

302827

17
24



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A.C.

ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA PIRETRINAS I, II Y PIPERONIL
BUTOXIDO EN UN SHAMPOO ANTIPEDICULOSIS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARTHA ELENA HERNANDEZ ALVARADO

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

Agradezco a:

Laboratorios Silanes, S.A de C.V

***... Por las facilidades otorgadas
para la realización de este trabajo.***

Bajo la Dirección de :

Q.F.B Martha Gorgonio Hernández.

*A Martha y Blanca por su apoyo, enorme
paciencia y entusiasmo para que siguiera adelante.*

Gracias :

Q.F.B Roberto Ramirez Rojo por su valiosa colaboración.

*A mis padres Julio y Martha por todo lo que hicieron para
que pudiera concluir otra etapa en mi vida.*

LOS QUIERO DEMASIADO!

A mis hermanos Lucero, Jose Luis y Alfredo.

A mis tios Lupita y Miguelito.

A mis amigas Martha, Tere y Luchy.

Gracias por todo.

A ti por ayudarme a concluir esto tan importante, y por tu gran apoyo cuando lo necesite, gracias !

A. B. V.

INDICE

| | Pág. |
|--|------|
| CAPITULO 1 INTRODUCCION | |
| 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 1 |
| 1.2 OBJETIVO | 2 |
| 1.3 HIPOTESIS | 2 |
| | |
| CAPITULO 2 ANTECEDENTES | |
| 2.1 GENERALIDADES | 3 |
| 2.1.1 DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO | 3 |
| | |
| 2.2 PIRETRINAS | |
| 2.2.1 CARACTERISTICAS GENERALES DE PIRETRINAS I,II. | 4 |
| 2.2.2 ESTRUCTURA QUIMICA | 5 |
| 2.2.3 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE PIRETRINAS III | 6 |
| 2.2.4 MECANISMO DE ACCION | 7 |
| 2.2.5 TOXICIDAD | 7 |
| | |
| 2.3 CARACTERISTICAS GENERALES DE PIPERONIL BUTOXIDO | 8 |
| 2.3.1 ESTRUCTURA QUIMICA | 9 |
| 2.3.2 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE PIPERONIL BUTOXIDO | 9 |
| 2.3.3 MECANISMO DE ACCION | 9 |
| 2.3.4 TOXICIDAD | 9 |
| | |
| 2.4 CROMATOGRAFIA | 10 |
| 2.4.1 ANTECEDENTES | 10 |
| 2.4.2 EQUIPO UTILIZADO EN CLAR | 12 |
| 2.4.3 PARAMETROS CROMATOGRAFICOS | 13 |
| 2.4.4 METODOS DE CUANTIFICACION EN CLAR | 14 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 2.5 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS | 17 |
| 2.5.1 PARAMETROS DE LA VALIDACION | 18 |

CAPITULO 3 PARTE EXPERIMENTAL

| | |
|---|----|
| 3.1 DIAGRAMA DE FLUJO PARA CUANTIFICAR PIRETRINAS I,II Y PERONIL BUTOXIDO | 20 |
| 3.1.1 DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA VALIDACION DE UN METODO ANALITICO | 21 |
| 3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO | 22 |
| 3.3 METODO ANALITICO | 23 |
| 3.3.1 FASE MOVIL | 23 |
| 3.3.2 PREPARACION DE ESTANDARES | 23 |
| 3.3.3 PREPARACION DE LA MUESTRA | 23 |
| 3.3.4 PREPARACION DE LA COLUMNA | 23 |
| 3.3.5 PROCEDIMIENTO DE ANALISIS | 24 |
| 3.3.6 PARAMETROS A EVALUAR | 25 |
| 3.4 ESPECIFICIDAD DEL METODO ANALITICO | 26 |
| 3.5 PARAMETROS DE LA VALIDACION | 28 |

CAPITULO 4 RESULTADOS

| | |
|--|----|
| 4.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO | 33 |
| 4.1.1 NUMERO DE PLATOS TEORICOS | 33 |
| 4.1.2 FACTOR DE RESOLUCION | 34 |
| 4.1.3 FACTOR DE ASIMETRIA | 34 |
| 4.1.4 CROMATOGRAMAS DEL METODO ANALITICO | 35 |
| 4.2 ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO | 37 |
| 4.3 PRECISION DEL SISTEMA | 46 |
| 4.4 LINEARIDAD DEL SISTEMA | 47 |
| 4.5 LINEARIDAD DEL METODO | 53 |
| 4.6 EXACTITUD DEL METODO | 59 |
| 4.7 REPRODUCIBILIDAD DEL METODO | 61 |
| 4.8 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA | 63 |

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| 4.9 ANALISIS DEL RESULTADO | 65 |
| CAPITULO 5 CONCLUSIONES | |
| 5.1 CONCLUSIONES | 69 |
| BIBLIOGRAFIA | 71 |

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del Problema

La industria farmacéutica requiere de métodos analíticos que aseguren que los medicamentos que se fabrican se encuentren dentro de una óptima calidad, no solo recién elaborados sino durante todo el tiempo que permanezcan en el mercado. Cuando no se cuenta con un método oficial farmacopéico para su análisis, es necesario desarrollar uno en el laboratorio, probarlo y validarlo debidamente.

La validación es parte fundamental del desarrollo de nuevas técnicas analíticas, implica la optimización del mismo mediante estudios de laboratorio. Dependiendo de las características del producto, serán los parámetros que se realicen para que el método sea el adecuado en las aplicaciones requeridas del producto. *

El Piretro es un insecticida que se obtiene de las flores secas del *Crysanthemum cinerariifolium* y el componente activo del Piretro son las Piretrinas que se utilizan en la agricultura, hogar y en tratamientos contra la infestación de escabiosis y pediculosis (piojos). 20,21

El Piperonil Butóxido se obtiene del aceite esencial del *Ocotea cymbarum*. Es un sinergista ampliamente usado en insecticidas caseros y preparaciones en aerosol. Es un ingrediente esencial para todas las formulaciones que contienen Piretrinas naturales y sintéticas. 22,20

Comercialmente en el mercado existen lociones y shampoos que contienen Piretrinas en una concentración de 0.17 - 0.33 % y de 2 - 4 % de Piperonil Butóxido. 20

Para su análisis existen métodos espectrofotométricos y por Cromatografía de gases pero se ha demostrado que no son eficientes. Por eso es importante el desarrollar y validar un método para cuantificar Piretrinas I, II y Piperonil Butóxido en un shampoo antipediculososis (antipiojos) por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) que también sea indicativo de estabilidad.

1.2 Objetivo

- a) Desarrollar un método analítico adecuado y específico para Piretrinas I, II y Piperonil Butóxido por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
- b) Validar el método y demostrar la confiabilidad del mismo, para fines prácticos del laboratorio.
- c) Adaptar y ser resolutivo para sus determinaciones como producto intermedio, producto terminado y producto de estabilidad.

1.3 Hipótesis

- 1) Si los componentes del piretro y de piperonil butóxido son separados por cromatografía líquida de alta resolución, entonces es posible establecer un método analítico basado en este principio para determinar estos compuestos.
- 2) El método analítico desarrollado cumplirá con los requisitos de validación para establecerse como procedimiento de rutina.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

2.1.1 Desarrollo de un método analítico

Cuando se está desarrollando un método analítico deben tomarse en cuenta los siguientes puntos:

CARACTERISTICAS DEL PRINCIPIO ACTIVO:

Es necesario realizar una investigación bibliográfica para conocer propiedades físicas y químicas más importantes: solubilidad, peso molecular, pH, fuerza iónica, etc. Así como para obtener datos de estabilidad del activo en estudio ya sea solo y con los posibles aditivos que pudieran interaccionar, se buscan referencias y todos los posibles métodos para la cuantificación del mismo. Se determina el método de análisis más adecuado.

PARA SU ADAPTACION EXPERIMENTAL:

Algunos de los factores que deben ser considerados son:

- a) Disponibilidad de materiales, reactivos y equipos.
- b) Tiempo para efectuar el análisis.
- c) Versatilidad (aplicable a estudios de estabilidad y control de calidad rutinario).
- d) Costo del análisis.
- e) Preparación de la muestra.

SEPARACION SELECTIVA:

En la mayor parte de los casos, se busca efectuar por lo menos una separación parcial previa de los componentes de la muestra con la finalidad de introducirla lo más pura posible, y de esta manera aumentar la especificidad del método.

2.2 PIRETRINAS

Antecedentes

Desde hace siglos en Persia (ahora Iran) se conoce que ciertas flores del género *Chrysanthemum* tienen propiedades insecticidas. No fue hasta que en 1840 se obtuvo referencias de la producción comercial del Piretro en Yugoslavia. El uso del polvo seco de las flores rápidamente se expande por Europa y se introduce a Estados Unidos.

El nombre de Piretro se acepta para nombrar a las flores secas del *Chrysanthemum* y el término de polvo de Piretro o extracto de Piretro se usa para describir el producto crudo obtenido de las flores secas del *Chrysanthemum cinerariifolium*.

2.2.1 Características Generales de Piretrinas

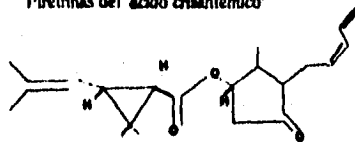
La obtención del Piretro es por medio de extracciones con querosina o dicloruro de etileno y el extracto se obtiene por destilación al vacío. 7.14

Las piretrinas son los componentes activos del piretro. Son ésteres, formados por la combinación de dos ácidos, ácido crisantémico y ácido pirétrico y tres alcoholes que son: piretrolona, cinerolona, jasmolona. El éster del ácido crisantémico se conoce como: piretrina I, cinerina I, jasmolina I, respectivamente, la fracción junta se conoce como piretrina I. Mientras que el éster del ácido pirétrico se conoce como: piretrina II, cinerina II, jasmolina II, estas representan la fracción de las piretrinas II. 3

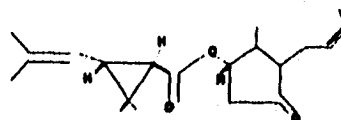
La piretrina I es la más activa de las piretrinas naturales. Los componentes ácidos son capaces de existir como isómeros cis y trans geométricos, debido a la presencia de una doble ligadura olefínica, y cada uno de estos isómeros puede existir, además, como isómeros ópticos dextrógiros (+) y levógiros (-). 3

2.2.2 Estructura Química

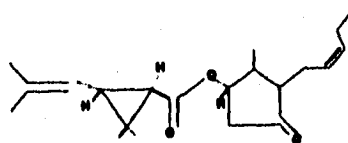
Piretrinas del ácido crisantémico



PIRETRINA I

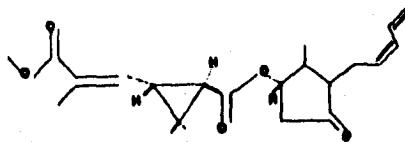


CINERINA I

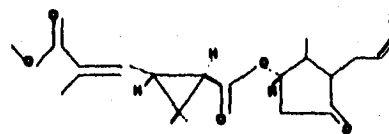


JASMOLINA I

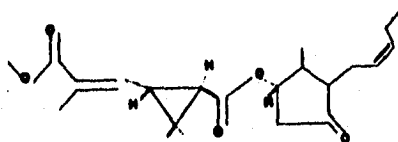
Piretrinas del ácido pirétrico:



PIRETRINA II



CINERINA II



JASMOLINA II

2.2.3 Propiedades Físicas y Químicas de Piretrinas I,II

PIRETRINAS I

fórmula condensada: $C_{21} H_{28} O_3$

densidad a 20°C: 1.5242

punto de ebullición: 146-150°C

peso molecular: 328.4

PIRETRINAS II

fórmula condensada: $C_{22} H_{28} O_3$

densidad a 20°C: 1.5355

punto de ebullición: 192-193°C

peso molecular: 372.4

Comercialmente se manejan estos activos (piretrinas I,II) en una misma solución, que presenta las siguientes características:

Líquido viscoso de color amarillo fuerte, de olor penetrante. Insoluble en agua, soluble en alcohol, queroseno, tetracloruro de carbono, nitrometano, dicloruro de etileno.

Se oxida fácilmente, pierden actividad por la luz y el aire, se debe refrigerar y guardar en un lugar oscuro.¹⁶

Se usan para combatir plagas en la agricultura, contra insectos caseros, ácaros, garrapata, pulgas y piojos. Los preparados comerciales contienen 0.17-0.35% de Piretrinas, se venden en gel, suspensiones líquidas y shampoo para el tratamiento contra la infestación de piojos.^{18,13}

El piretro es un insecticida que carece de persistencia, especialmente en uso contra plagas en la agricultura, debido a su inestabilidad ante la presencia de la luz y del aire.

Frecuentemente los insectos se pueden recuperar si han sido expuestos a una dosis subletal (0.33 mcg/insecto) de piretrinas, lo que quiere decir que este compuesto comercialmente se formula con sinergistas, ya que así mejora la eficacia del insecticida. 18

2.2.4 Mecanismo de Acción

El mecanismo de acción se presenta con la absorción de las Piretrinas a través del esqueleto de los insectos estimulando el sistema nervioso, aparentemente por la interrupción en la transmisión catiónica de la capa lipídica de las células nerviosas bloqueando la transmisión de impulsos. Ocasionando parálisis y posteriormente la muerte. 6

2.2.5 Toxicidad

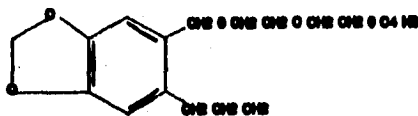
Existen numerosos casos de dermatitis por contacto y alergia respiratoria. Con los preparados que contienen piretroides sintéticos es menor la probabilidad de que se produzcan reacciones alérgicas que con los que se preparan con polvo de piretro. La dosis letal DL_{50} reportada para una toxicidad dérmica es de 1350 mg/kg a 5000 mg/kg. La dosis letal DL_{50} de Piretrina I es de 260 - 420 mg/kg y para las Piretrinas II que es menos tóxica la DL_{50} reportada es mayor a 600 mg/kg. En mamíferos, incluyendo humanos el isómero cis es más tóxico que el isómero trans que rápidamente es metabolizado y excretado por la orina. 3

2.3 Características Generales de Piperonil Butóxido

Es un aceite esencial que se obtiene de los árboles del *Ocotea cymbarum*, mediante un proceso mecánico. Los árboles son cortados en bloques, luego son astillados colocándose las astillas en largas filas; y por medio de un generador de vapor se inyecta vapor a las astillas. El aceite liberado por el vapor es filtrado a través de franela, algodón o papel filtro. 23

Brasil durante la segunda Guerra Mundial desarrolló la producción de varios aceites esenciales que son utilizados en la Industria Farmacéutica, en alimentos, jabones y la Industria Cosmética. En 1949 Wachs obtiene la patente de Piperonil Butóxido el cual se encontró que es un potente sinergista para piretrinas. 20

2.3.1 Estructura Química



fórmula condensada: $C_{19}H_{27}O_3$

peso molecular: 338.43

punto de ebullición: 180°C a 1 mmHg

densidad a 20°C : 1.0590

viscosidad: 40 cps

2.3.2 Propiedades Físicas y Químicas de Piperonil Butóxido

Líquido aceitoso amarillo claro con olor característico y ligero sabor amargo. Soluble en metanol, etanol, benceno, cloroformo. Insoluble en agua. Es estable en condiciones atmosféricas normales, a la luz y en solvente orgánicos.

Las condiciones de almacenamiento se recomiendan por debajo de los 50°C en envases herméticos de aluminio; en presencia de oxígeno hay cambio de color. Presenta buena compatibilidad con otros productos. El uso principal es como insecticida sinergista, especialmente para piretrinas. También se usa para el control de insectos caseros, y de jardín. 22

2.3.3 Mecanismo de Acción

El mecanismo de acción del Piperonil Butóxido potenciado con Piretrinas se basa en la inhibición de la enzima hidrolítica responsable del metabolismo en insectos. 23

2.3.4 Toxicidad

La DL₅₀ aguda para ratas es de 11.500 mg/kg.

La DL₅₀ dérmica para conejos es de 1880 mg/kg.

Cuando se administra oralmente Piperonil Butóxido en animales la mayoría de la dosis es excretada sin cambios por heces. 23

2.4 CROMATOGRAFIA

2.4.1 Antecedentes

La mayoría de las técnicas de cuantificación no son lo suficientemente selectivas para determinar cada uno de los componentes de una mezcla.

Las técnicas cromatográficas son el recurso analítico más importante con el que se cuenta para la separación, identificación y cuantificación de un amplia variedad de sustancias.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución es una de las técnicas analíticas que presentan una larga diversidad de aplicaciones en la industria farmacéutica, en análisis de alimentos, análisis industrial, análisis clínicos, etc. ²

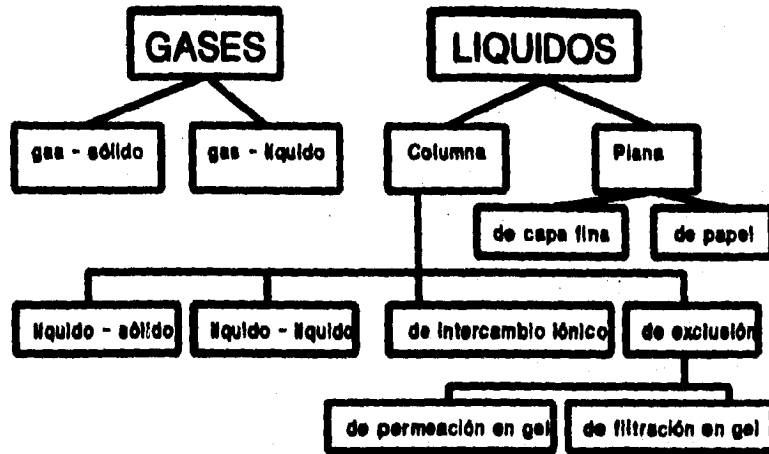
Los resultados que ofrece la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, representa una ventaja en cuanto a exactitud, rapidez y habilidad de llevar a cabo la separación de muestras difíciles. ²

La cromatografía puede definirse como la separación de moléculas por una migración diferencial. La separación se lleva a cabo por los diferentes componentes de la muestra (solutos) que muestran diferente distribución entre dos fases, una en la cual son retenidas selectivamente (fase estacionaria), y la otra en movimiento (fase móvil). ^{25,26}

Un sistema cromatográfico consta de la fase estacionaria la cual ejerce fuerzas de retención sobre los solutos y la fase móvil que transporta a los solutos en el orden en que emergieron. ^{25,19}

De acuerdo al estado físico de las fases móvil y estacionaria se tiene:

CROMATOGRAFIA



Cuadro 1

Clasificación de los diferentes tipos de cromatografía

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica en donde las separaciones se lleva acabo en minutos. Para ello se requiere de columnas de diámetros reducidos, este tipo de columna es muy eficaz pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, es decir, una gran caída de presión. Por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión que hagan fluir la fase móvil a través de la columna.

En la cromatografía líquida de acuerdo al mecanismo de separación se enumeran cuatro tipos: adsorción, partición, intercambio iónico y de exclusión. En base a la polaridad de las fases involucradas se clasifica en cromatografía en fase normal y en fase reversa.

En la fase normal de la cromatografía líquida la fase estacionaria es más polar mientras que la fase móvil está compuesta por solventes no polares.

En la fase reversa, la fase móvil es más polar que la fase estacionaria. Los solutos polares son fuertemente atraídos hacia la fase móvil que hacia la fase estacionaria, y por tanto, la elución es más rápida. Solutos menos polares gastan más tiempo en las interacciones con la fase estacionaria y son retenidos por más tiempo en la columna. »

2.4.2 Equipo utilizado en CLAR

Columna: Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que es en está, donde se va a llevar a cabo la separación. El material del tubo de la columna es de un material fuerte, e inerte (cromo, níquel, acero inoxidable), las dimensiones y el material de empaque va a depender del tipo de separación que se desee hacer.

La eficiencia de la columna es importante para obtener una mayor resolución y está va a depender del tipo de material de empaque y del tamaño de la partícula de está, ya que al aumentar el área de superficie del empaque, se aumenta la interacción del soluto con la fase estacionaria. »

Bomba: La función es proveer continuamente cierta cantidad de fase móvil a través de la columna. La liberación del solvente en el sistema es un factor importante dentro de la cromatografía líquida desde que el funcionamiento afecta directamente en la reproducibilidad del tiempo de retención y la estabilidad de la línea base del detector. Los tipos de bomba que existen son diversas siendo las más comunes las de flujo constante que puede ser de un pistón , pistón recíproco y jeringa. 1,8,10,29

Detectores: Se basan en la medición de las propiedades de los componentes de la muestra, siendo los más comunes espectrofotómetros, UV-VIS, Infrarrojo, refractómetros y de absorción atómica, fluorímetros, etc. 27

Integradores: La respuesta obtenida del detector se registra en el integrador obteniéndose el cromatograma correspondiente, mostrando cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico, por lo que este tiempo puede emplearse para identificar cada compuesto. 8

2.4.3 Parámetros Cromatográficos

Tiempo de retención: Es el tiempo transcurrido desde el momento de la inyección hasta el momento en que la concentración del compuesto es eluida.

Area Bajo la Curva: Representa la cantidad de moléculas obtenidas de cada soluto de la muestra.

Número de Platos Teóricos (N) : Mide la eficiencia de la columna basado en el volumen de elución y en el ancho del pico. Cuando el ancho del pico es pequeño la columna tiene una alta eficiencia. La columna puede dividirse en varias secciones llamadas platos teóricos y los solutos pueden mantener el equilibrio entre las dos fases (móvil y estacionaria) que existe entre cada plato.

El valor de N va a depender de las condiciones de operación tales como la fase móvil, la temperatura, la calidad del empaque, la uniformidad del empaque, del diámetro interno y el largo de la columna. A mayor valor de N mejor será la eficiencia de la columna. 2.26

$$N = 5.5 \times (T_r / W_{1/2})^2$$

Resolución: Es la distancia entre dos componentes que han sido separados. La resolución se produce de una interacción física y química que ocurre en la muestra a través de la columna. 2

$$R = \frac{T_2 - T_1}{1/2 (W_1 + W_2)}$$

Factor de Asimetría: Mide la simetría del pico y el valor se incrementa cuando el coleo del pico llega a ser más pronunciado, y por tanto menos confiable el resultado que se obtiene. 2

$$F_a = W_{0.05} / 2f$$

2.4.4 Métodos de cuantificación en CLAR

Con estándar externo:

El estándar externo, con inyecciones separadas de muestra y estándar, permite la cuantificación mediante la comparación de las áreas de los picos; esto es, comparando el área del pico obtenido para la muestra con el área del pico obtenido para el estándar.

El estándar externo debe ser de una concentración cercana a la esperada en la solución de la muestra. Se debe de asegurar que el área del pico podrá ser comparable, de esta manera evitar errores en las medidas.

La cantidad de la sustancia de interés se puede calcular con la siguiente fórmula :

$$C_x = \frac{A_m \cdot P_s \cdot D_m}{A_s \cdot D_s}$$

en donde:

C_x = Concentración del activo de la muestra.

A_m = Área del pico de la muestra.

A_s = Área del pico del estándar.

P_s = Cantidad en mg del estándar.

D_m = Dilución de la muestra en ml.

D_s = Dilución del estándar en ml.

Las ventajas de utilizar un estándar externo son:

- 1.- Simplicidad en las soluciones a analizar.
- 2.- Eliminación de buscar un estándar interno.
- 3.- Evitar problemas causados por una coelución del estándar interno y de productos de degradación desconocidos.

La estandarización interna se basa en la adición de una sustancia a la solución de interés. La relación del área del pico de la muestra de interés así como del estándar interno son comparadas de un cromatograma a otro. Un estándar interno debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- 1.- Debe ser completamente separado de los otros picos en el cromatograma.
- 2.- Debe eluir cerca de los solutos que serán cuantificados.
- 3.- Preferiblemente su estructura y el área del pico debe ser parecido al de la muestra por analizar, no debe ser producto de degradación de la muestra ni degradarla.
- 4.- Debe ser químicamente inerte bajo las condiciones de trabajo (cromatográficas).
- 5.- Debe ser fácilmente disponible, razonablemente de alta pureza o ser una sustancia fácil de purificar.

Existen dos variaciones en las técnicas para el uso de un estándar interno. Una comprende la determinación de factores respuesta, y la segunda, una relación entre las respuestas.

Los factores de respuesta son calculados dividiendo el peso de la muestra entre el correspondiente área del pico. El factor de respuesta es usado para calcular la concentración de la muestra:

$$FR = \frac{A_{sr} \times P_{si} \times D_{sr}}{A_{si} \times D_{si} \times P_{sr}}$$

en donde:

- FR = Factor de respuesta.
- A_{sr} = Área del pico del estándar de referencia.
- A_{si} = Área del pico del estándar interno.
- P_{sr} = Cantidad en mg del estándar de referencia.
- P_{si} = Cantidad en mg del estándar interno.
- D_{sr} = Dilución del estándar de referencia.
- D_{si} = Dilución del estándar interno.

La segunda manera de utilizar el estándar interno es preparando una solución de la muestra y una solución del estándar a los cuales han sido adicionados la misma cantidad de estándar interno.

Después de obtener el cromatograma de la muestra y del estándar, la relación de áreas para la muestra y el estándar, determina la respuesta analítica (R) en cada caso:

$$R = \frac{\text{Área del pico de la sustancia de interés}}{\text{Área del pico del estándar interno}}$$

Es importante la adición de un estándar interno que minimiza errores de inyección, medición o proceso de la muestra. El estándar interno debe ser similar al activo o activos de interés pero con un tiempo de retención diferente para que durante el proceso de separación y detección no presente grandes variaciones. 22

2.5 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

La validación de procesos consiste en establecer la evidencia documentada que nos proporcione un alto grado de seguridad de un proceso específico. Es importante que se prepare un protocolo de validación que especifique los procedimientos que deberán llevarse a cabo y los datos que deberán recabarse. El protocolo debe especificar el número de pruebas de proceso necesarias para demostrar reproducibilidad.

La documentación de validación deberá incluir la evidencia de la adecuabilidad de los materiales y el desempeño y confiabilidad de los equipos y sistemas.6

La validación de un método analítico es el proceso de establecer, por estudios de laboratorio que el funcionamiento del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. 17

El proceso de validación se basa en principios técnicos y científicos y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición. 12

Dentro de la validación se debe definir claramente los parámetros que van hacer medidos y su función; Mostrar el propósito para el cual fueron establecidos.

Primero el método debe ser exacto, es decir, dentro de los límites establecidos debe conocerse la cantidad de activo presente en la forma farmacéutica.

Segundo, ser específico. Esto significa que el método debe ser capaz de dar una respuesta al activo de interés y no a otro tipo de compuesto.

Tercero, ser preciso lo cual indica que el método debe ser capaz de repetir y reproducir la medición. 10

No obstante las variables que afectan al método deben conocerse, e, idealmente la validación debe demostrar que el método produce resultados equivalentes a través de un rango de condiciones que el método admite. 15

Entre las variables que afectan al método podemos mencionar los errores sistemáticos que llegan a corregirse si son detectados a tiempo y así demostrar la efectividad del método. En cuanto a los errores aleatorios difícilmente llegan a corregirse ya que no son fáciles de detectar por ser propios del método. 18

2.5.1 Parámetros de la Validación

Linealidad: Se define como la capacidad del método de asegurar que los resultados, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. 15

Exactitud: Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Precisión: Es la medida de la concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el método se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. 4

Reproducibilidad: Es la medida de la concordancia relativa, entre determinaciones independientes del activo bajo distintas condiciones (análisis, analistas, laboratorios, etc.) provenientes del muestreo de un material, en el cual el activo está distribuido de manera homogénea. 10

Límite de detección y cuantificación: El límite de detección es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser detectada. El límite de cuantificación es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud. 4

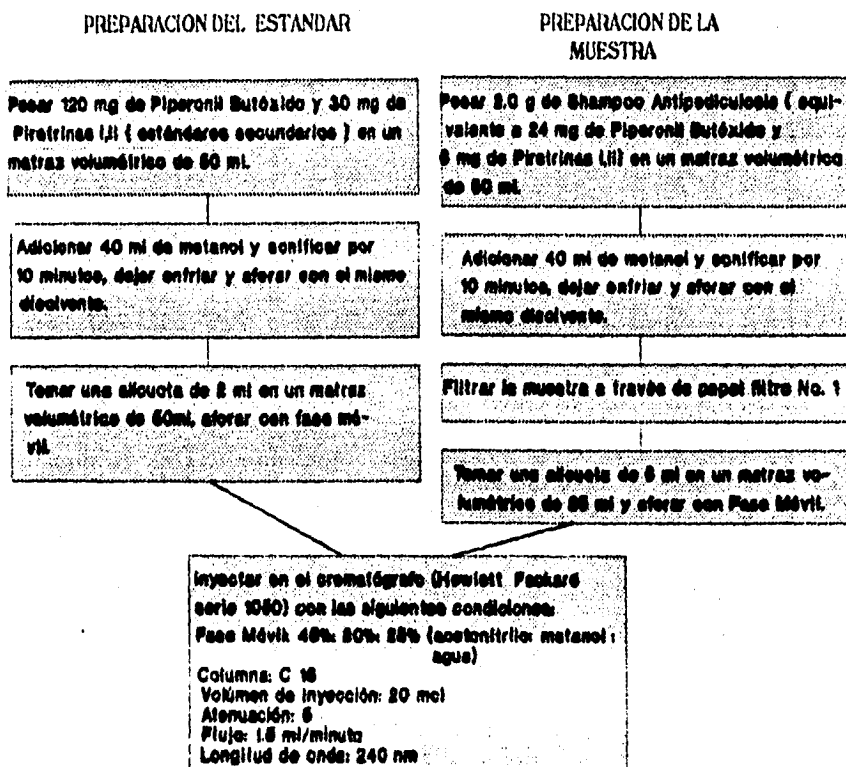
Especificidad: Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta medida únicamente a la sustancia de interés y que no interfiera con la cuantificación de la sustancia de interés.

Estabilidad de la muestra: Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar sus propiedades físicoquímicas y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse bajo distintas condiciones durante un tiempo preestablecido.

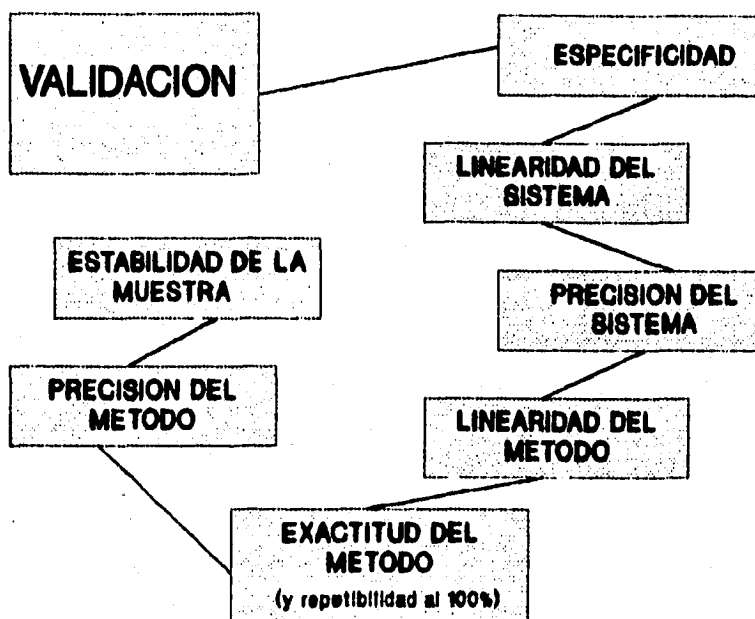
CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama de flujo 1: Cuantificación de Piretrinas I,II y Piperonil Butóxido por CLAR



3.1.1 Diagrama de flujo 2: Validación de un método analítico.



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 Material

- Matraces volumétricos de 25, 50 ml. (Pyrex)
- pipetas volumétricas de 2, 5 ml. (Pyrex)
- probeta graduada de 1000 ml. (Pyrex)
- papel filtro Whatman No.1, de 11 cm de diámetro. (Whatman)
- membrana tipo HVL.P de 0.45 micras. (Millipore)

3.2.2 Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC (Mallinckrodt)
- metanol grado HPLC (Baxter - Burdick & Jackson).
- piperonil butóxido (estándar secundario. Pureza 96.2 %).
- piretrinas I y II (estándar secundario. Pureza de piretrinas I 13.76 % , piretrinas II 11.72 %)

3.2.3 Equipo

Cromatógrafo de Líquidos Hewlett Packard serie 1050 con los siguientes módulos:

- programador de Disolventes: Hewlett Packard serie 1050 .
- bomba de disolventes con sistema de Desgasificación (Helio) : Hewlett Packard serie 1050 .
- detector UV - VIS: Hewlett Packard serie 1050 .
- inyector automático: Hewlett Packard serie 1050 .
- integrador: Hewlett Packard 3396 serie II .
- balanza analítica Mod Mettler AE 200
- ultrasonido: Branson Mod. 5200
- columna Nova - Pak C18 (Waters)

3.3 METODO ANALITICO

3.3.1 Fase Móvil

-Fase Móvil: Mezclar 300 ml de metanol, 450 ml de acetonitrilo y 250 ml de agua destilada .
Filtrar a través de una membrana tipo HVLP de 0.45 micras, degasificar por 5 minutos.

3.3.2 Preparación de Estándares

Pesar 120.0 mg de Piperonil Butóxido y 30 mg de Piretrinas I,II estándares de referencia, en un matraz volumétrico de 50 ml; adicionar 40 ml de metanol y sonificar por 10 minutos, dejar enfriar y aforar con el mismo disolvente. Tomar una alícuota de 2 ml en un matraz volumétrico de 50 ml y aforar con fase móvil. (concentración de Piperonil Butóxido = .096 mg/ml y de Piretrinas I,II = .024 mg/ml.)

3.3.3 Preparación de la Muestra

Homogeneizar el contenido de un frasco de Shampoo antiopiojos y pesar 2.0 g aproximadamente en un matraz volumétrico de 50 ml, adicionar 40 ml de metanol y sonificar por 10 minutos dejar enfriar y aforar; filtrar la muestra a través de papel Whatman No. 1, tomar una alícuota de 5 ml en un matraz de 25 ml y aforar con fase móvil. (Equivalente a 24 mg/ml de Piperonil Butóxido y 6 mg/ml de Piretrinas I,II)

3.3.4 Preparación de la Columna

Antes de iniciar el análisis pasar a través de la columna cromatográfica fase móvil con un flujo de 1.5 ml. por minuto durante 10 minutos.

3.3.5 Procedimiento de Análisis

- Columna : Nova - Pak C18 de 3.9 x 150 mm.
- fase móvil: 30% Metanol, 45 % Acetonitrilo y 25 % Agua.
- flujo: 1.5 ml. por minuto.
- velocidad de la carta 0.5 cm/min.
- longitud de onda: 240 nm.
- atenuación: 5
- THRS: 4
- volumen de inyección : 20 mcl.
- inyectar por duplicado 20 mcl de estándar y de cada muestra.
- tiempo de retención correspondiente a los activos de interés:
Tr de piretrina II : 2.496 minutos
Tr de piperonil Butóxido: 3.345 minutos
Tr de piretrina I: 5.239 minutos

Cálculos para determinar el % de piretrina I,II y piperonil Butóxido :

% de Piretrinas= $ABC\ mta\ 1 / ABC\ std \times C\ std / C\ mta\ 1 \times$ pureza del estándar.

% de Piperonil Butóxido = $ABC\ mta\ 2 / ABC\ std \times C\ std / C\ mta\ 2 \times$ pureza. del estándar.

en donde:

- ABC Mia 1 = area bajo la curva. de piretrinas I,II.
- ABC Std = area bajo la curva del estándar de piretrinas I y II.
- C std = concentración del estándar de piretrinas I,II.
- C mta 2 = concentración de la muestra de piretrinas I,II.
- ABC Mia 2 = area bajo la curva de piperonil butóxido.
- ABC Std = area bajo la curva del estándar de piperonil butóxido.
- C std = concentración del estándar de piperonil butóxido.
- C mta 2 = concentración de la muestra de piperonil butóxido.

3.3.6 Parámetros a Evaluar

Adecuabilidad del Sistema

Analizar un estándar de piretrinas I y II, piperonil butóxido, utilizando velocidad de carta de 2 cm. por minuto.

Establecer:

a) Número de platos teóricos de la columna para cada compuesto de interés, según la fórmula:

$$\text{Número de Platos Teóricos} = 5.5 \times (T_r / W_{1/2})^2$$

Donde:

T_r = Tiempo de retención en segundos

$W_{1/2}$ = Ancho de la base del pico, a una distancia media de la altura total del pico.

b) Factor de resolución entre piretrinas II y piperonil butóxido.

Factor de resolución entre piretrina I y piperonil butóxido.

$$\text{Factor de Resolución} = T_2 - T_1 / 1/2 (W_1 + W_2)$$

$T_2 - T_1$ = Distancia medida en milímetros desde el inicio de la corrida al máximo de cada pico.

$W_1 + W_2$ = Ancho de la base del pico, extendiendo los bordes de los lados hasta la línea base.

c) Factor de Asimetría de cada pico.

$$\text{Factor de asimetría} = W_{0.05} / 2f$$

Donde: $W_{0.05}$ = Ancho de la base del pico al 5% de su altura total.

f = Distancia medida del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico a un 5% de la altura partiendo de la línea base.

3.4 Especificidad del Sistema Cromatográfico

La especificidad del método se lleva a cabo de diferentes maneras dependiendo de su aplicación, en el caso de un método indicativo de estabilidad cuando no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones. La degradación debe ser tal que la concentración del activo en estudio esté disminuida por lo menos en un 25 % con respecto a la original. Las condiciones a las que el producto va hacer degradado son las siguientes:

I.- Colocar una muestra de:

- * producto terminado.
- * placebo.
- * estándar secundario de piretrinas I,II.
- * estándar secundario de piperonil butóxido.
- * estándar secundario de piretrinas I,II más estándar secundario de piperonil butóxido.

Cada una de estas muestras colocarlas a 60°C durante 20 días.

2.- Preparar las siguientes soluciones de tal manera que al final se llegue a la concentración que se estableció tanto para la muestra como para los estándares secundarios en el método desarrollado bajo las siguientes condiciones:

- * estándar secundario de piretrinas I,II con un pH entre 1-2 con HCl 1N.
- * estándar secundario de piretrinas I,II con un pH entre 10 - 12 con NaOH 1N.
- * estándar secundario de piperonil butóxido con un pH entre 1-2 con HCl 1N.
- * estándar secundario de piperonil butóxido con un pH entre 10 - 12 con NaOH 1N.
- * estándar secundario de piretrinas I,II más piperonil butóxido con un pH entre 1 - 2 con HCl 1N.
- * estándar secundario de piretrinas I,II más piperonil butóxido con un pH entre 10 - 12 NaOH 1N.

Colocar cada una de estas condiciones a 60°C durante 20 días.

3.- Preparar con peróxido de hidrógeno soluciones de:

- * estándar secundario de piretrinas I,II más piperonil butóxido a temperatura ambiente.
- * estándar secundario de piretrinas I,II más piperonil butóxido a 60°C por 20 días.
- * muestra de producto terminado a temperatura ambiente y a 60°C por 20 días.

Preparar cada una de las condiciones anteriores (1, 2, 3) como si fueran una muestra o estándar según sea el caso y analizarlas de acuerdo al método analítico establecido. Identificar la respuesta analítica de los principios activos.

CRITERIO:

El sistema será específico si no existe otro pico de algún otro compuesto que pudiera interferir con los picos de los principios activos de interés.

3.5 Parámetros de la Validación

PRECISION DEL SISTEMA

Analizar por sextuplicado una solución estándar al 100% de piretrinas I,II y piperonil butóxido.

CRITERIO:

Se considerará preciso el sistema si el coeficiente de variación es menor o igual a 1.5 %.

LINEARIDAD DEL SISTEMA

Preparar a partir de una solución patrón que contenga 24 mg de piretrinas I,II y 96 mg piperonil butóxido en un matraz de 100 ml, adicionar 40 ml de metanol grado HPLC sonificar por 10 minutos, enfriar y llevar a volumen con el mismo disolvente.

Tomar por triplicado de la solución patrón alícuotas de 2, 3, 4, 5, 6 (correspondientes a la concentración de 40 %, 60 %, 80 %, 100 %, 120 % respectivamente) transferirlos a un matraz de 50 ml y llevar al volumen con fase móvil y analizar.

Tabular para cada principio activo, el promedio del área bajo la curva contra la concentración de cada muestra y graficar. Calcular el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación y el coeficiente de variación.

CRITERIO:

Se considerará lineal el sistema si el coeficiente de correlación es mayor o igual a .99 %, y el coeficiente de determinación es mayor o igual a .98 %, el coeficiente de variación es menor o igual a 1.5%.

LINEARIDAD DEL METODO

Preparar una solución patrón que contenga 48 mg de piperonil butóxido y 12 mg de piretrinas I,II en un matraz volumétrico de 50 ml , adicionar 40 ml de metanol grado HPLC sonificar por 10 minutos, enfriar y llevar a volúmen con el mismo disolvente.

Tomar por triplicado de la solución patrón alícuotas de 4, 5, 6 ml (correspondientes a la concentración de 80 %, 100 %, 120% respectivamente) transferirlos a un matraz de 50 ml que contenga 394 mg de placebo, adicionar 30 ml de fase móvil sonificar por 10 min., enfriar y filtrar con papel filtro No. 1 y analizar cada muestra.

Tabular los mcg adicionados contra los mcg recuperados y el % de recobro y graficar los mcg recuperados contra los mcg adicionados. Calcular el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).

CRITERIO:

El método se considerará lineal si :

r^2 es mayor o igual a 0.98.

$m = 1$

$b = 0$

Cálculos para Linearidad del sistema y del método:

$$r = \left[\frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]} \right]^{1/2}$$

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

$$m = \frac{nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{nt(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{y - m(\sum x)}{nt}$$

$$\text{Coeficiente de variación} = \frac{\text{Desviación estándar} \times 100}{\bar{x}}$$

Donde:

- n = Número de repeticiones.
- x = Cantidad adicionada.
- y = Cantidad recuperada.
- t = Número de cantidades adicionadas.
- m = Pendiente.
- b = Ordenada al origen.
- r = Coeficiente de correlación.
- r² = Coeficiente de determinación.
- \bar{x} = Media

EXACTITUD DEL METODO Y (REPETIBILIDAD AL 100 %)

Preparar 6 muestras con placebos cargados de manera independiente, adicionando en cada uno 120 mg de Piperonil Butóxido, 30 mg de Piretrinas I,II y 394 mg de placebo. Adicionar 40 ml de fase móvil sonificar por 10 minutos, enfriar y llevar a volúmen con el mismo disolvente. Filtrar con papel filtro No. 1 y analizar cada muestra.

CRITERIO:

El método se considerará exacto si el coeficiente de variación es menor o igual 3%, y el porcentaje recuperado debe estar entre 97 - 103%.

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Proveer una muestra de producto terminado a dos analistas, para que se analice por triplicado y en dos días diferentes. Calcular el coeficiente de variación de los resultados que se obtengan.

CRITERIO:

El método se considerará reproducible si el coeficiente de variación es menor o igual 2 %.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Preparar 6 muestras de producto terminado, guardar 3 de las muestras ya filtradas a temperatura ambiente por 24, 48 y 72 horas, y 3 a refrigeración por 24, 48 y 72 horas. Analizar las 6 muestras a temperatura ambiente a las 0, 24, 48, 72 horas, y las de refrigeración a las 24, 48 y 72 horas de preparadas.

CRITERIO:

Las muestras son estables si el intervalo de confianza para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero. Y si el valor de la media para el factor I se encuentra entre 98 - 102 %

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Adecuabilidad del Sistema Cromatográfico

Se desarrolló un cromatograma de estándar secundario de piretrinas I, II y piperonil butóxido, a una velocidad de carta de 2 cm por minuto. Se calcularon el número de platos teóricos para cada compuesto, los factores de resolución entre piperonil butóxido y piretrina I ; entre piperonil butóxido y piretrina II, el factor de asimetría de cada pico de interés. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

4.1.1 Número de Platos Teóricos para:

I) Piretrina I:

Altura del pico = 1.3 cm
Ancho del pico ($W_{1/2}$) = 6 mm
Tiempo de retención (segundos) = 271.38 seg
Número de Platos Teóricos = 11251.641

II) Piretrina II:

Altura del pico = 2.8 cm
Ancho del pico ($W_{1/2}$) = 4 mm
Tiempo de retención (segundos) = 131.1 seg
Número de platos teóricos = 5908.1034

III) Piperonil Butóxido:

Altura del pico = 14.3 cm
Ancho del pico ($W_{1/2}$) = 4 mm
Tiempo de Retención (segundos) = 175.50 seg
Número de Platos teóricos = 10587.586

4.1.2 Factor de Resolución (R) :

| | Ancho de Base | Distancia al máximo del pico. | Resolución |
|--------------------|---------------|-------------------------------|------------|
| Piretrina II | 4.0 mm | 45 mm | 3.33 |
| Piperonil Butóxido | 6.0 mm | 60 mm | |
| Piretrina I | 4.0 mm | 91 mm | 6.66 |

Cuadro 1.- Factores de resolución entre Piretrina II y Piperonil Butóxido, Piretrina I y Piperonil Butóxido.

4.1.3 Factor de Asimetría :

| | t | Ancho de Base (al 5 %) | Factor de Asimetría |
|--------------------|--------|--------------------------|---------------------|
| Piretrina I | 0.3 mm | 0.70 mm | 1.12 |
| Piperonil Butóxido | 0.4 mm | 0.90 mm | 1.25 |
| Piretrina II | 0.4 mm | 10.0 mm | 1.16 |

Cuadro 2.- Factores de asimetría de Piretrina I, Piperonil Butóxido y Piretrina II.

4.1.4 Cromatogramas Obtenidos del método analítico

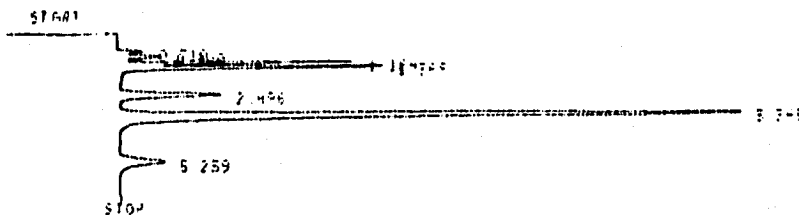
Los cromatogramas que aquí se presentan son los que se obtuvieron del desarrollo del método analítico preparando un estándar y muestra de Producto terminado al 100 %, para demostrar la separación de los activos de interés. Así como placebo a temperatura ambiente.

Los Tiempos de retención correspondientes a los compuesto de interés son los siguientes:

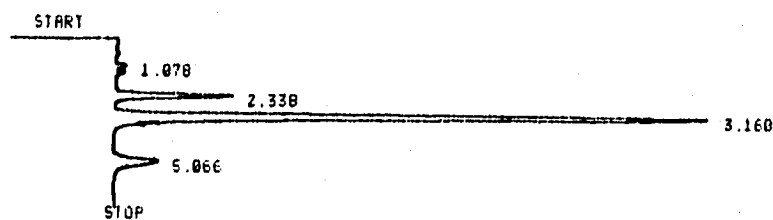
Piretrina II : 2.496 minutos

Piperonil Butóxido : 3.345 minutos

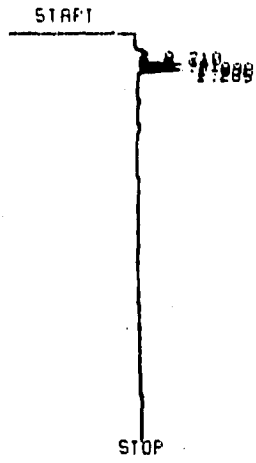
Piretrina I : 5.239 minutos



Producto terminado a temperatura ambiente.



Estándar secundario de Piretrina I,II y Piperonil Butóxido a temperatura ambiente.



Placebo a temperatura ambiente.

4.2 Especificidad del Sistema Cromatográfico

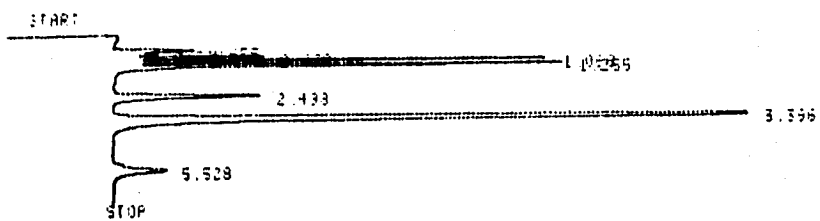
De acuerdo a las condiciones en que se degradaron las muestras como se indicó en el punto 3.4 se muestran a continuación los cromatogramas obtenidos indicando cada uno con el inciso correspondiente:

- A) Muestra de Producto terminado.
- B) Placebo.
- C) Estándar secundario de Piretrinas I,II.
- D) Estándar secundario de Piperonil Butóxido.
- E) Estándar secundario de Piretrinas I,II más Piperonil Butóxido.

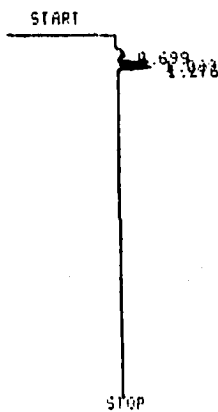
- F) Solucion de Piretrinas I,II con HCl 1N.
- G) Solucion de Piretrinas I,II con NaOH 1N.
- H) Solucion de Piperonil Butóxido con HCl 1N.
- I) Solucion de Piperonil Butóxido con NaOH 1N.
- J) Soluciones de Piretrinas I,II más Piperonil Butóxido con HCl 1N.
- K) Soluciones de Piretrinas I,II más Piperonil Butóxido con NaOH 1N.

- L) Solución de Piretrinas I,II más Piperonil Butóxido con peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente.
- M) Solución de Piretrinas I,II más Piperonil Butóxido con peróxido de hidrógeno a 60°C.
- N) Producto terminado con peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente.
- O) Producto terminado con peróxido de hidrógeno a 60°C durante 20 dias.

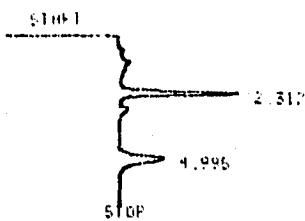
CROMATOGRAMAS DE ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO:



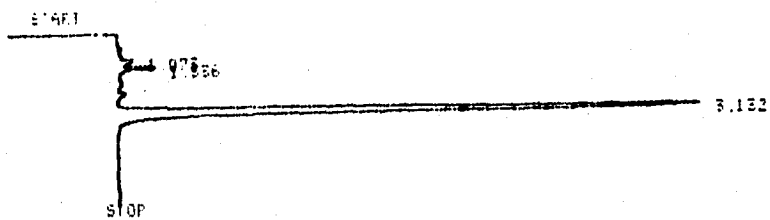
A) Muestra de producto terminado a 60°C.



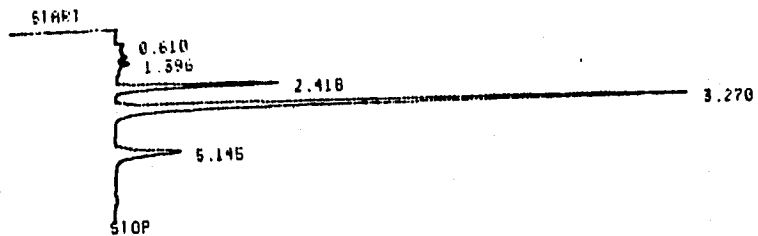
B) Placebo a 60°C



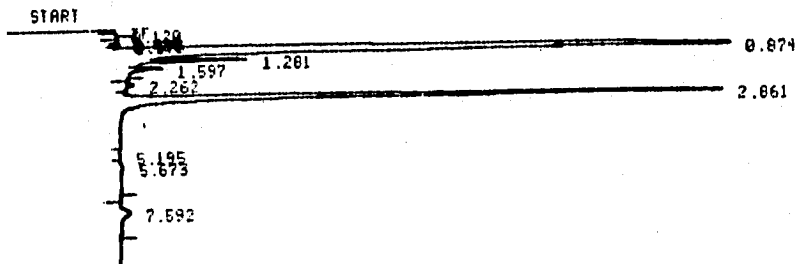
C) Estándar secundario de Piretrina II a 60°C.



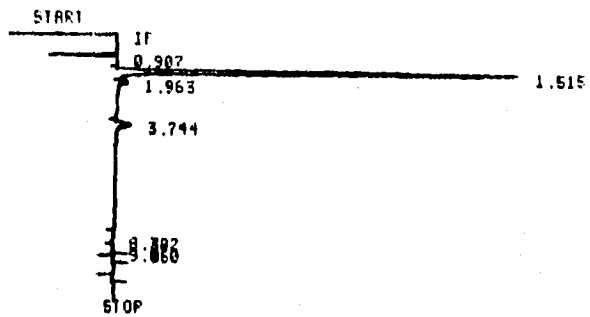
D) Estándar secundario de Piperonil Butóxido a 60°C.



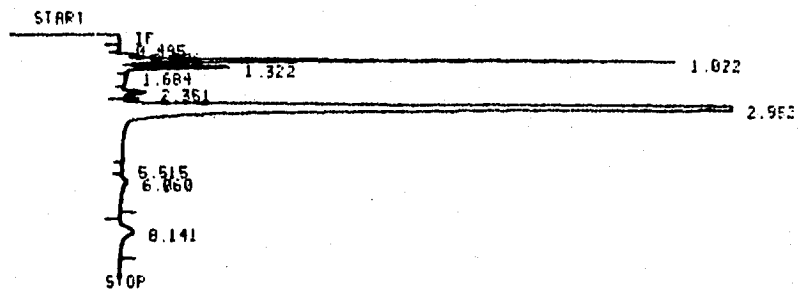
E) Estándar secundario de Piretrinas I,II más Piperonil Butóxido a 60°C.



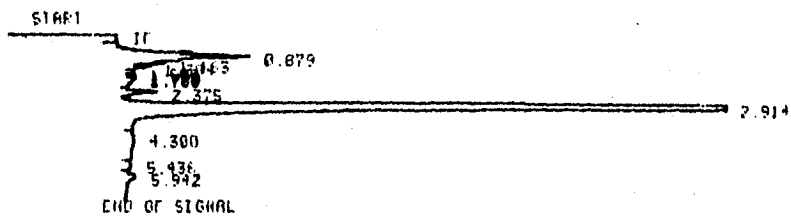
F) Solución de Piretrinas I,II con HCl 1N a 60°C.



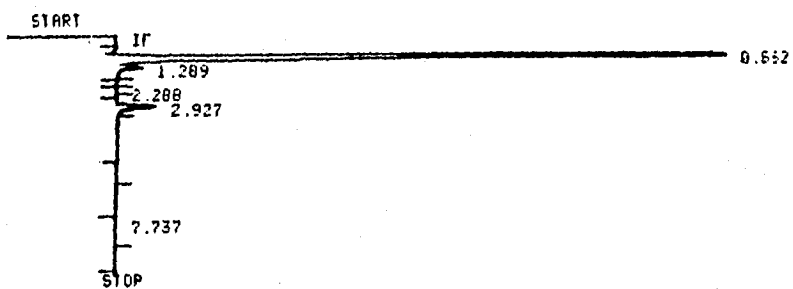
G) Solución de Piretrinas I,II con NaOH 1N a 60°C



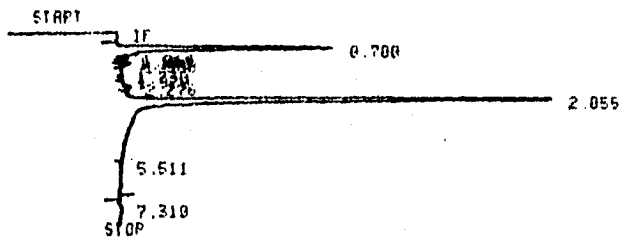
H) Solución de Piperonil Butóxido con HCl 1N a 60°C.



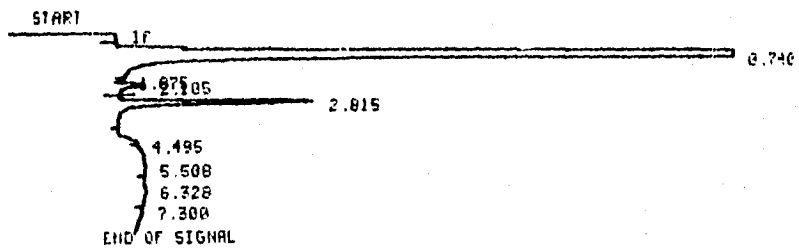
I) Solución de Piperonil Butóxido con NaOH 1N a 60°C.



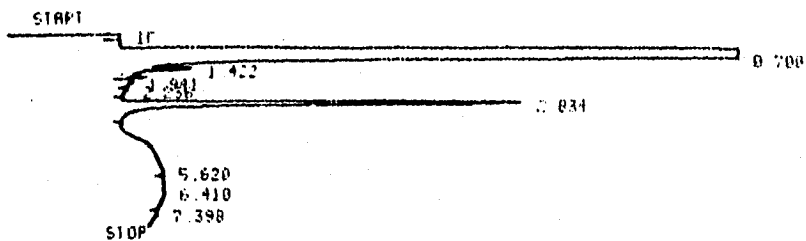
J) Solución de Piretrinas (II más Piperonil Butóxido con HCl 1N a 60°C.



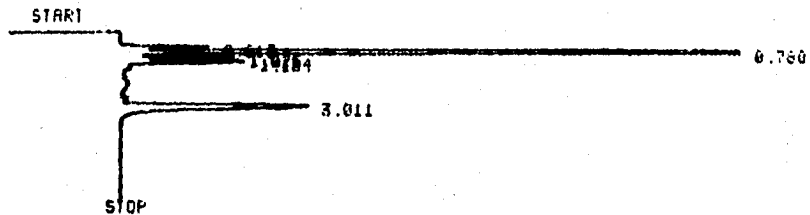
K) Solución de Piretrinas I,II más Piperonil Butóxido con NaOH N a 80°C.



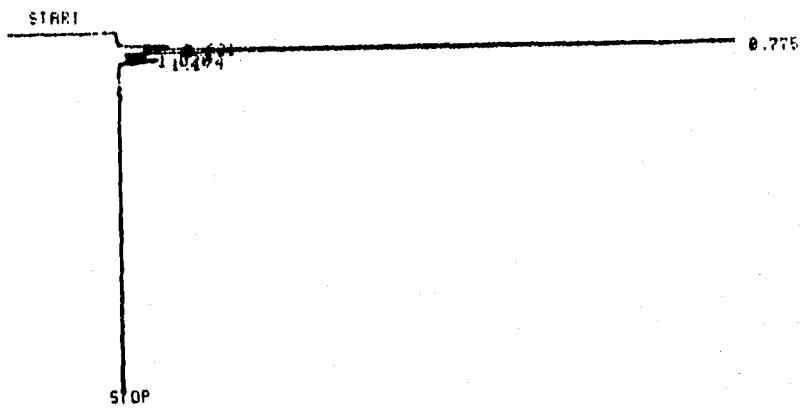
L) Solución de Piretrinas I,II más Piperonil Butóxido con peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente.



M) Solución de Piretrinas IJI más Piperoni Butóxido con peróxido de hidrógeno a 60°C.



N) Producto terminado con peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente



O) Producto terminado con peróxido de hidrógeno a 60°C

4.3 Precisión del Sistema

Se analizó por sextuplicado una solución estándar de Piretrinas I,II y Piperonil Butóxido. Se calculó el coeficiente de variación de las áreas obtenidas de cada uno de los compuestos. Obteniéndose el siguiente resultado:

| Porcentaje | Area Bajo la Curva | | |
|-------------|--------------------|-------------|--------------|
| | Piperonil Butóxido | Piratrina I | Piratrina II |
| 100 % | 3386184 | 376619 | 518660 |
| 100 % | 3410876 | 380253 | 522639 |
| 100 % | 3430032 | 380211 | 526491 |
| 100 % | 3466474 | 365338 | 529841 |
| 100 % | 3477064 | 367861 | 532565 |
| 100 % | 3500666 | 393627 | 536347 |
| \bar{X} = | 3443531 | 364001 | 527757.17 |
| D.E = | 42742.589 | 6122.3617 | 6605.4578 |
| C.V = | 1.24 % | 1.69 % | 1.23 % |

Cuadro 3.- Precisión del sistema cromatográfico.

4.4 Linearidad del Sistema

Se determinó a partir de una solución patrón de Piretrinas I, II y Piperonil Butóxido, preparando soluciones que contengan concentraciones correspondientes al 40 %, 60 %, 80 %, 100 %, 120 % de principio activo. Se calcularon los coeficientes de correlación y determinación para cada compuesto así como el coeficiente de variación. El análisis se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos son los siguientes:

| PIPERONIL BUTOXIDO | | |
|--------------------|----------------------|---------|
| Porcentaje | Concentración mcg/ml | Area |
| 40 % | 38.56 | 1252067 |
| 40 % | 38.56 | 1198592 |
| 40 % | 38.56 | 1219413 |
| 60 % | 57.84 | 1831249 |
| 60 % | 57.84 | 1601762 |
| 60 % | 57.84 | 1627695 |
| 60 % | 77.12 | 2411957 |
| 80 % | 77.12 | 2400653 |
| 80 % | 77.12 | 2475054 |
| 100 % | 96.40 | 3029109 |
| 100 % | 96.40 | 3022682 |
| 100 % | 96.40 | 3059024 |
| 120 % | 115.68 | 3661061 |
| 120 % | 115.68 | 3670370 |
| 120 % | 115.68 | 3687254 |

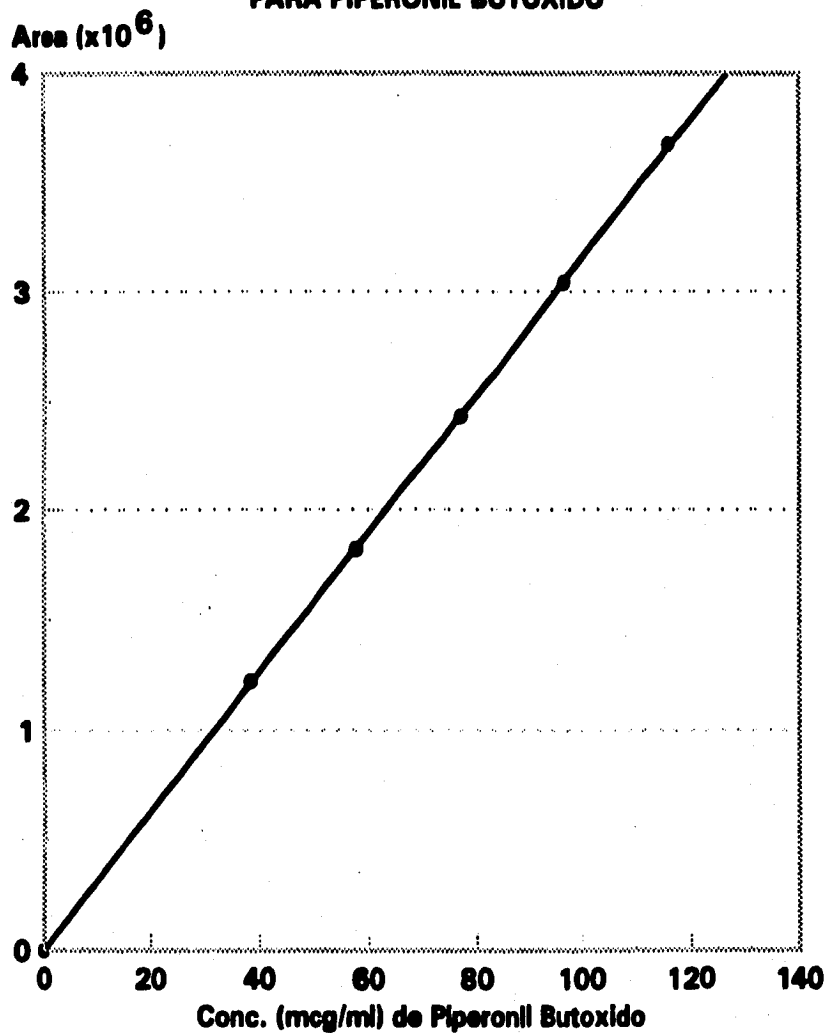
Cuadro 4.- Linearidad del sistema para Piperonil Butóxido.

COEFICIENTE DE CORRELACION: .9993

COEFICIENTE DE DETERMINACION: .9988

COEFICIENTE DE VARIACION: 1.19%

**LINEARIDAD DEL SISTEMA
PARA PIPERONIL BUTOXIDO**



Gráfica 1.- Linealidad del sistema para Piperonil Butoxido.

LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA PIRETRINA I

| PIRETRINA I | | |
|--------------------|-----------------------------|-------------|
| Porcentaje | Concentración mcg/ml | Area |
| 40 % | 10.96 | 163618 |
| 40 % | 10.96 | 158293 |
| 40 % | 10.96 | 159940 |
| 60 % | 16.44 | 236394 |
| 60 % | 16.44 | 242043 |
| 60 % | 16.44 | 242577 |
| 80 % | 21.92 | 326030 |
| 80 % | 21.92 | 316215 |
| 80 % | 21.92 | 326548 |
| 100 % | 27.40 | 401267 |
| 100 % | 27.40 | 402402 |
| 100 % | 27.40 | 410820 |
| 120 % | 32.88 | 490197 |
| 120 % | 32.88 | 491703 |
| 120 % | 32.88 | 492104 |

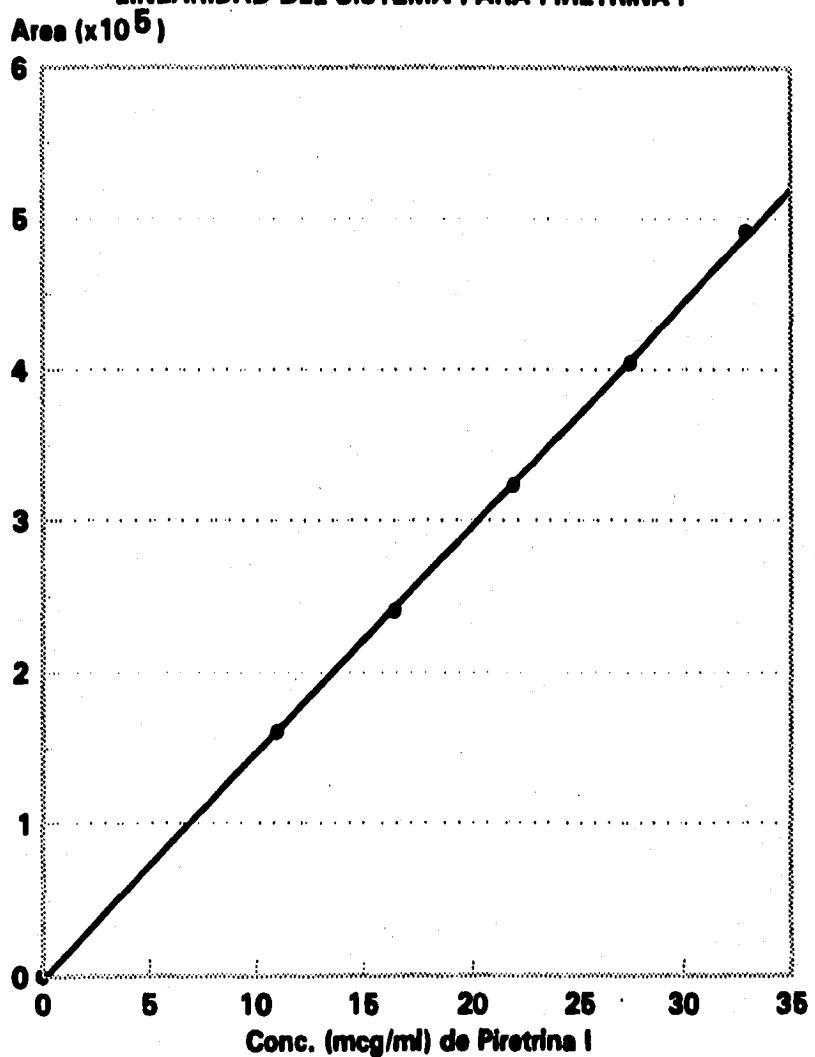
Cuadro 5.- Linealidad del sistema para Piretrina I.

COEFICIENTE DE CORRELACION: 1.0013

COEFICIENTE DE DETERMINACION: 1.0025

COEFICIENTE DE VARIACION: 1.16%

LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA PIRETRINA I



Gráfica 2.- Linearidad del sistema para Piretrina I

LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA PIRETRINA II

| PIRETRINA II | | |
|---------------------|-----------------------------|-------------|
| Porcentaje | Concentración mcg/ml | Area |
| 40 % | 10.96 | 227076 |
| 40 % | 10.96 | 222656 |
| 40 % | 10.96 | 223600 |
| 60 % | 16.44 | 333466 |
| 60 % | 16.44 | 327756 |
| 60 % | 16.44 | 329656 |
| 60 % | 21.92 | 441062 |
| 80 % | 21.92 | 437066 |
| 80 % | 21.92 | 466626 |
| 100 % | 27.40 | 660072 |
| 100 % | 27.40 | 647664 |
| 100 % | 27.40 | 667146 |
| 120 % | 32.88 | 676616 |
| 120 % | 32.88 | 661037 |
| 120 % | 32.88 | 676163 |

Cuadro 6.- Linealidad del sistema para Piretrina II.

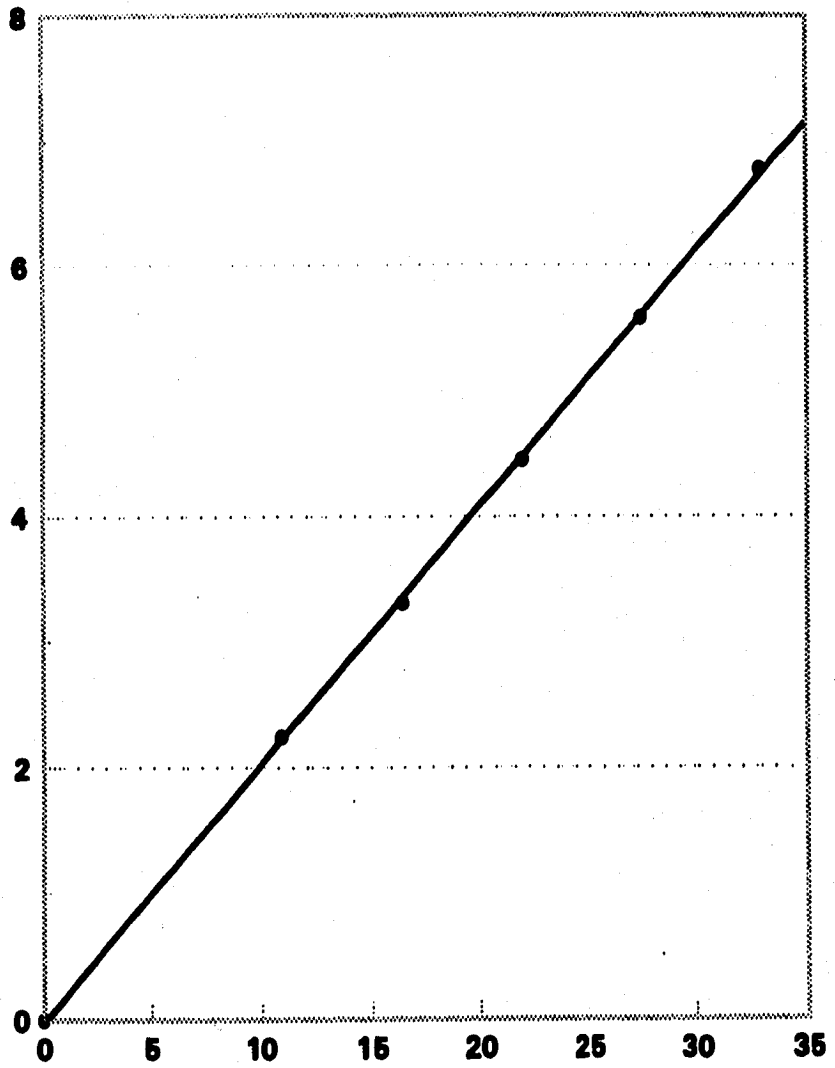
COEFICIENTE DE CORRELACION: .9986

COEFICIENTE DE DETERMINACION: .9975

COEFICIENTE DE VARIACION: 1.50%

LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA PIRETRINA II

Area ($\times 10^5$)



Gráfica 3.- Linealidad del sistema para Piretrina II

4.5 Linealidad del Método

A partir de una solución patrón se determinó la linealidad del método preparando soluciones por triplicado que contengan una concentración de 80%, 100%, 120% de cada uno de los principios activos (Piretrinas I,II y Piperonil Butóxido). Se tabularon los mcg/ml adicionados contra los mcg/ml recuperados y el porcentaje de recobro.

Se calculó el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b). Los resultados obtenidos son los siguientes.

| PIPERONIL BUTOXIDO | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Concentración | mcg/ml adicionada | mcg/ml recuperada | % de recobro |
| 80.0 % | 81.92 | 83.18 | 101.5580 |
| 80.0 % | 81.92 | 82.78 | 101.0620 |
| 80.0 % | 81.92 | 84.09 | 102.6657 |
| | $\bar{x} = 81.92$ | $\bar{x} = 83.35$ | $\bar{x} = 101.7619$ |
| 100.0 % | 102.40 | 102.70 | 100.3059 |
| 100.0 % | 102.40 | 103.60 | 101.1863 |
| 100.0 % | 102.40 | 104.67 | 102.2218 |
| | $\bar{x} = 102.40$ | $\bar{x} = 103.66$ | $\bar{x} = 101.2380$ |
| 120.0 % | 122.80 | 127.30 | 103.7060 |
| 120.0 % | 122.80 | 125.70 | 102.3807 |
| 120.0 % | 122.80 | 129.90 | 106.1227 |
| | $\bar{x} = 122.80$ | $\bar{x} = 127.33$ | $\bar{x} = 102.7364$ |

Cuadro 7.- Linealidad del método para Piperonil Butóxido

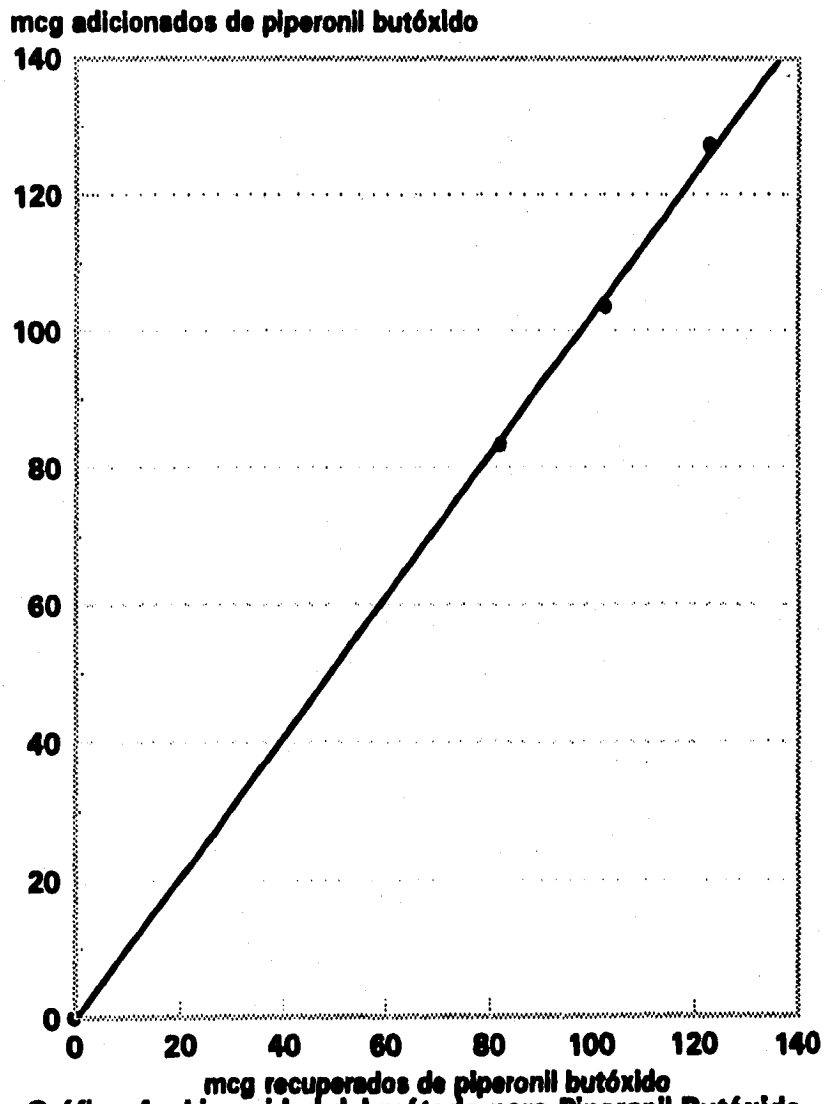
INTERCEPTO (b): -5.5592

PENDIENTE (m): 1.0759

COEFICIENTE DE DETERMINACION : .9951

COEFICIENTE DE VARIACION : 1.44%

**LINEARIDAD DEL METODO
PARA PIPERONIL BUTOXIDO**



Gráfica 4.- Linearidad del método para Piperonil Butóxido

LINEARIDAD DEL METODO PARA PIRETRINA I

| PIRETRINA I | | | |
|---------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Concentración | mcg/ml adicionados | mcg/ml recuperados | % de recobro |
| 80.0 % | 21.44 | 21.25 | 98.6151 |
| 80.0 % | 21.44 | 21.18 | 98.8131 |
| 80.0 % | 21.44 | 21.54 | 100.2021 |
| | $\bar{x} = 21.44$ | $\bar{x} = 21.33$ | $\bar{x} = 99.2101$ |
| 100.0 % | 26.80 | 26.41 | 98.5648 |
| 100.0 % | 26.80 | 26.66 | 99.4657 |
| 100.0 % | 26.80 | 26.85 | 100.2261 |
| | $\bar{x} = 26.80$ | $\bar{x} = 26.64$ | $\bar{x} = 99.4255$ |
| 120.0 % | 32.16 | 32.58 | 101.0075 |
| 120.0 % | 32.16 | 32.06 | 99.6990 |
| 120.0 % | 32.16 | 33.16 | 103.1150 |
| | $\bar{x} = 32.16$ | $\bar{x} = 32.60$ | $\bar{x} = 101.2738$ |

Cuadro 8.- Linealidad del método para Piretrina I.

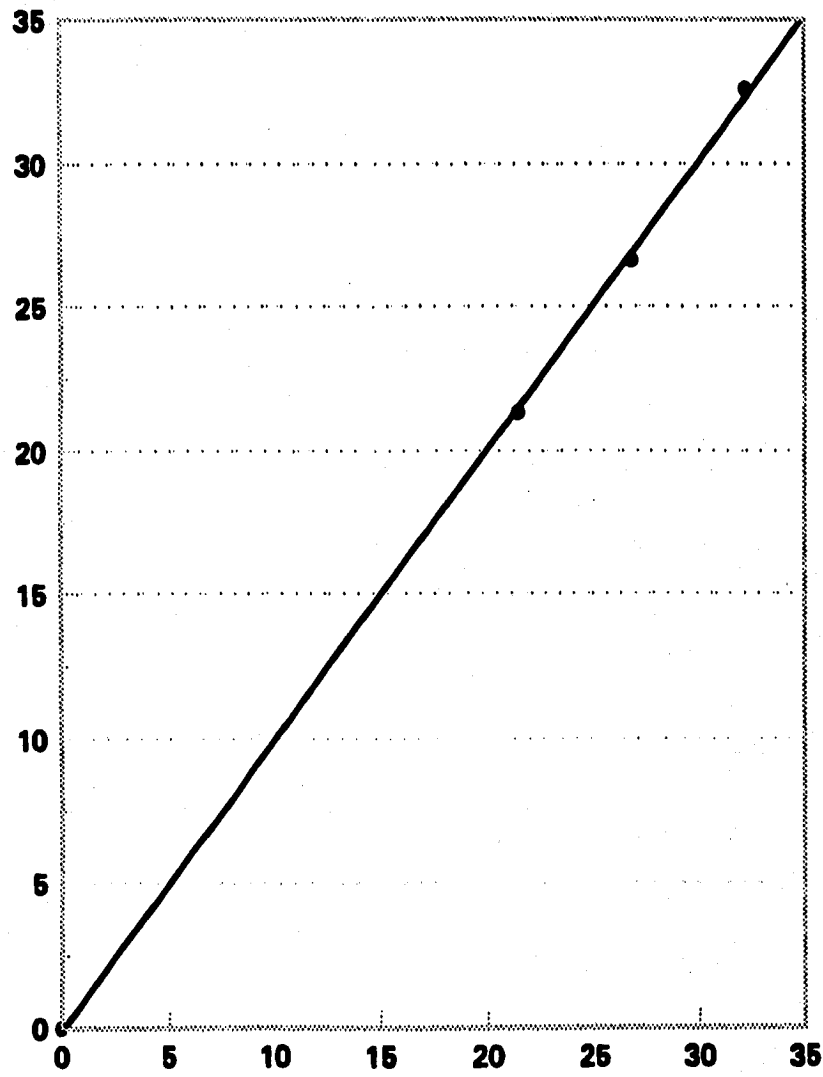
INTERCEPTO (b): 1.3089

PENDIENTE (m): 1.0510

COEFICIENTE DE DETERMINACION: .9919

COEFICIENTE DE VARIACION: 1.43%

LINEARIDAD DEL METODO PARA PIRETRINA I
mcg adicionados de piretrina I



Gráfica 5.- Linearidad del método para Piretrina I

LINEARIDAD DEL METODO PARA PIRETRINA II

| PIRETRINA II | | | |
|---------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Concentración | mcg/ml adicionados | mcg/ml recuperados | % de recobro |
| 80.0 % | 21.44 | 21.68 | 101.1518 |
| 80.0 % | 21.44 | 21.68 | 101.1254 |
| 80.0 % | 21.44 | 22.12 | 103.2100 |
| | $\bar{x} = 21.44$ | $\bar{x} = 21.82$ | $\bar{x} = 101.8290$ |
| 100.0 % | 26.80 | 26.69 | 99.6086 |
| 100.0 % | 26.80 | 27.05 | 101.0808 |
| 100.0 % | 26.80 | 27.33 | 102.1392 |
| | $\bar{x} = 26.80$ | $\bar{x} = 27.02$ | $\bar{x} = 100.9426$ |
| 120.0 % | 32.16 | 32.78 | 101.9394 |
| 120.0 % | 32.16 | 33.72 | 104.8632 |
| 120.0 % | 32.16 | 33.85 | 105.2712 |
| | $\bar{x} = 32.16$ | $\bar{x} = 33.45$ | $\bar{x} = 104.0246$ |

Cuadro 9.- Linealidad del método para Piretrina II.

INTERCEPTO (b) - 1.6250

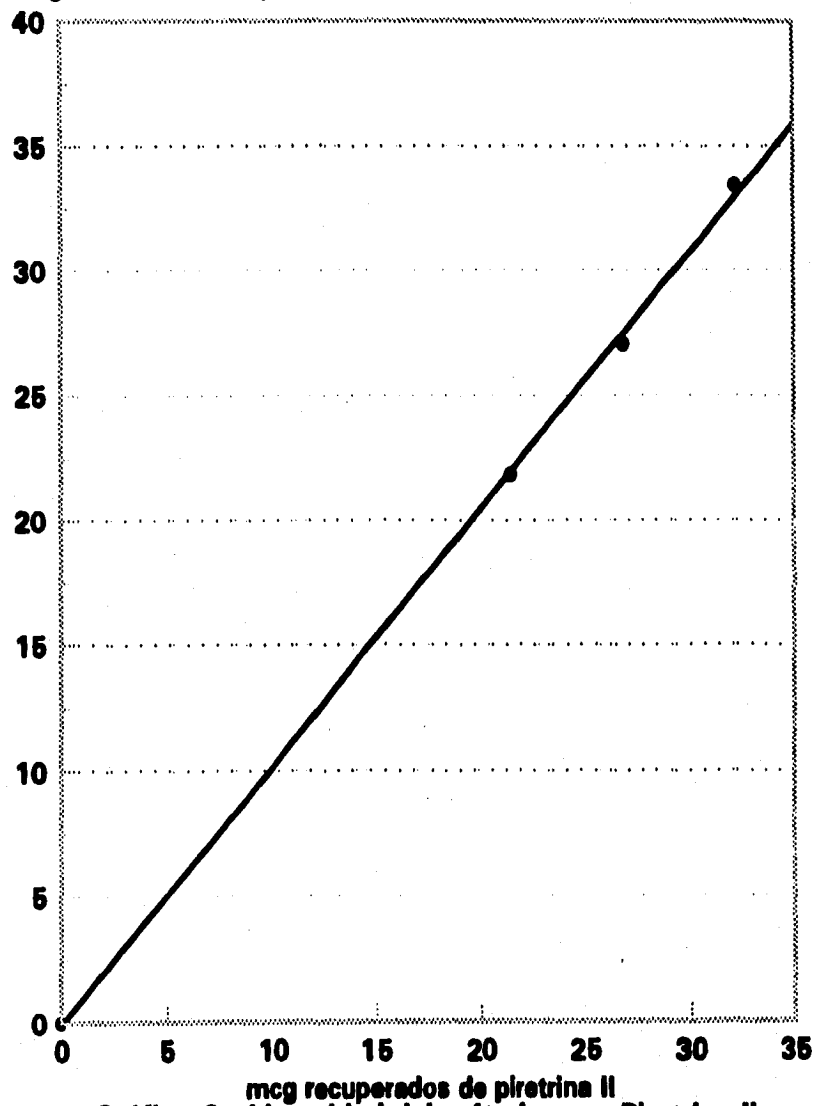
PENDIENTE (m) 1.0843

COEFICIENTE DE DETERMINACION .9913

COEFICIENTE DE VARIACION 1.82%

LINEARIDAD DEL METODO PARA PIRETRINA II

mcg adicionados de piretrina II



Gráfica 6.- Linealidad del método para Piretrina II

4.6 Exactitud del Método

Se prepararon 6 muestras con placebos cargados de manera independiente con Piretrina I, II, Piperonil Butóxido y Placebo. Se calculó el coeficiente de variación y el porcentaje recuperado para cada uno de los activos. Los resultados se presentan en los siguientes cuadros:

| PIPERONIL BUTOXIDO | | | |
|--------------------|--------------------|-----------------|----------------------|
| mcg adicionados | Area Bajo la Curva | mcg recuperados | % recuperado |
| 96.16 | 3125393 | 95.7080 | 99.5334 |
| 98.32 | 3230599 | 98.9295 | 100.8236 |
| 98.48 | 3220087.5 | 98.8080 | 100.1333 |
| 99.20 | 3248055 | 99.4579 | 100.2699 |
| 100.24 | 3249265.5 | 99.4982 | 99.2663 |
| 98.60 | 3231849 | 98.9683 | 102.2432 |
| | | | \bar{X} = 100.3449 |
| | | | C.V = 1.05 % |

Cuadro 10.- Exactitud del método para Piperonil Butóxido.

EXACTITUD DEL MÉTODO PARA PIRETRINA I Y II

| PIRETRINA I | | | |
|-----------------|--------------------|-----------------|----------------------|
| mcg adicionados | Area Bajo la Curva | mcg recuperados | % recuperado |
| 26.00 | 379654 | 25.8206 | 99.3172 |
| 26.68 | 380710 | 26.8931 | 100.8346 |
| 26.68 | 383244 | 26.0862 | 101.8056 |
| 25.76 | 383163.6 | 26.0588 | 101.1691 |
| 26.12 | 370907.6 | 26.2256 | 100.4262 |
| 24.96 | 381504.6 | 25.9683 | 104.0414 |
| | | | $\bar{x} = 101.2160$ |
| | | | C.V. = 1.65 % |

Cuadro 11.- Exactitud del método para Piretrina I.

| PIRETRINA II | | | |
|-----------------|--------------------|-----------------|---------------------|
| mcg adicionados | Area Bajo la Curva | mcg recuperados | % recuperado |
| 26.00 | 626166 | 25.2902 | 97.2766 |
| 26.68 | 626819 | 26.3230 | 98.6110 |
| 26.68 | 629739 | 26.4617 | 99.1676 |
| 26.76 | 627422.6 | 26.3604 | 98.4174 |
| 26.12 | 609644.6 | 24.4970 | 97.6229 |
| 24.96 | 623497 | 25.1821 | 100.8166 |
| | | | $\bar{x} = 98.6336$ |
| | | | C.V. = 1.29 % |

Cuadro 12.- Exactitud del método para Piretrina II.

4.7 Reproducibilidad del Método

Se analizó una muestra de producto terminado por triplicado en dos días diferentes por dos analistas. Se calculó el coeficiente de variación para Piretrinas I,II y Piperonil Butóxido. Los resultados se presentan en los siguientes cuadros:

| PIPERONIL BUTOXIDO | | |
|-----------------------------------|------------|------------|
| | Analista 1 | Analista 2 |
| Día 1 | 95.59 % | 94.34 % |
| | 96.20 % | 93.95 % |
| | 97.11 % | 96.45 % |
| Día 2 | 96.37 % | 94.23 % |
| | 96.55 % | 95.57 % |
| | 96.75 % | 94.25 % |
| Coeficiente de variación = 1.65 % | | |

Cuadro 13.- Reproducibilidad del método para Piperonil Butóxido.

| PIRETRINA I,II | | |
|---|------------------|------------------|
| | Analito 1 | Analito 2 |
| Día 1 | 24.62 % | 25.35 % |
| | 25.55 % | 25.57 % |
| | 25.55 % | 25.24 % |
| Día 2 | 24.53 % | 25.45 % |
| | 24.62 % | 25.31 % |
| | 25.06 % | 24.55 % |
| Coefficiente de variación = 2.06 % | | |

Cuadro 14.- Reproducibilidad del método para Piretrinas I,II

4.8 Estabilidad de la Muestra

Se analizaron 6 muestras de producto terminado a Temperatura Ambiente por 24, 48 y 72 horas y a refrigeración por 24, 48 y 72 horas.

La muestra será estable si:

- 1) El intervalo de confianza incluye el valor de cero para cada una de las condiciones analizadas.
- 2) La media del Factor I se encuentre entre 98 - 102 % para cada una de las condiciones analizadas.

Los resultados se presentan en los siguientes cuadros:

| PIPERONIL BUTOXIDO | | |
|--------------------|------------------------|----------|
| CONDICION/TIEMPO | INTERVALO DE CONFIANZA | FACTOR I |
| T.A / 24 horas | - .4989 a 3.6778 | 101.48 % |
| T.A / 48 horas | 3.7663 a 6.2736 | 104.97 % |
| T.A / 72 horas | .2151 a 1.5840 | 100.88 % |

Cuadro 15.- Intervalo de confianza y Factor I para Piperonil Butóxido a Temperatura Ambiente

| PIPERONIL BUTOXIDO | | |
|--------------------|------------------------|----------|
| CONDICION/TIEMPO | INTERVALO DE CONFIANZA | FACTOR I |
| T.A / 24 horas | - 1.4481 a 7.7281 | 103.10 % |
| T.A / 48 horas | .9473 a 2.6926 | 101.76 % |
| T.A / 72 horas | - .1480 a 2.6050 | 101.17 % |

Cuadro 16.- Intervalo de confianza y Factor I para Piperonil Butóxido a Refrigeración.

| PIRETRINA I,II | | |
|------------------|------------------------|----------|
| CONDICION/TIEMPO | INTERVALO DE CONFIANZA | FACTOR I |
| T.A / 24 horas | - .6044 a .6044 | 100.36 % |
| T.A / 48 horas | .1864 a 1.1136 | 102.40 % |
| T.A / 72 horas | - 1.4304 a 1.1604 | 99.45 % |

Cuadro 17.- Intervalo de confianza y Factor I para Piratrina I,II a Temperatura Ambiente.

| PIRETRINA I,II | | |
|------------------|------------------------|----------|
| CONDICION/TIEMPO | INTERVALO DE CONFIANZA | FACTOR I |
| T.A / 24 horas | - .2905 a 1.6905 | 102.98 % |
| T.A / 48 horas | - 1.6163 a -.2036 | 96.75 % |
| T.A / 72 horas | .02626 a .02620 | 98.95 % |

Cuadro 18.- Intervalo de confianza y Factor I para Piratrina I,II a Refrigeración.

4.9 Análisis de Resultados

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

En base a los resultados obtenidos del Número de Platos Teóricos para piretrina I,II y piperonil butóxido se establece que el sistema es adecuado demostrando así la eficiencia de la columna al obtener los siguientes resultados:

Para piretrina I : 11251.641

Para piretrina II: 5908.1034

Para piperonil butóxido: 10587.586

El factor de resolución entre piretrina II y piperonil butóxido se considerará aceptable ya que el valor obtenido es de 3.33. Entre piperonil butóxido y piretrina I la resolución también es aceptable porque el valor obtenido es de 6.88, estableciéndose que la separación que se lleva a cabo entre cada uno de los activos es satisfactoria. Al obtenerse un factor de resolución mayor a 1.

El factor de asimetría indica una deformación de los mismos, considerando que el valor no debe ser mayor a 1.2 el resultado que se obtuvo para piretrinas I es de 1.12, para piretrina II es de 1.16 el valor obtenido se demuestra que es menor al valor teórico por lo tanto se consideran simétricos, en el caso de piperonil butóxido el valor obtenido es de 1.25 la asimetría es muy ligera pero no interfiere con el resultado del análisis.

ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

En base a los cromatogramas obtenidos de la especificidad del sistema, al analizar las muestras a diferentes condiciones:

Muestra de producto terminado

Placebo

Estándar secundario de piretrinas I,II

Estándar secundario de piperonil butóxido

Estándar secundario de piretrinas I,II más piperonil butóxido

Cada una de estas muestras se colocó a 60°C, determinando que los picos de los posibles productos de degradación no interfieren con los picos de los activos de interés.

En el caso de las soluciones que se prepararon de cada estándar piretrinas I,II y piperonil butóxido por separado o en conjunto con NaOH 1N y HCl 1N a 60°C, se determinó que los picos de los posibles productos de degradación no interfieren con los picos de los activos de interés.

Las soluciones de piretrinas I,II más piperonil butóxido con peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente y a 60°C presentan una ligera inestabilidad de la línea base debido a una alteración en la estabilidad del sistema sin que afecte la especificidad del método.

Las piretrinas se oxidan con el peróxido de hidrógeno por lo tanto en los cromatogramas correspondientes de producto terminado a temperatura ambiente y a 60°C solo se observa el pico de piperonil butóxido.

Demostrando así, que el método es específico y que sirve para ser Indicativo de Estabilidad por que los productos de degradación no interfieren con los correspondientes picos de interés.

PRECISION DEL SISTEMA

En base al resultado obtenido de piretrina I cuyo coeficiente de variación es de 1.59%, para piretrina II de 1.23% y para piperonil butóxido de 1.24%. Tomando en cuenta que el coeficiente de variación no debe ser mayor a 1.5 el sistema se considerará preciso. En el caso de piretrina I el coeficiente de variación que se obtuvo es de 1.59% considerándose que la diferencia que se tiene es de .09 con respecto al valor establecido teóricamente, lo cual no produce mayor efecto para considerar el método preciso.

LINEARIDAD DEL SISTEMA

Para piperonil butóxido se obtuvo el siguiente resultado: el coeficiente de correlación es de .9993, el coeficiente de determinación es de .998 y el coeficiente de variación igual a 1.19%.

Para piretrina I: el coeficiente de correlación es de 1.001, el coeficiente de determinación de 1.002, el coeficiente de variación de 1.46%.

Para piretrina II: el coeficiente de correlación es de .9986, el coeficiente de determinación de .997 y el coeficiente de variación de 1.50%. Cada uno de los resultados obtenidos cumple con los parámetros establecidos considerándose que el sistema se comporta linealmente.

También el resultado que se observa de las gráficas de cada uno de los activos indican que la recta pasa por el origen. Demostrando que existe una relación entre la concentración de cada activo y el área bajo la curva detectada por el sistema.

LINEARIDAD DEL METODO

Para piperonil butóxido se obtuvo el siguiente resultado: el coeficiente de determinación es mayor a 0.98, la pendiente es igual a 1.0759, y la ordenada al origen es de -5.3592; el porcentaje recuperado para cada una de las concentraciones (80 %,100 %,120 %) está entre el 101- 103 % siendo el valor teórico del promedio de recobro entre 97-103%.

Indicando que cada uno de los resultados obtenidos y graficando los mcg adicionados contra los mcg recuperados se obtiene una línea recta demostrando así que el método es lineal.

Para piretrina I: el resultado obtenido es el siguiente: el coeficiente de determinación es mayor a 0.98, la pendiente igual a 1.0510 y la ordenada al origen de -1.3089, el porcentaje recuperado está entre 99 - 101 % para cada una de las concentraciones.

Para piretrina II: el coeficiente de determinación es mayor a 0.99, la pendiente igual a 1.0843 y la ordenada al origen de -1.6250, el porcentaje recuperado está entre 101 - 104 % ,el valor de 104 % no está dentro de los límites establecidos de porcentaje de recobro siendo la diferencia de 1.0246 la cual no se considerará que interfiera con los resultados anteriores puesto que la variación obtenida no se considera tan grande para descartar que el método sea lineal.

Las gráficas que se obtienen al graficar los mcg adicionados contra los mcg recuperados determinan una línea recta y los resultados anteriores entran dentro de especificaciones por lo tanto el método se considera lineal.

EXACTITUD DEL METODO

Los resultados de exactitud para cada uno de los activos de interés (piretrina I,II y piperonil butóxido) se encuentran dentro de las especificaciones establecidas el porcentaje de recobro teóricamente debe ser entre 97 - 103 % y el coeficiente de variación menor al 3 %. El porcentaje de recobro obtenido de cada uno de los activos se encuentra entre 100 - 101 % y el coeficiente de variación está entre 1 - 1.55 % por lo tanto el método se considerará exacto.

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Los resultados obtenidos para piperonil butóxido de cada uno de los analistas en diferentes días demuestra un coeficiente de variación de 1.85%, para piretrinas I,II el coeficiente de variación es de 2.06%. En base a los resultados anteriores para cada uno de los activos el método se puede considerar reproducible ya que ambos valores se encuentran dentro de las especificaciones establecidas.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Los resultados obtenidos de las muestras de estabilidad presentan variabilidad ya que en algunos de los casos el piperonil butóxido es estable a las 72 horas de preparadas en refrigeración y no a las 48 horas en refrigeración, En el caso de Temperatura Ambiente resulta estable a las 24 horas y no a las 48 y 72 horas de preparadas.

Para piretrinas I,II es estable a las 24 horas de preparación a Temperatura Ambiente y no a las 48 y 72 horas, en refrigeración solo es estable a las 24 horas y no a las 48 y 72 horas de preparadas, lo cual no resulta congruente por lo que se establece que existió algún error en la preparación de la muestra que haya ocasionado esta variación en los resultados.

Se determina por lo tanto que la muestra de piperonil butóxido y piretrina I,II solo es estable a temperatura ambiente y a refrigeración a las 24 horas de haberse preparado.

CAPITULO 5

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

5.1 Conclusiones

Se desarrolló un método analítico específico para la cuantificación de piretrinas I,II y piperonil butóxido por Cromatografía Líquida de Alta Resolución contenidos en un shampoo antipediculosis.

El método desarrollado es útil para las determinaciones como producto intermedio y producto terminado, así como para detectar la estabilidad del producto.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que el coeficiente de variación obtenido para linealidad, precisión, exactitud y especificidad está dentro de las especificaciones establecidas demostrando la efectividad del mismo al considerarse válido para los fines prácticos del laboratorio.

*Para la linealidad del sistema el coeficiente de variación obtenido es el siguiente:

piperonil butóxido: 1.19%
piretrina I : 1.46%
piretrina II: 1.50%

*Linealidad del método:

piperonil butóxido: 1.44%
piretrina I : 1.43%
piretrina II: 1.82%

*Precisión del sistema:

piperonil butóxido: 1.24%
piretrina I : 1.59%
piretrina II: 1.23%

*Exactitud del método:
piperonil butóxido: 1.05%
piretrina I: 1.55%
piretrina II: 1.29%

Se considera que se cumplieron los objetivos por que se subsanaron los inconvenientes de los métodos espectrofotométricos y por cromatografía de gases usados con anterioridad.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Berry and Karger B.L. *CRC Crit. Analytical Chemistry*, 45: 819A, 1973.
- 2.- Bidlingmeyer Brian A. *PRACTICAL HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHODOLOGY AND APPLICATIONS*. Editorial John Wiley & Sons, USA 1992.
- 3.- Casida E. John. *PYRETRUM THE NATURALE INSECTISIDE*. Editorial Academic Press, London and New York, 1973.
- 4.- Castañeda, Pedro, IBQ, et. al. *GUIAS OFICIALES DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS*. Comité de elaboración de Guías oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, S.S.A. México, 1991.
- 5.- Castañeda, Pedro, IBQ, et. al. *PROYECTO DE NORMA TECNICA QUE ESTABLECE LAS GUIAS GENERALES DE VALIDACION*. Comité de elaboración de Guías oficiales de Validación de la Dirección general de control de Insumos para la Salud, S.S.A. México, 1991.
- 6.- Corbett J.R. *THE BIOCHEMICAL MODE OF ACTION OF PESTICIDE*. Editorial Academic Press, London and New York, 1974.
- 7.- Crosby, D.G; Jacobson M. *NATURALLY OCURRING INSECTISIDES*. Dekker, New York, 1971.
- 8.- Dyson N. *CHROMATOGRAPHIC INTEGRATION METHODS*. Royal Society of Chemistry, London, UK, 1990.
- 9.- Dolan J.W and Snyder. *TROUBLESHOOTING LIQUID CHROMATOGRAPHY SYSTEM*. Humana Press, Clifton, N.J., 1989.
- 10.- Finkelson J, Martin. *VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS BY FDA LABORATORIES*. *Technology Pharmaceutical*, march 1986. 75:78-81

11. Foley J.P.; J.A Crow; B.A Thomas. CHROMATOGRAPHY TODAY. *Journal of Chromatographic*. 287,478. 1989.
12. Guerra Johnny. VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS BY FDA LABORATORIES. *Technology Pharmaceutical*. 74,76,77. march 1976.
13. Goodman Guilman A; Murad F. et.al. LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA. 7ma. Edición. Editorial Panamericana. 1986.
14. Hartley G; Sywest; T.F. CHEMICAL FOR PEST CONTROL. Pergamon Press, Oxford. 1969.
15. Larry Paul W; PH.D. USP PERSPECTIVES ON ANALYTICAL METHODS VALIDATION. *Technology Pharmaceutical*. march 1991. 130-141.
16. Lual. MODELOS ESTADISTICOS Y VALIDACION DE METODOS ANALITICOS. *Pharma News*. Julio 1995. 24-25.
17. Merck & Co. Inc. THE MERCK INDEX. 11 Edition. 1989.
18. Ombaka J.H. PYRETHRUM - THE NATURALE INSECTICIDE. *Kosmetika Aerosole Bleichstoffe*. 111 - 113. marz 1987.
19. Peter J. Schdenmaxers. OPTIMIZATION OF CHROMATOGRAPHIC SELECTIVITY. *Journal of Chromatography Library*. 35: 1-2. 1986.
20. Poon- King T; Potter EV; Stuartman M; et. al. EPIDEMIC OF ACUTE NEPHRITIS WITH REAPPEARANCE. *Lancet*. 1:475. 1973.
21. Pappas A.N. *CRC Crit. Analytical Chemistry*. 20: 359. 1989.

- 22.- Pharmacopela Forum. REPORT OF THE PMA QUALITY CONTROL SELECTION COMMITTEE ON PRESSURIZED LIQUID CHROMATOGRAPHY. Guidelines for the Analytical of High Performance Liquid Chromatography methods. March - April. 2789. 1983.
- 23.- Provedor Endura. PIPERONIL BUFOXIDO. Bologna Italy. 1- 3. 1995.
- 24.- Ravindranath, B. PRINCIPLES AND PRACTICE OF CHROMATOGRAPHY. Editorial Ellis Horwood Limited. England. 1989.
- 25.- Snyder L.R; Kirkland J.J. INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY. 2 Edition. John Wiley & Sons. Inc. New York. 1973.
- 26.- Taplin D; T. Lynn M. SEMINARS IN DERMATOLOGY. 6: (2) 125-135. 1987.
- 27.- U.S. Pharmacopela Convention Inc. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA XXIII. Edition U.S.A 1995.
- 28.- Valcárcel Cases M.; Gomez Henz A. TECNICAS ANALITICAS DE SEPARACION. Editorial Reverté. España. 1990.
- 29.- V. Berry. CRC. Crit. Analytical Chemistry. 21: 115. 1989.
- 30.- Wachs H. METHYLENEDIKYPHENOL DERIVATES. US Patent. 2: 485,681. 1949.