente significativa con respecto a la regresión lineal.

7.3.2 Exactitud y precisión del método analítico

Tabla 26. Datos de exactitud y precisión del método analítico evaluado en repetibilidad para la evaluación de las cápsulas de itraconazol

Concentración (µg/mL)	Área Itraconazol (mV.s)	Porcentaje de Error Relativo (%)
11,52104949	2259,625	1,64675232
11,39409358	2202,084	0,5266585
11,55704398	2275,939	1,9643208
11,45573033	2230,02	1,070461
11,39029644	2200,363	0,4931575
11,54028892	2268,345	1,8164959
Promedio:		1,2529744
Desviación estándar		0,0737485
Desviación estándar Relativa		0,6426093
55,97627441	22408,337	1,2276355
56,13020743	22478,105	0,9560146
56,82160869	22791,473	0,2639905
55,80456478	22330,512	1,530624
56,52197235	22655,667	0,2647298
55,81804561	22336,622	1,5068365
Promedio		0,9583051

Desviación estándar		0,4109851
Desviación estándar relativa		0,7315665
53432,074	124,4256724	0,2027036
53296,536	124,1266273	0,4425567
53084,696	123,6592329	0,8174367
53753,532	125,134923	0,3661605
53354,666	124,2548828	0,3396877
53943,122	125,553226	0,7016661
Promedio		0,4783686
Desviación estándar		0,6957491
Desviación estándar relativa		0,558719

Fuente: Elaboración propia, 2023.

Tabla 27. Datos de exactitud y precisión del método analítico evaluado en precisión intermedia para la evaluación del itraconazol

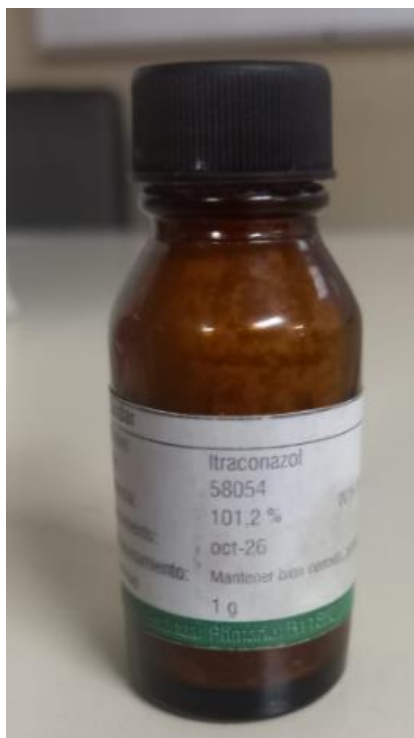
Concentración (µg/mL)	Área Itraconazol (mV.s)	Porcentaje de Error Relativo (%)
11,52104949	2259,625	1,6467523
11,39409358	2202,084	0,5266585
11,55704398	2275,939	1,9643208
11,38675966	2198,76	0,4619535
11,39799883	2203,854	0,5611134
11,42893635	2217,876	0,8340658
11,51453633	2256,673	1,5892886
11,49052236	2245,789	1,3774206
11,54738897	2271,563	1,8791376
Promedio:		1,2045235
Desviación estándar		0,0690379
Desviación estándar Relativa		0,601851
55,97627441	22408,337	1,2276355
56,13020743	22478,105	0,9560146
56,82160869	22791,473	0,2639905
57,25441183	22987,635	1,0276889
57,29951195	23008,076	1,1071698
57,60335801	23145,79	1,6434183
56,57244274	22678,542	0,1756727
57,21047888	22967,723	0,9501674
56,77182228	22768,908	0,1761404
Promedio		0,5212076
Desviación estándar		0,6380976
Desviación estándar relativa		0,6380976

53432,074	124,4256724	0,2027036
53296,536	124,1266273	0,4425567
53084,696	123,6592329	0,8174367
53154,895	123,8141169	0,69321
53018,763	123,5137613	0,9341143
53675,987	124,9638312	0,228934
53608,721	124,8154185	0,1098975
53076,761	123,6417255	0,8314788
53789,91	125,2151858	0,4305364
Promedio		0,5212076
Desviación estándar		0,6380976
Desviación estándar relativa		0,5135936

Fuente: Elaboración propia, 2023.

7.4 Anexo 4

Figura 6. Estándar de itraconazol, pureza 101,2 %



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Figura 7. HPLC modelo YL9100 y YL9150 utilizado en el método de validación



(7)

Figura 8. HPLC modelo YL9100 y YL9150 utilizado en el método de validación



(8)

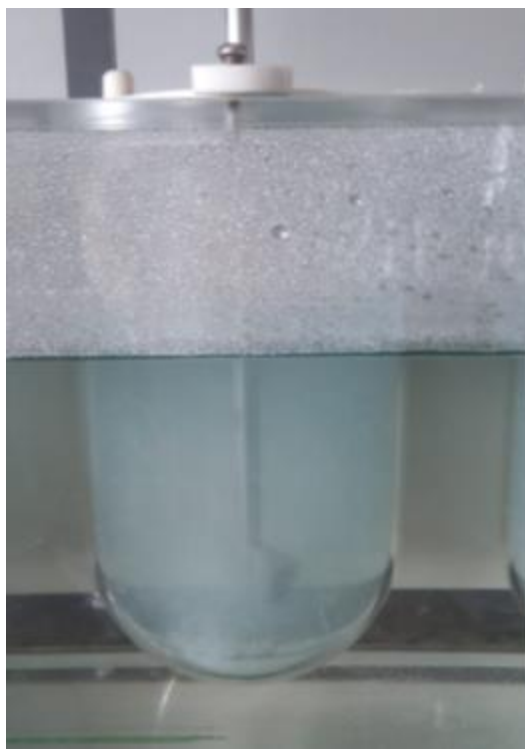
Fuente: Elaboración propia, con base en la referencia ⁹².

Figura 9. Disolutor a los 10 min de haber iniciado con las cápsulas de itraconazol



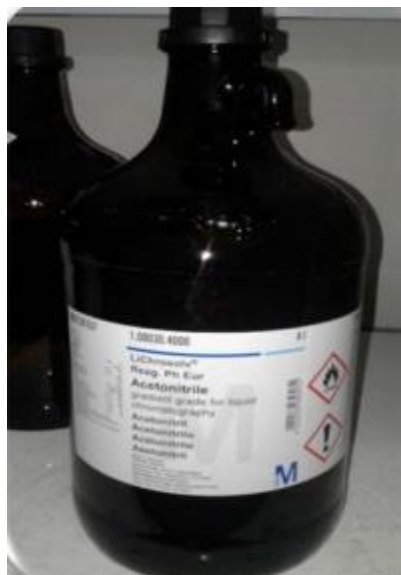
Fuente: Elaboración propia, 2023.

Figura 10. Cápsula de itraconazol ya disuelta en un medio de ácido clorhídrico 1M con lauril sulfato



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Figura 11. Acetonitrilo utilizado para la fase móvil, grado HPLC



Fuente: Elaboración propia basada en los reactivos para la parte experimental, 2023.