



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## **DESARROLLO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DISOLUCIÓN, VALORACIÓN Y PUREZA CROMATOGRÁFICA DE ITROCONAZOL PELLETS POR CLAR.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A N:

**ISAAC BARAJAS MEDINA  
NORMA LETICIA GUTIÉRREZ ORDAZ**

**DIRECTOR:** Q.F.B. MA. DE LOURDES ESTRADA MAYA  
**ASESOR:** Q.F.B. VICTOR HUGO BECERRA LÓPEZ



MEXICO D.F.

MARZO 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*AGRADECIMIENTOS:*

*A la QFB Ma de Lourdes Estrada ya que a su apoyo, paciencia, curiosidad, insistencia para llegar a esta meta y en compartir sus conocimientos...sobre todo en ser como ella es.*

*A Laboratorios PiSA por dejarme permitir crecer como profesionista y sobre todo como persona.*

*A Cony por que siempre esta dispuesta a escuchar y tratar de ayudar a resolver los problemas que con lleva esta tesis.*

*Siempre te llevo conmigo... mi gloriosa, honorable y amada UNAM...como se dice vulgarmente "mi piel dorada y mi sangre azul"*

*A mis maestros y amigos (ahora sinodales), el Prof. Víctor y la Profra Isabel, que a su comprensión, apoyo no lo hubiéramos logrado... valió la pena el esfuerzo.*

*A la QFB Lourdes Cervantes y a la QFB Teresa Benítez, gracias a sus recomendaciones y valiosas observaciones esto no hubiera podido dar ese sentido de profesionalismo.*

## DEDICATORIA

A mi mamá, una mujer en todo sentido de la palabra, con mucho carácter de salir adelante en las buenas y en las malas gracias... gracias a tus desvelos, regaños, empujones, apoyo, esfuerzo, tus preocupaciones, a tu forma de ser ahora soy una mejor persona y un mejor QFB y esto es para ti, por que te lo debía. Te amo y Te Quiero.

A mi segunda y tercera madre...jaja (Amalia y Bety), que les puedo decir mil gracias por el apoyo incondicional por que así como mi mamá lo vivió se que ustedes también y no saben cuanto las quiero.

A mi hermano (Jerónimo) sabes que te quiero que eres mi clon, que desde que tengo memoria siempre haz estado a mi lado ayudándome en todo y cubriéndome la espalda gracias y obviamente no podrá faltar a mis sobrinas (Zoé y Amacalli) que son unas hermosuras. Los quiero.

A mi padre que se perdió un poco en el camino, pero se que estas de vuelta y que tienes que vivir esto ahora, acompañándonos en las metas que están por delante.

A mi family que es poca, pero saben son muy grandes en todos los aspectos, pero en particular en lo profesional y lo personal ya que a las adversidades económicas nos han dado un ejemplo de valentía y coraje para lograr lo que deseamos.

A Edna Irais (LOVE OF MY LIFE), que te puedo decir que no sepa, pero bueno me esforzare en escribir unas cuantas cosas para que no te sientas jaja...gracias por ser mi amiga y apoyo incondicional, a tus coco wash me hiciste tener confianza y recalcar me que si puedo, que soy una persona grande e inteligente, pero sabes es un solo paso más de los que nos faltan por dar mi amor... por fin me podrás decir colega.

A unos nuevos amigos (Norma y Ricardo) que han tenido que aguantarme fines de semana para poder obtener la cereza del pastel, en lo particular Norma este es nuestro año y sabes nos espera muchas cosas mejores tu lo sabes.

A LA BANDA (Ira, Jazz, Ana, Alma, Licha, Diana, Israel, Mau, Manchitas, los dos Jonh, Edgar, José Luis) por la verdadera amistad que perdura y se que perdurara...

Si me falto a alguien mil disculpas, pero hay que ahorrar espacio y dinero jaja no es cierto pero a todos le agradezco lo que soy y en lo que me eh convertido.

## *AGRADECIMIENTOS*

*A DIOS por acompañarme y ayudarme en todos los momentos de mi vida, gracias por todo lo que me has dado.*

*A la UNAM esta gran institución por permitirme desarrollarme profesionalmente dentro de sus aulas, siempre estaré en deuda por todo lo recibí, gracias a una de las mejores Universidades del mundo.*

*A Laboratorios PiSA por las facilidades que nos proporcionó para el desarrollo del proyecto, así como los permisos adecuados para presentar los resultados.*

*A mis sinodales por su tiempo dedicado en la revisión del trabajo, en especial a mi asesor el profesor Victor Hugo Becerra y a la Maestra Isabel Garduño por su guía, sin profesores como ustedes esto no habría sido posible.*

*A la QFB. María de Lourdes Estrada Maya por su comprensión y a poyo en la realización de este trabajo, Gracias por involucrarte no solo como jefa, además, como asesora ayudándonos durante todo este proceso. ¡Mil gracias!*

*QFB Concepción Escobar Lujan (Cony) por compartir tus consejos, apoyo, confianza que nos otorgaste a Isaac y a mí, eres una gran persona.*

## DEDICATORIAS

*A mi mamá, mi amiga, consejera, etc., sabes que te admiro por todo lo que haz hecho por mí, gracias por confiar en mí siempre eres admirable y sabes que este logro es en parte tuyo. A mi papá por todo tu apoyo.*

*Rubén, hermano siempre estás ahí para mí apoyándome incondicionalmente y créeme que yo siempre estaré para ti. A Manuel (hermano) y José (sobrino) por todo su cariño.*

*Ricardo el amor de mi vida, por estar conmigo como amigo, compañero y esposo, sabes que eres mi persona favorita en todo el mundo, gracias por acompañarme en esta aventura y gracias por el regalo más grande que me acabas de dar.*

*Mis amigos incondicionales mi manada (Jas y Arturo) por todas los momentos que pasamos juntos en la Universidad, Armando, Erika, gracias amigos por todo su cariño.*

*A Isaac que creíste amigo que me iba a olvidar de ti, no sé que hubiera hecho por sin ti, sabes que siempre te agradeceré tu apoyo y confianza esto es el principio de algo bueno, sabes que de aquí en adelante solo buenas noticias. Irais cuidalo mucho sabes que sin tu apoyo no lo habríamos logrado (eres la única que lo mantiene a raya).*

## ÍNDICE GENERAL

	<b>PÁGINA</b>
ÍNDICE DE FIGURAS	i
<b>CONTENIDO</b>	
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. FUNDAMENTO TEÓRICO	4
2.1. Características farmacéuticas de los pellets	4
2.1.1. Difusión a través del recubrimiento	4
2.1.2. Difusión de la película de recubrimiento	4
2.1.3. Difusión parcial	5
2.1.4. Erosión	5
2.2. Propiedades Fisicoquímicas del Itraconazol	6
2.2.1. Nombres comunes	6
2.2.2. Posibles impurezas en el Itraconazol	7
2.2.3. Propiedades Fisicoquímicas	9
2.2.4. Propiedades Farmacológicas	9
2.2.5. Formas de Dosificación	11
2.3. Métodos Analíticos	12

2.3.1. Definición Método Analítico	12
2.3.1.1. Clasificación de Métodos Analíticos	12
2.4. Validación de Métodos Analíticos	13
2.4.1. Definición Validación	13
2.4.1.1. Validación de un Método Analítico	14
2.4.2. Parámetros de la Validación de Métodos Analíticos	14
2.4.2.1. Especificidad / Selectividad	14
2.4.2.2. Exactitud	14
2.4.2.3. Precisión	14
A. Precisión del sistema	15
B. Precisión Intermedia	15
C. Repetibilidad	15
D. Reproducibilidad	15
2.4.2.4. Limite de Detección	15
2.4.2.5. Limite de Cuantificación	15
2.4.2.6. Linealidad o proporcionalidad	15
2.4.2.7. Robustez	16
2.4.2.8. Tolerancia	16
2.4.2.9. Adecuabilidad del Sistema	16
2.4.2.10. Linealidad del Sistema	16
2.4.2.11. Linealidad e Intervalo del Método	16
2.5. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	17
2.5.1. Definición de Cromatografía	17



2.5.2. Cromatografía de Líquidos	18
2.5.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	20
2.5.3.1. Instrumentación	21
A. Sistemas de Bombeo	22
B. Sistemas de Inyección	22
C. Columnas	23
D. Detectores	23
E. Dispositivos de Recolección de Datos	24
2.6. Disolución	25
2.6.1. Definición de Disolución	25
2.6.2. Aparato 1 (Canastillas)	25
2.6.3. Aparato 2 (Paletas)	26
2.6.3.1. Calibración Interna	26
2.6.4. Medio de Disolución	27
2.7. Pureza Cromatográfica	29
2.7.1. Clasificación de Impurezas	29
2.7.2. Razones para la presentación y el control de impurezas	30
2.7.2.1. Impurezas Orgánicas	30
2.7.2.2. Impurezas Inorgánicas	30
2.7.2.3. Impurezas no disponibles	31
2.8. Valoración o ensayo	32
2.8.1. Definición de Valoración	32
2.8.2. Ensayo indicativo de Estabilidad	32

2.8.3. Uniformidad de Dosis	33
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
IV. OBJETIVO GENERAL	36
V. HIPÓTESIS	37
VI. DIAGRAMA DE FLUJO	38
VII. MATERIAL Y METODO	39
7.1. Equipos e Instrumentos	39
7.2. Insumos para el Método Analítico de Valoración	39
7.3. Insumos para el Método Analítico de Pureza Cromatográfica	39
7.4. Insumos para el Método Analítico de Disolución	39
7.5. Disolución	40
7.5.1. Condiciones Cromatográficas	40
7.5.2. Condiciones de Disolución	40
7.5.3. Validación del Método Analítico	40
7.5.3.1. Especificidad	40
7.5.3.2. Linealidad del Sistema	40
7.5.3.3. Repetibilidad del Sistema	41
7.5.3.4. Linealidad del Método	41
7.5.3.5. Exactitud y Estabilidad de la muestra	41

7.5.3.6. Precisión Intermedia	41
6.5.3.7. Robustez	41
7.6. Valoración	42
7.6.1. Condiciones Cromatográficas	42
7.6.2. Validación del Método Analítico	42
7.6.2.1. Especificidad	42
7.6.2.2. Linealidad del Sistema y Linealidad del Método	42
7.6.2.3. Exactitud, Repetibilidad y estabilidad de la muestra	43
7.6.2.4. Precisión intermedia	43
7.6.2.5. Robustez	43
7.6.2.6. Límites de Cuantificación y Detección	43
7.7. Pureza Cromatográfica	44
7.7.1. Condiciones Cromatográficas	44
7.7.2. Validación del Método Analítico	44
7.7.2.1. Especificidad	44
7.7.2.2. Linealidad del Sistema y del Método	45
7.7.2.3. Repetibilidad del Sistema	45
7.7.2.4. Exactitud y Repetibilidad del Método	45
7.7.2.5. Precisión Intermedia	45
7.7.2.6. Estabilidad de la muestra	45
7.7.2.7. Robustez	45
7.7.2.8. Límites de Cuantificación y Detección	46

VIII.	RESULTADOS	47
	8.1. Validación de Disolución de Itraconazol pellets y cápsulas	48
	8.2. Validación de Valoración de Itraconazol pellets y cápsulas	52
	8.3. Validación de Pureza cromatográfica de Itraconazol pellets y cápsulas.	57
IX.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	65
X.	CONCLUSIONES	73
XI.	REFERENCIAS	74
XII.	ANEXO I	77
XIII.	ANEXO II	83
XIV.	ANEXO III	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
FIGURA 1. Estructura Química del Itraconazol	6
FIGURA 2. Impureza I	7
FIGURA 3. Impureza II	7
FIGURA 4. Impureza III	7
FIGURA 5. Impureza IV	8
FIGURA 6. Impureza V	8
FIGURA 7. Impurezas VI	9
FIGURA 8. Espectro infrarrojo de Itraconazol	10
FIGURA 9. Esquema de los Módulos que Integran un CLAR	22
FIGURA 10. Especificidad de la prueba del método de disolución.	74
FIGURA 10a Especificidad de la prueba del método de disolución.	75
FIGURA 11. Linealidad del sistema del método de disolución.	75
FIGURA 12. Robustez del método de disolución modificando - 5% de Buffer	76
FIGURA 13. Robustez del método de disolución modificando + 5% de Buffer.	76
FIGURA 14. Robustez del método de disolución modificando - 0.1 en la adición de Ácido Fosfórico en la preparación del Buffer.	77
FIGURA 15. Robustez del método de disolución modificando + 0.1	78

en la adición de Ácido Fosfórico en la preparación del Buffer.

FIGURA 16. Robustez del método de disolución cambiando la columna analítica una Symmetry C18 de 4.6 x 250 mm por una Acclaim C18 de 4.6 x 250 mm Dionex.	78
FIGURA 17. Especificidad del método de valoración.	79
FIGURA 17a. Especificidad del método de valoración.	79
FIGURA 18. Especificidad del método de valoración. Degradacion a 40°C	80
FIGURA 18a. Especificidad del método de valoración. Degradacion a 40°C	80
FIGURA 19. Especificidad del método de valoración. Degradación con HCl 0.1 N	81
FIGURA 20. Especificidad del método de valoración. Degradación con NaOH 0.1 N.	81
FIGURA 21. Especificidad del método de valoración. Degradación con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	82
FIGURA 21a. Especificidad del método de valoración. Degradación con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	82
FIGURA 22. Adecuabilidad del sistema del método de valoración.	83
FIGURA 23. Linealidad del sistema del método de valoración.	83
FIGURA 24. Robustez del método de valoración modificando la proporción de fase móvil de Acetonitrilo (-4%), Metanol (+3%) y	84

Buffer (+1%).	
FIGURA 25. Robustez del método de valoración modificando la proporción de fase móvil de Acetonitrilo (-2%) y Buffer (+7%).	84
FIGURA 26. Robustez del método de valoración cambiando una columna de 4.6 x 250 mm por una Aclaim C18 de 4.6 x 250 mm Dionex.	85
FIGURA 27. Límites de cuantificación y detección del método de valoración.	85
FIGURA 28. Especificidad del método de pureza cromatográfica.	86
FIGURA 29. Adecuabilidad del método de pureza cromatográfica.	86
FIGURA 30. Especificidad del método de pureza cromatográfica.	87
Degradación a temperatura de 40°C.	
FIGURA 30a. Especificidad del método de pureza cromatográfica.	87
Degradación a temperatura de 40°C.	
FIGURA 31. Especificidad del método de sustancias relacionadas.	88
Degradación con HCl 0.1 N.	
FIGURA 31a. Especificidad del método de pureza cromatográfica.	88
Degradación con HCl 0.1 N.	
FIGURA 32. Especificidad del método de pureza cromatográfica.	89
Degradación con NaOH 0.1 N.	
FIGURA 32a. Especificidad del método de pureza cromatográfica.	89
Degradación con NaOH 0.1 N.	
FIGURA 33. Especificidad del método de pureza cromatográfica.	90
Degradación con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%.	
FIGURA 33a. Especificidad del método de pureza cromatográfica.	90

Degradación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

FIGURA 34. Linealidad del sistema del método de pureza cromatográfica.	91
FIGURA 35. Robustez del método de pureza cromatográfica modificando la proporción de Acetonitrilo - 5%.	91
FIGURA 36. Robustez del método de pureza cromatográfica modificando la proporción de Acetonitrilo + 5%.	92
FIGURA 37. Robustez del método de pureza cromatográfica cambiando la columna analítica una Symmetry C18 de 4.6 x 250 mm por una Aclaim C18 de 4.6 x 250 mm Dionex.	92
FIGURA 38. Límites de cuantificación y detección del método de pureza cromatográfica.	93



## INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Elementos requeridos para la validación de acuerdo a la FEUM	13
Tabla 2. Tipos de cromatografía de líquidos de acuerdo a la FEUM	18
Tabla 3. Exactitud del método de itraconazol pellets	48
Tabla 4. Precisión intermedia entre Analista 1 Día 1, Analista 2 Día 1; Analista 1 Día 2, Analista 2 Día 2	49
Tabla 5. Análisis de varianza de la precisión intermedia de la disolución	49
Tabla 6. Estabilidad de las muestras en solución durante dos días	50
Tabla 7. Robustez. Cambio en la proporción de la fase orgánica (+) un 5% en la fase móvil (Acetonitrilo: Buffer; 65:35)	51
Tabla 7a. Robustez. Cambio en la proporción de la fase orgánica (-) un 5% en la fase móvil (Acetonitrilo: Buffer; 55:45)	51
Tabla 7b. Robustez. Cambio en la preparación del Buffer de Ácido fosfórico (-) 0.1 mL	51
Tabla 7c. Robustez. Cambio en la preparación del Buffer de Ácido fosfórico (+) 0.1 mL	51
Tabla 7d. Robustez. Cambio de columna en el método analítico	51

Tabla 8. Exactitud del método con placebo, cantidad adicionada contra recuperada	53
Tabla 9. Precisión intermedia realizada por dos analistas en dos días diferentes	54
Tabla 10. Análisis de varianza obtenido de la precisión intermedia de la valoración	54
Tabla 11. Estabilidad de la muestra en solución	55
Tabla 12a. Cambio en la proporción de Acetonitrilo. Metanol y Buffer (51: 30: 19)	56
Tabla 12b. Cambio en la proporción de Acetonitrilo: Metanol: Buffer (53: 27: 25)	56
Tabla 12c. Cambio en Columna C18 5 $\mu$ m 4.6 X 250 mm Dionex	56
Tabla 13. Límites de Cuantificación y Detección	56
Tabla 14. Tiempos de retención relativo de impurezas obtenidas de las degradaciones de la especificidad	57
Tabla 15. Exactitud y Repetibilidad del método con placebo	59
Tabla 16. Precisión intermedia: análisis de dos días en dos diferentes días	60
Tabla 16a. Análisis de varianza calculados de la precisión intermedia	60
Tabla 17. Estabilidad de la muestra en solución	61
Tabla 18. Cambio en la proporción de Acetonitrilo +5% de la proporción inicial	61
Tabla 18a. Cambio en la columna C18 5 $\mu$ m 4.6 X 250 mm Dionex	61
Tabla 19. Determinación del límite cuantificación y detección	

por medio de diluciones	62
Tabla 20. Análisis de ANAdeVA para linealidad del sistema	63
Tabla 21. Análisis de ANAdeVA para linealidad del método	64
Tabla 22. Análisis de ANAdeVA de la linealidad del sistema para el método de valoración	67
Tabla 23. Análisis de ANAdevA de la linealidad del método para valoración	68
Tabla 24. Análisis de ANAdeVA de la linealidad del sistema para el método de pureza cromatográfica	70
Tabla 25. Análisis de ANAdevA de la linealidad del método para pureza cromatográfica	71

## RESUMEN

En el presente trabajo se cuantificó itraconazol pellets en disolución, valoración y pureza cromatográfica. El estudio se llevó a cabo utilizando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) como método de análisis, realizando un barrido para determinar su punto máximo de absorción los cuales son: 260, 254 y 225 nm, empleando una columna Symmetry C18 4.6 x 250 mm 5 µm; definiendo condiciones de extracción y análisis para cada una de las pruebas. En la evaluación estadística de la disolución se obtuvo  $y = 2.0^7 x - 3666.1$ , con una  $r^2 = 0.9995$  el porciento recuperado de 100.3547%. En la determinación de valoración y pureza cromatográfica se demostró que son indicativos de estabilidad; para el primer caso se obtuvo la ecuación  $y = 214.6561x + 0.1353$  y  $r^2 = 0.9992$ , un porciento de recobro de 99.6404% y el límite de cuantificación fue 0.6350 ppm y el límite de detección 0.1250 ppm. Por último en la pureza cromatográfica se obtuvo  $y = 306.2035 x + 0.0527$  con  $r^2 = 0.9988$  y un porciento de recobro de 100.8902% y un límite de cuantificación fue de 0.2500 ppm y 0.0500 ppm, cumpliendo con los demás parámetros analizados respectivamente.

## I. INTRODUCCIÓN

La coccidioidomicosis incluye un espectro de presentaciones que van desde una infección no complicada, que es auto limitada y se resuelve sin tratamiento en el 95% de los casos aproximadamente, hasta las formas diseminadas agudas casi siempre fatales. Por esta razón las estrategias de tratamiento varían considerablemente de un paciente a otro.

Los antimicóticos más utilizados son la amfotericina B (0.5-1.5 mg/kg/día por vía intravenosa), el fluconazol (400-800 mg/día por vía oral o intravenosa) y el Itraconazol (400 mg/día por vía oral).

El itraconazol es un antifúngico de la síntesis de los triazoles que ha sido usado a lo largo de dos décadas. En comparación con otros miembros de su clase, el itraconazol se muestra una serie de características farmacocinéticas favorables, incluyendo un tiempo de vida media largo y una extensa distribución tisular.

Es un derivado imidazólico de última generación utilizado en medicina por sus propiedades antifúngicas. Es un antifúngico triazólico sintético, químicamente emparentado con el ketoconazol pero con menos efectos adversos. El itraconazol es activo frente a los mismos hongos que el ketoconazol y fluconazol, pero es más activo que estos frente a los *Aspergillus*. En general, se utiliza por vía oral, pero también existe una formulación parenteral que se utiliza en el tratamiento de las dermatitis, onicomycosis y aspergilosis que no responden a la amfotericina B.

Es interesante hacer notar que la eficacia de la amfotericina B se ha documentado únicamente en unos cuantos estudios no controlados que incluían sólo a un pequeño número de pacientes.

La amfotericina liposomal, a pesar de su ventaja teórica de menor toxicidad, es virtualmente inaccesible en nuestro medio por su elevado costo.

En general, entre más rápidamente progresiva sea la enfermedad, más probable será que se seleccione la amfotericina B para iniciar la terapia, aunque hoy en día con frecuencia se utiliza en terapia combinada con azoles. No existe evidencia de que esta estrategia sea efectiva, y en otras micosis existen ejemplos de antagonismo farmacológico con la terapia combinada. En un ensayo clínico abierto con itraconazol en pacientes con coccidioidomicosis progresiva no meníngea, se obtuvo remisión en el 57% de los casos; el 16% de éstos presentó recaída.

La absorción digestiva del itraconazol requiere de un medio ácido para su disolución, en consecuencia causa irritación en la mucosa gástrica, a raíz de eso se ha desarrollado una nueva forma farmacéutica combinada con el principio activo, la cual se dispersa libremente en el tracto gastrointestinal, maximiza la absorción del fármaco y reduce la variabilidad intrapaciente.

Estas nuevas formas farmacéuticas como son los pellets de Itraconazol requieren de una metodología oficial, la cual aún no ha sido reportada; por lo que se desarrolló y evaluó a través de un análisis estadístico.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), debido a que es una herramienta muy útil para la cuantificación de algún activo en común; por lo cual fue la herramienta seleccionada para el presente estudio ya que con un buen desarrollo analítico nos ayuda a la optimización de tiempos de análisis, recursos, reactivos, consumibles y horas máquina.

## II. FUNDAMENTACION TEORICA

### 2.1 Características farmacéuticas de los pellets

Los pellets son cuerpos esféricos de libre flujo, manufacturados por la aglomeración de polvos finos o granulados de principio activo y los excipientes. La adición de microesferas a una forma farmacéuticas oral, es debido a que este se dispersa libremente en el tracto gastrointestinal, maximiza la absorción del fármaco reduce la variabilidad intrapaciente. <sup>(1)</sup>

La liberación del fármaco en un pellets se efectúa de una manera continua e interrumpida, los mecanismos que explican el comportamiento de liberación se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo al tipo de sustancia utilizada en el control de liberación:

**2.1.1 Difusión a través del recubrimiento.** Este mecanismo puede obtenerse aplicando sobre los pellets el fármaco impregnado, un recubrimiento denominado barrera, constituido por una película formada por sustancias insolubles en condiciones fisiológicas, pero que realiza las funciones de una membrana permeable. Esta película deja difundir el fármaco progresivamente hacia el medio exterior por un proceso de diálisis. De esta manera la liberación del fármaco depende de la permeabilidad de la membrana.

**2.1.2 Difusión de la película de recubrimiento.** Este mecanismo se presenta cuando se aplica al pellets con el fármaco impregnando, un recubrimiento formado por una película constituida por una sustancia que tiene la característica de ser soluble en condiciones de pH básico e insoluble en pH ácido.

**2.1.3 Difusión parcial.** Este mecanismo se presenta cuando se aplica sobre el pellet y el fármaco impregnado, un recubrimiento de película constituida por sustancias de permeabilidad controlada, que están mezcladas con sustancias

hidrofílicas, que sirven para formar poros en la película y de esta manera controlar la velocidad de liberación.

**2.1.4 Erosión.** Este mecanismo se presenta cuando el pellet es formado con materiales cericos en los cuales el fármaco está embebido. Tras la ingestión, la microesfera se va erosionando lentamente, en consecuencia la hidrólisis enzimática de los ácidos grasos. <sup>(1)</sup>

Entre las principales ventajas de estos modernos sistemas farmacéuticos se pueden destacar:

- a) El mantenimiento de los niveles relativamente constantes del fármaco en el sitio de acción.
- b) Se evitan las fluctuaciones pico- valle en la curva dosis respuesta.
- c) Reducción de la dosis del fármaco.
- d) Reducción en la frecuencia de administración.
- e) Disminución de los efectos adversos.
- f) Aumento en la aceptación del paciente hacia la farmacoterapia.

Los pellets ofrecen numerosas ventajas sobre los sistemas de dosis simple. Estos sistemas evitan el riesgo de las dosis de depósito y facilitan el mezclado de unidades por diferentes patrones de liberación. Por otra parte se logran tiempos de vaciado gástrico más cortos y reproducibles.

Una de las principales desventajas de esta forma farmacéutica es la baja capacidad de carga debido a la gran cantidad de excipientes incorporados en la formulación. Estos sistemas son invariablemente de tipo reservorio (es aquel que contiene el fármaco, formado por un núcleo sólido con capacidad osmótica). Rodeando el reservorio existe una membrana semipermeable que permite el paso del agua procedente del exterior del sistema. Cuando el comprimido entra en contacto con el jugo gastrointestinal, la penetración del agua produce la disolución del núcleo osmótico y la salida del medicamento por un orificio o zona de



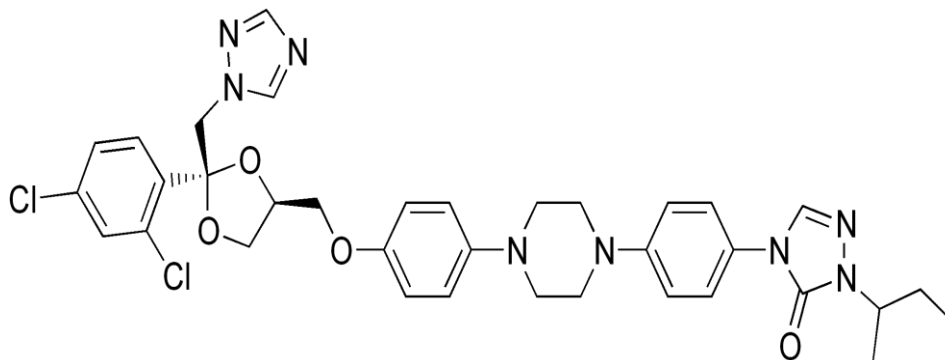
liberación. Por lo cual dependen de un recubrimiento desintegrable o de permeabilidad modificable en el tiempo. (2)

**2.1.5 Definición de capsulas.** Cuerpo hueco (pequeño receptáculo), obtenido por moldeo de gelatina, que puede ser de haber sido selladas). Ambas se fabrican en varios tamaños y formas. Se pueden de textura dura o blanda; dentro de la cual se dosifica el o los fármacos y aditivos en forma sólida (mezcla de polvos o microgránulos) o líquida.

Las cápsulas duras están constituidas por dos secciones que se unen posteriormente a su dosificación (se pueden volver a abrir con facilidad); las cápsulas blandas están constituidas por una sola sección y son selladas después de su dosificación éstas no se abren después usar para liberación prolongada y de liberación retardada. (32)

## 2.2 Propiedades fisicoquímicas del Itraconazol

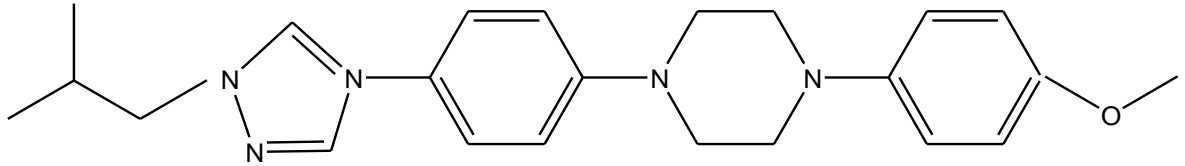
**2.2.1 Nombres comunes.** Oriconazol, químicamente es un derivado triazólico, al igual que el fluconazol o el voriconazol, de fórmula química  $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$ , se comporta como una base débil. (3)



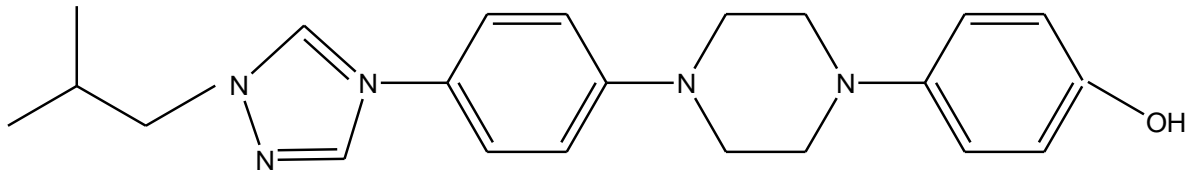
**Figura 1. Estructura química del Itraconazol**

## 2.2.2 Posibles impurezas en el Itraconazol

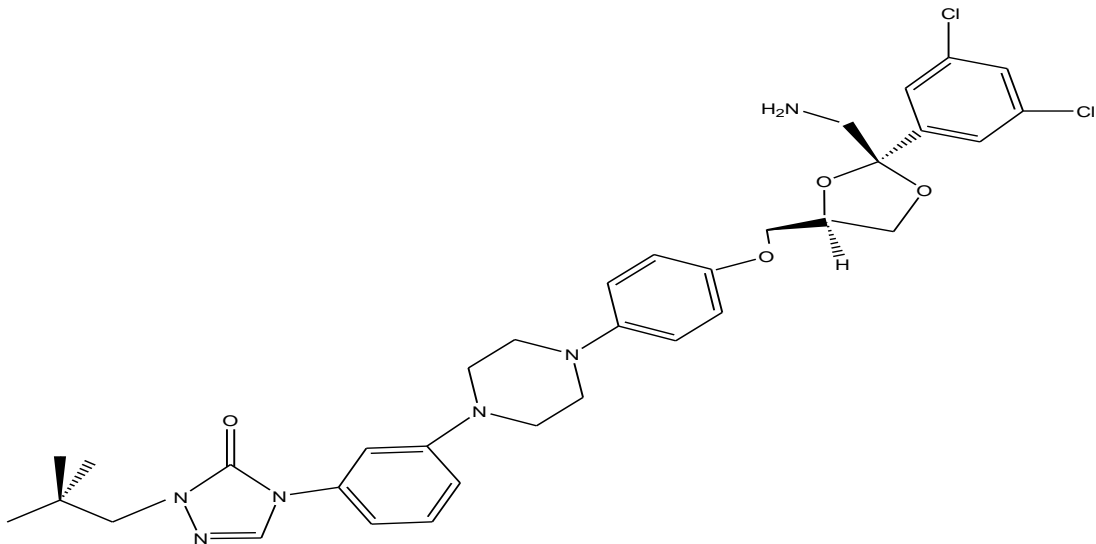
Las siguientes figuras representan las posibles impurezas generadas a partir de la ruta de síntesis y fabricación de los pellets de itraconazol. (18)



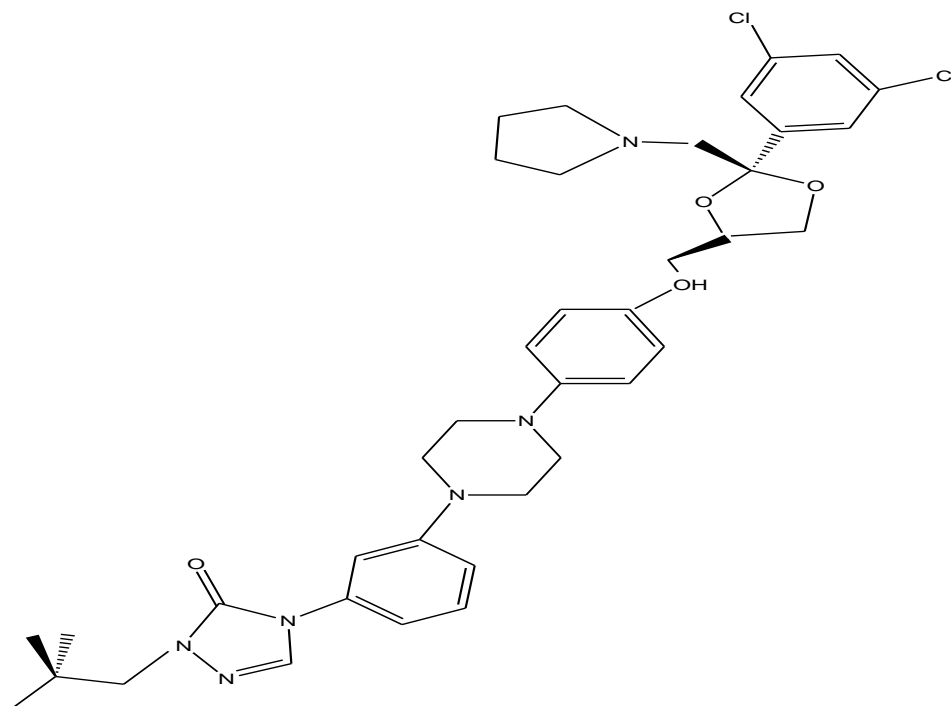
**Figura 2. Impureza I de Itraconazol**



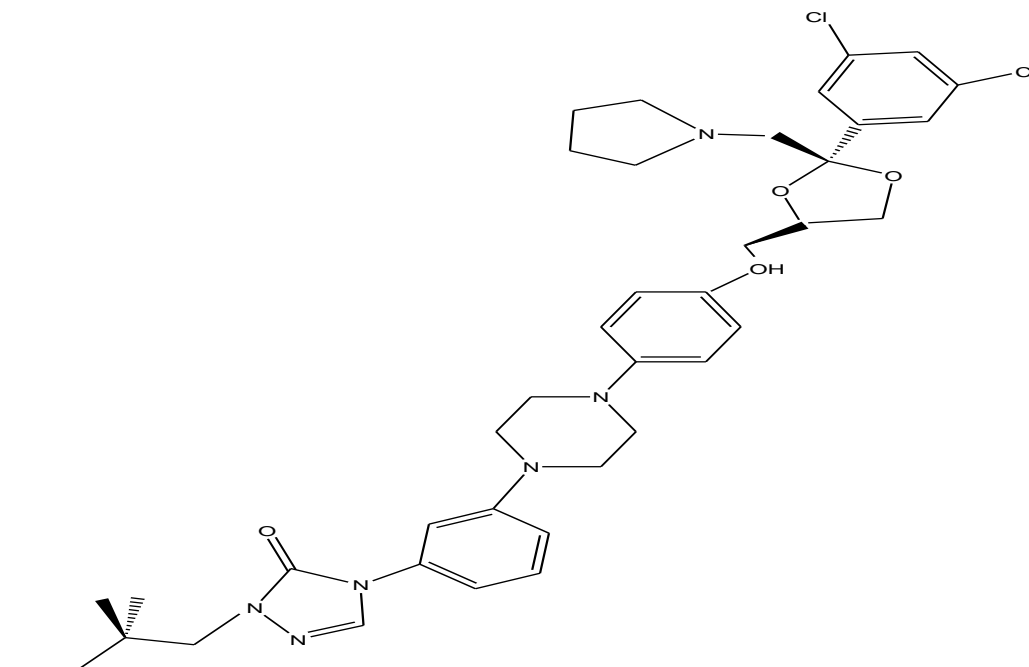
**Figura 3. Impureza II de Itraconazol**



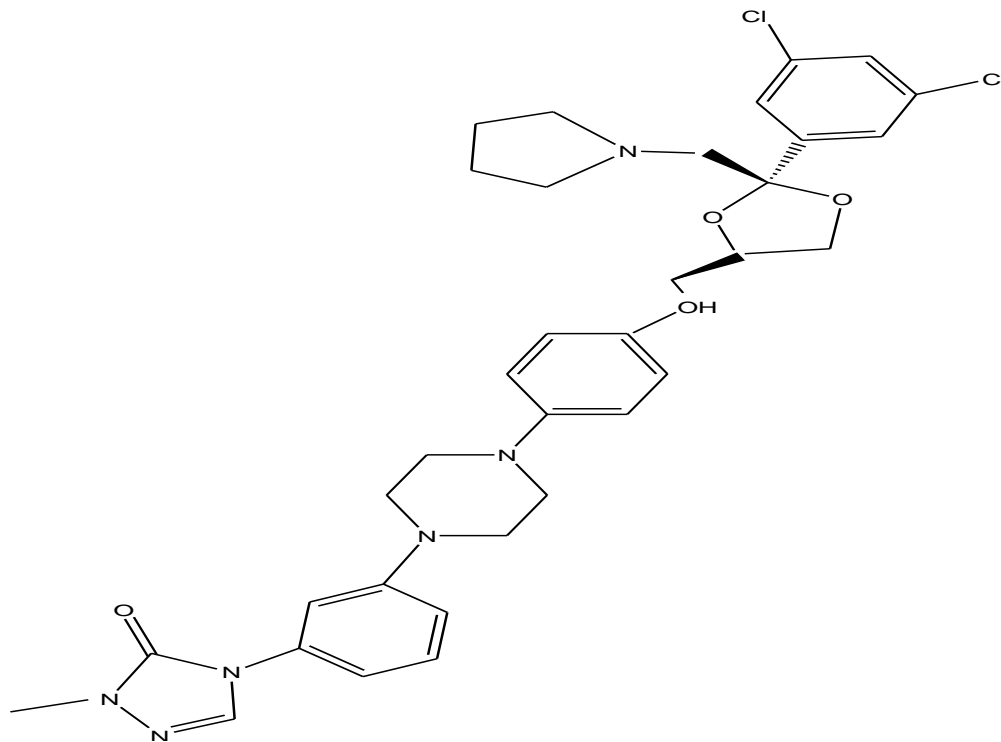
**Figura 4. Impureza III de Itraconazol**



**Figura 5. Impureza IV de Itraconazol**



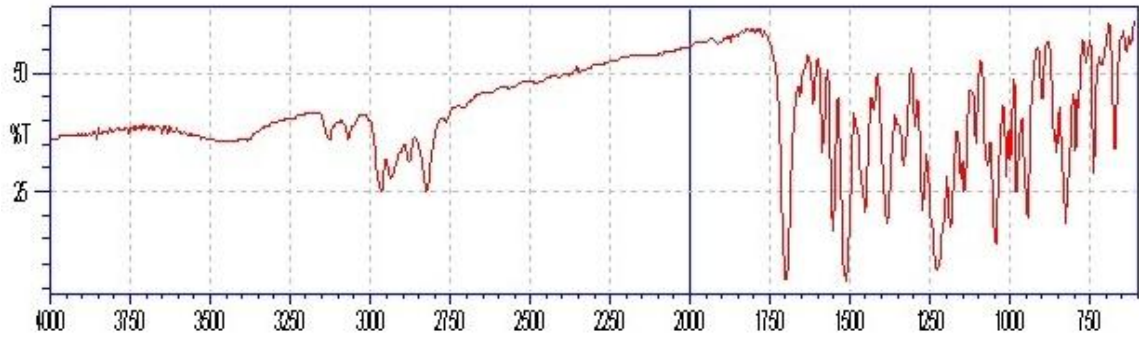
**Figura 6. Impureza V de Itraconazol**



**Figura 7. Impureza VI de Itraconazol**

**2.2.3 Propiedades Físicoquímicas.** Polvo blanco cristalino-amarillento, inodoro; punto de fusión de 160-170°C; pKa de 3.5. Prácticamente insoluble en agua y soluble en cloruro de metileno ligeramente soluble en alcohol. <sup>(3)</sup>

Los picos característicos del itraconazol se encuentran a los 3126, 3069, 2962, 2821, 1699, 1510, 1450 y 410  $\text{cm}^{-1}$ ; las bandas de absorción entre 2800 y 3200  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a los alcanos aromáticos CH y grupos amino. Las señales observadas a 1609 y 1425 corresponden a los enlaces C=N y C-N respectivamente. La banda de mayor intensidad se produjo a 1699  $\text{cm}^{-1}$  eso se debe a los enlaces C=O del fármaco; los enlaces -C=C- de compuestos aromáticos es de 1600 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Ver figura 8. <sup>(33)</sup>



**Figura 8. Espectro de Infrarrojo del Itraconazol.**

**2.2.4 Propiedades Farmacológicas.** El itraconazol es un derivado triazólico, activo contra infecciones por dermatofitos (*Trichophyton* spp, *Microsporum* spp, *Epidermophyton floccosum*), levaduras (*Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*), y otros hongos y levaduras. (4)

Esta indicado para el tratamiento de la las infecciones micóticas en huéspedes inmunocomprometidos y en pacientes inmunocompetentes.

Estudios *in vitro* han demostrado que inhibe la síntesis de ergosterol de la célula fúngica. El ergosterol es un componente fundamental en la membrana celular del hongo. También inhibe la síntesis de quitina en la fase de gemación e hifa del crecimiento mitótico. Esto es lo que le confiere las propiedades antimicóticos. (4)

La biodisponibilidad del itraconazol por vía oral es del 55%, la cual aumenta hasta un 99.8% cuando se administra inmediatamente después del alimento principal. Los niveles plasmáticos máximos se alcanzan de 3 a 4 horas después de la toma de 100 mg. (4)

Se une a proteínas plasmáticas en un 98%. La concentración en sangre es 60% superior a la concentración en plasma. La captación de tejidos queratinizados, especialmente la piel, es cuatro veces superior a la concentración

en el plasma, estado relacionada su eliminación con la regeneración de la epidermis. (4)

En contraste con los niveles plasmáticos, los cuales son indetectables dentro de los siete días siguientes a la supresión de la terapia, los niveles terapéuticos en la piel persisten de 2 a 4 semanas, después de finalizado el tratamiento de cuatro semanas. La concentración en hígado, riñón, hueso, estómago, vesícula y músculo es entre dos y tres veces mejor que la de plasma.

El itraconazol es metabolizado en el hígado dando lugar a un gran número de metabolitos. Uno de los metabolitos más importantes es el hidroxiiitraconazol. El cual tiene una actividad *in vitro* comparable con el itraconazol. La excreción del fármaco estudiado es en heces, de 3 a 18% de la dosis y la excreción renal es 0.03% de la dosis. Aproximadamente el 35% de la dosis se excreta en forma de metabolitos a través de la orina en una semana. (5)

Los efectos más frecuentes son de origen gastrointestinal, como dispepsia, náusea, vómito, diarrea, dolor abdominal y constipación. Otros reportes incluyen cefalea, elevación reversible de enzimas hepáticas, hepatitis, trastornos menstruales, vértigo y reacciones adversas (prurito, exantema, urticaria), neuropatía periférica, alopecia, edema, insuficiencia cardíaca congestiva y edema pulmonar. (5)

**2.2.5 Formas de dosificación.** Cápsulas de 100 mg; en algunos países existe una suspensión oral estabilizada en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina diseñada para el tratamiento de las micosis esofágicas u orofaríngeas. (6)

## 2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

**2.3.1 Definición de Método analítico.** Se refiere a la manera de realizar un procedimiento y deben describirse detalladamente los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Este debe incluir: la preparación de la muestra, el estándar de referencia y preparaciones de los reactivos, el uso del aparato, determinación de la curva de calibración, así como los cálculos matemáticos necesarios, entre otros puntos. <sup>(7)</sup>

### 2.3.1.1 Clasificación de los métodos analíticos

Los requisitos de los métodos varían desde valoraciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones de atributos subjetivos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes parámetros. <sup>(8)</sup>

En general se pueden clasificar los métodos analíticos de la siguiente manera:

**Categoría I.** Los procedimientos analíticos para cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados. <sup>(8)</sup>

**Categoría II.** Los 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. <sup>(8)</sup>

**Categoría III.** Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación del fármaco). <sup>(8)</sup>

**Categoría IV.** Pruebas de identificación. <sup>(8)</sup>

Para cada categoría, se requiere diferente información analítica en el Cuadro 1 se indican los elementos que se requieren normalmente en cada una de las categorías. (8)

**Cuadro 1. Elementos requeridos para la Validación de acuerdo a la FEUM.**

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Prueba de límite	Prueba de límite		
		Cuantitativa	Cualitativa		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

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

## 2.4 Validación de Métodos Analíticos

**2.4.1 Definición de Validación.** Es el proceso que establece evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con alto grado de seguridad la obtención de resultados, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las



aplicaciones analíticas previstas dentro de los intervalos de aceptación definidos.

(8, 20, 21)

**2.4.1.1 Validación de un método analítico.** Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, es decir, debe ser específico a lo que se está demostrando, debe ser aprobado y documentado. <sup>(9)</sup>

## **2.4.2 Parámetros de la validación de métodos analíticos**

**2.4.2.1 Especificidad / Selectividad.** Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, que pueden estar presentes (especificidad) o que se pudieran presentar por efectos ambientales y/o de interacción con los mismos componentes (selectividad) tales como: impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra. <sup>(8, 9 y 10)</sup>.

El estudio de este parámetro permite determinar si otros residuos potenciales (agente de limpieza, excipientes, fármacos, intermediarios) o sustancias como disolvente de remoción, materiales de elemento de remoción del residuo (hisopo, paño, tela), del contenedor y de la determinación no interfieren en la respuesta analítica del residuo. <sup>(9)</sup>

**2.4.2.2 Exactitud.** Expresa la proximidad entre el valor que se acepta como verdadero o el valor de referencia comparado con el valor determinado experimentalmente <sup>(7)</sup>. La exactitud de un procedimiento analítico y deben establecerse en todo su intervalo. <sup>(8)</sup>

**2.4.2.3 Precisión.** Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente diferentes porciones de una muestra homogénea. <sup>(9)</sup>

A. Precisión del sistema. Grado de concordancia entre los resultados analíticos obtenidos por un instrumento de medición, cuando se aplica repetidamente a una muestra homogénea de una solución de referencia. (10)

B. Precisión intermedia. Precisión de un método analítico expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas en distintos días a diferentes proporciones de una muestra homogénea. (9)

C. Repetibilidad. Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método. (9)

D. Reproducibilidad. Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios. (9)

**2.4.2.4 Límite de detección.** Es la cantidad menor de analito en una muestra que se puede detectar pero no cuantificar necesariamente como un valor exacto. (7)

**2.4.2.5 Límite de la cuantificación.** Es un parámetro cuantitativo en los análisis para niveles bajos de compuestos en matrices, y se utiliza particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación. (7)

**2.4.2.6 Linealidad o proporcionalidad.** Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado. (9)

**2.4.2.7 Robustez.** Es una medida de la capacidad del método para permanecer intacto por variaciones pequeñas pero deliberadas, esto proporciona confiabilidad durante el uso normal del método. <sup>(9)</sup>

**2.4.2.8 Tolerancia.** Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser: equipos, columnas, proveedores de reactivos, entre otros. <sup>(9)</sup>

**2.4.2.9 Adecuabilidad del sistema.** Verificación de que el sistema (Instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico. <sup>(9)</sup>

Esta verificación permite establecer la confiabilidad del sistema, antes del procesamiento de las muestras durante el uso rutinario del método; estas son definidas en función de una respuesta analítica, como pueden ser sus propiedades, su variabilidad, su forma, su tiempo de respuesta, indicadores de separación, indicadores de eficiencia, repuesta de blancos, entre otros. <sup>(10)</sup>

**2.4.2.10 Linealidad del Sistema.** Es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito (puede ser una sustancia de referencia) se ajustan al modelo matemático, en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica. <sup>(10)</sup>

**2.4.2.11 Linealidad e Intervalo del Método.** Es la capacidad del método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado. <sup>(10)</sup>

El *intervalo* es comprendido entre las concentraciones superior e inferior del analito y para el que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel

satisfactorio de precisión, exactitud y linealidad, cuando se aplica al método analítico. (20)

## 2.5 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

**2.5.1 Definición de cromatografía.** Se define como un procedimiento mediante el cual se separan solutos por un proceso dinámico de migración diferencial en un sistema que consta de dos o más fases, una de las cuales se mueven continuamente en una dirección dada y en la que las sustancias individuales presentan diferentes movibilidades por diversas causas como: adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica. Las sustancias individuales así separadas se pueden identificar o determinar mediante procedimientos analíticos. (8)

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR; siglas en inglés HPLC High Performance Liquid Chromatography), es una modalidad de la cromatografía. Este proceso es definido como la técnica de separación donde se realizan transferencias de los solutos entre la fase estacionaria y móvil. (21)

La CLAR utiliza una fase líquida móvil para separar los componentes de una mezcla. Estos componentes (o analitos) son primeramente disueltos en una matriz líquida, y después son inyectados a alta presión a través un flujo en la columna cromatográfica. La resolución del sistema es dependiente de la interacción entre los componentes del soluto y la fase estacionaria. La fase estacionaria es definida como el material de empaque inmóvil en la columna. La interacción del soluto con las fases estacionaria y móvil puede ser manipulada a través de diferentes factores asociados a la fase estacionaria y móvil. Como resultado, la CLAR adquiere un alto grado de versatilidad no encontrada en otros

sistemas cromatográficos y tiene la capacidad de separar fácilmente una gran variedad de mezclas químicas. (11)

La técnica cromatográfica en general requiere que un soluto se distribuya entre dos fases, una fija (fase estacionaria) y otra móvil (fase móvil). La fase móvil transfiere el soluto a través del medio, hasta que éste finamente emerge separado por medio de una corriente de disolvente líquido o gaseosos denominado eluyente. La fase estacionaria puede actuar mediante adsorción, como es el caso de adsorbentes como el gel de sílice, o pueden actuar por disolución del soluto, produciendo partición del soluto entre la fase estacionaria y la móvil. (8)

**2.5.2 Cromatografía de líquidos.** En el Cuadro 2, se describen los tipos de cromatografía de líquidos, en esta se incluye la cromatografía en capa delgada el adsorbente es una capa relativamente delgada y uniforme de material seco y reducido a polvo fino, sobre una lámina o placa de vidrio. Las separaciones logradas pueden basarse en la adsorción, la partición o una combinación de ambos efectos.

**Cuadro 2. Tipos de cromatografía de líquidos de acuerdo a la FEUM.**

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS	
Cromatografía plana	Cromatografía en columna
Cromatografía en capa delgada (adsorción)	Cromatografía líquido- sólido (adsorción)
	Cromatografía líquido- sólido (partición)
Cromatografía en papel (partición)	Cromatografía de intercambio iónico
	Cromatografía de exclusión

En la cromatografía en papel, el adsorbente es una hoja de papel de textura y espesor adecuados. La separación cromatográfica puede efectuarse mediante la acción de una sola fase líquida en un proceso análogo a la cromatografía de

adsorción en columna dado que el contenido natural de agua del papel o por la inhibición selectiva de un componente hidrófilo de la fase realizada por las fibras del papel pueden considerarse fase estacionaria, un mecanismo de partición puede contribuir significativamente a la separación. (8)

Cromatografía en columna de adsorción. En este tipo de cromatografía el adsorbente se introduce como relleno, en forma de sólido seco en una suspensión espesa, dentro de una columna cromatográfica de vidrio o cuarzo. A la cual se le agregan los compuestos en solución, estos se separan cuantitativamente de la solución y quedan absorbidos en una banda transversal estrecha en la parte superior de la columna. A medida que se deja fluir una cantidad adicional de disolvente a través de la columna. La velocidad de movimiento de una sustancia se ve afectada por diversas variables, que incluyen el poder de adsorción del adsorbente, el tamaño de partícula y el área; la naturaleza y la polaridad del disolvente; la presión aplicada o la carga hidrostática y la temperatura del sistema cromatográfico. (8)

En la cromatografía de partición, las sustancias que se desea separar se dividen entre dos líquidos inmiscibles, en uno de los cuales, la fase estacionaria, se adsorbe en un soporte sólido, presentando de este modo un área de contacto muy grande con el flujo de disolvente o fase móvil. El gran número de contactos sucesivos líquido-líquido permite una eficiencia en la separación que no se logra en la separación que no se logra en la extracción común líquido-líquido. (8)

La muestra que se introduce a la cromatografía generalmente en el sistema cromatográfico por alguno de los dos métodos siguientes: (a) una solución de la muestra en un volumen pequeño de la fase móvil se agrega a la parte superior de la columna; o (b), una solución de la muestra en un volumen pequeño de la fase estacionaria se mezcla con el soporte sólido y se transfiere a la columna como una capa colocada por encima de un lecho constituido por una mezcla de la fase estacionaria y adsorbente. (8)

La cromatografía de intercambio iónico se emplea para separar compuestos ionizables y solubles en agua con un peso molecular menor de 1 500. Las fases estacionarias son generalmente resinas orgánicas sintética; las resinas de intercambio catiónico contienen sitios activos con carga negativa y se emplean para separar sustancias básicas, por ejemplo las aminas, mientras que las resinas de intercambio aniónico tienen sitios activos con carga positiva para la separación de compuestos con grupos con carga negativa, como los grupo fosfato, sulfonato o carboxilato. Los compuestos iónicos y ionizables hidrosolubles son atraídos hacia las resinas y las diferencias en la afinidad producen la separación cromatográfica. El pH de la fase móvil, la temperatura, el tipo de ión, la concentración iónica y los modificadores orgánicos influyen en el equilibrio; estas variables pueden ajustarse para obtener el grado deseado de separación. (8)

En la cromatografía de exclusión por tamaño, las columnas están rellenas con una fase estacionaria porosa. Las moléculas de los compuestos cromatográficos se filtran de acuerdo con el tamaño. Las que son demasiado grandes para pasar por los poros pasan a través de la columna sin ser retenidas. Las moléculas más pequeñas se introducen en los poros y se retienen más a medida que el tamaño molecular disminuye, este tipo de columnas se emplean comúnmente para medir la agregación y la degradación de macromoléculas (8)

**2.5.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).** La cromatografía líquida de alta resolución, constituye una técnica analítica de uso muy generalizado. Deriva de la evolución de la cromatografía preparativa en columna cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución, han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas. (12)

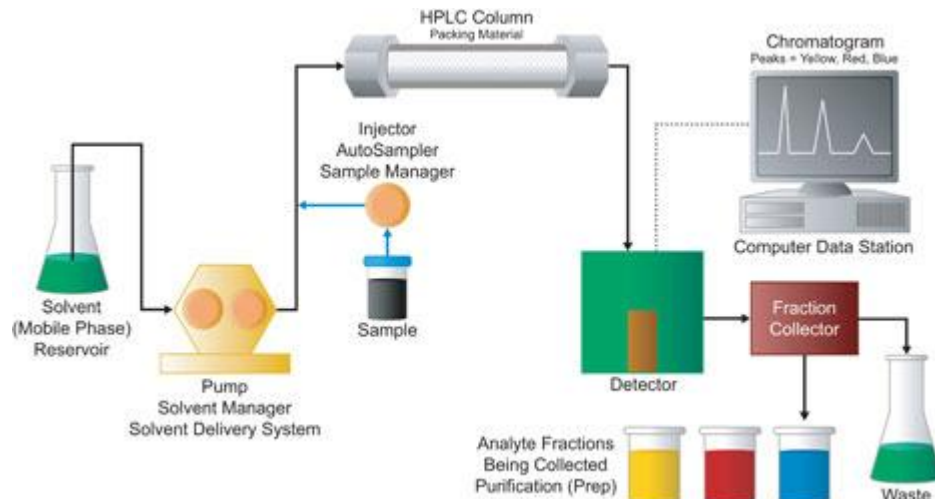
Su éxito se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad entre los compuestos a través de la elección de la columna y de la

composición del eluyente, es decir, al sacar partido de las interacciones disolución/fase móvil/ fase estacionaria. (12)

La migración diferencial en la CLAR es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase móvil en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad, sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. La cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale en la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención que se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma. (10)

**2.5.3.1 Instrumentación.** Un equipo de cromatografía de líquidos se compone de varios módulos con funcionalidades definidas (12), que están integrados en general de la misma manera: un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos, por ejemplo una computadora, un integrador y un registrador. Además de recibir y reproducir datos las computadoras se emplean para controlar las operaciones y los parámetros cromatográficos y permiten períodos largos de operación sin necesidad de supervisión. (8). En la Figura 9 se observa como se conforma un CLAR.





**Figura 9. Esquema de los módulos que integran un CLAR. Tomado de Waters. (33)**

**A. Sistema de bombeo.** Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión manteniendo un flujo laminar y de velocidad constante. (10)

La bomba se utiliza para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna cuyo relleno, es responsable de una sobrepresión muy importante a nivel del inyector. Esta presión puede alcanzar los 20 000 kPa, según sea el caudal de la fase móvil, su viscosidad y el tamaño de las partículas de la fase móvil. (12)

**B. Sistema de inyección.** Un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar la muestra es en forma de “paquete pequeño”, ya que esto ayuda en la obtención de picos simétricos y angostos.

Existen varios mecanismos de inyección. El más sencillo consiste en introducir la muestra mediante una jeringa; esta tiene que atravesar un septo y

soportar la presión del sistema, la precisión del volumen de inyección depende de la jeringa empleada. (10)

Un segundo y mejor sistema consiste en inyectores con asas intercambiables de volumen fijo, las cuales pueden llenarse con un exceso de muestra; estos dispositivos desvían el flujo del disolvente mientras se introduce la muestra reanudándolo posteriormente a través del inyector y arrastrando un volumen constante. (10)

Un tercer sistema que minimiza errores en la introducción de la muestra consiste en un inyector automático. Este dispositivo ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen por inyectar mediante el uso de un mecanismo de regulación. (10)

**C. Columnas.** Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que es en ésta, donde se va llevar a cabo la separación. El material de empaque seleccionado dependerá básicamente de la separación que se desee hacer. (10)

La columna es un tubo recto, calibrado, de acero (a veces forrado de un material inerte de vidrio en PEEK). La fase estacionaria se mantiene entre dos discos porosos situados entre sus extremidades cuyos volúmenes muertos deben ser lo más pequeños posible. (12)

**D. Detectores.** Cualquier detector debe reunir cierto número de cualidades: dar a cada compuesto detectado una respuesta proporcional a su concentración instantánea, ser sensible y tener poco ruido de fondo, ser estable en el tiempo. Los modos de detención más comunes se basan en propiedades polaridad de los compuestos: absorción, fluorescencia e índice de refracción. (12)

Los detectores pueden ser de dos tipos:

**Tipo I.** Aquellos que miden alguna propiedad de la fase móvil, estos son detectores de índice de refracción y de conductividad eléctrica. (10)

Son completamente inespecíficos y detectan variaciones en la propiedad particular (refracción o conductancia) de la fase móvil, y cualquier cambio de la fase producido por la viscosidad, temperatura o luz puede alterar el comportamiento del detector. <sup>(10)</sup>

**Tipo II.** Aquellos que miden alguna propiedad del analíto, en este tipo se encuentra el detector de luz UV/Visible (longitud fija o arreglo de diodos), de radioactividad (con contador *alfa*, *beta* o *gamma*), fluorescencia (fijos o monocromador de excitación o emisión), electroquímico (amperométricos y coulométricos) y espectro de masas (sencillos o en "tandem"). Estos detectores son muy específicos y miden alguna propiedad intrínseca de la molécula a medir.

<sup>(10)</sup>

**E. Dispositivos de recolección de datos.** Las estaciones de datos modernas reciben y almacenan la señal de los detectores e imprimen el cromatograma completo con las alturas y las áreas de los picos, la identificación de la muestra y las variables del método. Se emplean también para programar la cromatografía de líquidos, controlando la mayoría de las variables y proporcionando períodos largos de operación. <sup>(8)</sup>

Especificaciones: Una lista de las pruebas, las referencias a los procedimientos analíticos, la aceptación y adecuados criterios que son límites numéricos, intervalos de tiempo, o de otros criterios para los ensayos descritos. Lo establece el conjunto de criterios a los que un fármaco o medicamento debe cumplir para ser considerado aceptable para su uso. "Los criterios de aceptación" significan que la(s) sustancia(s) de fármacos y / o producto, durante la prueba de análisis y procedimientos reúna criterios de admisión ya establecidos. Las especificaciones son fundamentalmente normas para el control de calidad que se proponen y se justifica por el fabricante y aprobado por autoridades regulatorias.

## 2.6 Disolución

**2.6.1 Definición de Disolución.** Es un método para medir la liberación de un principio activo, a partir de la forma de dosificación que lo contiene y la disolución de éste, en el medio de prueba. <sup>(23)</sup>

Este método se emplea para determinar el cumplimiento de los requisitos de disolución en tabletas o cápsulas establecidos en la monografía individual. <sup>(10)</sup>

**2.6.2 Aparato 1 (Canastillas).** Los equipos comerciales de disolución por lo general constan de un baño de agua y de seis unidades de prueba, donde cada una está constituida por:

- Vasos cilíndricos con tapa.
- Un eje transmisor.
- Un regulador de velocidad de rotación
- Una canastilla

El vaso cilíndrico debe ser de vidrio o de otro material inerte y transparente, de fondo esférico; la tapa debe estar ajustada para retardar la evaporación y permitir la inserción de un termómetro, así como la toma de la muestra. El vaso debe estar parcialmente sumergido en el baño de agua, el cual debe tener un ligero movimiento constante y mantener la temperatura del medio de disolución a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . Es conveniente que el aparato permita la observación de la muestra. El eje transmisor, debe ser de acero inoxidable y girar suavemente sin bambolear; está colocado en el centro del vaso, de tal manera que no quede a más de 2,0 mm a cualquier punto del eje vertical del vaso. El regulador de velocidad de rotación, debe mantener la velocidad constante de acuerdo a lo indicado a cada producto y con una variación no mayor de  $\pm 4.0$  por ciento. La canastilla

consta de dos partes: la parte superior está unida al eje transmisor del movimiento y es de acero inoxidable con un orificio de salida de  $2.0 \text{ mm} \pm 0.5$  de diámetro, se ajusta a la parte inferior por medio de 3 grapas para permitir que se coloque la muestra en el interior de la canastilla y la sostenga firmemente, permitiendo que gire en forma concéntrica al eje del vaso durante la rotación. La distancia entre el fondo del vaso y la canastilla, debe mantenerse constante durante la prueba. (29)

**2.6.3 Aparato 2 (Paletas).** Los equipos comerciales de disolución por lo general constan de un baño de agua y de seis unidades de prueba, donde cada una está constituida por:

- Vasos cilíndricos con tapa.
- Un eje transmisor.
- Un regulador de velocidad de rotación
- Una hélice

El vaso, el baño de agua, el regulador de velocidad y el eje transmisor siguen las mismas especificaciones que para el *Aparato 1*. La hélice agitadora es una paleta de acero inoxidable o puede estar recubierta con un polímero de fluorocarbono o de cualquier otro material inerte. Durante la prueba se debe mantener una distancia entre la cuchilla y el fondo del vaso.

Si es el caso, para mantener la muestra en el fondo del vaso y evitar que flote, se puede utilizar una espiral de material no reactivo.

**2.6.3.1 Calibración mecánica.** La calibración mecánica requiere una serie de instrumentos certificados que son: termómetro o termopar, medidor de vibraciones, dispositivo calibrador para centrado, medidor de profundidad, tacómetro, medidor de balaceo o desviación de la vertical, medidor de nivel horizontal y cronómetro. (10)

### 2.6.3.2 Medio de disolución

Datos físicos y químicos del fármaco y la unidad de dosis deben ser determinadas antes de seleccionar el medio de disolución, para ello dos propiedades clave del principio son la solubilidad y estabilidad de la solución del estado del activo en función de la valor de pH. Al seleccionar la composición del medio, la influencia de buffers, el valor de pH, y surfactantes sobre la solubilidad y la estabilidad del activo a evaluar sus propiedades fundamentales de la unidad de dosis que pueden afectar la disolución incluyen mecanismo de liberación (inmediato, diferido o modificadas), la desintegración, la dureza, friabilidad, la presencia de los potenciadores de solubilidad, y presencia de otros excipientes.

Por lo general, cuando se desarrolla un procedimiento de disolución, una meta es tener condiciones óptimas, que se definen como el volumen de medio de al menos tres veces a la exigida para formar una solución saturada, cuando las condiciones son adecuadas, es más probable que los resultados reflejen la disolución de las propiedades de la forma de dosificación. (29)

Usando una mezcla de solventes acuosos orgánicos como medio de disolución es inadecuado, sin embargo, con la debida justificación de este tipo de medio puede ser aceptable.

El agua purificada se utiliza a menudo como el medio de disolución, pero no es ideal por varios razones, en primer lugar la calidad del agua puede variar dependiendo de la fuente del agua, y el valor del pH si no está controlado, en segundo lugar, el valor del pH puede variar día a día y también puede cambiar durante la fabricación, dependiendo de la principio activo y excipientes. A pesar de estas limitaciones, el agua es barata, fácilmente disponible, pueden eliminar fácilmente, ecológicamente aceptables y adecuados para productos con una velocidad de liberación independiente del valor del pH del medio. Las características de disolución de una formulación oral debe ser evaluado en un rango fisiológico a pH de 1.2 - 6.8 (1.2 a 7.5 para las formulaciones de liberación modificada). (29)

Durante el desarrollo del método analítico, puede ser útil medir el pH antes y después de la fabricación para descubrir los cambios de pH durante la prueba, la selección de las condiciones más adecuadas en las pruebas de rutina se basa en analizar la robustez, estabilidad del analito en el medio de disolución, la pertinencia en el rendimiento in vivo, cuando sea posible, los medios típicos de disolución pueden incluir los siguientes (no incluidos el orden de preferencia): ácido clorhídrico diluido, buffers en el rango de pH fisiológico de 1.2 a 7.5, el fluido gástrico simulado o intestinal (con o sin enzimas), agua y tensoactivos (con o sin ácidos o buffer), como el polisorbato 80, lauril sulfato de sodio, y las sales biliares. La molaridad de los buffers y los ácidos utilizados pueden influir en el efecto solubilizante y este factor puede ser evaluado. Para los compuestos con alta solubilidad y alta permeabilidad (según la definición del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica), la elección del medio y aparatos puede estar influenciada por la FDA Guidance referencia. (29)

Para compuestos no solubles en solución acuosa puede contener un porcentaje de tensoactivo (por ejemplo, lauril sulfato de sodio, polisorbato, u óxido de lauril dimetilamino) que se utiliza para aumentar la solubilidad de los fármacos. La necesidad de los tensoactivos y la concentraciones utilizadas pueden justificarse, mostrando perfiles diferentes en varios concentraciones. Los tensoactivos se puede utilizar ya sea como agentes humectantes o solubilizar a los medicamentos. (29)

## 2.7 PUREZA CROMATOGRÁFICA

### 2.7.1 Clasificación de las impurezas

Las impurezas se pueden clasificar en las siguientes categorías:

- Impurezas orgánicas (proceso y relacionada con las fármacos)
- Impurezas inorgánicas
- Disolventes residuales

Impurezas orgánicas pueden surgir durante el proceso de fabricación y / o almacenamiento de la sustancia. Pueden ser identificados o no identificados, volátiles o no volátiles, e incluyen:

- Materias primas
- Subproductos
- Intermediarios
- Productos de degradación

Impurezas inorgánicas puede resultar del proceso de fabricación. Normalmente son conocidos e identificados e incluyen:

- Los reactivos, ligandos y catalizadores
- Metales pesados y otros metales residuales
- Sales inorgánicas
- Otros materiales (por ejemplo, coadyuvantes de filtración, el carbón vegetal)

Los disolventes son líquidos inorgánicos u orgánicos utilizados como vehículos para la preparación de las soluciones o suspensiones en la síntesis de un nuevo fármaco. Puesto que se trata en general de toxicidad conocida, la selección de controles adecuados se consigue fácilmente.



## 2.7.2 Razones para la presentación y el control de las impurezas

### 2.7.2.1 Impurezas orgánicas.

El solicitante debe resumir las impurezas reales y potenciales, donde puede producirse durante la síntesis, purificación y almacenamiento de la sustancia de un nuevo fármaco. Este resumen debe basarse en la evaluación científica sólida de las reacciones químicas involucradas en la síntesis, las impurezas asociadas a las materias primas que puedan contribuir al grado de impureza de la nueva sustancia, y posibles productos de degradación. Esta discusión puede limitarse a las impurezas que razonablemente cabría esperar sobre la base de conocimiento de las reacciones químicas y procesos implicados. (24, 25)

Además, el solicitante debe resumir los estudios de laboratorio realizados para la detección de impurezas en el nuevo principio activo. Este resumen deberá incluir los resultados del examen de los lotes fabricados durante el proceso de desarrollo y los lotes del proceso comercial, así como los resultados de las pruebas de tensión, para identificar posibles impurezas que surgen durante el almacenamiento. El perfil de impurezas de los lotes de medicamentos de sustancias destinadas a la comercialización debe ser comparado con los utilizados en el desarrollo. Cuando se han hecho intentos para identificar las impurezas presentes en niveles que no excedan de ( $\leq$ ) los límites de identificación, es útil también informar de los resultados de estos estudios. (24, 25)

### 2.7.2.2 Impurezas inorgánicas

Son normalmente detectados y cuantificados usando los procedimientos adecuados de la farmacopea, o de otro tipo. Se autoriza el traslado de catalizadores a la nueva sustancia donde deben ser evaluados durante el desarrollo. La necesidad de inclusión o exclusión de impurezas inorgánicas en la especificación de fármacos nuevos se debe discutir. Los criterios de aceptación

deben basarse en las normas de la farmacopea, o los datos conocidos de seguridad. (24, 25)

La prueba de impurezas puede ser un prueba cuantitativa o una prueba límite para la impureza en una muestra, cualquier ensayo tiene por objeto reflejar con exactitud las características de pureza en la muestra. (24, 25)

Se consideran impurezas los contaminantes adicionados durante el curso del proceso de manufactura o almacenamiento, y contaminantes peligrosos tales como metales pesados o arsénico, entre otros. Aunque el objetivo principal es darle al usuario medicamentos de calidad que es imposible incluir en cada monografía una prueba para cada impureza o adulterante que puede estar presente (metales, penicilina, contaminación cruzada, contaminación microbiana, sustancias extrañas, entre otros). Por lo tanto, cuando los resultados de una prueba demuestren la presencia de impurezas o contaminación microbiana en concentraciones peligrosas u objetables por alguna razón, se pueden citar esos resultados para impugnar la calidad del producto. (10)

### **2.7.2.3 Impurezas no disponibles.**

Si las impurezas o los productos de degradación no están disponibles, la especificidad puede demostrarse mediante la comparación de los resultados de las pruebas de las muestras que contienen impurezas o productos de degradación con un segundo y bien caracterizado método por ejemplo, el método de la farmacopea u otro método validado de análisis (procedimiento independiente). (24, 25)

Cuando proceda, este debe incluir muestras almacenadas bajo condiciones de estrés relevantes: luz, calor, humedad, acido/ base de la hidrólisis y la oxidación.

- Para el ensayo, los dos resultados deben compararse;

- Para las pruebas de la impureza, los perfiles de impureza debe ser comparado.

Las pruebas de pureza de pico puede ser útil para demostrar que el pico cromatográfico del analito no es atribuible a más de un componente (por ejemplo: diodos, espectrofotometría de masas). (24, 25)

Producto de degradación: Una molécula resultante de un cambio químico en la molécula de fármaco producido en el tiempo y / o por la acción de la luz, temperatura, pH, agua, o por reacción con un excipiente y / o el envase inmediato / sistema de cierre. También se llama descomposición del producto. (15)

## 2.8 Valoración o Ensayo

**2.8.1 Definición de la Valoración.** Determinación que pretende medir el analito en una muestra dada el cual representa una medida cuantitativa de los componentes principales en un fármaco; para los fármacos las características de validación se aplican también en los análisis para cualquier componente o activo en una forma farmacéutica. (30, 31)

**2.8.2 Método indicativo de estabilidad:** Un procedimiento específico, que indica la estabilidad que debe incluirse para determinar el contenido de la nueva sustancia. En muchos casos es posible emplear el mismo procedimiento (Por ejemplo, CLAR), tanto para determinación cuantitativa del principio activo y cuantificación de las impurezas. En los casos en que el uso de un ensayo no específico se justifica, con el apoyo de otros procedimientos analíticos; se deben utilizar para lograr la especificidad global. Por ejemplo, cuando la valoración se adopta para la cuantificación y / o detección de impurezas de los

fármacos, la combinación de un método oficial y de una metodología desarrollada para las impurezas debe ser utilizado. (30, 31)

**2.8.3 La uniformidad de dosis.** Este término incluye tanto la masa de la forma farmacéutica y el contenido de la sustancia activa en la cantidad marbeteada, por lo cual debe ser utilizado un procedimiento farmacopéico. En general, la especificación debe incluir una o la otra pero no ambas. Estas pruebas se pueden realizar durante el proceso; los criterios de aceptación deben ser incluidos en la monografía. Cuando la variación del peso se aplica para nuevos productos se realiza uniformidad mediante la variación del peso, los solicitantes deben comprobar durante el desarrollo del fármaco que la homogeneidad del producto es adecuado; sino se tiene que realizar con respecto al método de ensayo (valoración). (30, 31)

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según un estudio realizado por el Instituto Mexicano del Seguro Social y la Universidad Nacional Autónoma de México, 40 por ciento de algunos sectores de la población urbana padece micosis (una infección generada por hongos microscópicos que pueden ser superficiales, sistémicos o profundos), especialmente de la llamada dermatofitosis que afecta a las plantas o uñas de los pies. <sup>(13)</sup>

Aunque en el caso de las micosis sistémicas no hay estadísticas confiables, en los últimos años, este tipo de infecciones se ha incrementado considerablemente. El doctor Méndez Tovar menciona que los compuestos azólicos son una alternativa útil en el tratamiento de micosis superficiales y sistémicas, para su tratamiento hay cerca de 30 compuestos azólicos, entre ellos miconazol, bifonazol e izoconazol. <sup>(14)</sup>

El itraconazol es un antimicótico, efectivo por vía oral, perteneciente a la familia de los triazoles y está indicado en micosis superficiales y profundas. Se emplea en el tratamiento de infecciones por hongos que afectan a los pulmones, uñas, boca, garganta, tiñas causadas por dermatófitos, enfermedades sistémicas parasitarias, entre otros, por lo que es un medicamento de amplio espectro. <sup>(15)</sup> La absorción digestiva del itraconazol requiere de un medio ácido para su disolución, en consecuencia causa irritación en la mucosa gástrica, a raíz de eso se ha desarrollado una nueva forma farmacéutica combinada con el principio activo, la cual se dispersa libremente en el tracto gastrointestinal, maximiza la absorción del fármaco y reduce la variabilidad intrapaciente. <sup>(16)</sup>

Estas nuevas formas farmacéuticas como son los pellets de Itraconazol requiere de metodologías para su análisis y cuantificación ya que no se tiene un método oficial, por lo que se decidió emplear la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), debido a que es una herramienta muy útil para la cuantificación de algún activo en común; así mismo hay que enfocarse al desarrollo del método analítico de nuestro interés, ya que con un buen desarrollo podemos optimizar tiempos de análisis, recursos, reactivos, consumibles y horas maquina.

En un método se requiere rapidez, que sea robusto, exacto, específico, sensible, preciso y en el cual se requiera de mínimo uso de muestra, así como su preparación y/o extracción del activo sea fácil y rápida.

El presente proyecto pretende dar respuesta a estos requerimientos garantizando así la conformidad dentro del laboratorio de control de calidad.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

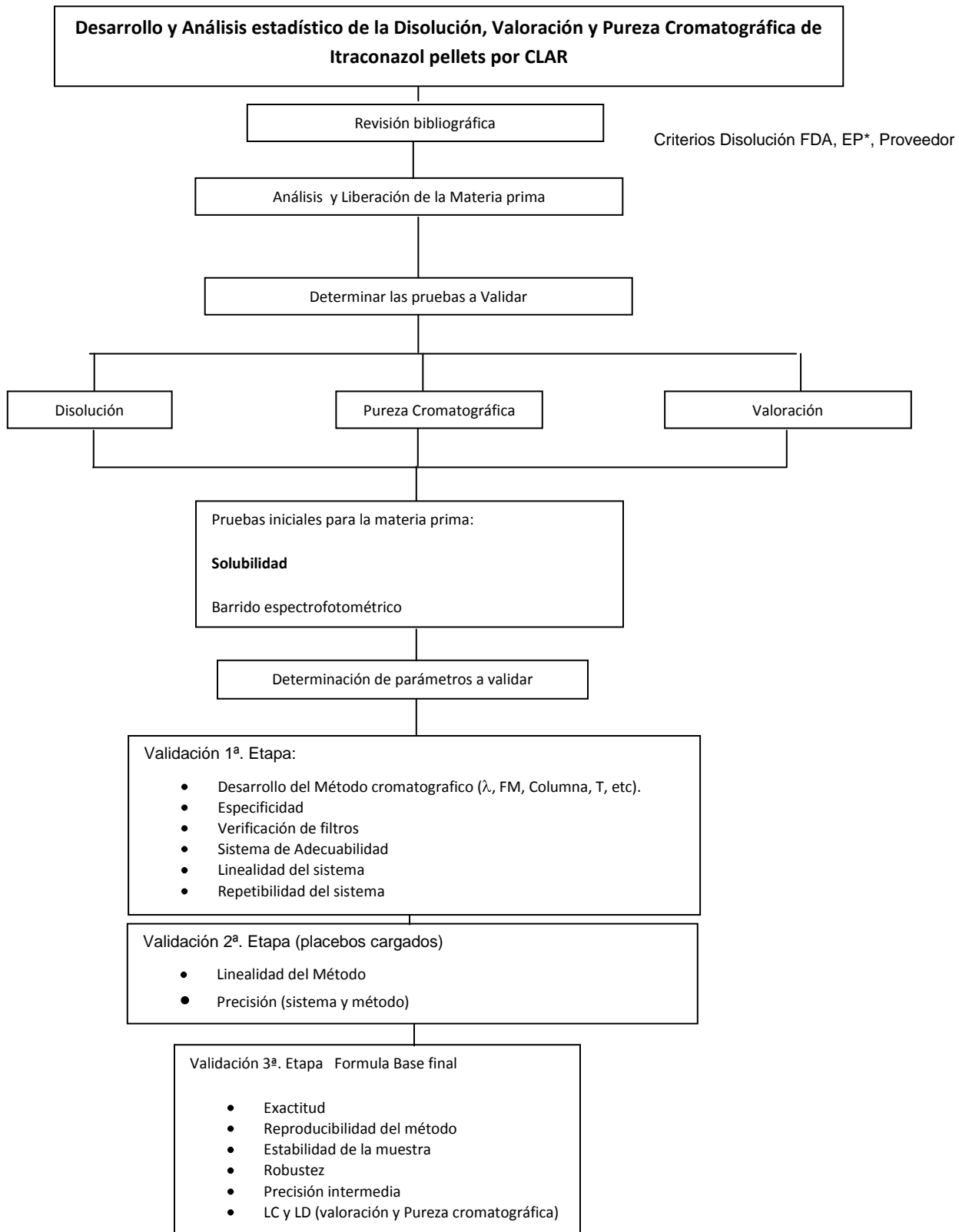
Desarrollar una metodología analítica confiable, exacta, precisa y reproducible en pellets de itraconazol, realizando un estudio estadístico inferencial, para su disolución, valoración y pureza cromatográfica.

## V. HIPOTESIS

Utilizando condiciones ácidas para la extracción de itraconazol así como determinando condiciones cromatográficas específicas para disociar la molécula, se podrá desarrollar una metodología analítica que permita identificar, separar y cuantificar el itraconazol en pellets y demostrar la confiabilidad de este método a través de un estudio estadístico inferencial tanto en disolución, valoración y pureza cromatográfica



## VI. DIAGRAMA DE FLUJO



## VII. MATERIAL Y MÉTODO

### 7.1 Equipos e Instrumentos

Cromatografo	Dionex	Ultimate 3000
Balanza analítica	Mettler Toledo	XS205

### 7.2 Insumos para el Método Analítico de Valoración

STD In House de Itraconazol	Chemo S.A. de C.V.
Itraconazol pellets	Chemo S.A. de C.V.
Heptanosulfonato de sodio GR	J.T.Baker
Acetonitrilo Grado HPLC	TSD
Metano Grado HPLC	Honeywel
Agua desmineralizada	N/A
Ácido fosfórico GR	J.T.Baker
Ácido clorhídrico GR	Proveedor Cientifico S.A
Columna Acclaim C18 5µm 4.6X 250 nm	Dionex
Columna Symmetry C18 5µm 4.6X 250 nm	Waters

### 7.3 Insumos para el Método Analítico de Pureza Cromatográfica

STD In House de Itraconazol	Chemo S.A. de C.V.
Itraconazol pellets	Chemo S.A. de C.V.
Tetrabutilamonio hidrógeno sulfato GR	J.T.Baker
Acetonitrilo Grado HPLC	TSD
Metano Grado HPLC	Honeywel
Agua desmineralizada	N/A
Tetrahidrofurano Grado HPLC	Tecsiquim
Ácido clorhídrico GR	Proveedor Cientifico S.A
Columna Acclaim C18 5µm 4.6X 250 nm	Dionex
Columna Symmetry C18 5µm 4.6X 250 nm	Waters

### 7.4 Insumos para el Método Analítico de Disolución

Itraconazol pellets	Chemo S.A. de C.V.
Heptanosulfonato de sodio GR	J.T.Baker
Acetonitrilo Grado HPLC	TSD
Metano Grado HPLC	Honeywel
Agua desmineralizada	N/A
Cloruro de sodio GR	J.T. Baker
Ácido clorhídrico GR	Proveedor Cientifico S.A
Pepsina	J.T. Baker
Columna Acclaim C18 5µm 4.6X 250 nm	Dionex

Columna Symmetry C18 5 $\mu$ m 4.6X 250 nm Waters

## 7.5 Disolución

### 7.5.1 Condiciones cromatográficas

- Fase móvil: Acetonitrilo : Buffer de sulfonatos (60:40)
- Flujo: 1 mL/ min
- Longitud de onda: 260 nm
- Volumen de inyección: 10  $\mu$ L
- Temperatura de la columna: 30 °C
- Temperatura del automuestreador: 15°C
- Diluyente: Medio de disolución

### 7.5.2 Condiciones de disolución

- Aparatos de disolución: Aparato 2
- Velocidad: 100 rpm
- Tiempo: 60 min
- Medio de disolución: Fluido gástrico con enzima

### 7.5.3 Validación del método analítico

**7.5.3.1 Especificidad:** Se realizó un barrido del estándar de Itraconazol polvo, itraconazol pellets, diluyente, fase móvil, cápsula, muestras y medio de disolución para determinar, su punto máximo de Absorción 260 nm.

**7.5.3.2 Linealidad del sistema:** Se evaluó mediante el análisis por triplicado de una curva de calibración preparada a partir de estándar de referencia de Itraconazol pellets y con 5 puntos correspondientes a las concentraciones de 0.022, 0.066, 0.088, 0.111, 0.133 mg/mL equivalentes al 20, 60, 80, 100, 120 % de la concentración normalmente analizada; se empleó el método de mínimos cuadrados para determinar los valores de intercepto, pendiente y coeficiente de

correlación a partir de los datos de la curva de calibración y utilizando la concentración de las soluciones y el área bajo la curva.

**7.5.3.3 Repetibilidad del sistema:** Se tomo una muestra al 100% de la linealidad del sistema se inyectaron 10 veces para determinar la repetibilidad del sistema y así determinar el coeficiente de variación.

**7.5.3.4 Linealidad del método:** Se determinaron las mismas concentraciones que en la del sistema solo que se emplearon placebos cargados.

**7.5.3.5 Exactitud y estabilidad de la muestra:** Se determino el porcentaje de recuperación de 10 placebos cargados con 0.111 mg/mL de Itraconazol correspondiente al 100% de la concentración normalmente analizada, de estas mismas muestras se someten a estabilidad por dos días en refrigeración (2 a 8°C) expuestas a la luz y sin exponer en un matraz de vidrio. (6 muestras en total); posteriormente se someten otras 6 muestras a temperatura ambiente, expuestas a la luz y sin exponer en un matraz de vidrio.

**7.5.3.6 Precisión intermedia:** se evaluó con dos analistas en dos días preparando cada uno 3 muestras a una concentración del 100%.

**7.5.3.7 Robustez:** Se modificó la proporción del buffer de sulfonatos  $\pm 5\%$  y dejando los demás parámetros cromatográficos fijos, otro cambio fue el de la adición del ácido fosfórico de  $\pm 0.1$  mL en la preparación del buffer y se dejaron los demás parámetros fijos, por último se modificó la columna Symmetry C18 de 4.6 x 250 mm Waters por una Acclaim C18 de 4.6 x 250 mm Dionex.

## 7.6 Valoración

### 7.6.1 Condiciones cromatográficas

- Fase móvil: Acetonitrilo: Metanol: Buffer de sulfatos (55:27:18)
- Flujo: 0.8 mL/min
- Longitud de onda: 254 nm
- Volumen de Inyección: 5  $\mu$ L
- Temperatura de columna: Temperatura ambiente
- Temperatura del automuestreador: 15° C
- Diluyente: HCl 0.1 N y Fase móvil
- Filtros: Celulosa Regenerada de 0.45  $\mu$ m
- Columna C18 de 4.6 x 250 mm de 5  $\mu$ m.

### 7.6.2 Validación del método analítico

**7.6.2.1 Especificidad:** Se realizó un barrido del estándar, muestra de Itraconazol, diluyente y fase móvil para determinar, su punto máximo de absorción el cual fue de 254 nm, se sometieron a condiciones de stress muestras del principio activo las cuales fueron: ácido clorhídrico 0.1 N, hidróxido de sodio 0.1 N, peróxido de hidrógeno al 30% y a temperatura de 40°C esto es para asegurar que el método puede identificar picos de degradación y por consiguiente ser indicativo de estabilidad.

**7.6.2.2 Linealidad del sistema y Linealidad del método:** Se analizó por triplicado de una curva de calibración preparada a partir de estándar de referencia de Itraconazol y con 5 puntos correspondientes a las concentraciones de 0.0251, 0.0502, 0.0753, 0.1254 y 0.1505 mg/mL equivalentes al 20, 40, 60, 100, 120% de la concentración normalmente analizada, se empleó el método de mínimos

cuadrados para determinar los valores de intercepto, pendiente y coeficiente de correlación a partir de los datos de la curva de calibración, utilizando la concentración de las soluciones y la respuesta del sistema de medición; en la linealidad del método se determinaron las mismas concentraciones que en la linealidad del sistema solo que se emplearon placebos cargados.

**7.6.2.3. Exactitud, repetibilidad y estabilidad de la muestra:** Se realizó con 10 muestras cargadas preparadas a la concentración normalmente analizada 100%, de estas muestras se someten a estabilidad por dos días en refrigeración (3 a 8°C) expuestas a la luz y sin exponer en un matraz de vidrio. (6 muestras en total); posteriormente se someten otras 6 muestras a temperatura ambiente, expuestas a la luz y sin exponer en un matraz de vidrio.

**7.6.2.4 Precisión intermedia:** Se realizó por triplicado de una misma muestra al 100% preparadas por dos analistas diferentes y en dos días diferentes.

**7.6.2.5 Robustez:** Se modificaron ciertos parámetros como: la proporción de la fase móvil de Acetonitrilo (-4%), Metanol (+3%) y Buffer (+1%) y de de Acetonitrilo (-2%) y Buffer (+7%) manteniendo todos los demás parámetros fijos, por último se modificó la columna Symmetry C18 de 4.6 x 250 mm Waters por una Acclaim C18 de 4.6 x 250 mm Dionex.

**7.6.2.6 Límites de detección y cuantificación:** Se realizó a partir de diluciones partiendo del 100, 20, 10, 8, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 y 0.1 % de la Concentración normalmente analizada. Se calculó el coeficiente de variación para cada nivel de concentración.

## 7.7 Pureza cromatográfica

### 7.7.1 Condiciones cromatográficas

- Fase móvil: Buffer de Sulfato ácido de tetrabutilamonio : Acetonitrilo

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Buffer (%)	Acetonitrilo (%)
0	1.5	70	30
20	1.5	50	50
25	1.5	70	30
30	1.5	70	30

- Longitud de onda: 225 nm
- Volumen de Inyección: 10  $\mu$ L
- Temperatura de columna: 30°C
- Temperatura del automuestreador: 15 °C
- Diluyente: HCl 0.1N y Mezcla de Tetrahidrofurano: Metanol (1:1)
- Filtros: Celulosa regenerada de 0.45  $\mu$ m
- Columna C18 de 4.6 x 250 mm de 5  $\mu$ m

### 7.7.2 Validación del Método analítico

**7.7.2.1 Especificidad:** Se realizó barrido del estándar y muestra de Itraconazol, diluyente, fase móvil y placebo para determinar su punto máximo de Absorción. Se degradaron muestras con ácido clorhídrico 0.1 N, hidróxido de sodio 0.1 N y peróxido de hidrógeno al 30 % en solución así como la exposición de las muestras a temperatura de 40°C para verificar que el método sea indicativo de estabilidad. El pico es espectralmente homogéneo.

**7.7.2.2 Linealidad del Sistema y del Método:** Se evaluó mediante el análisis por triplicado de una curva de calibración preparada a partir de estándar de referencia de Itraconazol y con cinco puntos correspondientes a las concentraciones de 0.0100, 0.0300, 0.0400, 0.0500 y 0.070 mg/mL equivalentes al 20.0, 60.0, 80.0, 100.0, 140.0 % de la concentración normalmente analizada. La linealidad del método se realizó bajo las mismas condiciones con placebos cargados.

**7.7.2.2 Linealidad del Sistema y del Método:** Se evaluó mediante el análisis por triplicado de una curva de calibración preparada a partir de estándar de referencia de Itraconazol y con cinco puntos correspondientes a las concentraciones de 0.0100, 0.0300, 0.0400, 0.0500 y 0.070 mg/mL equivalentes al 20.0, 60.0, 80.0, 100.0, 140.0 % de la concentración normalmente analizada. La linealidad del método se realizó bajo las mismas condiciones con placebos cargados.

**7.7.2.3 Repetibilidad del sistema:** Se evaluó a partir de 10 determinaciones de una misma solución muestra a la concentración de 0.050 mg/mL de Itraconazol y se calculó el % de desviación estándar relativa (%DER).

**7.7.2.4 Exactitud y Repetibilidad del método:** Se evaluó el porcentaje de recuperación de 10 placebos cargados con 0.050 mg/mL de Itraconazol correspondiente al 100% de la concentración normalmente analizada.

**7.7.2.3 Precisión intermedia:** Se evaluó mediante el análisis por triplicado de una misma muestra realizado en dos días diferentes por dos analistas. De los datos obtenidos (12 resultados individuales) se calculó el %DER. La muestra utilizada corresponde a placebos cargados.

**7.7.2.4 Estabilidad de la muestra:** Se sometieron las muestras a las mismas condiciones descritas en la valoración y disolución.



**7.7.2.5 Robutez:** Se modifico la columna Symmetry C18 de 4.6 x 250 mm por una Acclaim C18 de 4.6 x 250 mm Dionex manteniendo todos los demás parametros fijos. En los resultados no se observa una diferencia significativa en comparación con los resultados iniciales. Solo se ve modificado el tiempo de retención del Itraconazol.

**7.7.2.6 Límites de detección y cuantificación:** Se realizó a partir de diluciones partiendo del 100, 20, 10, 8, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 y 0.1 % de la Concentración normalmente analizada. Se calculo el coeficiente de variación para cada nivel de concentración.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Validación de disolución de itraconazol pellets y cápsulas.

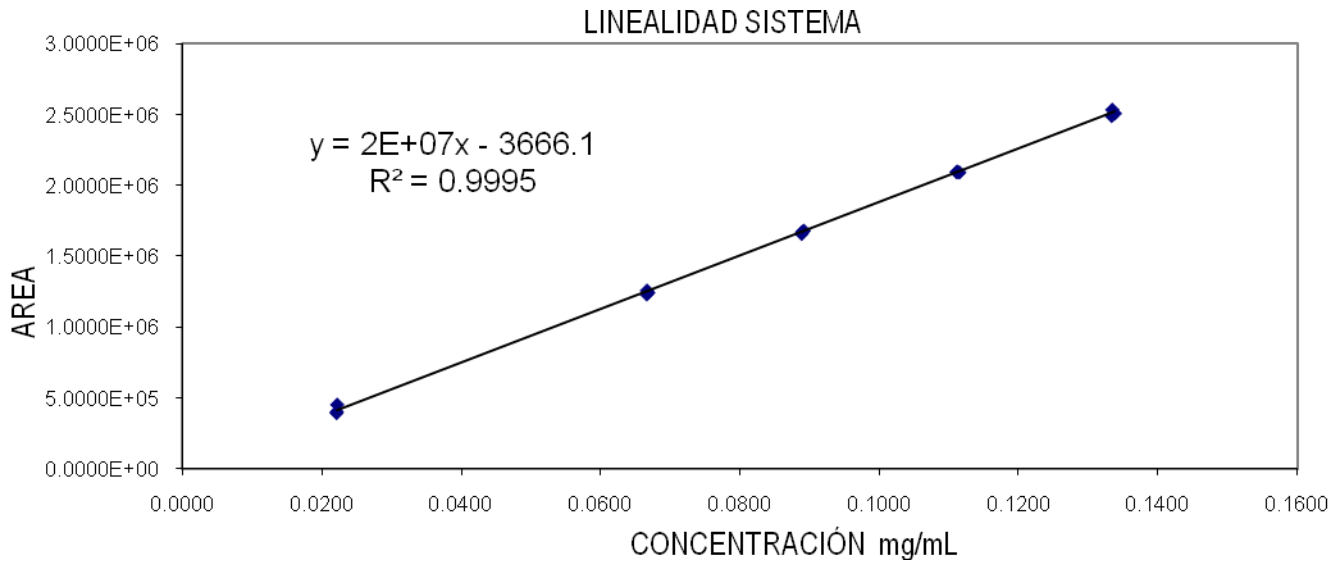
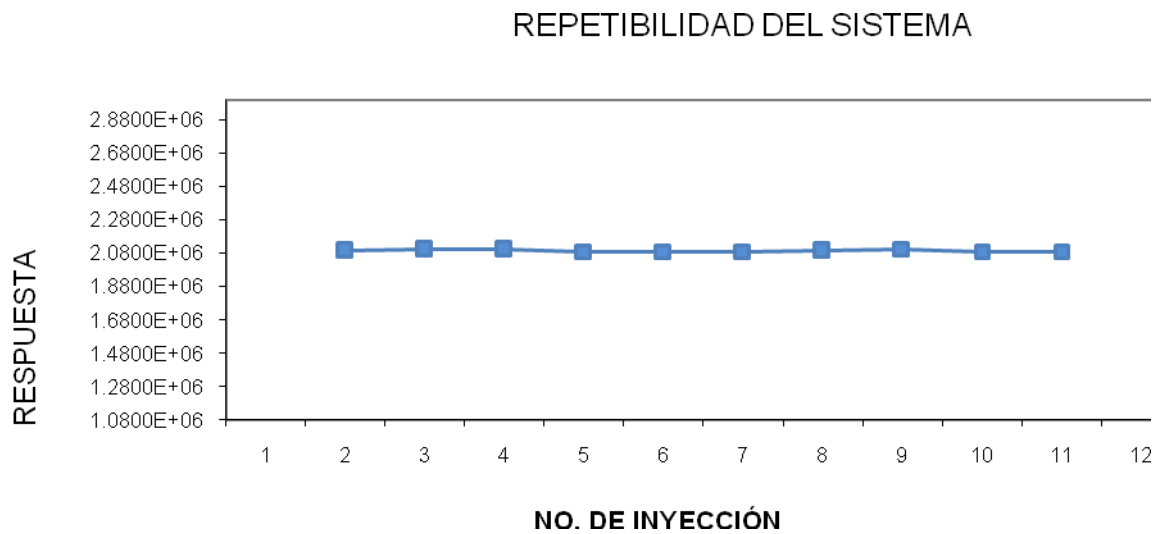
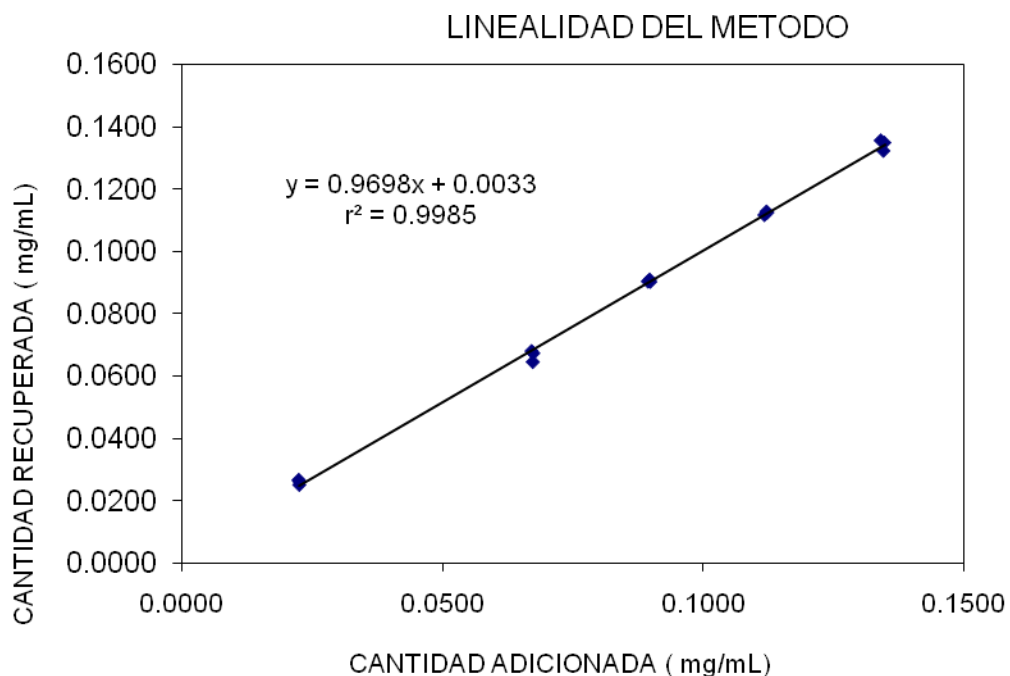


Gráfico 1. Linealidad del sistema. Área de Itraconazol pellets vs Concentración de Itraconazol (mg/mL).



Gráfica 2. Repetibilidad del sistema de Itraconazol Pellets.



Grafica 3. Linealidad del método cantidad recuperada de Itraconazol pellets vs Cantidad adicionada de Itraconazol pellets

Muestra	Cantidad recuperada (mg)	Cantidad adicionada (mg)	% Recuperado
1	14.0628	14.0302	100.2328
2	14.2207	14.0364	101.3133
3	14.4058	14.2726	100.9334
4	14.0747	14.0012	100.5250
5	14.1574	14.0592	100.6987
6	13.9328	14.0654	99.0571
7	14.1376	14.0633	100.5278
8	14.0216	13.9618	100.4281
9	13.9142	14.0405	99.0998
10	14.0033	13.9017	100.7310
		<b>Promedio</b>	<b>100.3547 %</b>
		<b>C.V.</b>	<b>0.7316 %</b>

Tabla 3. Exactitud del método de Itraconazol pellets.

DIA	ANALISTA No.1 % Recuperado	ANALISTA No. 2 % Recuperado
1	99.8201	100.2698
	98.3813	101.5288
	101.5288	101.4388
	100.0899	100.1799
	99.7302	100.6295
	101.3489	101.4388
<b>SUMA</b>	<b>600.8992</b>	<b>605.4856</b>
2	101.5288	98.7410
	101.5288	99.3705
	100.8993	100.4496
	100.4496	100.6295
	99.6403	98.2014
	99.4604	98.2014
<b>SUMA</b>	<b>603.5072</b>	<b>595.5934</b>
<b>SUMA POR ANALISTA</b>	<b>1204.4064</b>	<b>1201.0790</b>
<b>SUMA TOTAL</b>	<b>2405.4854</b>	
<b>PROMEDIO</b>	<b>100.2286</b>	
<b>C.V.</b>	<b>0.2963%</b>	

Tabla 4. Precisión intermedia entre Analista 1 Día 1, Analista 2 Día 1; Analista 1 Día 2, Analista 2 Día 2.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
ANALISTAS	1.0000	0.0000	0.0000	0.8365	38.5100
DIAS	2.0000	0.0001	0.0001	20.4817	4.4600
ERROR PURO	20.0000	0.0001	0.0000		
TOTAL	23.0000	0.0002			

Tabla 5. Análisis de varianza de la precisión intermedia de la disolución.

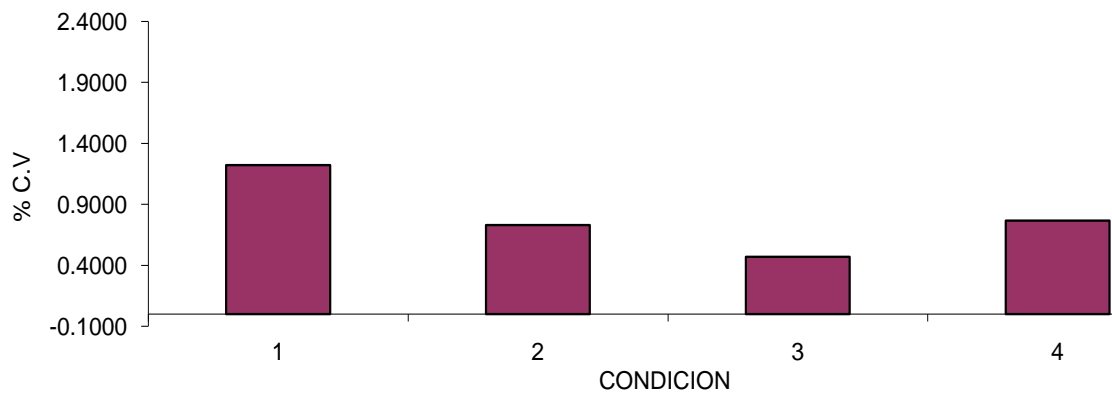
Muestra	Inicio % Recuperado	2 días % Recuperado	Promedio % Recuperado	%CV
1	100.4496	100.6295	100.5396	0.1265
2	100.5396	100.1799	100.3598	0.2534
3	100.3597	100.0000	100.1799	0.2539
4	100.2698	100.4496	100.3597	0.1267
5	100.2698	100.1799	100.2249	0.0634
6	100.6295	100.3597	100.4946	0.1898
7	100.0899	103.2374	101.6637	2.1892
8	99.9101	101.9910	100.9506	1.4576
9	98.2914	100.4496	99.3705	1.5357
10	98.5612	102.4281	100.4947	2.7209
11	98.2014	100.6294	99.4154	1.7270
12	99.1906	103.2374	101.2140	2.8272

Tabla 6. Estabilidad de las muestras en solución durante dos días.

Condición

1. Las muestra 1 a la 3 se mantuvieron en refrigeración sin protección a la luz.
2. Las muestra 4 a la 6 se mantuvieron en refrigeración con protección a la luz.
3. Las muestra 7 a la 9 se mantuvieron a temperatura ambiente sin protección a la luz.
4. Las muestras 10 a la 12 se mantuvieron a temperatura con protección a la luz.

ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS



Grafica 4. Estabilidad de la muestra comparativa entre el coeficiente de variación de las muestras respecto a la condición de almacenamiento.

mg/mL Concentración Recuperada	mg/mL Concentración Inicial	PROMEDIO	%C.V
99.3705	101.8885	100.6295	1.7693
98.0216	98.4712	98.2464	0.3236
99.7302	100.1799	99.9551	0.3181

Tabla 7. Robustez. Cambio en la proporción de la fase orgánica (+) un 5% en la fase móvil (Acetonitrilo: Buffer; 65:35).

mg/mL Concentración Recuperada	mg/mL Concentración Inicial	PROMEDIO	%C.V
100.8094	101.8885	101.3489	0.7529
99.1906	98.4712	98.8309	0.5147
99.8201	100.1799	100.0000	0.2544

Tabla 7a. Robustez. Cambio en la proporción de la fase orgánica (-) un 5% en la fase móvil (Acetonitrilo: Buffer; 55:45).

mg/mL Concentración Recuperada	mg/mL Concentración Inicial	PROMEDIO	%C.V
98.4712	101.8885	101.4497	1.2164
98.0216	98.4712	98.3363	0.3236
98.2014	100.1799	99.1907	1.2810

Tabla 7b. Robustez. Cambio en la preparación del Buffer de Ácido fosfórico (-) 0.1 mL

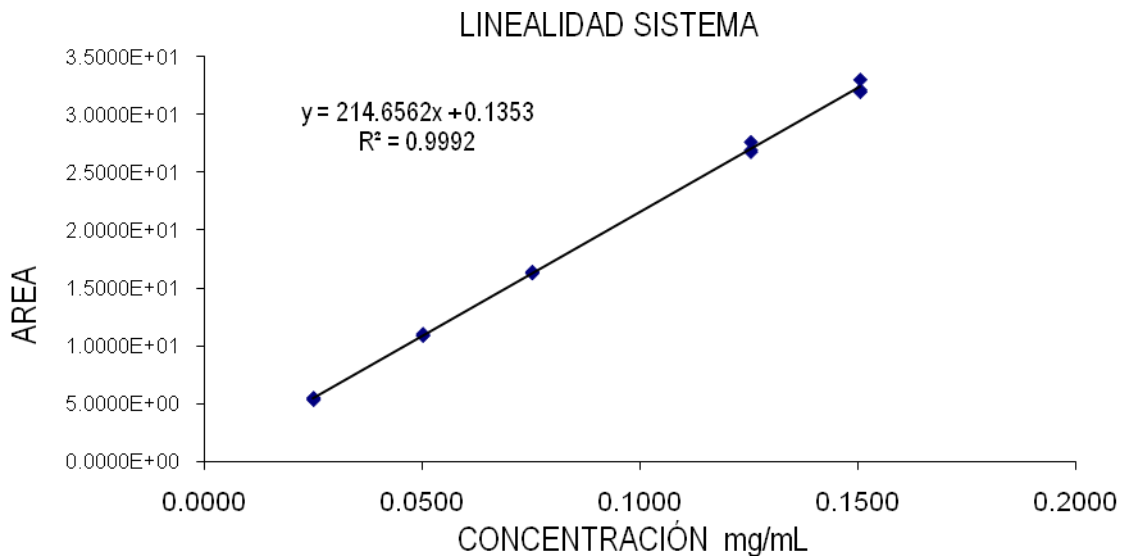
mg/mL Concentración Recuperada	mg/mL Concentración Inicial	PROMEDIO	%C.V
99.9108	101.8885	101.4497	1.8383
98.2014	98.4712	98.3363	0.1940
98.2014	100.1799	99.1907	1.4104

Tabla 7c. Robustez. Cambio en la preparación del Buffer de Ácido fosfórico (+) 0.1 mL

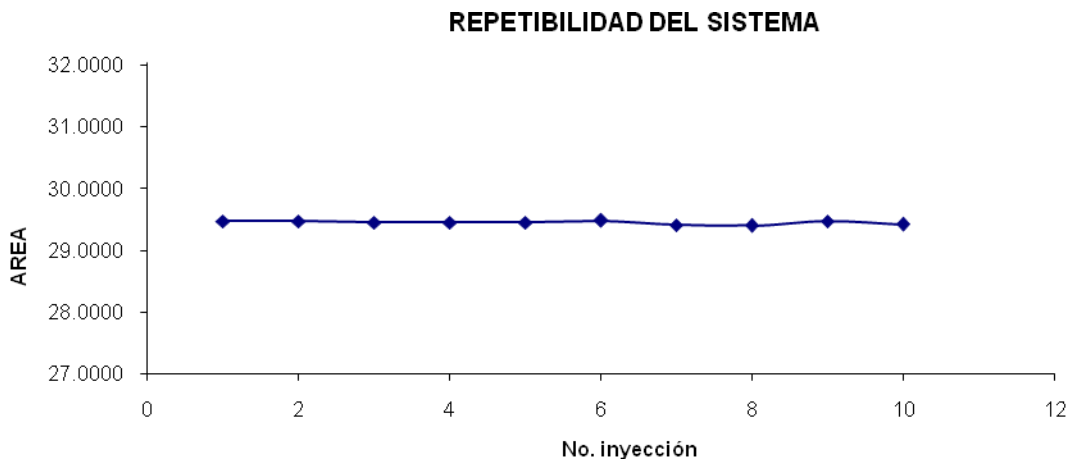
mg/mL Concentración Recuperada	mg/mL Concentración Inicial	PROMEDIO	%C.V
99.9101	101.8885	100.8993	1.3865
98.5612	98.4712	98.5162	0.0636
98.2014	100.1799	99.1907	1.4104

Tabla 7d. Robustez. Cambio de columna en el método analítico.

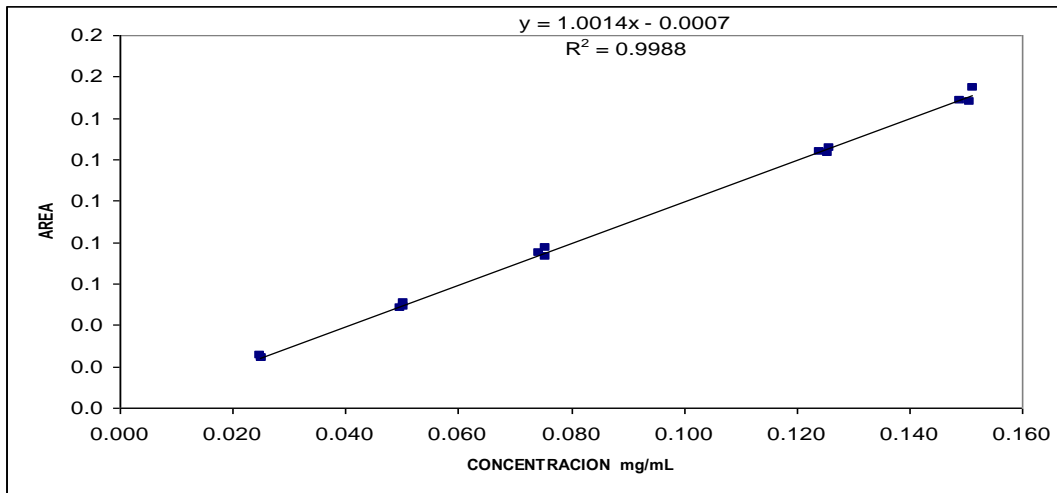
## 8.2 Validación de valoración de itraconazol pellets y cápsulas



Gráfica 5. Representación de la linealidad del sistema: concentración contra área bajo la curva del itraconazol.



Gráfica 6. Repetibilidad del sistema, dispersión de diez inyecciones comparadas contra la respuesta.



Gráfica 7. Linealidad del método cantidad adicionada contra cantidad recuperada.

MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% RECUPERADO
1	13.4967	13.5635	100.4944
2	13.4578	13.6747	101.6113
3	13.2395	13.0513	98.5790
4	14.5474	14.4857	99.5759
5	13.3151	13.0630	98.1063
6	13.2481	13.2052	99.6758
7	13.5076	13.3608	98.9137
8	14.0480	14.1790	100.9324
9	13.6135	13.4129	98.5266
10	13.7194	13.7179	99.9886
<b>PROMEDIO</b>	<b>13.6193</b>	<b>13.5714</b>	<b>99.6404</b>
<b>S</b>	<b>0.4060</b>	<b>0.4678</b>	<b>1.1381</b>
<b>C.V.</b>	<b>2.9809</b>	<b>3.4473</b>	<b>1.1423</b>

Tabla 8. Exactitud del método con placebo, cantidad adicionada contra recuperada.



## PRECISIÓN INTERMEDIA

DIA	ANALISTA No1	ANALISTA No 2
UNO	99.4100	100.5984
	98.9115	99.1941
	100.9886	98.6966
SUMA	<b>299.3101</b>	<b>298.4891</b>
DOS	98.4352	100.0713
	99.1137	99.8514
	98.7150	101.7332
SUMA	<b>296.2640</b>	<b>301.6560</b>
SUMA TOTAL	<b>595.5740</b>	<b>600.1451</b>
SUMA TOTAL	<b>1195.7191</b>	
PROMEDIO	<b>99.6433</b>	
C.V.	<b>1.0309</b>	

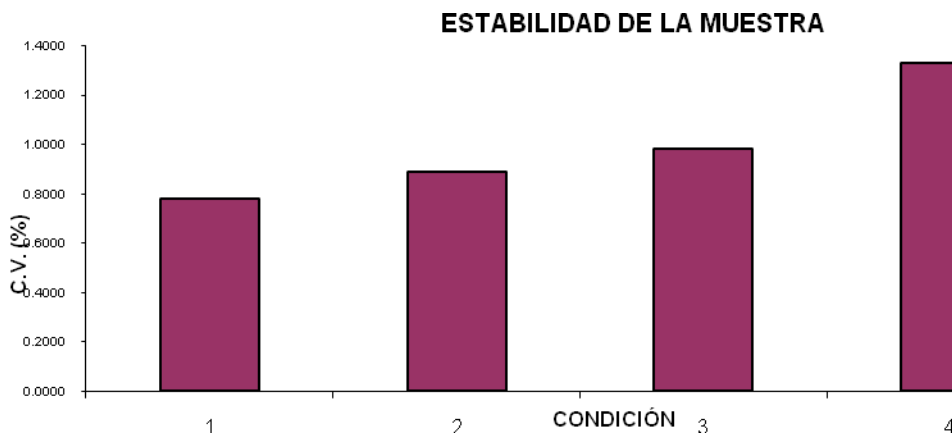
Tabla 9. Precisión intermedia realizada por dos analistas en dos días diferentes.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
ANALISTAS	1	1.741188	1.741188	1.0821	38.5100
DIAS	2	3.218016	1.609008	1.9366	6.0600
ERROR PURO	8	6.646741	0.830843		
TOTAL	11	11.605944			

Tabla 10. Análisis de varianza obtenido de la precisión intermedia de la valoración.

Muestra	INICIO	Cantidad rec 2días	PROMEDIO	C.V
1	100.9484	100.4348	100.6916	0.3607
2	100.1788	99.4466	99.8127	0.5187
3	100.4944	99.2091	99.8518	0.9102
4	101.6113	99.7189	100.6651	1.3293
5	98.5790	100.0040	99.2915	1.0148
6	99.5759	99.1241	99.3500	0.3216
7	98.1063	100.5622	99.3343	1.7482
8	99.6758	100.2406	99.9582	0.3995
9	98.9137	100.0181	99.4659	0.7851
10	100.9324	98.2344	99.5834	1.9157
11	98.5266	99.6071	99.0669	0.7712
12	99.9886	98.1820	99.0853	1.2893

Tabla 11. Estabilidad de la muestra en solución.



Gráfica 8. Esabilidad de la muestra en solución sometida a cuatro condiciones:

Condición:

1. La muestra 1 a la 3 se mantuvieron en refrigeración sin protección a la luz.
2. La muestra 4 a la 6 se en refrigeración con protección a la luz.
3. Las muestras de la 7 a la 9 se mantuvieron a Temperatura ambiente sin protección a la luz.
4. Las muestras de la 10 a la 12 se mantuvieron a Temperatura ambiente con protección a la luz.

## ROBUSTEZ

INICIO	RECUPERADO	PROMEDIO	C.V
98.6544	98.3711	98.5127	0.2033
101.7190	99.5516	100.6353	1.5229
101.5464	99.8527	100.6996	1.1893

Tabla 12a. Cambio en la proporción de Acetonitrilo. Metanol y Buffer (51: 30: 19)

INICIO	RECUPERADO	PROMEDIO	C.V
98.6544	100.8499	99.7521	1.5563
101.7190	101.3453	101.5321	0.2603
101.5464	101.1046	101.3255	0.3083

Tabla 12b. Cambio en la proporción de Acetonitrilo: Metanol: Buffer (53: 27: 25)

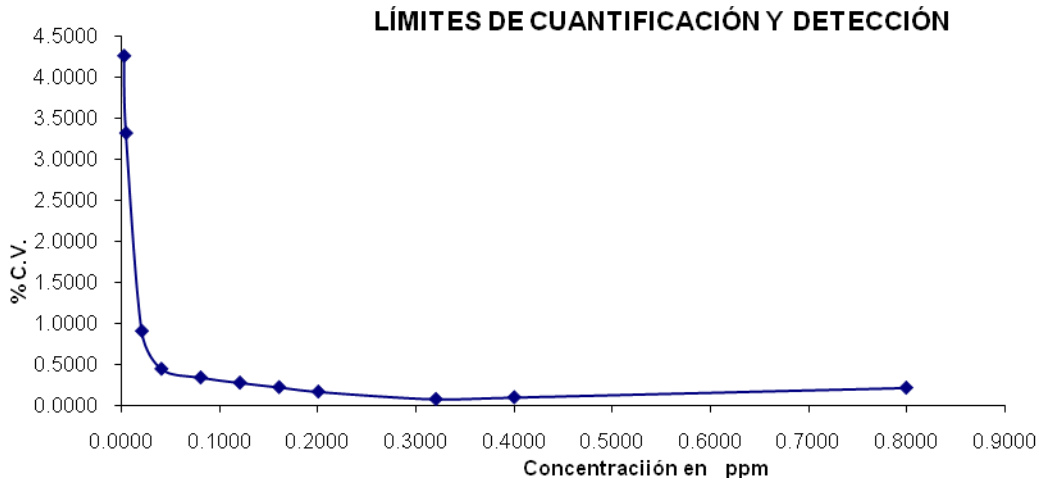
INICIO	RECUPERADO	PROMEDIO	C.V
98.6544	99.7167	99.1856	0.7573
101.7190	99.9253	100.8221	1.2580
101.5464	100.5891	101.0677	0.6698

Tabla 12c. Cambio en Columna C18 5µm 4.6 X 250 mm Dionex

## LIMITES DE CUANTIFICACION Y DETECCON

	Concentración	0.125 mg/mL			
	equivalente	100			
Muestra (%)	Concentración mg/mL	alícuota	volumen	ppm	C.V.
20.00	0.025000	5	25	25.0000	0.3999
10.00	0.012500	5	50	12.5000	0.6036
8.00	0.010000	2	25	10.0000	0.2240
5.00	0.006250	5	100	6.2500	0.3004
4.00	0.005000	4	100	5.0000	0.2328
3.00	0.003750	3	100	3.7500	0.3590
2.00	0.002500	2	100	2.5000	0.2950
1.00	0.001250	1	100	1.2500	0.8358
0.50	0.000625	5	1000	0.6250	1.2613 LC
0.10	0.000125	5	5000	0.1250	17.9290 LD

Tabla 13. Límites de Cuantificación y Detección.



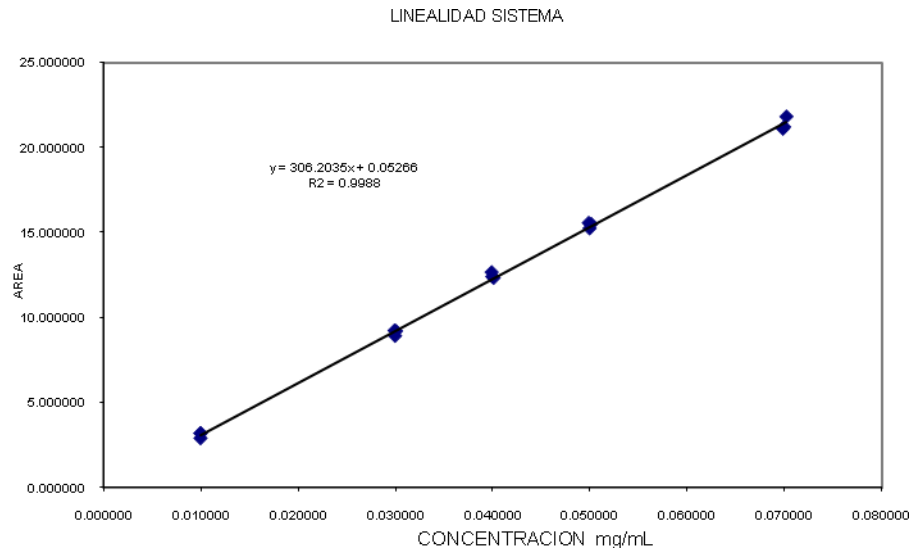
Gráfica 9. Representación de los límites de cuantificación y detección de la valoración.

### 8.3 Validación de pureza cromatográfica de itraconazol pellets y cápsulas

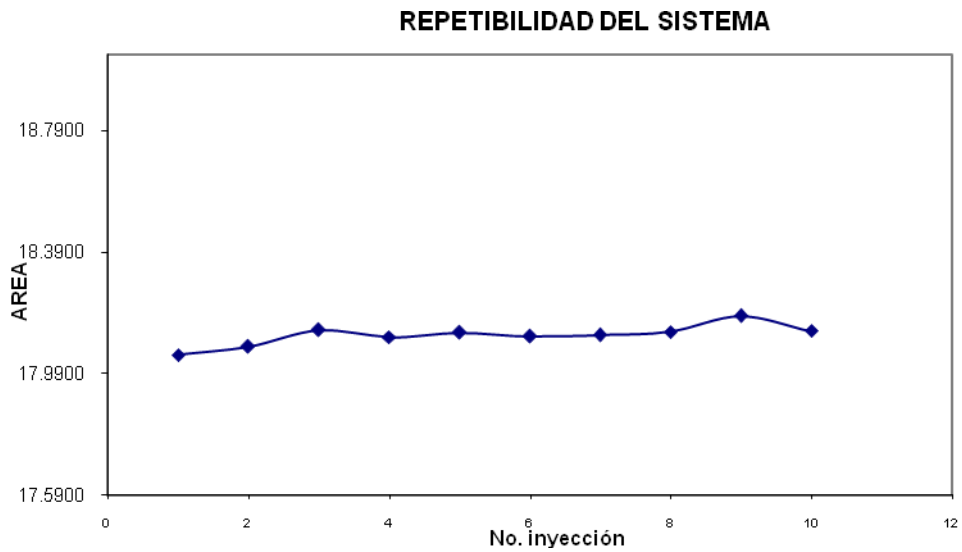
IMPUREZA	Tiempo de retención relativo ( $t_{RR}$ )
Impureza 1	0.52
Impureza 2	0.74
Impureza 3	0.81
Impureza 4	0.88
Impureza 5	1.05
Impureza 6	1.53
Impureza 7	1.57

Tabla 14. Tiempos de retención relativo de impurezas obtenidas de las degradaciones de la especificidad.

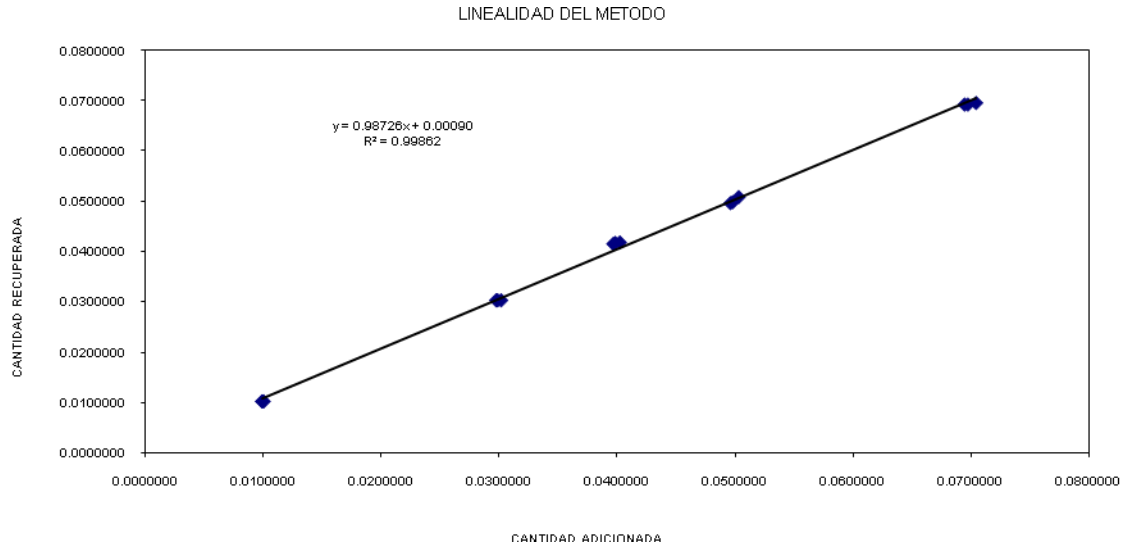
## LINEALIDAD DEL SISTEMA PUREZA CROMATOGRAFICA



Gráfica 10. Representación de la linealidad del sistema: concentración de itraconazol y el área bajo la curva.



Gráfica 11. Repetibilidad del sistema, dispersión del área bajo la curva obtenida de diez inyecciones.



Gráfica 12. Linealidad del Método, cantidad adicionada contra cantidad recuperada.

MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA	CANTIDAD RECUPERADA	% RECUPERADO
1	5.0113	5.1100	101.9699
2	5.0070	4.9600	99.0621
3	5.0070	5.0200	100.2604
4	5.0022	5.0600	101.1554
5	5.0083	5.0600	101.0331
6	5.0078	5.0300	100.4428
7	5.0026	5.0900	101.7463
8	4.9940	5.0700	101.5220
9	5.0091	5.0700	101.2153
10	4.9953	5.0200	100.4947
<b>PROMEDIO</b>	<b>5.0045</b>	<b>5.0490</b>	<b>100.8902</b>
<b>S</b>	<b>0.0059</b>	<b>0.0428</b>	<b>0.8557</b>
<b>C.V.</b>	<b>0.1170</b>	<b>0.8478</b>	<b>0.8481</b>

Tabla 15. Exactitud y Repetibilidad del método con placebo.

DIA	ANALISTA No1	ANALISTA No 2
UNO	99.0347	99.8047
	98.8571	98.6111
	98.0315	100.1996
<b>SUMA</b>	<b>295.9234</b>	<b>298.6154</b>
DOS	98.8212	99.8051
	100.4040	98.3936
	100.4040	100.1953
<b>SUMA</b>	<b>299.6293</b>	<b>298.3940</b>
<b>SUMA TOTAL</b>	<b>595.5527</b>	<b>597.0094</b>
<b>SUMA TOTAL</b>	<b>1192.5620</b>	
<b>PROMEDIO</b>	<b>99.3802</b>	
<b>C.V.</b>	<b>0.8518</b>	

Tabla 16. Precisión intermedia: análisis de dos días en dos diferentes días

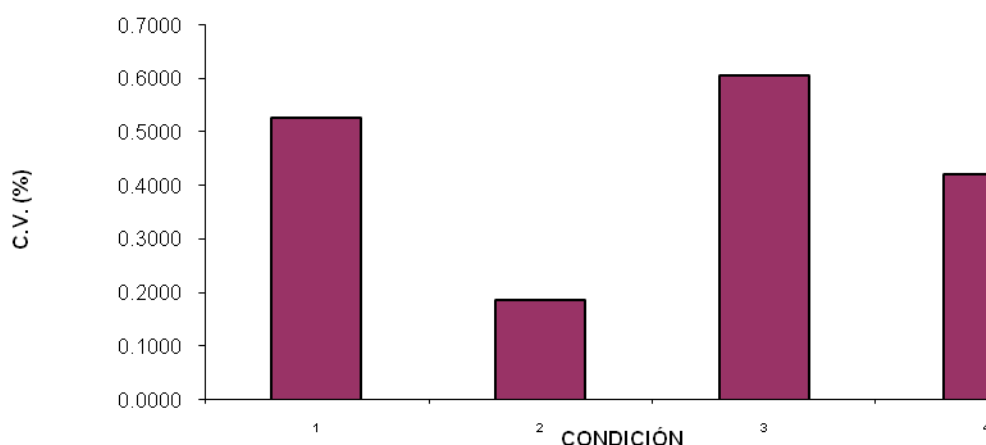
FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
ANALISTAS	1	0.176823	0.176823	0.1540	38.5100
DIAS	2	2.297136	1.148568	1.6989	6.0600
ERROR PURO	8	5.408384	0.676048		
<b>TOTAL</b>	<b>11</b>	<b>7.882343</b>			

Tabla 16a. Análisis de varianza calculados de la precisión intermedia.

Muestra	INICIO	Cantidad rec 2 días	PROMEDIO	C.V
1	5.1100	5.0600	5.0850	0.6953
2	4.9600	4.9300	4.9450	0.4290
3	5.0200	4.9600	4.9900	0.8502
4	5.0600	5.0500	5.0550	0.1399
5	5.0600	5.0500	5.0550	0.1399
6	5.0300	5.0100	5.0200	0.2817
7	5.0900	5.0400	5.0650	0.6980
8	5.0700	5.0300	5.0500	0.5601
9	5.0700	5.0300	5.0500	0.5601
10	5.0200	5.0600	5.0400	0.5612
11	4.9900	4.9800	4.9850	0.1418
12	5.0000	5.0400	5.0200	0.5634

Tabla 17. Estabilidad de la muestra en solución.

### ESTABILIDAD DE LA MUESTRA



Gráfica 13. Estabilidad de la muestra en solución sometida a cuatro condiciones:

La muestra 1 a la 3 se mantuvieron en refrigeración sin protección a la luz.

La muestra 4 a la 6 se en refrigeración con protección a la luz.

Las muestras de la 7 a la 9 se mantuvieron a Temperatura ambiente sin protección a la luz.

Las muestras de la 10 a la 12 se mantuvieron a Temperatura ambiente con protección a la luz.

INICIO	RECUPERADO	PROMEDIO	C.V
5.13	5.1000	5.1150	0.4147
5.19	5.1000	5.1450	1.2369
4.98	4.9100	4.9450	1.0010

Tabla 18. Cambio en la proporción de Acetonitrilo +5% de la proporción inicial.

INICIO	RECUPERADO	PROMEDIO	C.V
5.13	5.0200	5.0750	1.5326
5.19	5.0900	5.1400	1.3757
4.98	5.0100	4.9950	0.4247

Tabla 18a. Cambio en la columna C18 5 $\mu$ m 4.6 X 250 mm Dionex

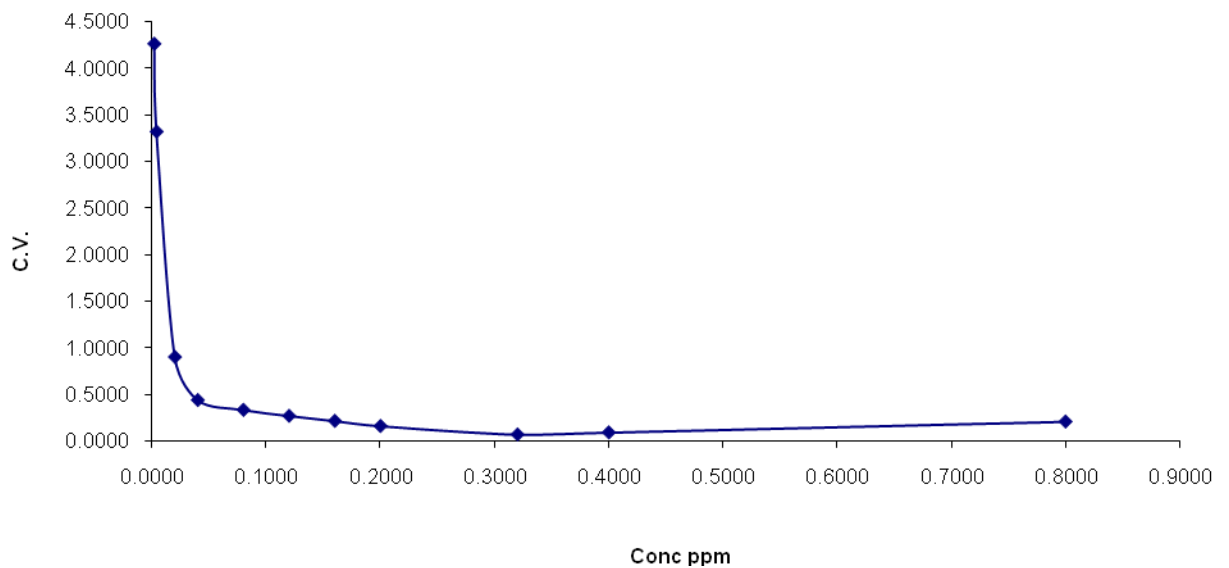


Muestra (%)	Concentración equivalente al 100%	0.05 mg/mL	volumen	ppm	C.V.
	Concentración (mg/mL)	alícuota			
20.00	0.010000	5	25	10.0000	0.3999
10.00	0.005000	5	50	5.0000	0.6036
8.00	0.004000	2	25	4.0000	0.2240
5.00	0.002500	5	100	2.5000	0.3004
4.00	0.002000	4	100	2.0000	0.2328
3.00	0.001500	3	100	1.5000	0.3590
2.00	0.001000	2	100	1.0000	0.2950
1.00	0.000500	1	100	0.5000	0.8358
0.50	0.000250	5	1000	0.2500	1.2613
0.10	0.000050	5	5000	0.0500	17.9290

LC  
LD

Tabla 19. Determinación del límite cuantificación y detección por medio de diluciones.

### LÍMITES DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN



Gráfica 14. Representación gráfica de los límites de cuantificación y detección.

## IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el desarrollo de la metodología analítica para evaluar el porcentaje disuelto del Itraconazol tanto pellets como cápsulas, el método es específico como se muestra en la figura 10 y 10a (Ver. Anexo I), no hay interferencia con el medio de disolución, ni con la matriz (excipientes del núcleo y cápsula), por lo que la respuesta obtenida a la longitud de onda solo se debe al fármaco.

En el gráfico 1 y figura 11 (Ver. Anexo I), se representa la linealidad del sistema que se realizó con concentraciones que van de 0.0220 a 0.1330 mg/mL, obteniendo un coeficiente de determinación de 0.9998, cumpliendo con la especificación de  $\geq 0.99$ , así como una pendiente mayor a cero y la ordenada que incluye al cero.

Simultáneamente a estos resultados, se realizó una prueba adicional: homoscedasticidad, como se observa en la siguiente tabla de ANAdeVA, donde la  $F_{cal} \text{ regresión} > F_{tab}$ ; es decir el sistema es estadísticamente lineal, lo cual indica que existe una proporcionalidad entre el área bajo la curva y la concentración.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
REGRESION	1	7.83112E+12	7.83112E+12	27109.32447	6.41
ERROR DE REGRESION	13	3755335920.86	288871993.9		
FALTA DE AJUSTE	3	5.24688E+14	1.74896E+14	-3.333357191	4.83
ERROR PURO	10	-5.24684E+14	-5.24684E+13		

Tabla 20. Análisis de ANAdeVA para linealidad del sistema.

En la gráfica 2, se representa la repetibilidad del sistema con un C.V. = 0.2653%, en la cual se observa que la dispersión obtenida de la respuesta por cada una de las inyecciones no es significativa, es decir, es menor del 2 %, por lo cual se determinó que el sistema es repetible.

En la gráfica 3, se observa la linealidad del método, esta se realizó con cinco niveles de concentración (0.022 a 0.133 mg/mL), se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9949, así como una pendiente de 0.9866 con IC de 0.9944-1.0288 y la ordenada al origen es de 0.0038 y un Intervalo de confianza -0.020 – 0.0075. Donde para la pendiente incluye al 1, y el IC de la ordenada al origen incluye al cero, por lo que el modelo es linealmente correcto para describir la relación entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

Para comprobar que la ecuación se ajusta a un modelo lineal, al igual que en la linealidad del sistema se realizó la prueba de homoscedasticidad, como se observa en la siguiente tabla de ANAdeVA donde la  $F_{cal}$  regresión >  $F_{tab}$ .

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
REGRESION	1	0.020854993	0.020854993	1676.995276	6.41
ERROR DE REGRESION	13	0.00016167	1.24359E-05		
FALTA DE AJUSTE	3	1.535117711	0.511705904	-3.333684412	4.83
ERROR PURO	10	-1.534956044	-0.153495604		

Tabla 21. Análisis de ANAdeVA para linealidad del método

Para determinar la exactitud del método, en la tabla 3, se observa que la determinación promedio fue de 100.3547 % obtenido de las 10 muestras preparadas a una concentración aproximada de 0.1112 mg/mL se encuentra en el rango del 98-102% y el intervalo de confianza (98.7685 -101.9408 %) incluye al 100%, por tanto el método es exacto.

A partir de los datos anteriores se calculó también el coeficiente de variación de 0.7316%, por lo tanto el método es repetible ya que la especificación describe que debe ser menor al 2%.

En las tablas 4 y 5 se observa que la  $F_{cal}$  día >  $F_{tab}$  y  $F_{cal}$  analista >  $F_{tab}$ , lo cual determina que estadísticamente no existe diferencia significativa entre los

resultados obtenidos por diferentes analista ni diferentes días, además que el coeficiente de variación obtenido para las 12 muestras analizadas es menor al 6% (C.V = 1.7552%), esto indica que el método es preciso.

El gráfico 4, se observa el coeficiente de variación obtenido a partir de las muestras iniciales y finales para cada una de las condiciones, determinando que para un C.V. mayor a 2% no se considera estable la muestra, por lo que en la tabla 6 se observa que las muestras no son estables durante 2 días a temperatura ambiente (con y sin protección a la luz), pero si son estables de 2 a 8°C sin importar si estén o no protegidas de la luz.

En la tabla 7a y figura 12 (Ver Anexo I) se observa que al modificar la proporción de fase móvil del Buffer (-5%) y manteniendo los demás parámetros fijos. En resultados no se observan diferencias significativas en comparación con los resultados iniciales. Solo se ve modificado el tiempo de retención de 2.8 min a 4.1 min del Itraconazol.

Por otro lado en las tablas 7 y figura 13 (Ver Anexo I) se modifico la proporción de fase móvil del Buffer (+5%) y manteniendo los demás parámetros fijos. En los resultados no se observa una diferencia significativa en comparación con los resultados iniciales con respecto a la respuesta obtenida por el itraconazol y solo se ve afectado su tiempo de retención de 2.8 min a 2.6 min.

En la tabla 7b y figura 14 (Ver Anexo I) se modifico la preparación del buffer quitando - 0.1mL de ácido fosfórico y manteniendo los demás parámetros fijos. En los resultados no se observa una diferencia significativa en comparación con los resultados iniciales con respecto a la respuesta obtenida por el itraconazol, es decir, solo se ve afectado el tiempo de retención de 2.8 min a 3.0 min.

En la tabla 7c y figura 15 (Ver Anexo I) se modifico la preparación del buffer quitando + 0.1mL de ácido fosfórico y manteniendo los demás parámetros fijos. En

los resultados no se observa una diferencia significativa en comparación con los resultados iniciales con respecto a la respuesta obtenida por el itraconazol, es decir, solo se ve afectado el tiempo de retención de 2.8 min a 2.8 min.

En la tabla 7d y figura 16 (Ver Anexo I) se modifico la columna Symmetry C18 de 4.6 x 250 mm por una Aclaim C18 de 4.6 x 250 mm Dionex manteniendo todos los demás parametros fijos. En los resultados no se observa una diferencia significativa en comparación con los resultados iniciales. Solo se ve modificado el tiempo de retención de 2.8 min a 4.7 min del Itraconazol.

En el desarrollo de la metodología analítica de valoración como se muestra en la figura 17, 17a y 22 (Ver Anexo II), nuestro método es específico, al no existir ninguna interferencia de la matriz, por lo tanto, la respuesta obtenida a esta longitud de onda se debe solamente al itraconazol.

El siguiente paso, fue detectar respuestas obtenidas por los productos de degradación del analito para lo cual se sometio a diferentes condiciones de estrés (Acido clorhídrico 0.1 N , hidróxido de sodio 0.1 N y peróxido de hidrogeno al 30 % en solución así como la exposición de las muestras temperatura de 40°C) verificando que el pico es espectralmente homogéneo y el método analítico es indicativo de estabilidad. Ver figuras de la 18 a 21a(Anexo II).

En la grafico 5 y fig. 23 se demuestra la linealidad del sistema que se realizó por triplicado y con cinco niveles de concentración (0.02 a 0.15 mg/mL), obteniendo un coeficiente de determinación 0.9998, reflejando el cumplimiento de la especificación de linealidad, así como una pendiente mayor a cero y la ordenada al origen que incluye al cero (-0.0831 a 0.4802).

Para comprobar que la ecuación se ajusta un modelo lineal también se realizó una prueba de homoscedasticidad como se observa en la siguiente tabla de ANAdeVA la  $F_{cal}$  regresión >  $F_{tab}$ ; es decir el sistema es estadísticamente lineal, lo cual indica que existe una proporcionalidad entre el área bajo la curva y concentración.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
REGRESION	1	1496.583488	1496.583488	16570.6569332	6.4100000
ERROR DE REGRESION	13	1.174099	0.090315		
FALTA DE AJUSTE	3	69986.663323	23328.887774	-3.3333893	4.8300000
ERROR PURO	10	-69985.489224	-6998.548922		

Tabla 22. Análisis de ANAdeVA de la linealidad del sistema para el método de valoración

En la gráfica 6 se representa la variabilidad obtenida de la repetibilidad del sistema con un  $c.v = 0.1042 \%$ , en la cual se observa que la dispersión obtenida por cada una de las inyecciones no representa ser significativa, es decir es menor del  $2 \%$ , por lo cual se determinó que el sistema es repetible.

En el gráfico 7 se observa la linealidad del método, esta se realizó por triplicado y con cinco niveles de concentración (0.02 a 0.15 mg/mL), se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9988, así como una pendiente de 1.0014 y la ordenada al origen es de 0.0007. Además el intervalo de confianza determinado para la pendiente incluye al 1, y el IC de la ordenada al origen incluye al cero, por lo que el modelo lineal es correcto para describir la relación entre la concentración del analito y el área bajo la curva obtenida.

Así mismo, para comprobar que la ecuación se ajusta a un modelo lineal, se realizó la prueba de homoscedasticidad y como se observa en la siguiente tabla de ANAdeVA la  $F_{cal}$  regresión >  $F_{tab}$ .

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F calculada	F de tablas
REGRESION	1	0.0325	0.0325	11067.7808	6.41E+00
ERROR DE REGRESION	13	0.0000	0.0000		
FALTA DE AJUSTE	3	0.0000	0.0000	0.0001	4.83E+00
ERROR PURO	10	-1.4704	-0.1470		

Tabla 23. Análisis de ANAdevA de la linealidad del método para valoración.

En la tabla 8 se observa que el promedio obtenido de las 10 muestras preparadas a una concentración aproximada de 0.125 mg/mL es de 100.3547% y el intervalo de confianza (97.1816 -102.0993 %) incluye al 100%, su coeficiente de variación es de 0.7326%, por lo tanto es exacto y repetible ya que es un valor menor a la especificación del 2% y los valores obtenidos están dentro del rango de 98 al 102%.

De las tablas 9 y 10 a partir de la cual se observa que la  $F_{cal} día > F_{tab}$  y  $F_{cal} analista > F_{tab}$ , lo cual determina que estadísticamente, no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por diferentes analista ni diferentes días, además que el coeficiente de variación obtenido para las 12 muestras analizadas es menor al 2% (C.V = 1.7991), esto indica que el método es preciso.

En el grafico 8 y tabla 11 se determinó la estabilidad de las muestras en las cuatro condiciones descritas; una vez obtenido el coeficiente de variación entre las muestras iniciales y finales para cada condición se obtuvo un valor menor a la especificación (C.V < 2%), lo cual indica que las muestras son estables en solución durante 2 días con y sin protección de la luz.

En la tabla 12a y fig. 24 se observa que al modificar la proporción de fase móvil de Acetonitrilo (-4%), Metanol (+3%) y Buffer (+1%) manteniendo todos los demás parametros fijos. En los resultados no se observan diferencias significativas

en comparación con los resultados iniciales. Solo se ve modificado el tiempo de retención del Itraconazol que va de 5.4 min a 5.3 min.

Por otro lado en la tabla 12b y fig. 25, se modificó la proporción de fase móvil de Acetonitrilo (-2%) y Buffer (+7%) manteniendo todos los demás parámetros fijos. En los resultados no se observa una diferencia significativa en comparación con los resultados iniciales con respecto a la respuesta obtenida por el itraconazol, pero el miconazol presenta deformación del pico, por lo que este cambio no permite la correcta simetría del miconazol.

En la tabla 12c y fig. 26 se modificó la columna Symmetry C18 de 4.6 x 250 mm por una Aclaim C18 de 4.6 x 250 mm Dionex manteniendo todos los demás parámetros fijos. En los resultados no se observa una diferencia significativa en comparación con los resultados iniciales. Solo se ve modificado el tiempo de retención del Itraconazol.

El límite de cuantificación se realizó a partir de diluciones que van del 100% al 0.1%; el límite de cuantificación obtenido fue de 0.635 ppm y su validez se ve reflejada a través de su coeficiente de variación que es menor al 2%, mientras que el límite de detección 0.125 ppm, se realizó de manera visual comparando la respuesta más baja con el diluyente. Ver gráfico 9 y figura 27 (Anexo II).

Aún cuando la metodología analítica de valoración demuestra ser indicativo de estabilidad, las especificaciones actuales requieren un método que además permita la detección y cuantificación de los productos de degradación presentes en la formulación de itraconazol, para ello el paso final del proyecto fue desarrollar una metodología para determinar la pureza cromatográfica de itraconazol. Para determinar las impurezas presentes se sometieron muestras en condiciones extremas de degradación (ver figura 30 a 33a Anexo III), comparando con las condiciones normales (ver figura 28 Anexo III) se obtuvieron 6 impurezas



identificadas por el tiempo relativo de retención (ver tabla 13), demostrando así que este método es indicativo de estabilidad, específico y los picos obtenidos son espectralmente homogéneos.

En la grafico 10 y figura 34 se demuestra la linealidad del sistema que se realizó por triplicado y con cinco niveles de concentración (0.01 a 0.07 mg/mL), obteniendo un coeficiente de determinación 0.9988, reflejando el cumplimiento de la especificación de linealidad, así como una pendiente mayor a cero y la ordenada al origen que incluye al cero (-0.2272 a 0.3328).

Para comprobar que la ecuación se ajusta un modelo lineal como en los dos casos anteriores realizó una prueba de homoscedasticidad como se observa en la siguiente tabla de ANAdeVA la  $F_{cal} \text{ regresión} > F_{tab}$ ; lo cual indica que existe una proporcionalidad entre el área bajo la curva y concentración.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
REGRESION	1	561.937342	561.937342	11160.8091599	6.4100000
ERROR DE REGRESION	13	0.654539	0.050349		
FALTA DE AJUSTE	3	31196.947324	10398.982441	-3.3334033	4.8300000
ERROR PURO	10	-31196.292785	-3119.629278		

Tabla 24. Análisis de ANAdeVA de la linealidad del sistema para el método de pureza cromatográfica

En la gráfica 10 se representa la la repetibilidad del sistema con un c.v = 0.1861 %, en la cual se observa que la dispersión obtenida por cada una de las

inyecciones comprobando que el sistema es repetible cumpliendo con la especificación de menor al 2%.

En el grafico 11 se observa la linealidad del método, esta se realizó por triplicado con los mismos niveles de concentración de la linealidad del sistema, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9986, así como una pendiente de  $0.9872 \pm 0.022$  y la ordenada al origen es de  $0.0009 \pm 0.001$ . Por lo que se determina que el modelo lineal es correcto para describir la relación entre la concentración del analíto y el área bajo la curva obtenida.

Así mismo, para comprobar que la ecuación se ajusta a un modelo lineal, se realizó la prueba de homoscedasticidad y como se observa en la siguiente tabla de ANAdeVA la  $F_{cal}$  regresión >  $F_{tab}$ .

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
REGRESION	1	5.825675E-03	5.825675E-03	9402.387796	6.410000
ERROR DE REGRESION	13	8.054738E-06	6.195952E-07		
FALTA DE AJUSTE	3	3.355987E-01	1.118662E-01	-3.333413	4.830000
ERROR PURO	10	-3.355906E-01	-3.355906E-02		

Tabla 25. Análisis de ANAdevA de la linealidad del método para pureza cromatográfica.

En la tabla 15 se observa que el promedio obtenido de las 10 muestras preparadas a una concentración aproximada de 0.05 mg/mL es de 100.8962%, su coeficiente de variación es de 8481%, por lo tanto es exacto y repetible ya que es un valor menor a la especificación del 2% y los valores obtenidos están dentro del rango de 98 al 102%.

De las tablas 16 y 16a a partir de la cual se observa que la  $F_{cal}$  día  $>F_{tab}$  y  $F_{cal}$  analista  $>F_{tab}$ , lo cual determina que estadísticamente, no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por diferentes analista ni diferentes días, además que el coeficiente de variación obtenido para las 12 muestras analizadas es menor al 2% (C.V = 8518), esto indica que el método es preciso.

En el grafico 13 y tabla 17 se determinó la estabilidad de las muestras en las cuatro condiciones descritas; una vez obtenido el coeficiente de variación entre las muestras iniciales y finales para cada condición se obtuvo un valor menor a la especificación (C.V < 2%), lo cual indica que las muestras son estables en solución durante 2 días con y sin protección de la luz.

En la tabla 12a y fig. 24 se observa que al modificar la proporción de fase móvil de Acetonitrilo (-4%), Metanol (+3%) y Buffer (+1%) manteniendo todos los demás parametros fijos. En los resultados no se observan diferencias significativas en comparación con los resultados iniciales. Solo se ve modificado el tiempo de retención del Itraconazol que va de 5.4 min a 5.3 min.

Para determinar la robustez como se observan en la en tabla 18 y fig. 49, se modificó la proporción de fase móvil de Acetonitrilo (+5%), así como en la tabla 18 b y figura 50 cambio en la columna manteniendo todos los demás parametros fijos, no se observa una diferencia significativa en comparación con los resultados iniciales con respecto a la respuesta obtenida por el itraconazol solo se observa modificación en el tiempo de retención de analito.

Por último se determinó el límite de cuantificación se realizó a partir de diluciones que van del 100% al 0.1%; el límite de cuantificación obtenido fue de 0.25 ppm y su validez se ve reflejada a través de su coeficiente de variación que es menor al 2%, mientras que el límite de detección 0.05 ppm, se realizó de manera visual comparando la respuesta más baja con el diluyente. Ver gráfica 14 y figura 51.

## X. CONCLUSIONES

A través de condiciones ácidas se logró la extracción de itraconazol, desarrollo una metodología analítica es específica (indicativa de estabilidad para la valoración y pureza cromatográfica), exacta, precisa, reproducible para las determinaciones de disolución, valoración y pureza cromatografía, comprobado a través de un estudio estadístico inferencial. Por lo tanto se concluye que cada uno de los procedimientos analíticos cumplen con los parámetros necesarios para que esos puedan ser utilizados en el análisis rutinario de itraconazol pellets: en materia prima, producto en proceso, terminado así como en estabilidades, ya que hasta el momento no existe una referencia oficial para estos productos.

## XI. REFERENCIAS

1. Swabrik, J. 2002. Pelletization Techniques. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Vol 3. 2a ed. Marcel Dekker. New York. 2067-20802.
2. Palma, S. Allenandi, D. 2004. Sistemas de Liberación Pulsatil de Fármacos. Farmacotécnica. Volumen 3. No.15, pág: 16-21. 2004.
3. Index Merck. 14<sup>a</sup>. Edición. Merck KGaA. Pág. 5247.
4. Remington, G. A. 1993. Farmacia, Vol. 2, 19 ed., Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, pág: 946-949.
5. Korolkovas A. 1998. Essential of Medicinal Chemistry, A Willey-Interscience Publication. New York, pág: 338-345.
6. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas PLM, 51<sup>a</sup> .ed, Colombia; 2005: 1856-1857, 3026-3027.
7. Food and Drug Administration. (1995) Guideline for Industry Text on Validation of Analytical Procedures ICH Q2A. A1-A3.
8. Pharmacopoeia Convention, Inc. United States Pharmacopoeia 29/ National formulary 24. Rockeville, MD: U.S Pharmacopeia Convention, Inc. 2007. VERSIÓN EN ESPAÑOL: 2872-2883.
9. CIPAM. Comisión Interinstitucional de buenas practicas de fabricación. Guía de validación de métodos analíticos limpieza de equipos. Monografía técnica No. 22, México D.F. 2004. pp. 33-53.
10. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México. 2008. pp. 367-379.
11. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos. Guía de validación de métodos analíticos. México. 2000. pp. 8-40; 57-91.
12. Rousessac, F., Rousessac, A. (2003). Métodos y técnicas instrumentales modernas. Mc Graw Hill, Madrid España; 5-17.
13. Duhamel. Clinical Atlas of Respiratory Diseases. Bronchoscopy, Radiology and Pathology. 2004. Elsevier. 213 pág.

14. Cordoba, E., Gayozo. M, López, R., Buzón, E., López, R. Salud Pública de México. Frecuencia de Micosis en Pacientes inmunosuprimidos en hospitales. Vol.45. 2003. Instituto Nacional de Salud Pública. 444-460 págs.
15. Fica, A. Revista Chilena de Infecciones. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. 2004. 21(1): 26-38.
16. Valeska C.A Martinello y Cristina H.R. Serra. Latin American Journal of Pharmacy. Estudio de Disolución del contenido de Cápsulas de Itraconazol. 2008.27 (1): 93-99.
17. European DMF; Applicant's Part. Nosch Labs Private Limited. India
18. Laniado-Laborín R. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. Coccidioimicosis. Más que una enfermedad regional. 2004; 19 (4): 301-308.
19. Guanhao Ye, Siling Wang, Paul Wan SiaHeng, Ling Chen, Chao Wang. International Journal of Pharmaceutics. Development and optimization of solid dispersion containing pellets of itraconazole prepared by high shear pelletization. 2007. 337:80-87.
20. Fica. Alberto. Rev. ChilInfect. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. 2004; 21 (1): 26-38
21. Burgess Christopher. Valid Analytical Methods and Procedures. Royal Society Chemistry Cambridge. 2000. 37-39.
22. Torres de Yon Stella. Introducción a la Cromatografía. Ed. Universitaria Nacional. Bogota; 1994. pp 134.
23. Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release solid oral dosage form. U.S. Department of Health on Human Service FDA. August 1997. 2-6
24. Impurities in New Veterinary Drug Substance (Revision). FDA Center for Veterinary Medicine. November, 2007. 1-11.
25. Guidance for Industry Q3A Impurities in New Drugs Substances. 2008. 1-13.
26. Q1A. Stability Testing of New Drugs Substance on Proceeded. Nov. 2003.

27. Q4B Evaluation and Recommendations of Pharmaceutical Pharmacopeia Text for use ICH Regions. Nov. 2003
28. Anex 6. Uniformity of Dosage Unit. General Chapter FDA. Nov. 2008. 2
29. Anex 7. Dissolution Test. Apr. 2010.
30. United States Pharmacopeia (USP): <711> Dissolution as presented in Pharmacopeia Forum, Volume 35(3), May/June 2009, to be official in USP 33, May 2010.
31. United States Pharmacopeia (USP): 213 <905> Uniformity of Dosage Units, Pharmacopeia Forum, Volume 34, 214 Number 5, to be official December 2009.
32. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Primer suplemento Secretaría de Salud, Ciudad de México, México. 2008. pp. 2482.
33. Gamal H El Maghanby; Abdullah M. Alomran. Synorgastic Enhancement of Itraconazol Dissolution by Ternary System Formation with Pluronic F68 an Hydroxy propyl methy cellulose. Scientia Pharmaceutical. 2009: 401-417.
34. SDCES-I208. Desarrollo y Validación de Métodos. Versión 1. Vigencia 2011. Laboratorios PiSA Farmacéutica.

## ANEXO I

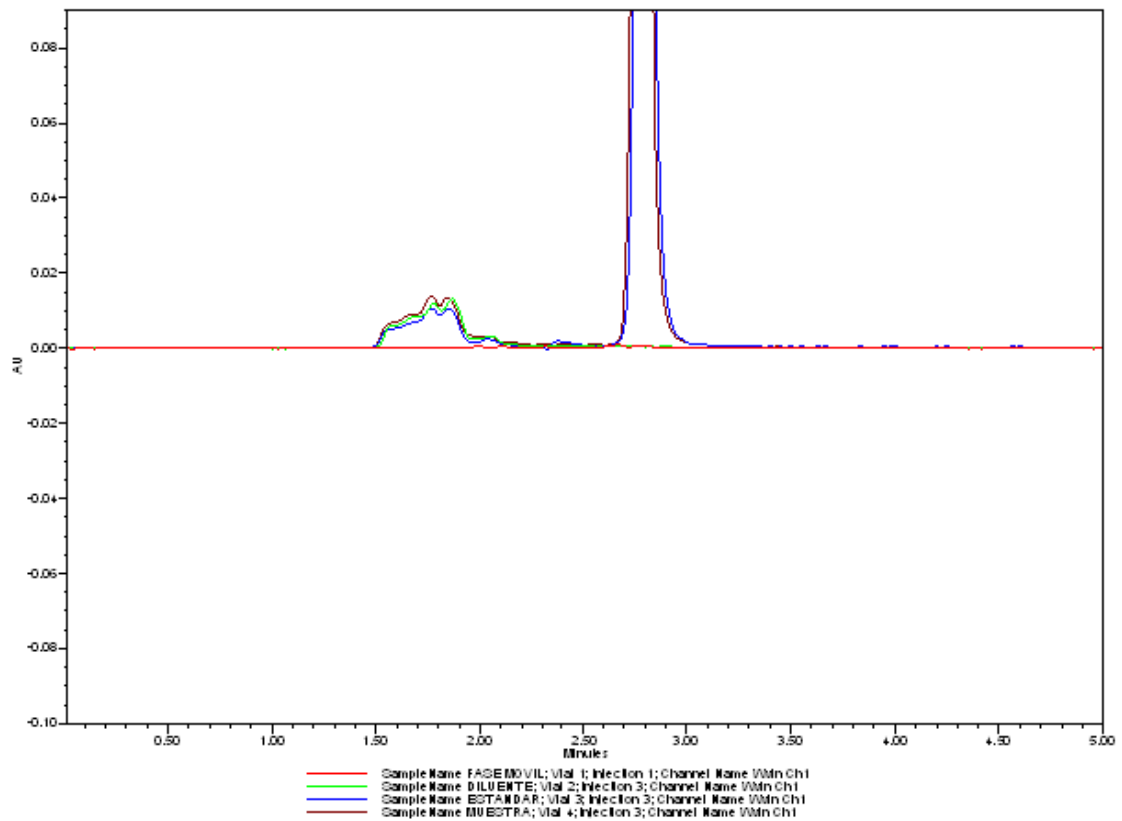


Figura 10. Especificidad de la prueba del método de disolución.



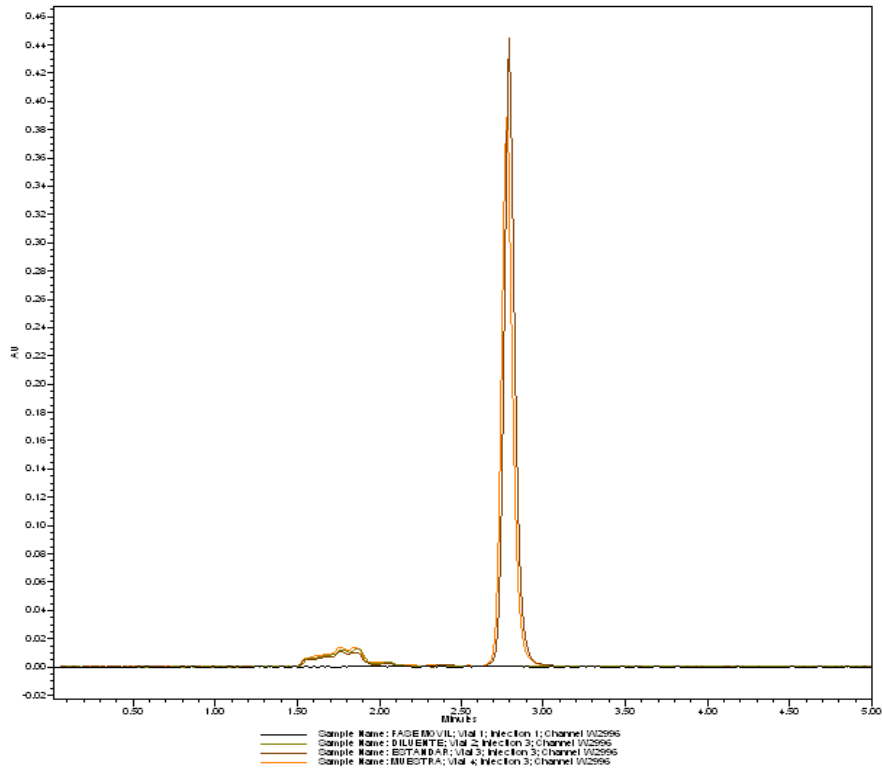


Figura 10a. Especificidad de la prueba del método de disolución.

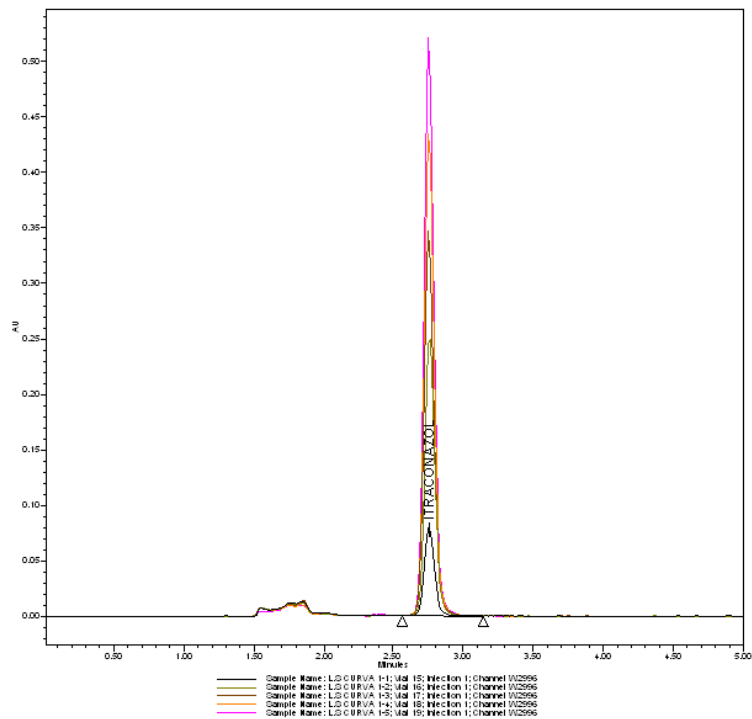


Figura 11. Linealidad del sistema del método de disolución

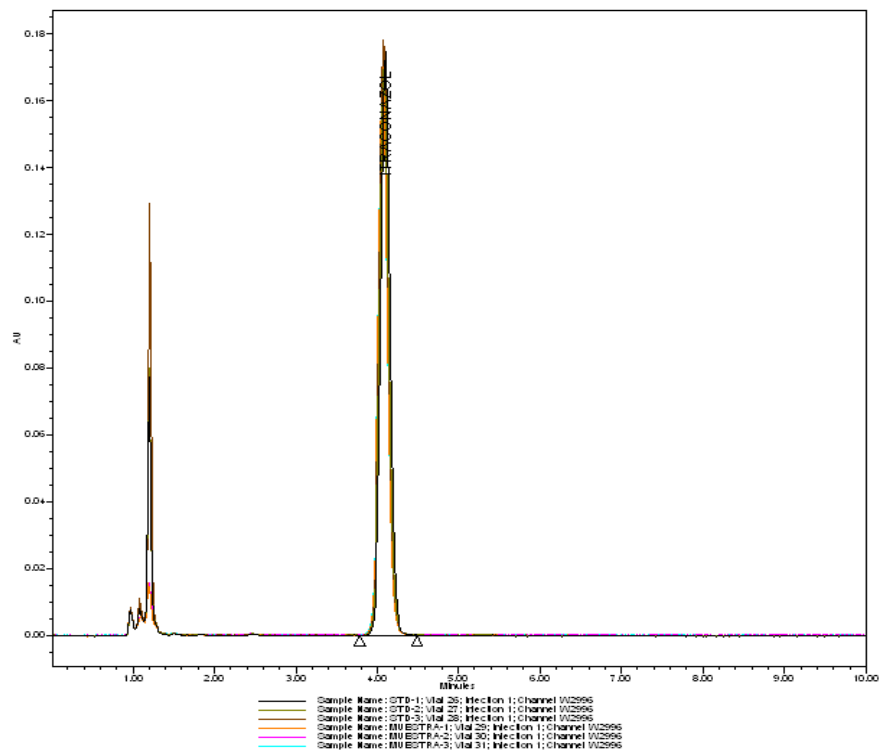


Figura 12. Robustez del método de disolución modificando - 5% de Buffer

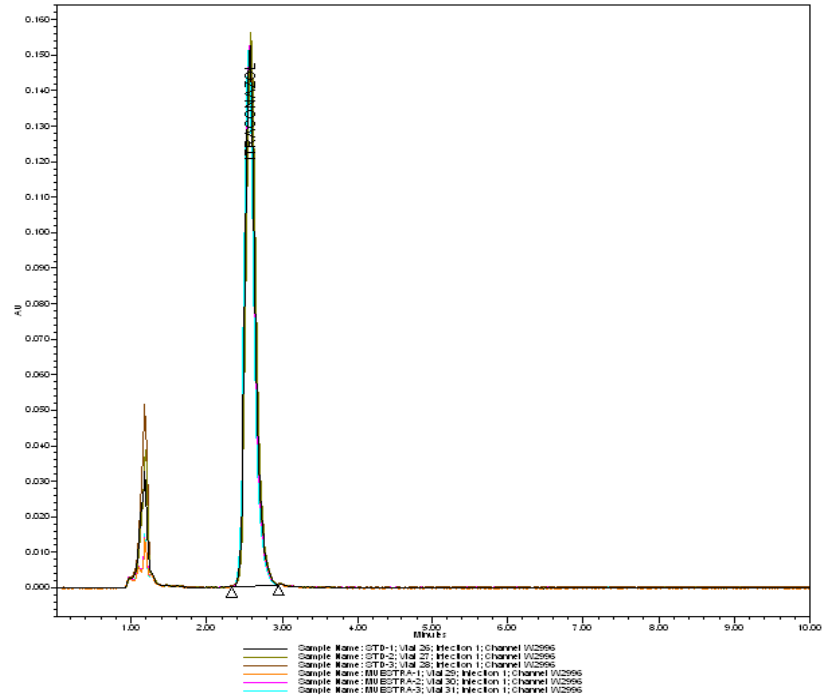


Figura 13. Robustez del método de disolución modificando + 5% de Buffer.

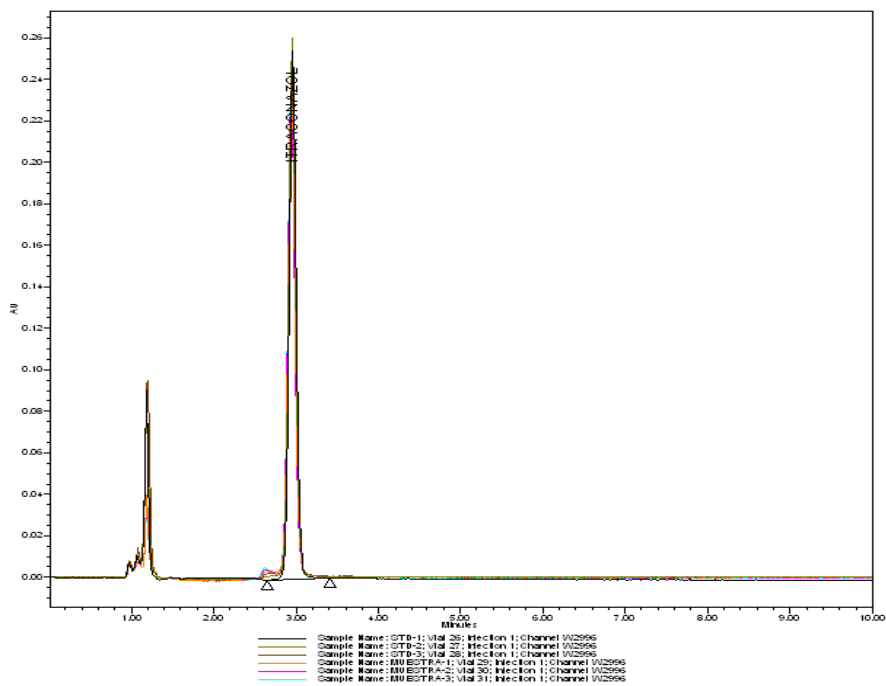


Figura 14. Robustez del método de disolución modificando - 0.1 en la adición de Ácido Fosfórico en la preparación del Buffer.

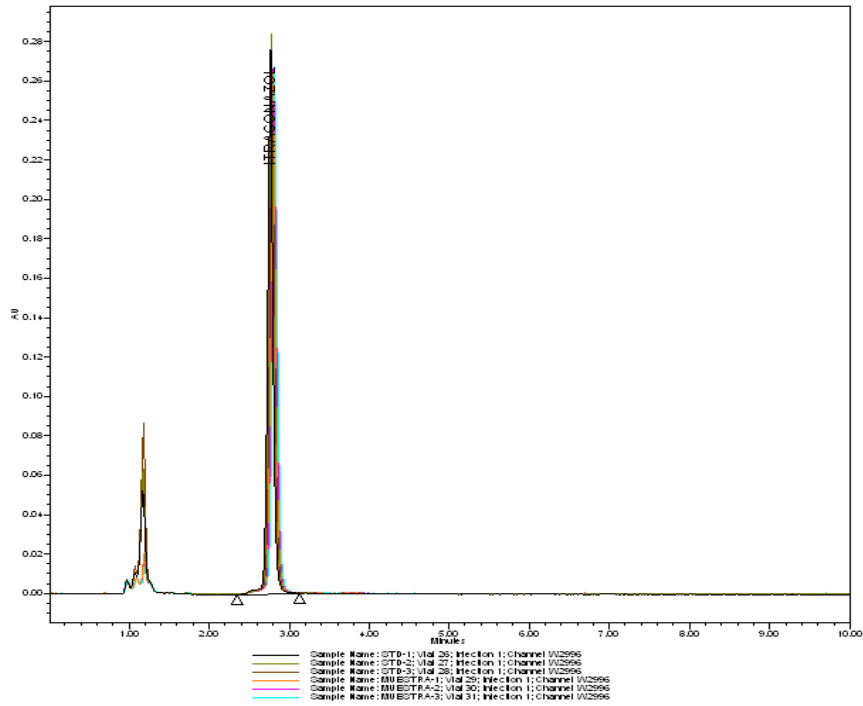


Figura 15. Robustez del método de disolución modificando + 0.1 en la adición de Ácido Fosfórico en la preparación del Buffer.

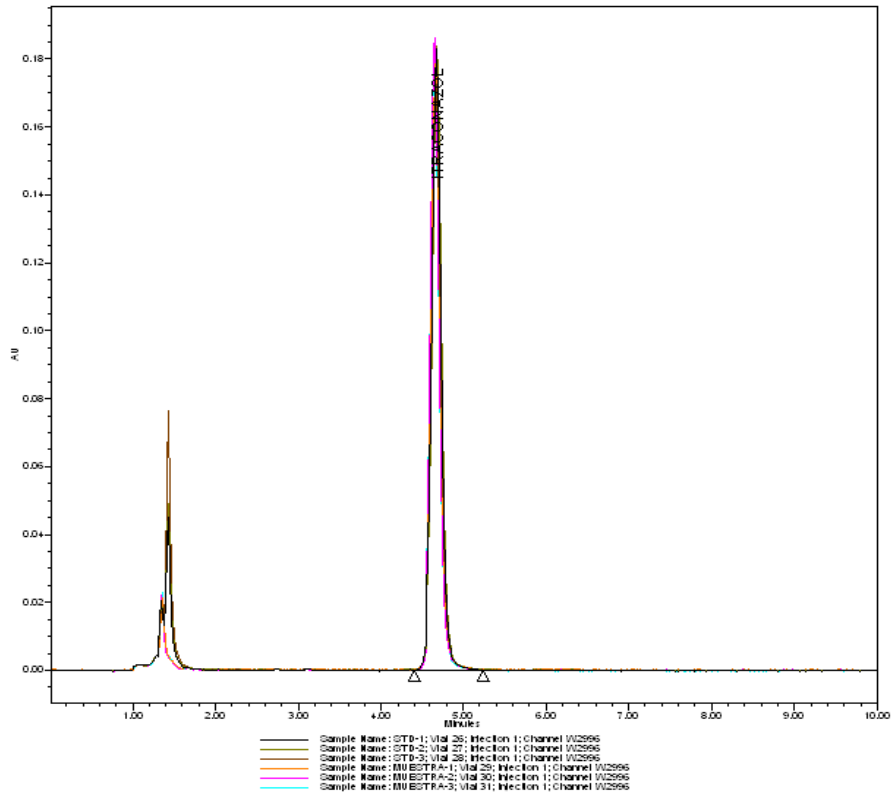


Figura 16. Robustez del método de disolución cambiando la columna analítica una Symmetry C18 de 4.6 x 250 mm por una Aclaim C18 de 4.6 x 250 mm Dionex.

## ANEXO II.

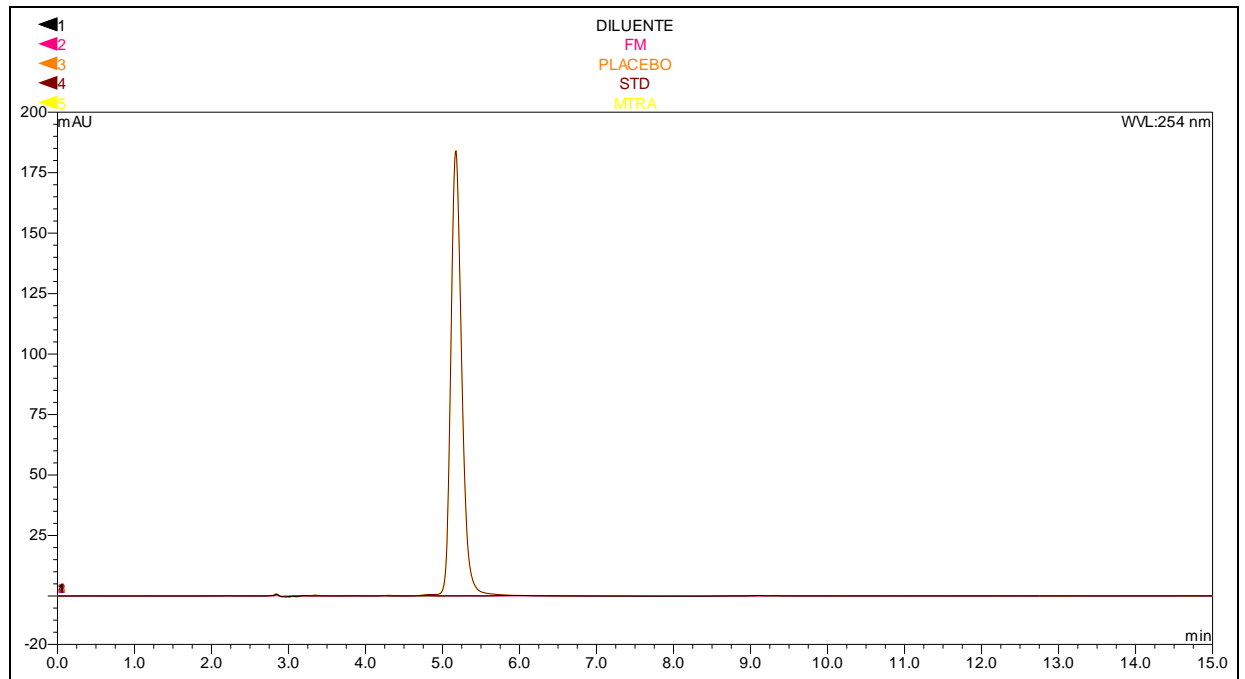


Figura 17. Especificidad del método de valoración.

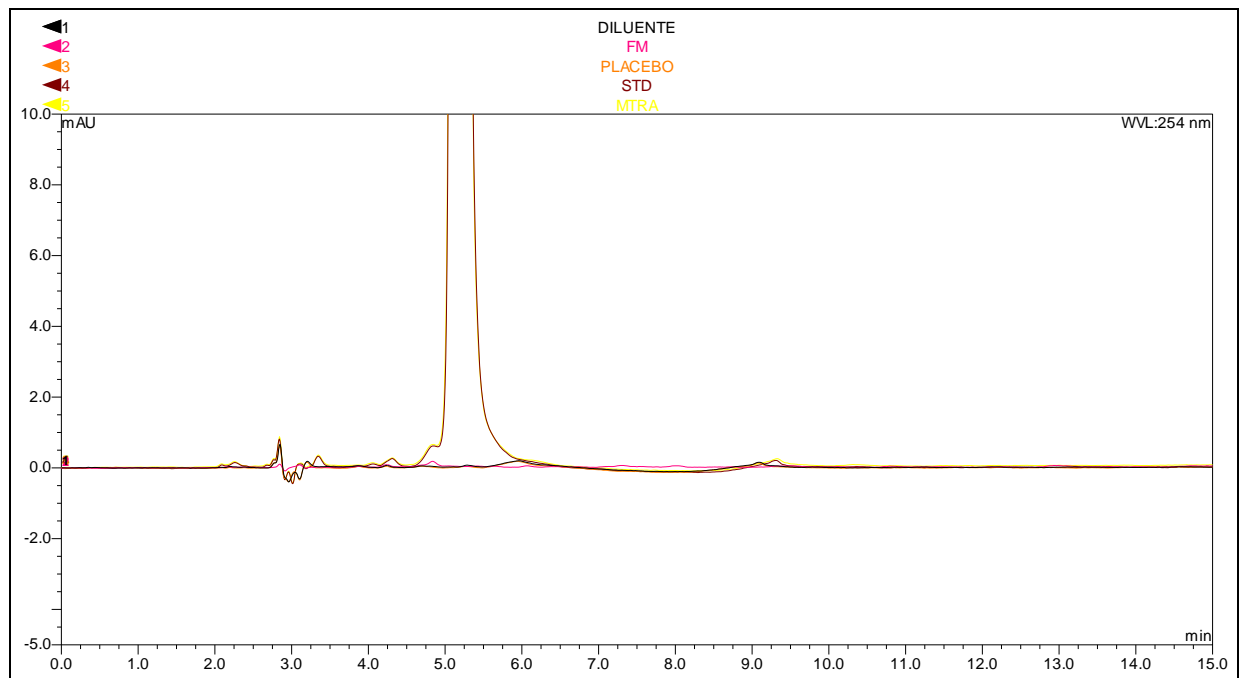


Figura 17a. Especificidad del método de valoración.

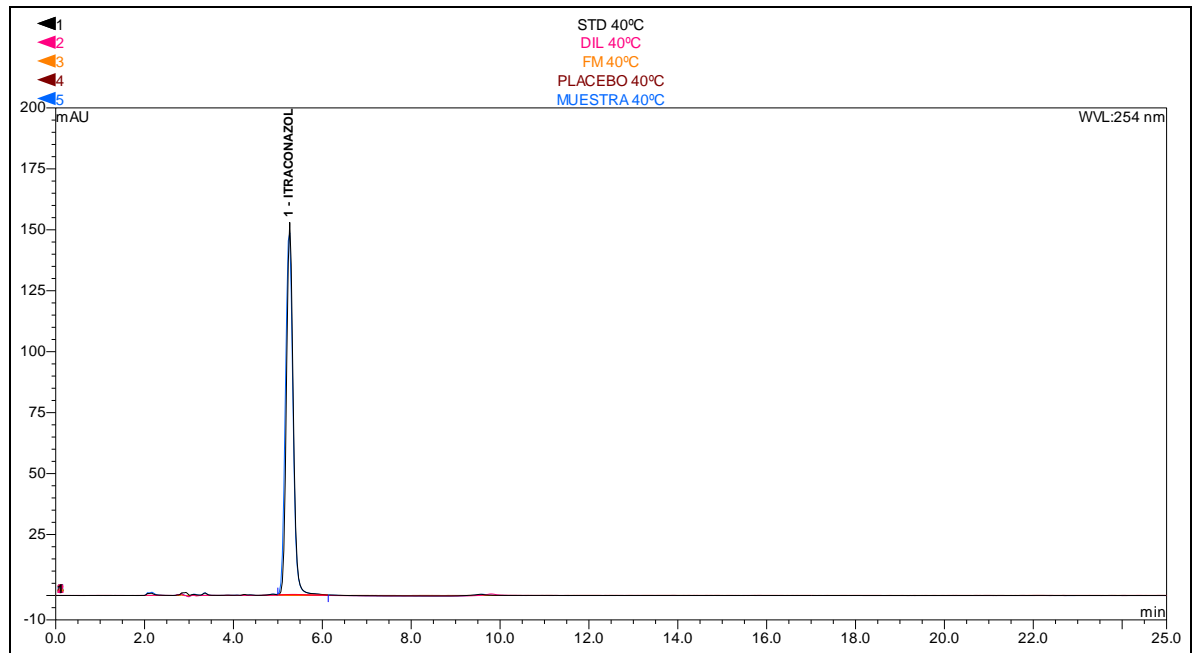


Figura 18. Especificidad del método de valoración. Degradación a 40°C

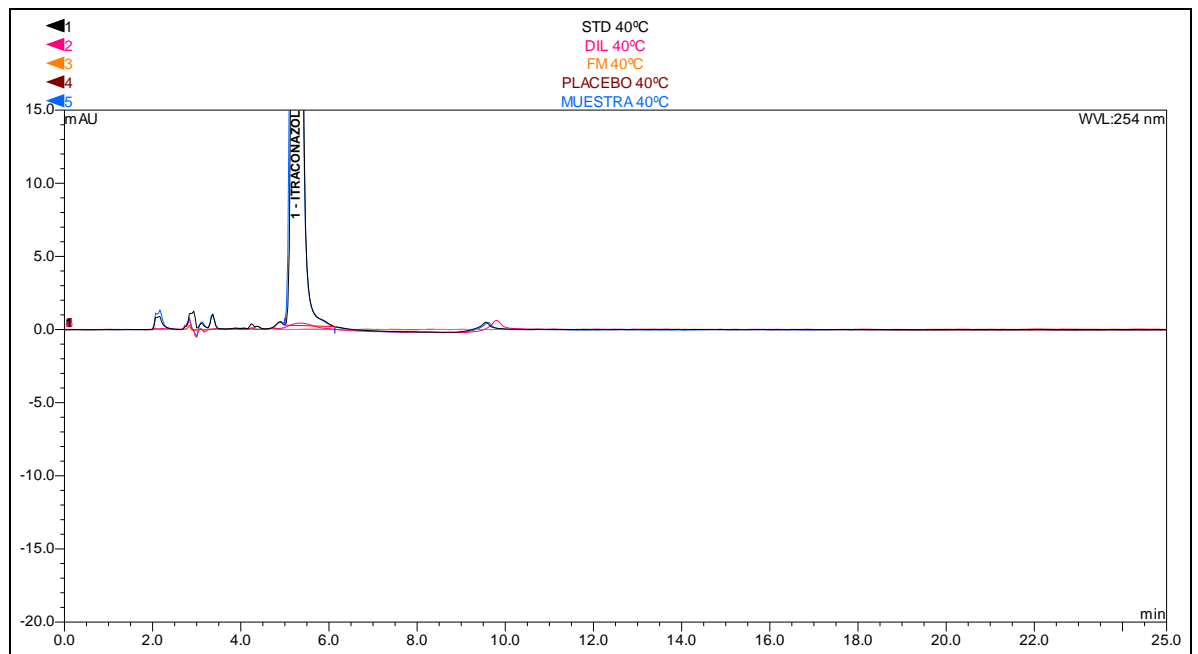


Figura 18a. Especificidad del método de valoración. Degradación a 40°C

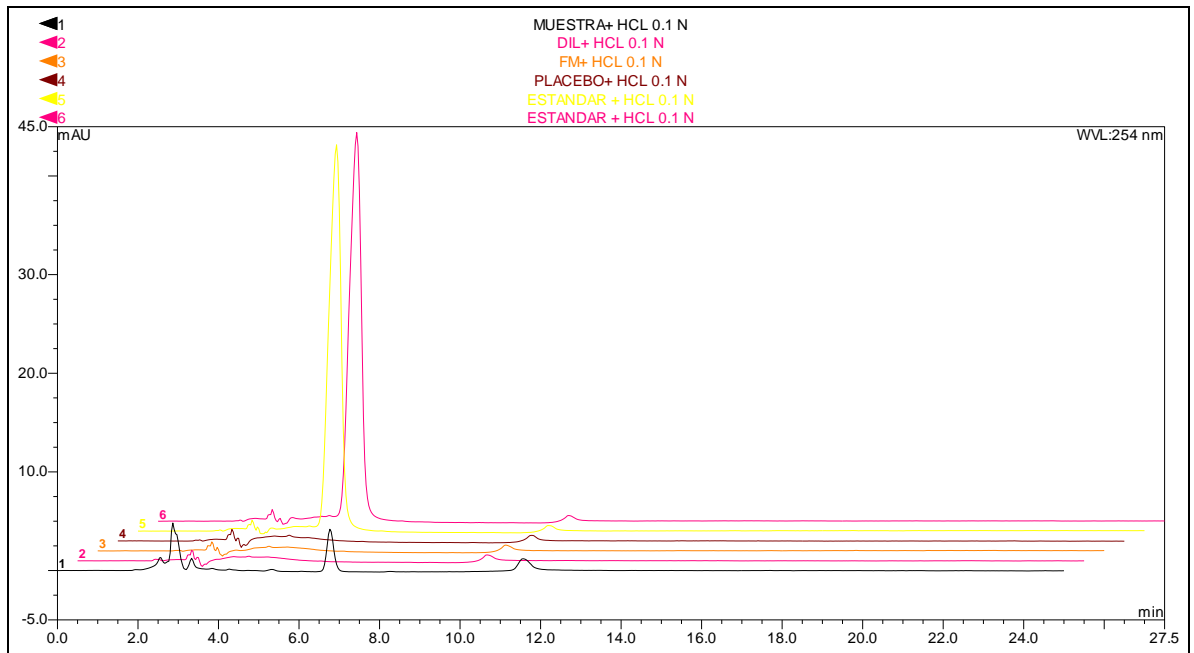


Figura 19. Especificidad del método de valoración. Degradación con HCl 0.1 N

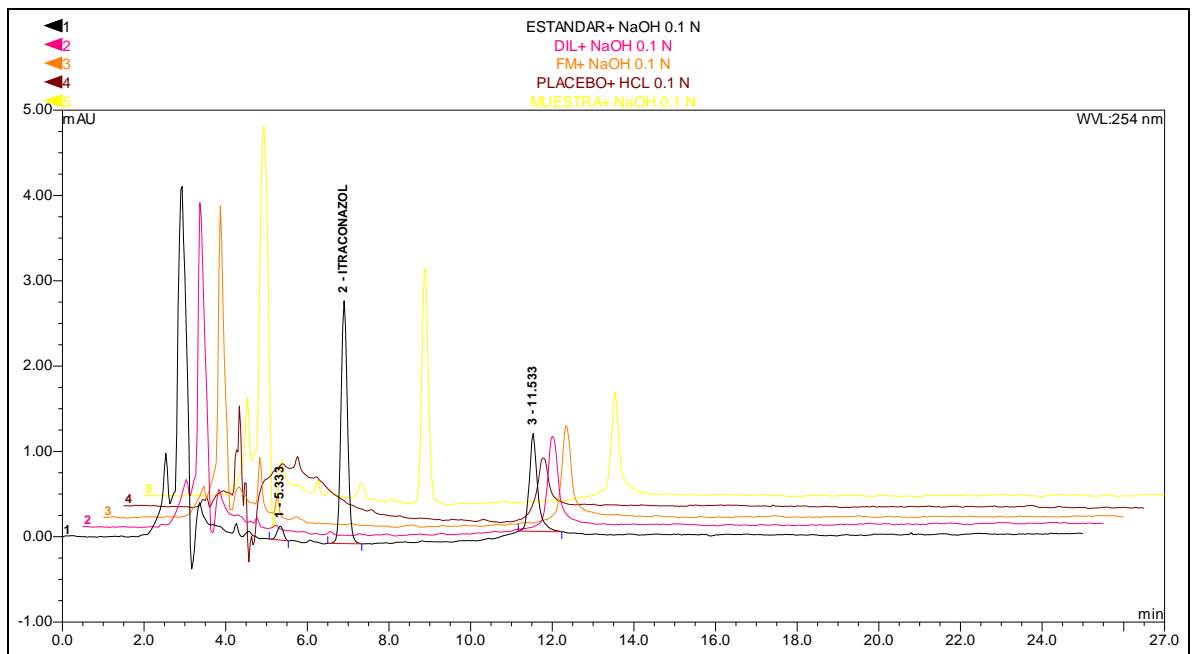


Figura 20. Especificidad del método de valoración. Degradación con NaOH 0.1 N.



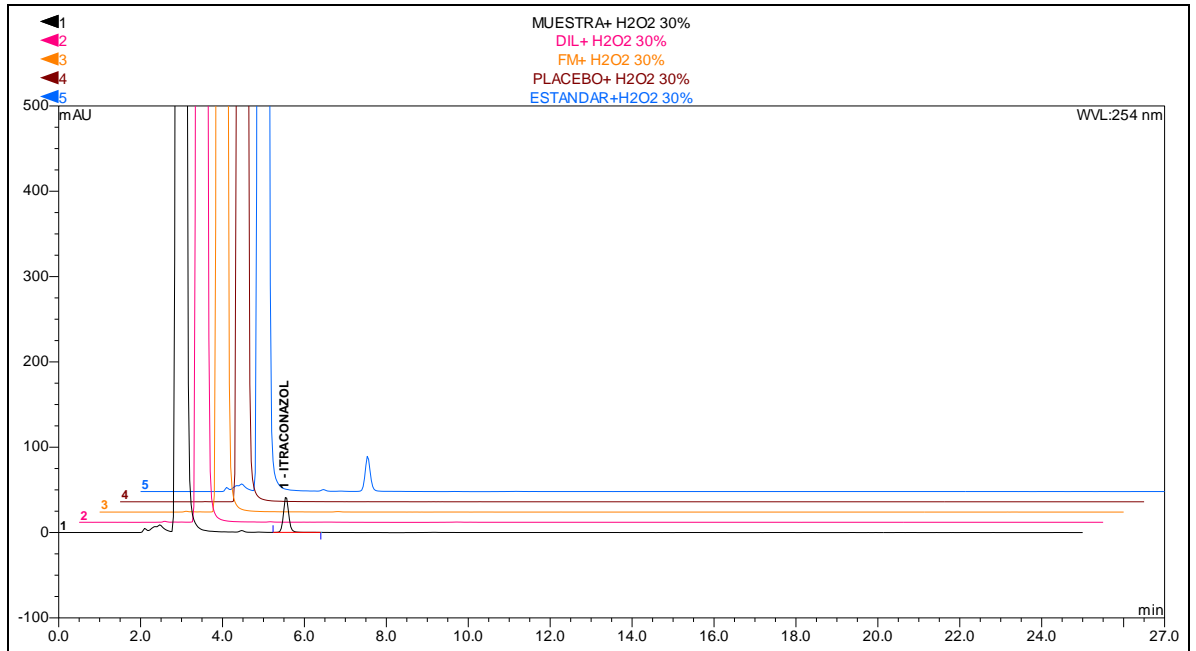


Figura 21. Especificidad del método de valoración. Degradación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%

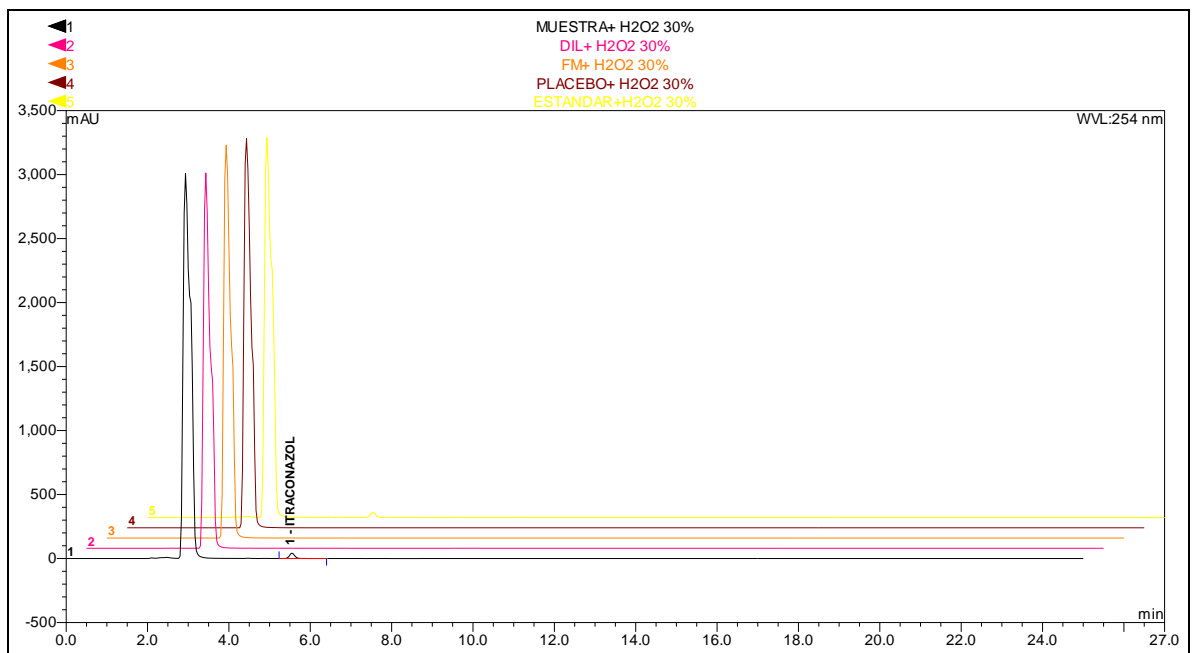


Figura 21a. Especificidad del método de valoración. Degradación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%

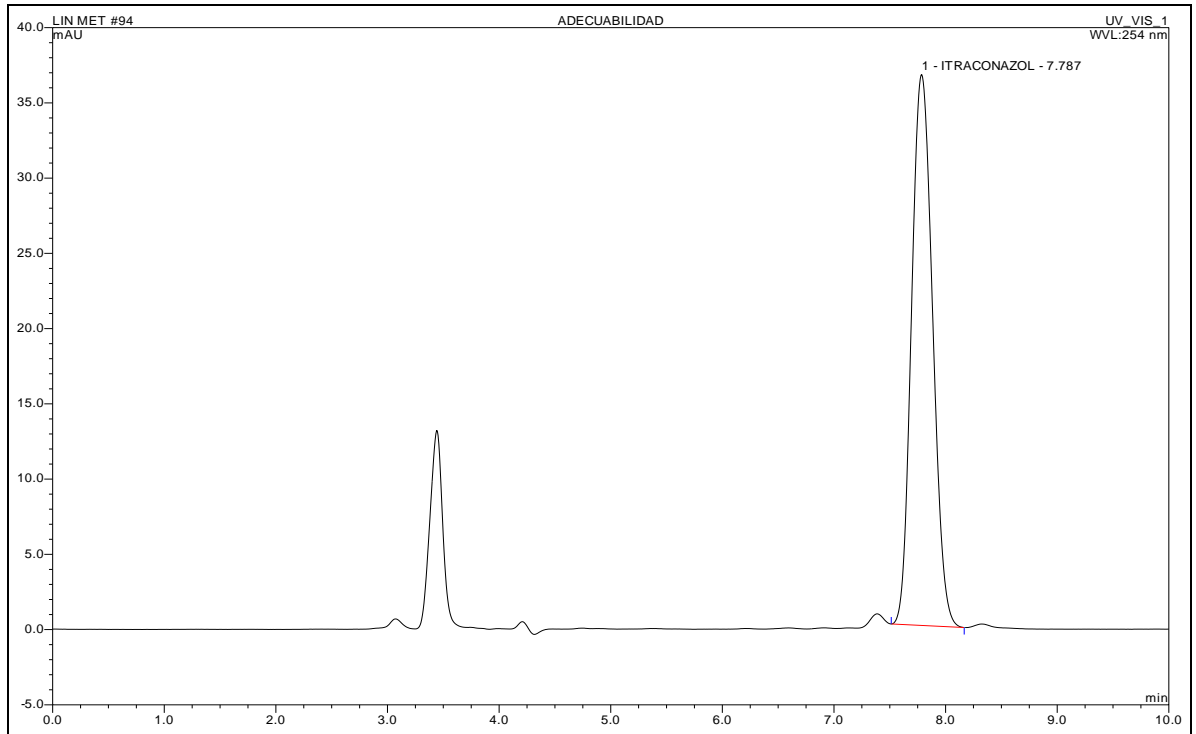


Figura 22. Adecuabilidad del sistema del método de valoración.

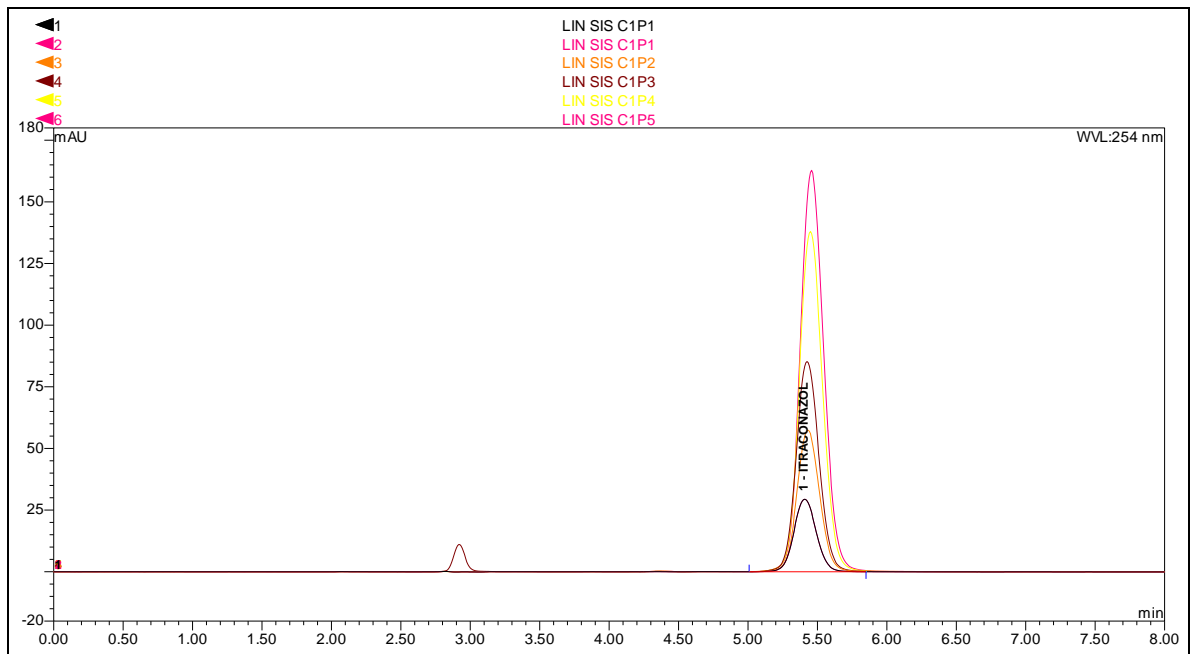


Figura 23. Linealidad del sistema del método de valoración.

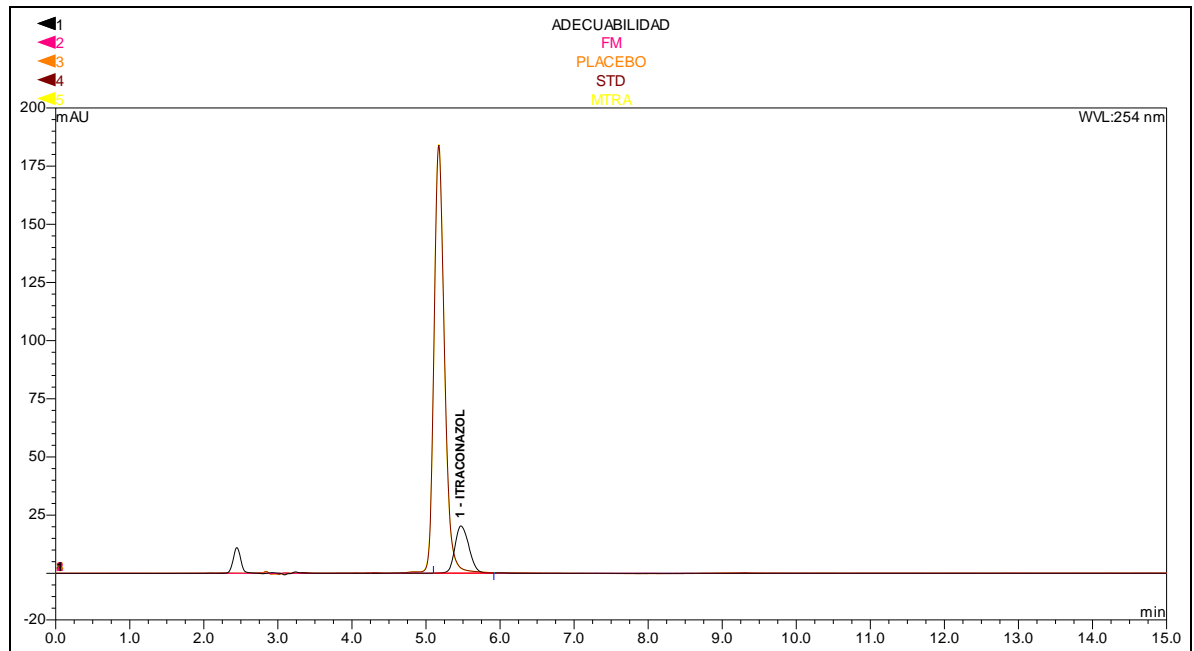


Figura 24. Robustez del método de valoración modificando la proporción de fase móvil de Acetonitrilo (-4%), Metanol (+3%) y Buffer (+1%).

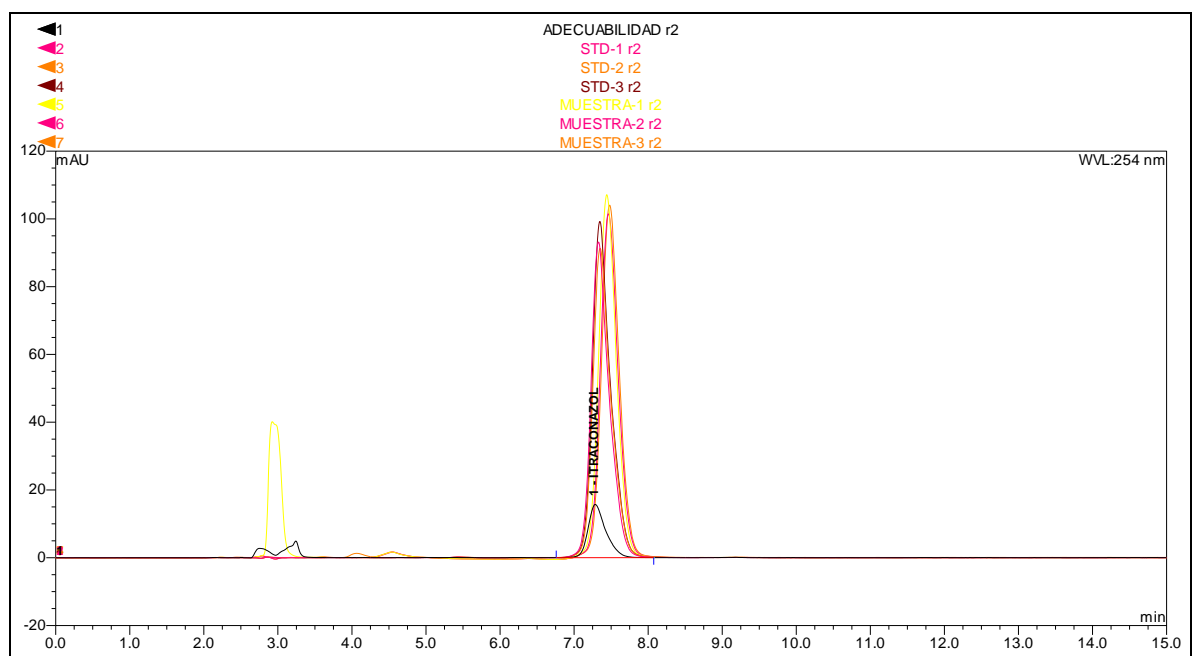


Figura 25. Robustez del método de valoración modificando la proporción de fase móvil de Acetonitrilo (-2%) y Buffer (+7%).

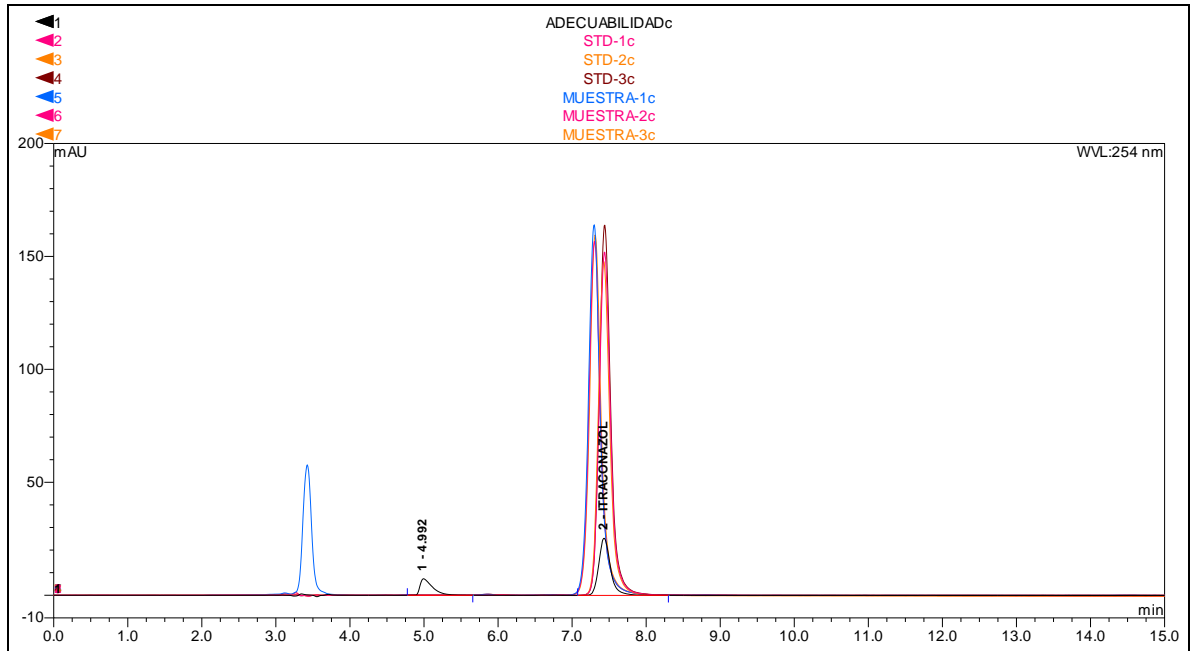


Figura 26. Robustez del método de valoración cambiando una columna de 4.6 x 250 mm por una Aclaim C18 de 4.6 x 250 mm Dionex

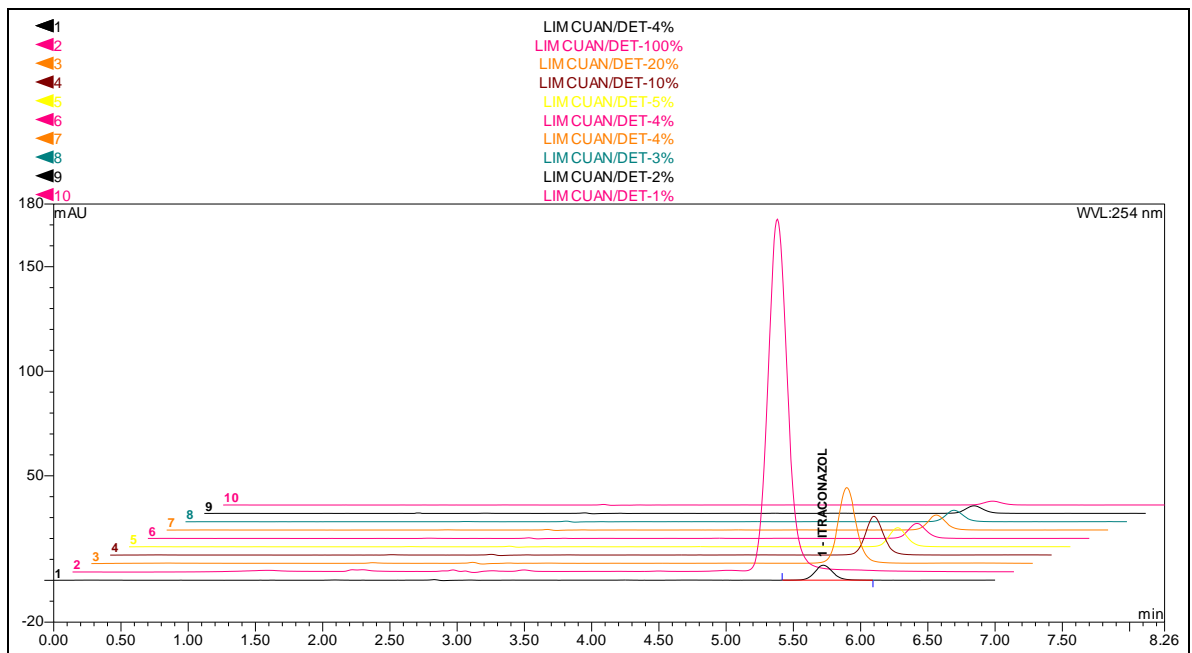


Figura 27. Límites de cuantificación y detección del método de valoración.

### ANEXO III

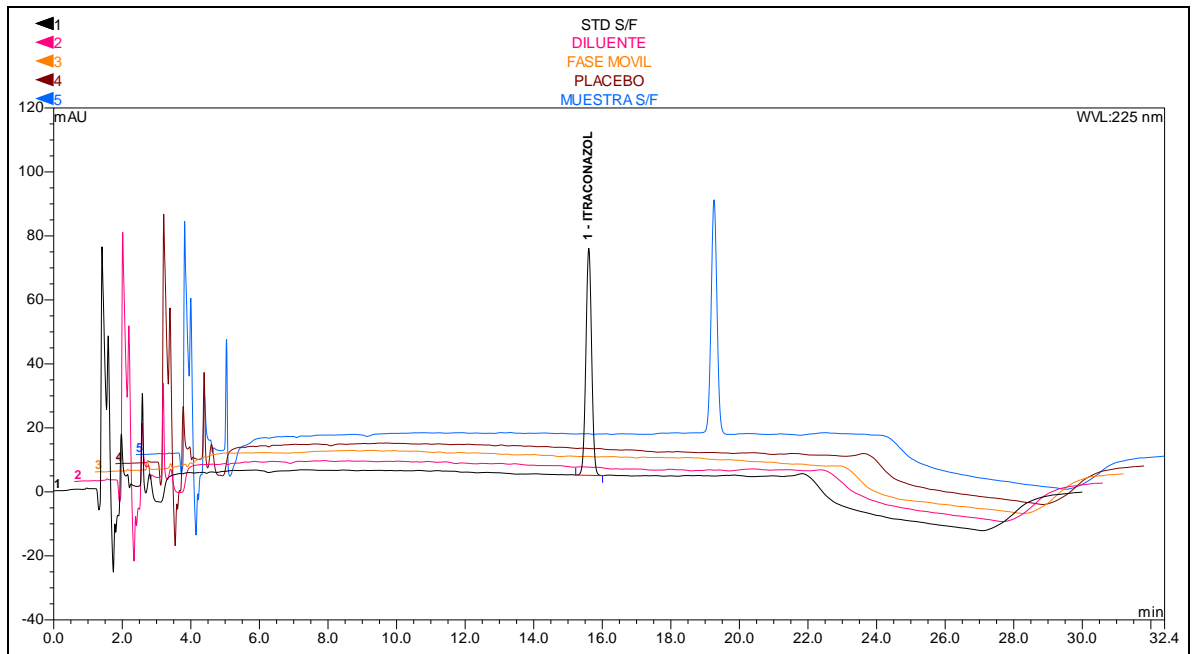


Figura 28. Especificidad del método de pureza cromatográfica.

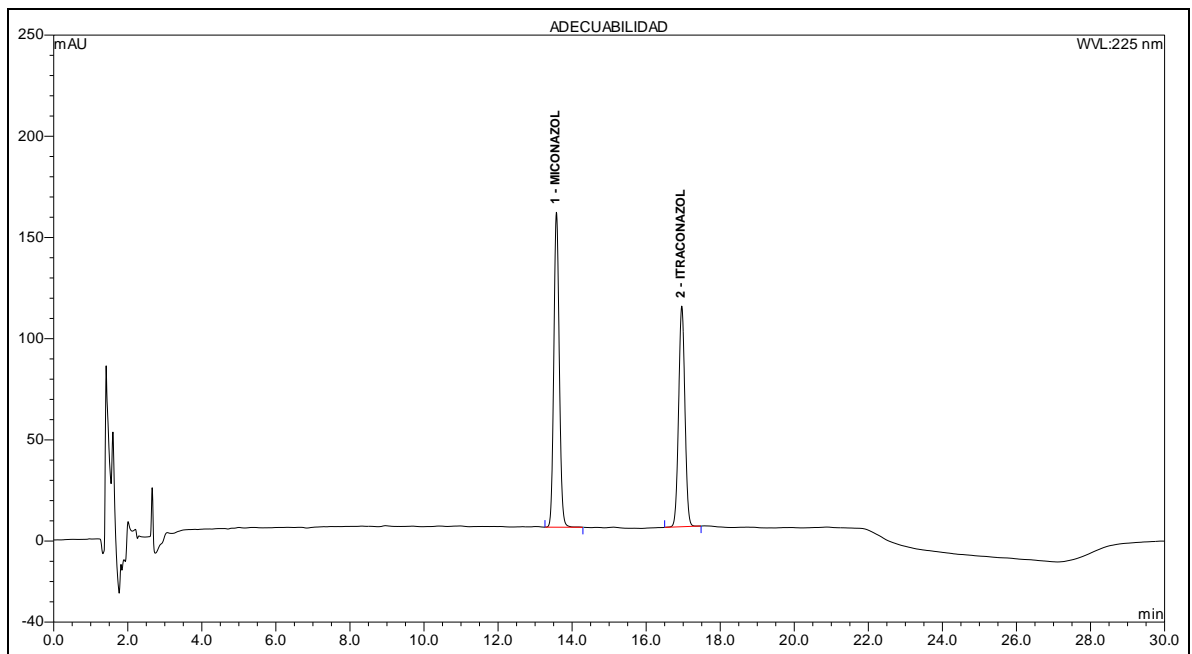


Figura 29. Adecuabilidad del método de pureza cromatográfica.

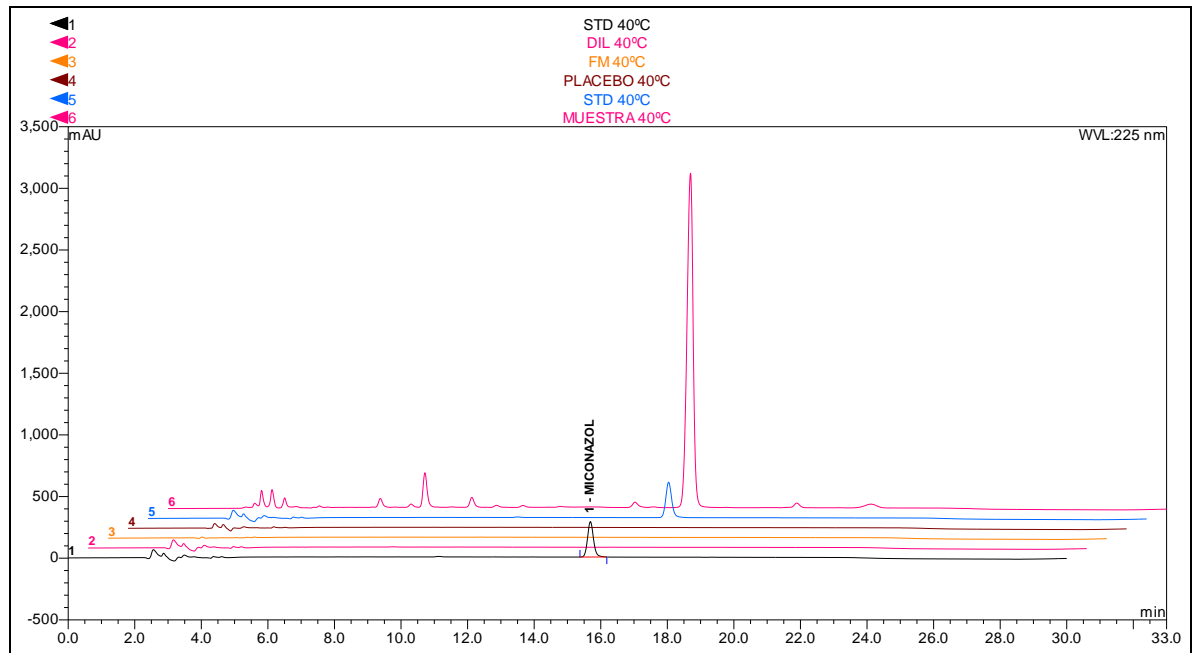


Figura 30. Especificidad del método de pureza cromatográfica.  
Degradación a temperatura de 40°C.

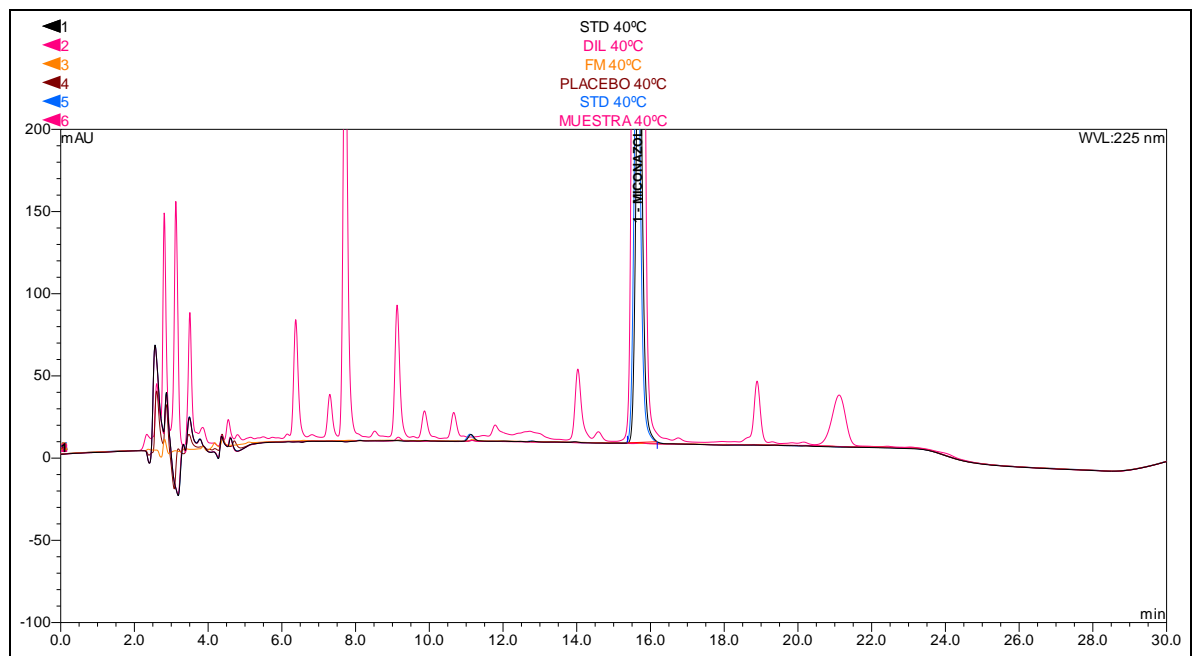


Figura 30a. Especificidad del método de pureza cromatográfica.  
Degradación a temperatura de 40°C.

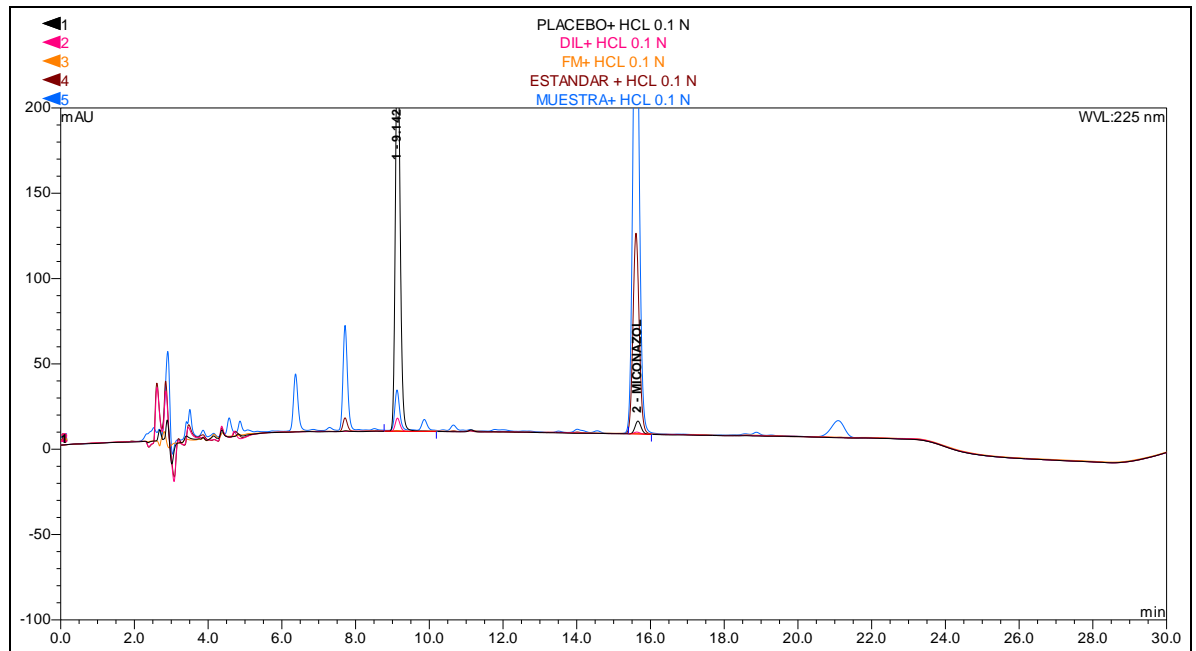


Figura 31. Especificidad del método de sustancias relacionadas.  
Degradación con HCl 0.1 N.

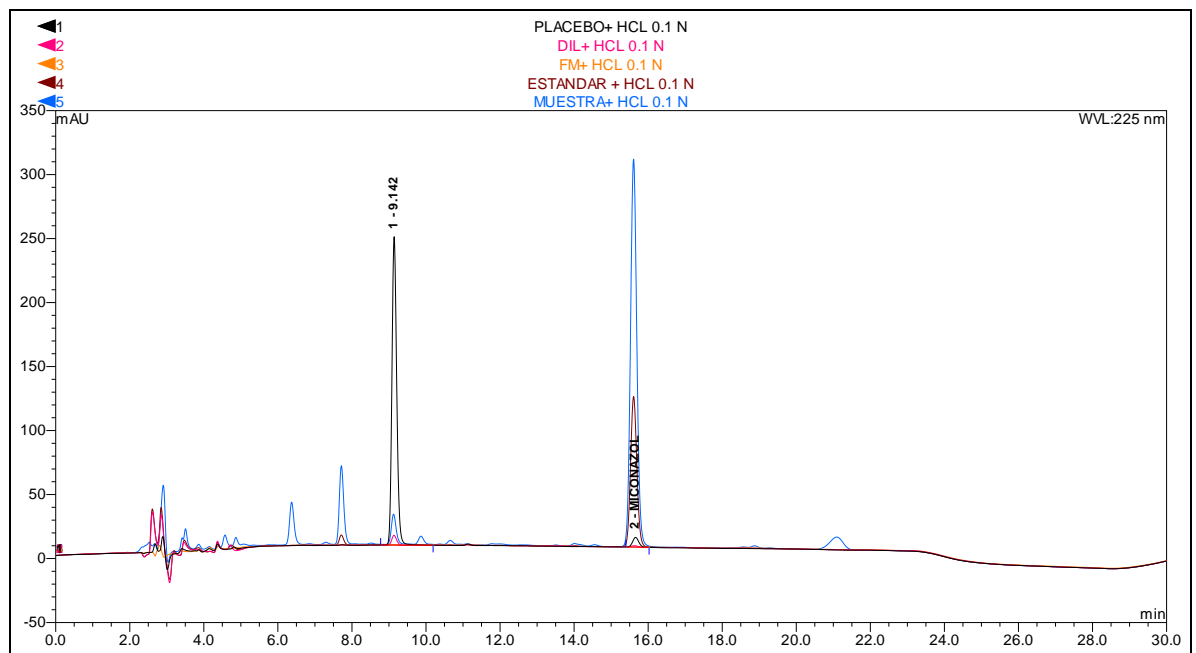


Figura 31a. Especificidad del método de pureza cromatográfica.  
Degradación con HCl 0.1 N.

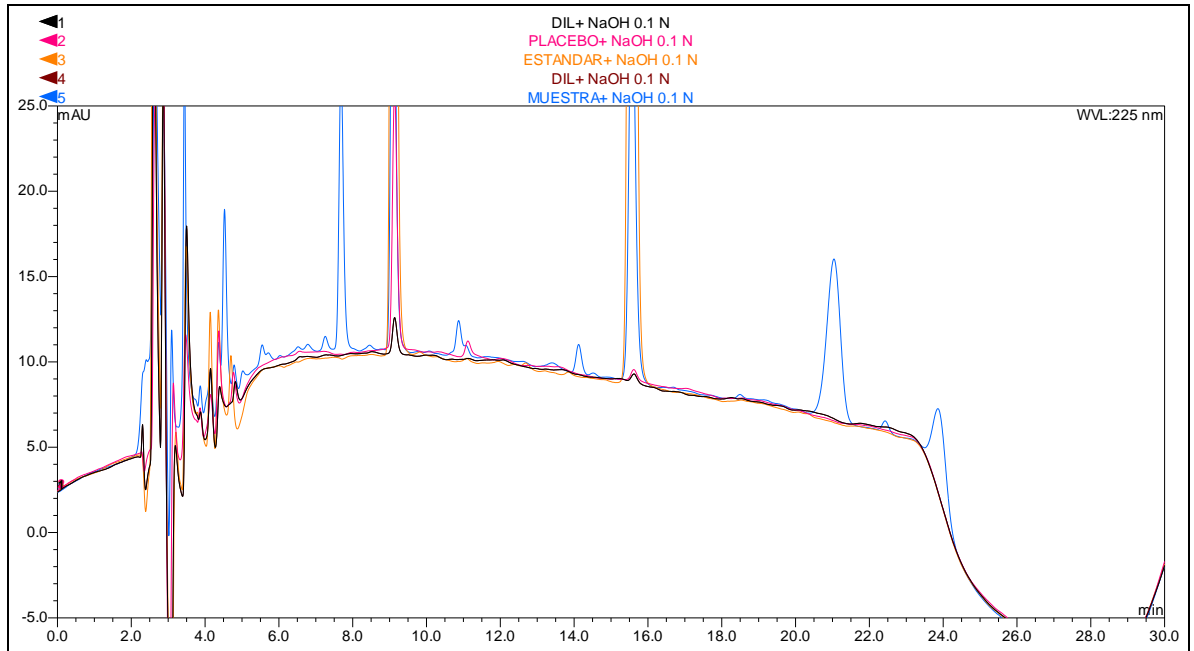


Figura 32. Especificidad del método de pureza cromatográfica. Degradación con NaOH 0.1 N.

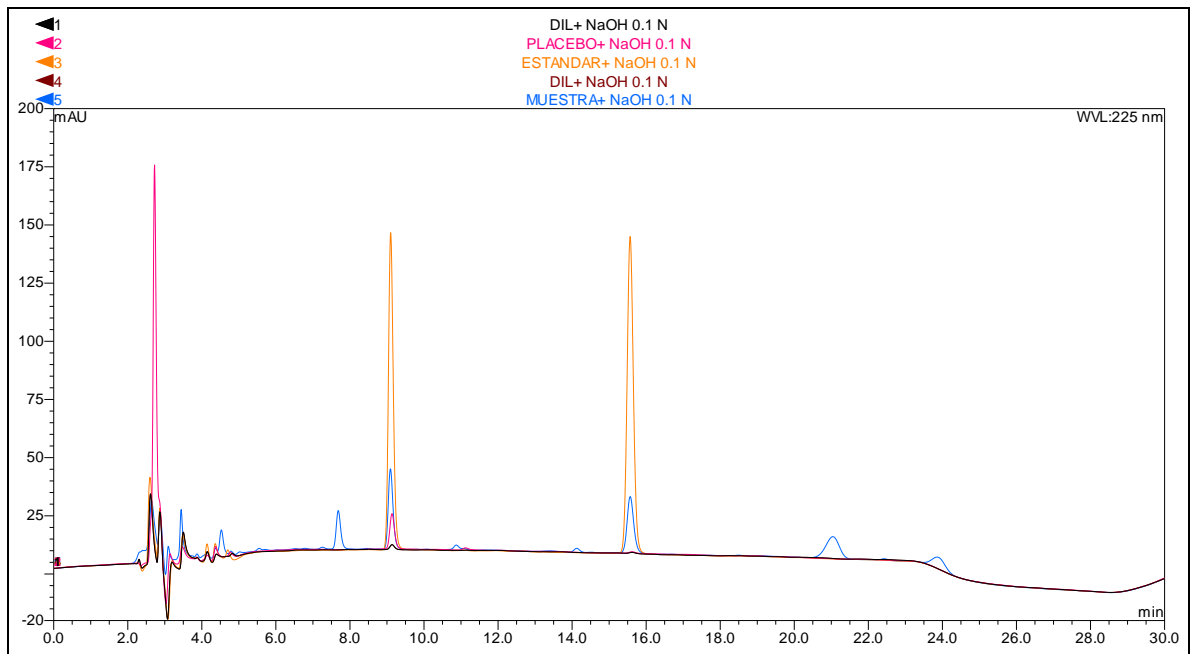


Figura 32a. Especificidad del método de pureza cromatográfica. Degradación con NaOH 0.1 N.



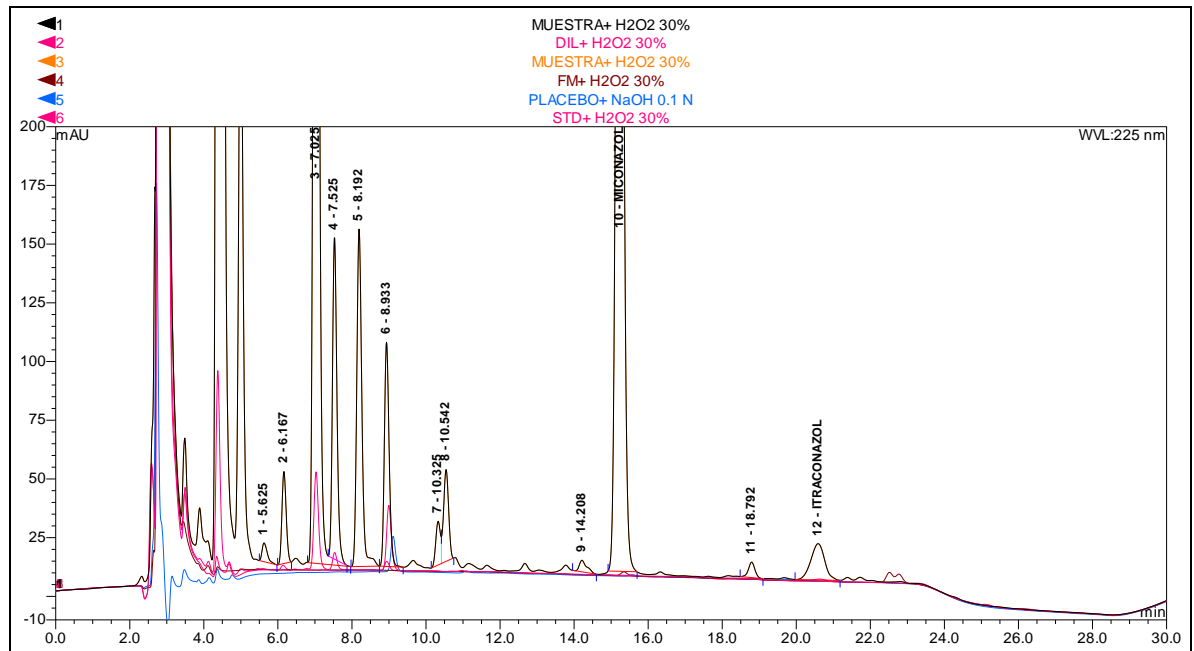


Figura 33. Especificidad del método de pureza cromatográfica. Degradación con  $H_2O_2$  al 30%.

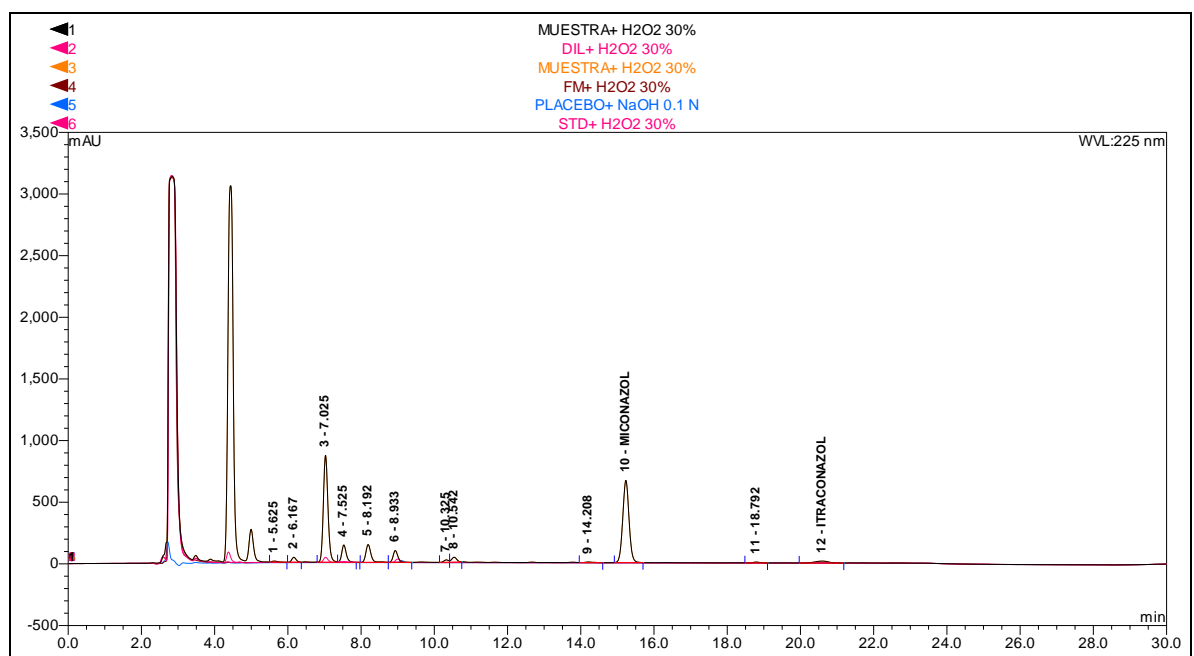


Figura 33a. Especificidad del método de pureza cromatográfica. Degradación con  $H_2O_2$  al 30%.

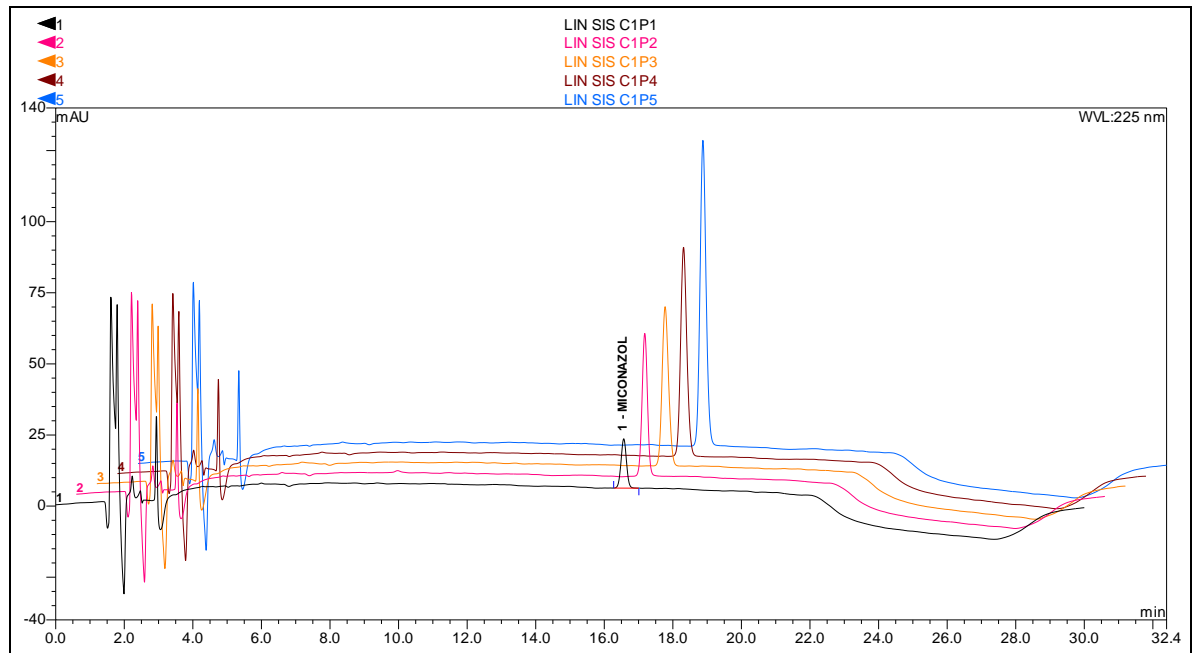


Figura 47. Linealidad del sistema del método de pureza cromatográfica.

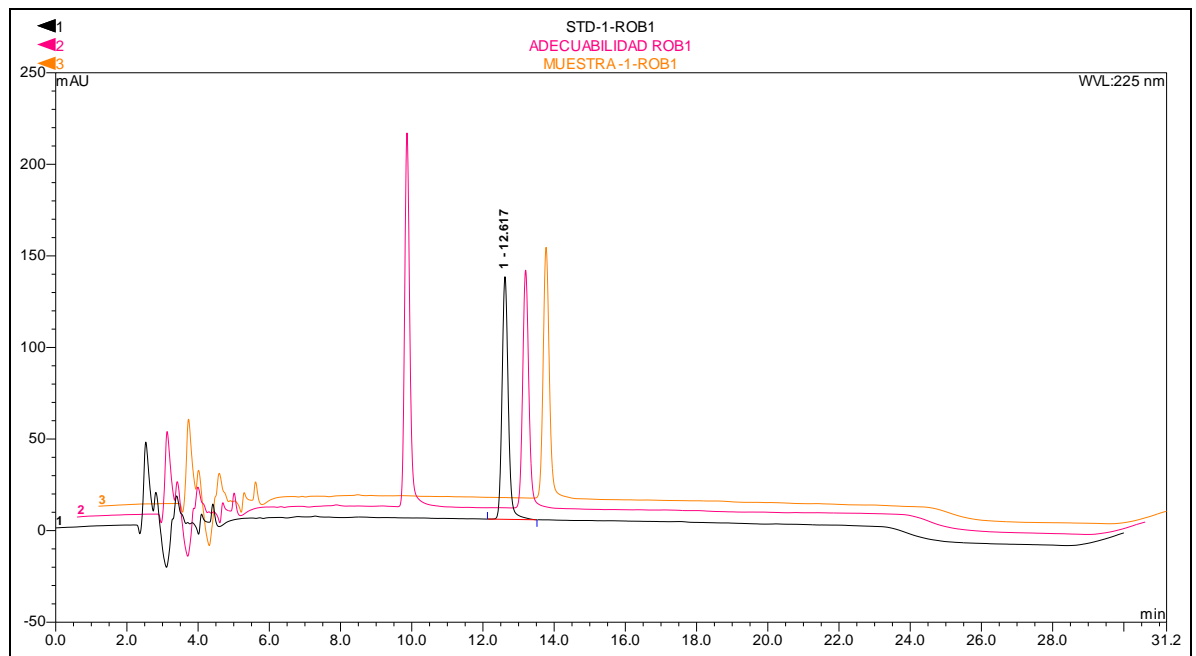


Figura 48. Robustez del método de pureza cromatográfica modificando la proporción de Acetonitrilo - 5%.

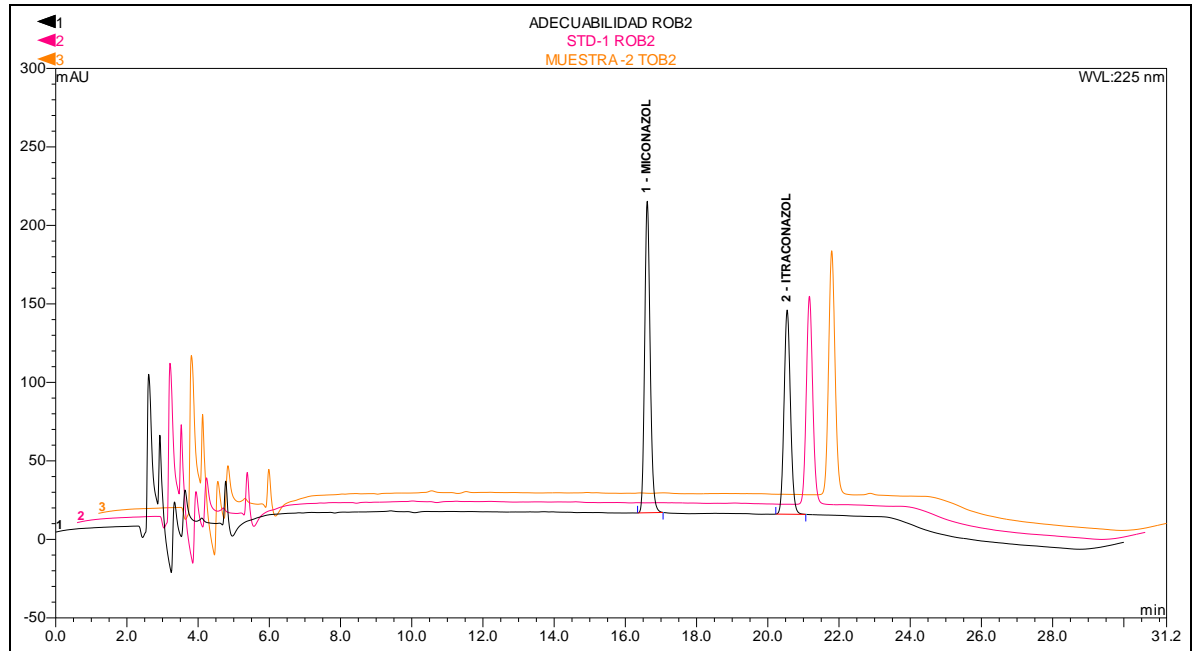


Figura 49. Robustez del método de pureza cromatográfica modificando la proporción de Acetonitrilo + 5%.

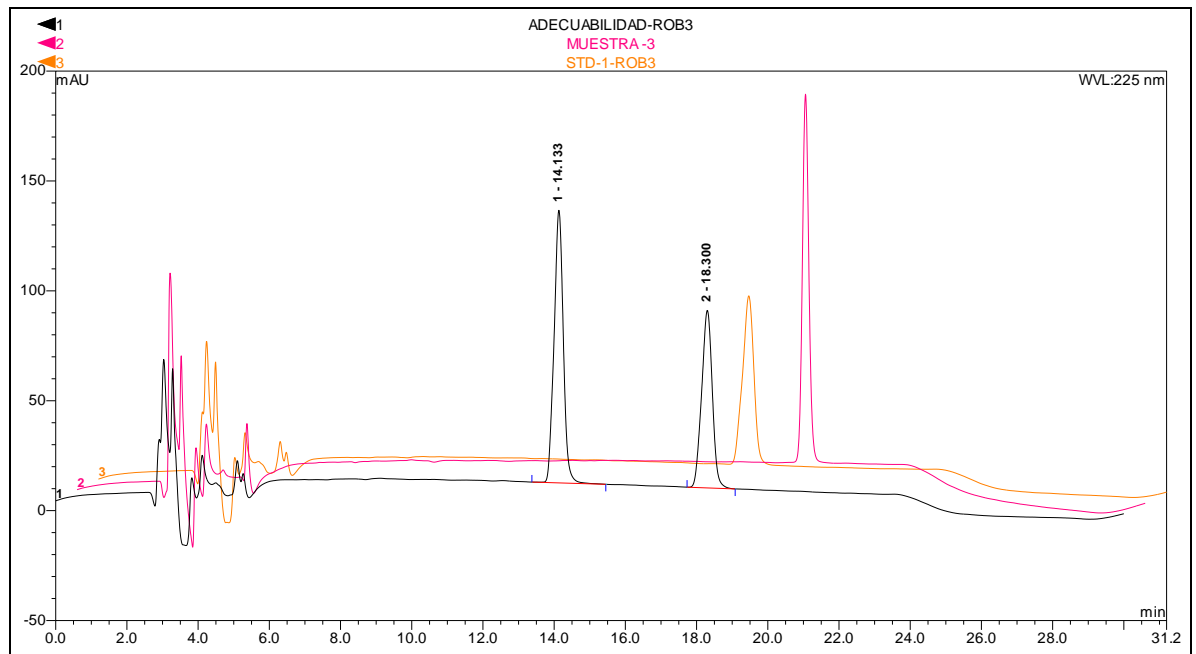


Figura 50. Robustez del método de pureza cromatográfica cambiando la columna analítica una Symmetry C18 de 4.6 x 250 mm por una Aclaim C18 de 4.6 x 250 mm Dionex.

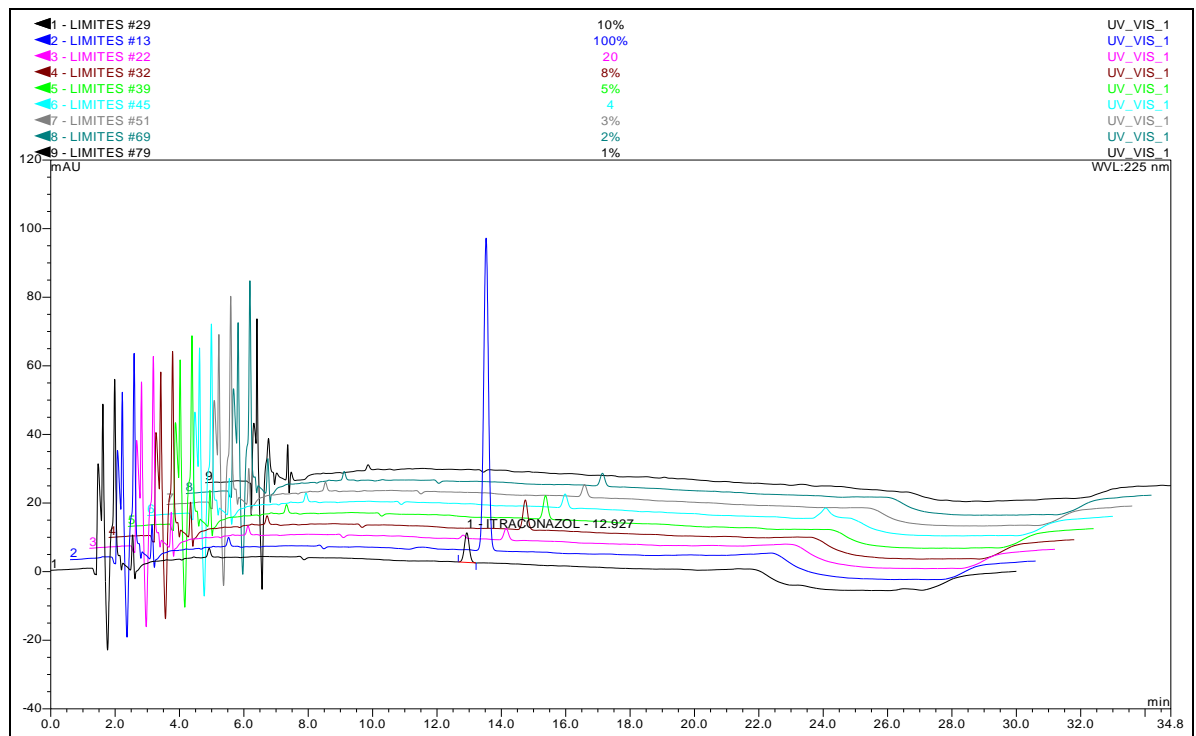


Figura 51. Limites de cuantificación y detección del método de pureza cromatográfica.