



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA  
DETERMINAR KETOCONAZOL EN CREMA.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
**P R E S E N T A :**  
**RAQUEL COLIN LOPEZ**



MEXICO, D.F.  
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**

2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Jurado asignado:**

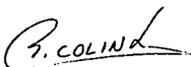
<b>Presidente</b>	<b>Prof. PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ</b>
<b>Vocal</b>	<b>Prof. HONORIA FUENTES SIXTOS</b>
<b>Secretario</b>	<b>Prof. RAÚL LUGO VILLEGAS</b>
<b>1er. Suplente</b>	<b>Prof. FERNANDO NONATO NONATO</b>
<b>2o. Suplente</b>	<b>Prof. ÁNGEL ÁVILA VILLAGRÁN</b>

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

**Laboratorio 3-D Edificio "A" Facultad de Química.**



**Prof. Pedro Villanueva González**  
**Asesor del tema:**



**Raquel Colín López**  
**Sustentante:**

### 13 LINEAS PARA VIVIR

- 1.- Te quiero no por quien eres, sino por quien soy cuando estoy contigo.
- 2.- Ninguna persona merece tus lágrimas, y quien se las merezca no te hará llorar.
- 3.- Sólo porque alguien no te ame como tú quieres, no significa que no te ame con todo su ser.
- 4.- Un verdadero amigo es quien te toma de la mano y te toca el corazón.
- 5.- La peor forma de extrañar a alguien es estar sentado a su lado y saber que nunca lo podrás tener.
- 6.- Nunca dejes de sonreír, ni siquiera cuando estés triste porque nunca sabes quien se puede enamorar de tu sonrisa.
- 7.- Puedes ser solamente una persona para el mundo, pero para alguna persona tú eres el mundo.
- 8.- No pases el tiempo con alguien que no esté dispuesto a pasarlo contigo.
- 9.- Quizá Dios quiera que conozcas mucha gente equivocada, antes de que conozcas a la persona adecuada, para que cuando al fin la conozcas sepas estar agradecido.
- 10.- No llores porque ya se terminó, sonríe porque sucedió.
- 11.- Siempre habrá gente que te lastime, así que lo que tienes que hacer es seguir confiando y solo ser más cuidadoso en quien confías dos veces.
- 12.- Conviértete en una mejor persona y asegúrate de saber quién eres antes de conocer a alguien más y esperar que esa persona sepa quien eres.
- 13.- No te esfuerces tanto, las mejores cosas suceden cuando menos te las esperas.

Gabriel García Márquez

## DEDICATORIAS

### A MI MADRE:

Por todo su apoyo amor y confianza, sin los cuales no hubiera podido concluir con mi carrera universitaria.

### A MI PADRE:

Por toda la ayuda y paciencia.

### A MIS HERMANOS:

Ricardo, Macario y Lino, por su cariño, comprensión y ayuda cuando lo he necesitado.

Cinthy, Lorena y Asunción, por ser tres hermanas más y consentirme tanto.

### A MIS NIÑOS:

Lupita, Cinthya, Laura, Ricardo, Luis Eduardo y...

### A MARY:

Porque siempre estás con nosotros.

## AGRADECIMIENTOS

### A LA FACULTAD DE QUÍMICA:

Por haber sido mi casa durante todo éste tiempo, por todas las enseñanzas que me diste y porque a ti te debo mi formación profesional.

### A MIS PROFESORES:

Por haber sembrado el deseo de superación, y por haber compartido, tanto su sabiduría como sus experiencias que tanto me han enriquecido.

### A LA MAESTRA HONORIA:

Por su colaboración en la realización de éste trabajo.

### AL PROFESOR PEDRO VILLANUEVA:

Por toda la ayuda brindada, pero principalmente por su amistad, que conservaré por siempre.

Gracias por todo.

### A TODOS MIS AMIGOS:

A todos mis amigos, con quienes compartí parte de mi vida, tanto momentos difíciles como momentos inolvidables.  
Nunca los olvidaré.

## ÍNDICE

	Página
<b>CAPITULO I    INTRODUCCIÓN</b>	
Introducción	1
1.1    Objetivos	4
<b>CAPITULO II    GENERALIDADES</b>	
2.1    Ketoconazol	5
2.1.2    Presentaciones comerciales y dosificación	6
2.1.3    Indicaciones terapéuticas	7
2.1.4    Propiedades físicas	8
2.1.5    Propiedades químicas	9
2.1.6    Farmacología	9
2.1.7    Mecanismo de acción	10
2.1.8    Farmacodinámica	11
2.1.9    Farmacocinética	12
2.2    Métodos analíticos para la determinación de ketoconazol	13
2.2.1    Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	13

2.2.2	Métodos espectrofotométricos	14
2.2.3	Método extractivo - espectrofotométrico	15
2.2.4	Método voltamétrico	15
2.3	Espectroscopía de absorción	16
2.4	Validación	17
2.5	Protocolo de validación	20
2.6	Parámetros de validación	22
2.6.1	Especificidad	22
2.6.2	Linealidad del sistema	23
2.6.3	Precisión del sistema	23
2.6.4	Linealidad del método	25
2.6.5	Repetibilidad del método	26
2.6.6	Reproducibilidad del método	26
2.6.7	Estabilidad de la muestra analítica	27

### CAPITULO III      PARTE EXPERIMENTAL

3.1	Desarrollo del método analítico	30
3.1.1	Formulación	31
3.1.2	Material y reactivos	32
3.1.3	Equipo	32
3.1.4	Diagrama de flujo para la preparación de las disoluciones de referencia y muestra problema	33
3.1.5	Preparación de la disolución de la muestra de referencia	34
3.1.6	Preparación de la disolución de la muestra problema	34
3.1.7	Procedimiento	34
3.1.8	Cálculos	35

3.2	Validación del método analítico	36
3.2.1	Especificidad	36
3.2.2	Linealidad del sistema	36
3.2.3	Precisión del sistema	37
3.2.4	Diagrama de flujo para linealidad y precisión del sistema	39
3.2.5	Linealidad del método	40
3.2.6	Repetibilidad del método	40
3.2.7	Diagrama de flujo para linealidad y repetibilidad del método	41
3.2.8	Reproducibilidad del método	42
3.2.9	Estabilidad de la muestra analítica	43

#### **CAPITULO IV      RESULTADOS**

4.1	Especificidad	44
4.2	Linealidad del sistema	47
4.3	Precisión del sistema	50
4.4	Linealidad del método	52
4.5	Repetibilidad del método	55
4.6	Reproducibilidad del método	57
4.7	Estabilidad de la muestra analítica	59

#### **CAPITULO V      CONCLUSIONES**

5.1	Especificidad	61
5.2	Linealidad del sistema	61
5.3	Precisión del sistema	62
5.4	Linealidad del método	62

<b>5.5</b>	<b>Repetibilidad del método</b>	<b>63</b>
<b>5.6</b>	<b>Reproducibilidad del método</b>	<b>63</b>
<b>5.7</b>	<b>Estabilidad de la muestra analítica</b>	<b>64</b>
<b>5.8</b>	<b>Conclusión final</b>	<b>64</b>
<b>APÉNDICE</b>		<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>71</b>

# **CAPITULO I**

# **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

Existen varios medicamentos con acción antimicótica con formulaciones en las cuales el principio activo es un derivado imidazólico como lo es el ketoconazol, cuyo mecanismo de acción es alterar la permeabilidad celular.

En este tipo de medicamentos el ketoconazol, se encuentra solo combinado con los excipientes; las formas farmacéuticas más comunes son tabletas, crema, suspensión, óvulos y gel-shampoo.

La validación de métodos analíticos verifica en forma documentada que la metodología propuesta esté basada en principios científicos adecuados y que cumpla con los propósitos prácticos de medición para los cuales ha sido optimizado. Por lo tanto, la validación de métodos analíticos permite asegurar la aceptación y utilidad de los resultados obtenidos en el laboratorio.

Todos los medicamentos deben cumplir con las normas especificadas en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, tales normas establecen especificaciones sobre características de calidad (identidad, pureza, concentración, potencia e inocuidad), así como los métodos de prueba y análisis que se tienen que aplicar para determinar si el medicamento cumple o no con los requerimientos legales.

Los métodos analíticos permiten determinar la concentración y/o potencia entre otras, del fármaco o de algún contaminante, y es fundamental establecer la confiabilidad del método, ya que es un elemento importante para construir la calidad del medicamento, la validación, es la actividad que nos permite cumplir con esta finalidad.

El emplear métodos analíticos no confiables puede llevar a liberar un medicamento que potencialmente va a ser dosificado a un paciente; si el resultado de la validación es menor que el valor real, se da lugar a una subdosificación por lo que en muchos casos no es posible alcanzar los niveles terapéuticos y por lo tanto se presenta una acción farmacológicamente deficiente; si por el contrario, se encuentra un resultado mayor que el valor real se presentan efectos colaterales no deseados, intoxicación entre otros. Por lo tanto un buen producto es el resultado de un buen proceso y ambos deben de ser aprobados y controlados para asegurar la calidad final.

**El presente trabajo tiene como objetivo proponer y validar un método analítico espectroscópico para la determinación de ketoconazol en un medicamento comercial en presentación crema.**

### **1.1 Objetivos**

- **Realizar la validación del método analítico por espectroscopia UV para la determinación de ketoconazol en presentación comercial de crema, verificando los parámetros de especificidad, linealidad, precisión y exactitud del sistema y del método.**
  
- **Comprobar que el método de análisis propuesto es específico, preciso, exacto y lineal.**

## **CAPITULO II**

# **GENERALIDADES**

## **2.1 Ketoconazol**

El ketoconazol fue sintetizado en los Janssen Pharmaceutical Research Laboratories en Bélgica en la década de los 70's y sus estudios clínicos comenzaron en 1977.

El ketoconazol es un derivado del imidazol, se clasifica como antimicótico de amplio espectro, se caracteriza por poseer un anillo imidazólico libre unido mediante un enlace C- N a otros anillos, es único entre los imidazoles porque es soluble en soluciones acuosas ácidas, debido a un anillo de piperazina en su estructura. <sup>(19)</sup>

Aunado al ketoconazol encontramos que los imidazoles más comunes dentro del mercado comercial son el Clotrimazol, Econazol, Miconazol, entre otros. Sin embargo el Miconazol y el ketoconazol son antifúngicos sistémicos, a diferencia del resto que son tópicos.

El ketoconazol, se presenta en varias formas farmacéuticas como: tabletas, crema, suspensión, óvulos, gel-shampoo y generalmente, esta presente sólo con el excipiente.

### 2.1.2 Presentaciones comerciales y dosificación

- AKORAZOL\* (tabletas y crema)
- EUROLAT\* (cápsulas, tabletas y crema)
- FUNGOSINE\* (crema y tabletas)
- LIZOVAG\* (crema y tabletas)
- NIZORAL\* (gel shampoo, tabletas, suspensión, óvulos y crema)
- TERMIZOL\* (tabletas y crema)
- MICOSER\* (tabletas)

\* Nombre comercial.

El contenido de ketoconazol en las presentaciones comerciales es:

- tabletas (200 mg.)
- crema (2 %)
- suspensión (2 %)
- óvulos (400 mg)
- gel-shampoo (20 mg)

Para la realización de éste trabajo se eligió una forma farmacéutica (crema) cuyo contenido de ketoconazol corresponde al 2%

### **2.1.3 Indicaciones Terapéuticas**

Usualmente la crema al 2% de ketoconazol, está indicado para la aplicación tópica en el tratamiento de las infecciones por dermatófitos en la piel: tiña de cuerpo, tiña crural, tiña de mano, tiña de pie, tiña de pelo, tiña de uña, micosis en membranas mucosas debido a diversos microorganismos, así como en el tratamiento de candidiasis cutánea. (5)

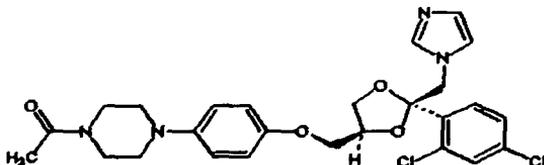
Cuando el ketoconazol se administra por vía oral es necesaria la suficiente acidez gástrica para su transformación en un clorhidrato. Debe evitarse la ingesta de antiácidos, anticolinérgicos y bloqueadores H<sub>2</sub> hasta 2 horas después de la ingesta del fármaco. Los parámetros farmacocinéticos varían ampliamente de una persona a otra. También el efecto de la combinación del fármaco con la comida rica en grasas es variable. (19)

### 2.1.4 Propiedades Físicas <sup>(6, 20)</sup>

**Nombre:** 1-acetil-4-(4{[2-(diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi}fenil)piperazina.

**Fórmula condensada:**  $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$

**Fórmula desarrollada:**



**Peso Molecular:** 531.44 g/mol.

**Descripción:** Polvo microcristalino de color blanco a ligeramente crema, inodoro y ligeramente amargo.

**Punto de fusión:** 148 - 152°C

Su espectro infrarrojo presenta bandas de absorción a:  
1507, 1640, 1240, 1258, 1200, 1221  $cm^{-1}$ .

### 2.1.5 Propiedades Químicas <sup>(6,17)</sup>

El ketoconazol es una base débil con dos pka : 6.51 y 2.94, requiere de un medio ácido para su disolución y absorción, puede sufrir una degradación incluyendo oxidación e hidrólisis especialmente en medio acuoso, si no se maneja apropiadamente.

**Solubilidad:** Es soluble en cloroformo, metanol y ácido clorhídrico diluido, ligeramente soluble en etanol muy poco soluble en éter e insoluble en agua.

### 2.1.6 Farmacología

El ketoconazol actúa principalmente en enfermedades producidas por hongos que se dividen en dos grupos:

- Las micosis superficiales, dermatomicosis o dermatofitosis; afectan epidermis, cabello, uñas y mucosas.
- Las micosis profundas o sistémicas; afectan el tejido subcutáneo y diversos órganos internos. <sup>(2)</sup>

El ketoconazol administrado oralmente, tiene un amplio espectro en el ataque de las micosis en general, ya sean superficiales o sistémicas.

El ketoconazol también es único por su capacidad para inhibir la formación de seudomicelios por parte de *Candida albicans*, porque es 100 veces más potente que el miconazol. <sup>(19)</sup>

### 2.1.7 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de los agentes antifúngicos consiste en alterar la permeabilidad de la membrana celular, el Ergosterol es el componente fundamental de las membranas de los hongos y su síntesis es bloqueada por los agentes antifúngicos, especialmente los imidazoles, causando pérdida significativa de sustancias intracelulares llevando al hongo a la muerte.

El mecanismo de acción antimicótico del ketoconazol es variado, pero el daño que hace a la célula se debe a una combinación de mecanismos tales como la inhibición de la síntesis de Ergosterol, alteración en la composición de lípidos de naturaleza no esteroide de la membrana plasmática, la interferencia con la respiración aeróbica y posiblemente otro tipo de disfunciones en la membrana celular fúngica.

Es por esto que el ketoconazol actúa mucho mejor en los hongos en crecimiento que en los completamente desarrollados, ya que la modificación del ambiente intracelular de los hongos, produce trastornos en el metabolismo y necrosis celular. <sup>(2, 7)</sup>

### 2.1.8 Farmacodinámica <sup>(13)</sup>

**Acción antimicótica:** El ketoconazol es fungicida y fungistático, dependiendo de las concentraciones del fármaco.

El espectro de actividad incluye a la mayor parte de hongos patógenos. No debe emplearse para meningitis por hongos y es necesario obtener muestras para pruebas de susceptibilidad antes de iniciar el tratamiento. Las pruebas de que se dispone en la actualidad pueden no reflejar en forma precisa su actividad *in vivo*, de tal manera que los resultados deben interpretarse con precaución.

Se emplea por vía oral para tratar coccidiomicosis diseminada o pulmonar, para coccidiomicosis o histoplasmosis; candidiasis oral y candiduria (pero su bajo valor de depuración renal puede limitar su utilidad).

También se emplea en algunas dermatofitosis, incluyendo tiñas. *Taenia capitis*, *Taenia cruris*, *Taenia pedis*, *Taenia manus*, *Taenia unguium* (onicomicosis) ocasionada por *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*.

### 2.1.9 Farmacocinética <sup>(13)</sup>

**ABSORCIÓN:** El ketoconazol se transforma a clorhidrato, la absorción es irregular; disminuye por elevación del pH gástrico y puede aumentarse en grado y constancia por las comidas. Las concentraciones máximas en el plasma ocurren en 1 a 4 horas.

**DISTRIBUCIÓN:** El ketoconazol se distribuye en bilis, saliva, cerumen, líquido sinovial y sebo; la penetración al líquido cefalorraquídeo es irregular y se considera mínima. Está unido a las proteínas del plasma en un 84 a 99%.

**METABOLISMO:** El ketoconazol se convierte en el hígado en varios metabolitos inactivos.

**EXCRECIÓN:** Más del 50% de una dosis de ketoconazol se excreta en las heces dentro de cuatro días; el fármaco y los metabolitos se secretan en la bilis. Cerca del 13% se excreta sin cambios en la orina. Probablemente se excreta en la leche materna. La vida media es bifásica, inicialmente de dos horas con una vida media terminal de ocho horas.

## **2.2 Métodos analíticos para la determinación de ketoconazol**

### **2.2.1 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)**

Se han realizado diversas determinaciones de ketoconazol en presentaciones farmacéuticas como tabletas y crema, la mayoría de éstas con muy buenos resultados. Algunas determinaciones usan columnas de diferentes dimensiones y como fase móvil diversas mezclas de disolventes.

En 1999, Low, A. S. et al.<sup>(12)</sup> Realizaron la determinación de ketoconazol en presentaciones farmacéuticas como tabletas, crema y shampoo, usaron metanol al 40%, con un recobro de 98.7 - 103%. El método es selectivo para ketoconazol en presencia de 4 impurezas relacionadas con su estructura.

### 2.2.2 Métodos espectrofotométricos

Para métodos espectrofotométricos se usan agentes cromógenos, cuando éstos reaccionan con el derivado de piperazina, en este caso el ketoconazol se forma un complejo colorido, que se cuantifica a determinada longitud de onda.

Los métodos aplicados para la determinación de los derivados de piperazina en presentaciones farmacéuticas, y los resultados son comparables con los obtenidos por los métodos oficiales.<sup>(1)</sup>

En 1991, Zarapkar, S. S. et al.<sup>(23)</sup> Realizaron la determinación de ketoconazol en tabletas, usaron una muestra triturada de tabletas, la cuál disolvieron en agua, usando HCl, esta solución se trata con solución buffer de biftalato de potasio y finalmente se toma una alícuota que se mezcla con azul de bromofenol o naranja de metilo en cloroformo. El coeficiente de variación fue de 0.26%.

### 2.2.3 Método extractivo - espectrofotométrico

En 1998, Sadeghi, S. et al.<sup>(15)</sup> Propusieron un método para determinar ketoconazol en tabletas y crema, el método consiste en formar un complejo entre el ketoconazol y el ácido pícrico en presencia de buffer de citratos, el complejo se extrae con cloroformo, la absorbancia se midió a 410 nm. Los resultados están dentro de los límites establecidos.

### 2.2.4 Método voltamétrico

En Shamsipur, M. et al.<sup>(16)</sup> Realizaron un método en el que utilizan electrodos de carbón, basándose en que la oxidación de ketoconazol en un electrodo de carbón puro puede estudiarse voltaméricamente, el proceso es irreversible y controlado por un proceso de adsorción - extracción que se da cuando el fármaco se acumula en la superficie del electrodo. Optimizando el pH de la solución, se obtiene un barrido voltamétrico que es lineal y directamente proporcional a la concentración de ketoconazol. Es un procedimiento simple para determinar ketoconazol en formulaciones como crema y tabletas.

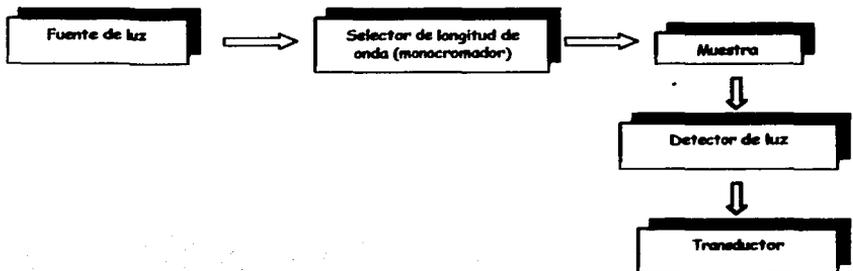
### 2.3 Espectroscopia de absorción

La espectroscopia de absorción es indudablemente una de las técnicas analíticas que ofrece varias ventajas en la solución de muchos problemas, estas ventajas incluyen rapidez, sencillez, especificidad y sensibilidad.

En la mayor parte de los análisis espectrofotométricos cuantitativos se emplean medidas realizadas en las regiones ultravioleta y visible del espectro.

La espectroscopia ultravioleta y visible, son técnicas instrumentales de amplio uso en análisis farmacéuticos debido a su aplicabilidad a las especies farmacológicamente activas o sus derivados que por sus características espectrales, absorben en estas zonas.

Un espectrofotómetro básicamente se compone de:



## 2.4 Validación

El término "Validación" se puede definir como la determinación del grado de validez de un "Proceso de Medición".

La FDA (Food and Drug Administration) define la validación como el establecimiento de la evidencia documentada la cual provee un alto grado de garantía de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumple con sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados.

Por lo tanto la validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, por estudios experimentales y estadísticos, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

La selección de los parámetros para validar un método analítico, depende generalmente de las necesidades de cada laboratorio, de la aplicación que tenga el método, de los requerimientos oficiales y algunas veces del criterio de la persona que lo realiza. <sup>(3)</sup>

Es importante señalar que desde el punto de vista de la validación se manejan de manera independiente las características del sistema y del método. El sistema involucra todas las variables que pueden afectar los resultados provenientes del equipo, reactivos y manipulación del principio

activo. El método sólo involucra la manipulación química ó física de la muestra y por lo tanto las variables que se presentan en los resultados dependerán únicamente del tratamiento de la misma y las interacciones que presente el compuesto que se valora con otras sustancias presentes en la muestra.

En base al método analítico y los procedimientos que se aplicaran en este método, la validación se ha clasificado en las siguientes categorías:

- **Categoría I. Métodos indicadores de control de calidad:**  
se usan para la cuantificación de los principales componentes de un medicamento o de los principios activos ( incluyendo conservadores ), en productos farmacéuticos terminados.
  
- **Categoría II. Métodos indicadores de estabilidad:**  
se usan para la determinación de impurezas en medicamentos o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados, incluyendo ensayos cuantitativos y pruebas limite.
  
- **Categoría III. Métodos indicadores de biodisponibilidad:**  
se usan para la determinación de las características de comportamiento del producto (pruebas de disolución, liberación de fármacos, etc ).

En la siguiente tabla se presentan los parámetros necesarios para la validación de métodos analíticos, basándose en las categorías antes mencionadas ya que los requisitos son diferentes para cada categoría.

PARÁMETROS	CATEGORÍAS			
	I	II		III
		Cuantitativa	Prueba limite	
Precisión	Si	Si	No	Si
Exactitud	Si	Si	*	*
Limite de detección	No	No	Si	*
Limite de Cuantificación	No	Si	No	*
Especificidad	Si	Si	Si	*
Linealidad	Si	Si	No	*
Tolerancia	Si	Si	Si	Si

\* Estos son ensayos que pueden o no requerirse, dependiendo de la naturaleza del análisis en particular.

## **2.5 Protocolo de validación <sup>(3)</sup>**

Un protocolo de validación consiste en un plan experimental que debe contener las siguientes especificaciones:

1.- **Control de materias primas.** Se refiere al control de las materias primas procedentes de casas comerciales reconocidas que se utilicen en el proceso de validación. Deberán aparecer de forma detallada las especificaciones de la muestra de ensayo, la preparación y estabilidad de las disoluciones, diluciones, pH y temperatura.

2.- **Material de referencia.** Se utilizarán para la calibración del sistema de medición (por ejemplo disoluciones tampones para la calibración de potenciómetros o pHmetros) o como patrón de comparación en las determinaciones del analito. Durante la validación se utilizarán materiales de referencia secundarios o de trabajo contrastados contra un material de referencia primario. En caso de no disponer de material de referencia primario, se propone la caracterización (mediante métodos especiales que aseguren la evaluación correcta de los niveles de pureza requeridos) de una parte de un lote industrial para emplearlo como patrón de trabajo en determinaciones cuantitativas. Las características del material de referencia que se utilizará en la validación aparecerán como anexo en el protocolo de validación.

3.- Verificación, calibración y control del equipo. En las Farmacopeas aparecen reportados los métodos para realizar la calibración y/o control de espectrofotómetros, pHmetros, etcétera, pero no se incluyen los métodos para equipos de tecnología avanzada (como sistemas de adquisición de datos, densitómetros, detectores cromatográficos, etcétera). En la actualidad la mayoría de los productores desarrollan la calificación de los equipos analíticos para satisfacer los requisitos internacionales que permitan su utilización en el control de calidad en diferentes industrias incluyendo la industria farmacéutica y aun cuando en los manuales del usuario aparezcan especificaciones de precisión y exactitud del equipo, por lo general el usuario debe desarrollar su propio procedimiento para la comprobación del buen funcionamiento del instrumento o seguir las recomendaciones del fabricante. Cuando el equipo está verificado se realiza un simple control de rutina.

4.- Entrenamiento del personal. El personal encargado de realizar los ensayos analíticos estará entrenado específicamente en este tipo de trabajo y su entrenamiento estará rigurosamente documentado.

5.- Procedimiento normalizado de operación del método. Refleja el procedimiento exacto de ejecución del método analítico y estará anexo al protocolo de validación.

## **2.6 Parámetros de validación <sup>(4, 10)</sup>**

### **2.6.1 Especificidad**

La especificidad es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Este parámetro se puede evaluar de dos formas, una de ellas se realiza para métodos indicadores de control de calidad y la otra para métodos indicadores de estabilidad ( en ésta se incluyen métodos para análisis de fármacos en fluidos biológicos); la aplicación de una o de otra forma, va a depender del objetivo del método. En nuestro caso por ser un método de control de calidad, se procederá de la siguiente forma:

Para el método propuesto:

- 1.- Analizar placebos del producto.
- 2.- Identificar la (s) respuesta (s) del (los) activo (s), y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

**Criterio:**

Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

### **2.6.2 Linealidad del sistema**

La linealidad del sistema se determina, construyendo un gráfico de calibración (concentración en función de la respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

**NOTA:** Se considera el 100% como la concentración de la muestra en la solución final a analizar, que proporciona una respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación.

### **2.6.3 Precisión del sistema**

La precisión del sistema se determina por el análisis sextuplicado de una misma disolución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

PARÁMETROS DEL SISTEMA	FORMULAS	CRITERIO
LINEALIDAD	$r = \left\{ \frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]} \right\}^{1/2}$ $r^2 = \frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$ $DE = \left[ \frac{N(\sum F^2) - (\sum F)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$ $CV = \frac{DE}{\bar{F}} * 100$	$r \geq 0.99$  $r^2 \geq 0.98$   $CV \leq 1.5\%$
PRECISIÓN	$\bar{y} = \frac{\sum y}{N}$ <p>Donde: y es la respuesta medida.</p> $CV = \frac{DE}{\bar{F}} * 100$	$CV \leq 1.5\%$

NOTA: Para las pruebas estadísticas adicionales "t" Student, consultar Anexo 1

#### 2.6.4 Linealidad del método

La linealidad del método se determina a partir de placebos adicionados en al menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las disoluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método, (control de calidad, estudios de estabilidad, etc.) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Los cálculos se realizan tomando en cuenta la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, es necesario que el número de cantidades recuperadas (replicaciones) de cada cantidad adicionada, sean equivalentes.

### **2.6.5 Repetibilidad del método**

La repetibilidad del método se determina, de cuando menos 6 placebos cargados de manera independiente, con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto, haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Para realizar el procesamiento de los datos, se necesitan los resultados del porcentaje recuperado (R).

### **2.6.6 Reproducibilidad del método**

La reproducibilidad del método se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

### **2.6.7 Estabilidad de la muestra analítica**

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones (por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc.), durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Realizarlas bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una disolución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

PARÁMETROS DEL MÉTODO	FORMULAS	CRITERIO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	$m = \frac{nt (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)}{nt (\sum x^2) - (\sum x)^2}$ $b = \frac{(\sum y) - m (\sum x)}{nt}$ $r^2 = \frac{[nt (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)]^2}{[nt (\sum x^2) - (\sum x)^2] [nt (\sum y^2) - (\sum y)^2]}$ <p>Porciento recuperado:</p> $R = \left(\frac{y}{x}\right) \times 100$ $\bar{R} = \frac{(\sum R)}{N}$ $DE = \left[ \frac{N (\sum R^2) - (\sum R)^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$ $CV = \frac{DE}{\bar{R}} \times 100$	<p>Cantidad adicionada en función de la cantidad recuperada:</p> <p>m = 1 b = 0</p> <p>r<sup>2</sup> ≥ 0.98</p> <p>Promedio de recobro: 97 - 103%</p> <p>CV ≤ 3%</p>
REPETIBILIDAD AL 100%	$\bar{R} = \frac{(\sum R)}{N}$ $DE = \left[ \frac{N (\sum R^2) - (\sum R)^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$ $CV = \frac{DE}{\bar{R}} \times 100$	<p>Promedio de recobro: 97 - 103%</p> <p>CV ≤ 3%</p>
REPRODUCIBILIDAD	$DE = \left[ \frac{N (\sum y^2) - (y \dots)^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$ $CV = \left( \frac{DE}{\bar{y}} \right) \times 100$	<p>CV ≤ 3%</p>

<p><b>ESTABILIDAD</b></p>	$IC = \left( \bar{Y}_i - \bar{Y}_0 \right) \pm t^* \times \sqrt{Sp^2 \left[ \frac{2}{3} \right]}$ $S^2 = \left( \frac{1}{n-1} \right) \sum_{i=1}^n \left( x_i - \bar{x} \right)^2$ <p>Donde:  <b>t*</b> = valor de la t de Dunnett con c comparaciones y 2(c + 1) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975</p> <p>Para cada condición / tiempo / muestra calcular el factor (I) con la siguiente fórmula:</p> $I = \frac{(\text{análisis muestra / condición / tiempo})_i}{(\text{análisis inicial})_i} \times 100$ <p>Para cada condición / tiempo calcular la media del factor (I) con la siguiente fórmula</p> $\bar{I} = \frac{\sum I (\text{condición / tiempo})}{N}$	<p>IC = ± 3%</p>
---------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------

**NOTA:** Para las pruebas estadísticas adicionales, "t" Student, Análisis de varianza, Consultar Anexo 1

**CAPITULO III**

**PARTE**

**EXPERIMENTAL**

### 3.1 Desarrollo del método analítico

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por estudios de laboratorio, que las características de comportamiento del método cumplen con los requerimientos para las aplicaciones analíticas propuestas. Estas características de comportamiento se expresan en términos de parámetros analíticos; para una apropiada discusión de los resultados obtenidos con el método analítico.

El análisis del principio activo, para la validación del método, se realizó por espectrofotometría ultravioleta y consistió en determinar los siguientes parámetros:

- Especificidad
- Linealidad del sistema
- Precisión del sistema
- Linealidad del método
- Repetibilidad del método
- Reproducibilidad del método
- Estabilidad de la muestra analítica

El método analítico para la cuantificación de ketoconazol, se desarrolló en una crema, cuya formulación es la siguiente:

<b>3.1.1 Formulación</b>	<b>100 g.</b>
<b>PRINCIPIO ACTIVO:</b>	
Ketoconazol	2.0 g
<b>EXCIPIENTES:</b>	
EDTA, sal disódica	0.10 g
Propilenglicol	10.0 g
Alcohol estearílico	7.5 g
Alcohol cetílico	2.0 g
Monoestearato de sorbitán	2.0 g
Polisorbato 60	1.5 g
Miristato de isopropilo	1.0 g
Germal 115	0.20 g
Polisorbato 80	0.10 g
Hidróxido de sodio c.b.p.	pH 7.0 ± 0.1
Agua purificada c.b.p.	100.0 g

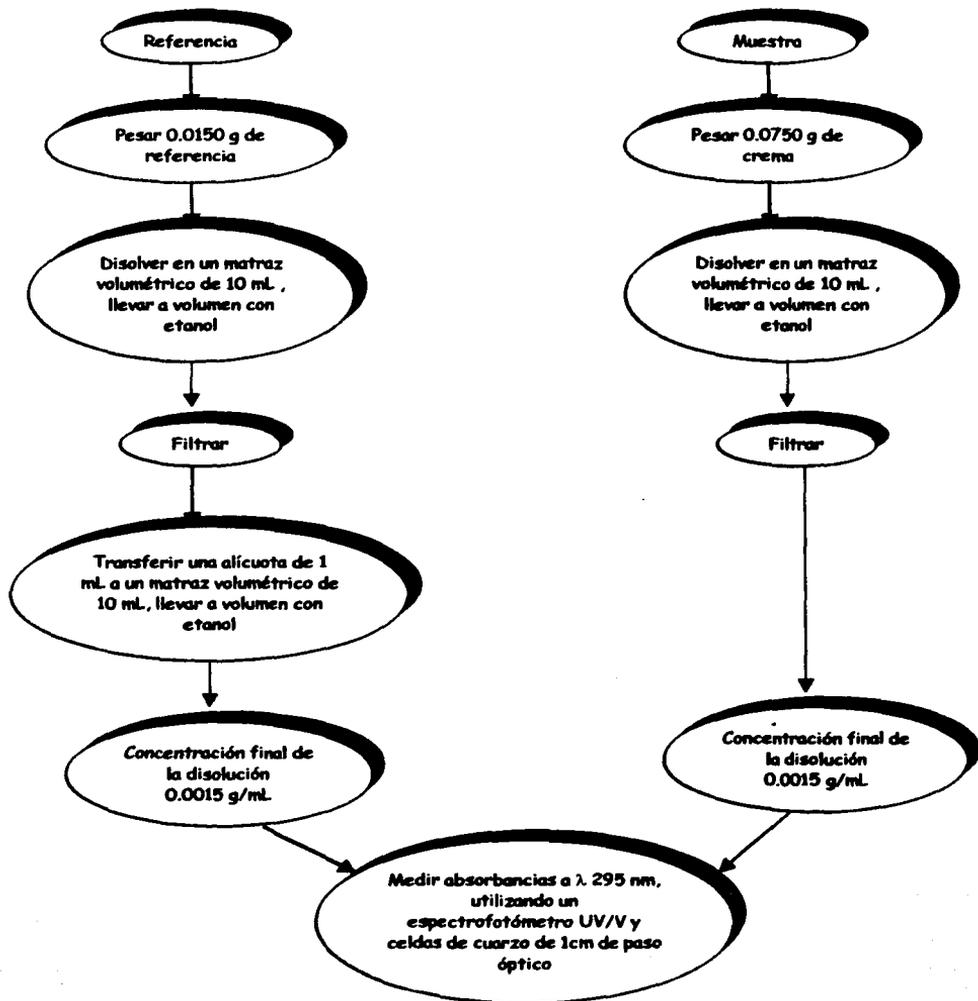
### 3.1.2 Material y reactivos

- **Matraces volumétricos de 100 mL**
- **Matraces volumétricos de 10 mL**
- **Cápsulas de vidrio para pesar**
- **Micropipetas 100  $\mu$ L**
- **Espátula de nicromel**
- **Agitador de vidrio**
- **Frascos de vidrio con capacidad de 20 mL**
- **Embudos de filtración**
- **Papel filtro Watman No. 40**
  
- **Etanol USP**
- **Reactivo estándar de ketoconazol**

### 3.1.3 Equipo

- **Espectrofotómetro UV/Visible**  
**Spectronic 21 Milton Roy Company.**
- **Celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico**
  
- **Balanza analítica**  
**Santorios BP 210S**  
**Max 210 g.  $d=0.1$  mg.**

### 3.1.4 Diagrama de flujo para preparación de disoluciones de referencia y muestra.



### 3.1.5 Preparación de la disolución de la muestra de referencia.

Se pesó con exactitud, 0.0150 g de la sustancia de referencia, se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió en etanol y se llevó a volumen con el mismo disolvente. Se filtró y enseguida se tomó una alícuota de 1 mL, se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, se llevó a volumen con etanol. La concentración final de la disolución de referencia es de 0.0015 g/mL de Ketoconazol.

### 3.1.6 Preparación de la disolución de la muestra problema.

Se pesó con exactitud, 0.0750 g de crema, cantidad equivalente a 0.0015 g de ketoconazol contenidos en la crema, se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió en etanol y se llevó a volumen usando etanol, y por último se filtró.

NOTA: Se utilizó una cantidad mayor de la muestra de referencia, ya que las cantidades a pesar eran muy pequeñas, es por eso que se hizo una dilución para poder llegar a la concentración deseada.

### 3.1.7 Procedimiento

Determinar las absorbancias de la disolución de la muestra de referencia y de la disolución de la muestra problema, en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 295 nm, utilizando etanol como blanco de referencia y celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

### 3.1.8 Cálculos

La cantidad de ketoconazol expresada en miligramos, contenida en 100 g de crema, se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mg de ketoconazol / 100g de muestra} = \frac{A_p / A_r \times C \times FD \times 100}{V}$$

donde:

**A<sub>p</sub>** = Absorbancia de la disolución de la muestra problema, leída a  $\lambda = 295 \text{ nm}$ .

**A<sub>r</sub>** = Absorbancia de la disolución de la muestra de referencia, leída a  $\lambda = 295 \text{ nm}$ .

**C** = Concentración de la disolución final de la sustancia de referencia, expresada en mg/mL.

**FD** = Factor de dilución de la muestra.

**V** = Volumen (mL), de muestra utilizada en el análisis.

### **3.2 Validación del método analítico**

Para llevar a cabo la validación del método analítico se evaluaron los siguientes parámetros:

#### **3.2.1 Especificidad**

La especificidad del método se determinó efectuando un barrido espectrofotométrico a un intervalo de longitudes de onda entre 340 y 250 nm de las siguientes disoluciones:

- Disolución de la sustancia de referencia
- Disolución de la muestra problema
- Disolución del placebo

**NOTA:** Las disoluciones utilizadas para determinar éste parámetro se realizaron como se indicó anteriormente en la preparación de la disolución de la muestra de referencia y la disolución de la muestra problema.

#### **3.2.2 Linealidad del sistema.**

La linealidad del sistema se llevó a cabo mediante la realización del análisis por duplicado de diferentes disoluciones estándar y en concentraciones de 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 y 180 %, considerando como el 100% el valor esperado.

Se preparó una disolución stock de Ketoconazol de concentración 1mg/mL.

Se pesó con exactitud, 0.1 g de estándar de ketoconazol, se depositó en un matraz volumétrico de 100 mL y se disuelve con etanol, se llevó a volumen con el mismo disolvente. Utilizando micropipetas se tomaron las alícuotas necesarias para obtener las concentraciones establecidas de: 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 y 270  $\mu\text{g/mL}$  de Ketoconazol.

Una vez que se tomaron las alícuotas correspondientes, y haciéndolo por duplicado, se llevaron a un volumen de 10 mL utilizando etanol, una vez preparadas las disoluciones de trabajo, se midieron sus respectivas absorbancias a una longitud de onda de 295 nm en un espectrofotómetro UV/V utilizando celdas de 1 cm de paso óptico y por último, se hace el procesamiento de los datos obtenidos.

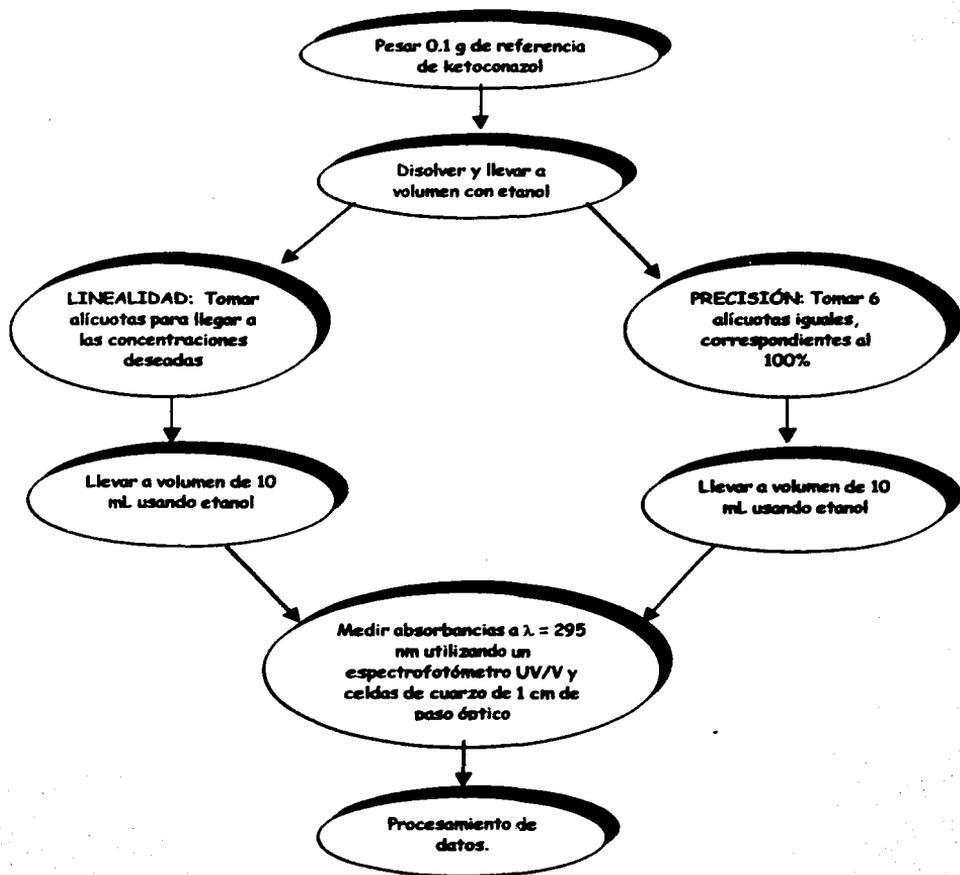
### 3.2.3 Precisión del sistema.

La precisión del sistema se realizó con 6 muestras de la misma disolución estándar al nivel del 100% del procedimiento normal de análisis.

Se preparó una disolución stock de Ketoconazol de concentración 1mg/mL.

Se pesó con exactitud, 0.1 g de estándar de ketoconazol, se depositó en un matraz volumétrico de 100 mL y se disolvió con etanol, se llevó a volumen con el mismo disolvente, se tomaron 6 alícuotas de la disolución stock correspondientes al 100 % del nivel de análisis, establecido como la concentración de 150 µg/mL. Las 6 alícuotas se llevaron a un volumen de 10 mL, usando etanol, una vez preparadas las disoluciones de trabajo, se midieron sus respectivas absorbancias a una longitud de onda de 295 nm en un espectrofotómetro UV/V utilizando celdas de 1 cm de paso óptico, con los resultados obtenidos se realiza el procesamiento de los datos.

3.2.4. Diagrama de flujo para Linealidad y Precisión del sistema.



### **3.2.5 Linealidad del método.**

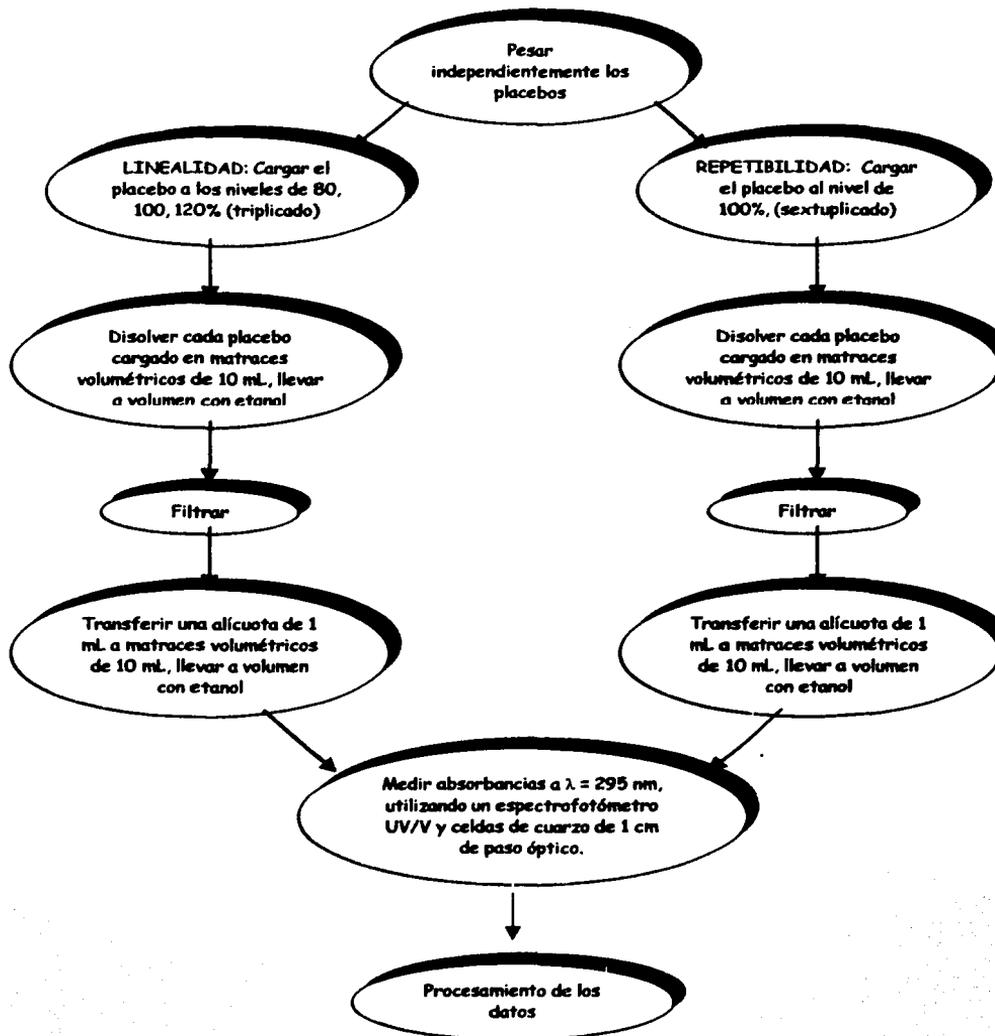
La linealidad del método se determinó utilizando placebos cargados al nivel de 80, 100, 120% , se realizó por triplicado y las concentraciones usadas fueron: 120, 150 y 180  $\mu\text{g/mL}$  de ketoconazol.

### **3.2.6 Repetibilidad del método.**

La repetibilidad al 100% se determinó pesando independientemente 6 placebos cargados al nivel de 100%, es decir a una concentración de 150  $\mu\text{g/mL}$  de ketoconazol.

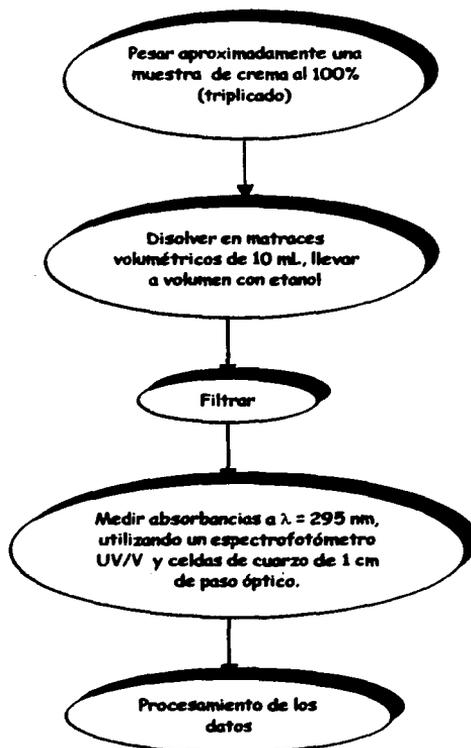
**NOTA:** Se utilizó una cantidad mayor de la muestra de referencia, ya que las cantidades a pesar eran muy pequeñas, es por eso que se hizo una dilución para poder llegar a la concentración deseada.

3.2.7. Diagrama de flujo para Linealidad y Repetibilidad del Método.



### 3.2.8 Reproducibilidad del método.

La reproducibilidad del método se realizó valorando por triplicado, por dos analistas y en diferentes días, muestras de producto (crema) aproximadamente equivalente al 100% del nivel de análisis.



NOTA: El procedimiento es el mismo para los dos analistas en los dos días.

### 3.2.9 Estabilidad de la muestra analítica.

La estabilidad se determinó mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Las condiciones fueron:

- Temperatura ambiente (25°C)
- Refrigeración (4°C)
- Protección a la luz (Se utilizó papel aluminio)

El tiempo establecido fue : 3 y 24 hrs.

# **CAPITULO IV**

# **RESULTADOS**

#### 4.1 Especificidad

En la tabla No. 1 se presentan los resultados de las muestras analizadas para evaluar el parámetro de especificidad. Las disoluciones de la muestra de referencia y de la muestra problema fueron preparadas en concentraciones correspondientes al 100% del nivel normal de análisis.

MUESTRA ANALIZADA	ABSORBANCIA $\lambda = 295 \text{ nm}$
Ketoconazol (muestra de referencia)	0.505
Muestra problema (crema)	0.510
Placebo	0.015
Blanco	0.000

Tabla No. 1 Resultados obtenidos en la determinación de la especificidad.

La especificidad del método se determinó efectuando un barrido espectrofotométrico a un intervalo de longitudes de onda entre 340 y 250 nm.

A continuación se presentan los gráficos de absorción correspondientes a:

- ketoconazol (muestra de referencia). Figura No. 1
- Muestra problema (crema). Figura No. 2
- Placebo. Figura No. 3

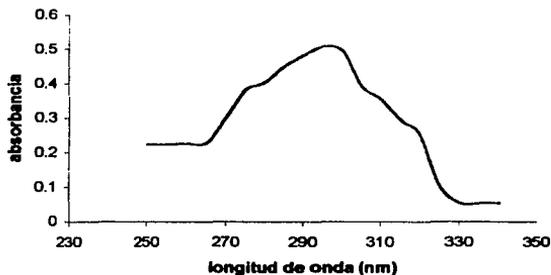


Figura No. 1 Espectro de absorción para referencia de ketoconazol.

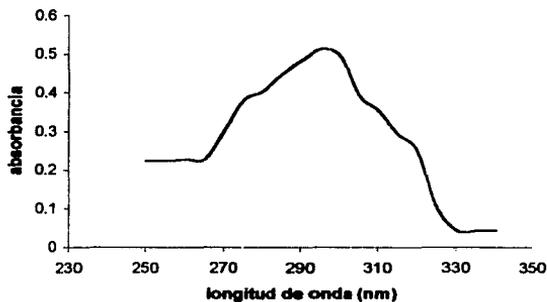


Figura No. 2 Espectro de absorción para muestra problema (crema).

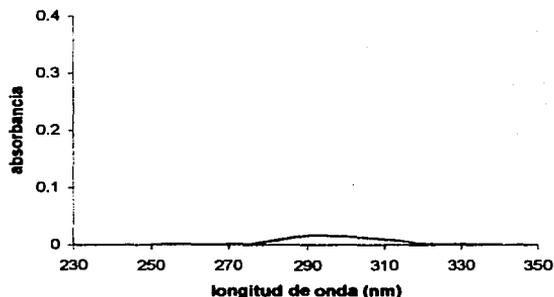


Figura No. 3 Espectro de absorción para placebo.

Se observa que los espectros de absorción del ketoconazol en la muestra de referencia y la muestra problema (crema) son muy semejantes, ambos presentan un máximo de absorbancia a 295 nm, lo que indica que la respuesta obtenida en la muestra problema (crema) se debe únicamente al ketoconazol.

Con respecto al placebo sin ketoconazol, se observa que presenta una lectura de absorbancia correspondiente a 0.015 a la longitud de onda de 295 nm, ésta lectura es prácticamente despreciable en comparación con la del principio activo, por lo que puede decirse que el placebo de la formulación no interfiere en el análisis.

#### 4.2 Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema se determinó mediante la realización del análisis por duplicado de ocho diferentes disoluciones estándar, preparadas a partir de una misma disolución patrón.

En la tabla No. 2 se presentan los resultados de las lecturas medidas en un espectrofotómetro UV/V a una  $\lambda = 295 \text{ nm}$  y utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. En el gráfico No. 1 se observa la tendencia lineal de los datos.

[mcg/mL]	ABSORBANCIA	
	Serie 1	Serie 2
60	0.171	0.170
90	0.255	0.261
120	0.341	0.343
150	0.422	0.424
180	0.506	0.505
210	0.591	0.592
240	0.678	0.675
270	0.754	0.756

Tabla No. 2

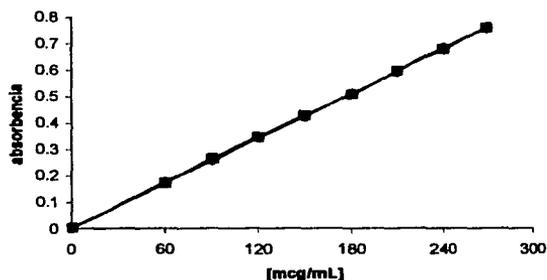


Gráfico No. 1 Linealidad del sistema.

La tabla No. 3 muestra los resultados obtenidos para la linealidad del sistema, además de los criterios para su aceptación.

	CRITERIO
$r = 0.99992$ $r^2 = 0.99992$ pendiente (m) = 0.0078 ordenada (b) = 0.00593 CV = 0.93064%	$r \geq 0.99$ $r^2 \geq 0.98$  CV $\leq$ 1.5%

Tabla No. 3

A continuación se muestran los resultados de las pruebas estadísticas realizadas:

**ORDENADA AL ORIGEN**

$$H_0 : b = \beta$$

$$H_1 : b \neq \beta \quad \text{donde } \beta = 0$$

$$t_{\text{cal}} = 0.044$$

$$t_{\text{tab}(14,0.975)} = 2.145$$

$$\text{Intervalo de confianza} = 0.00593 \pm 0.28511$$

$$\text{Limite superior} = 0.2910$$

$$\text{Limite inferior} = -0.2791$$

$$\text{Criterio: } |t_{\text{cal}}| < t_{\text{tab}}$$

Limites de confianza deben incluir a cero.

La ordenada al origen es estadísticamente igual a cero, ya que, el valor de la  $t_{\text{cal}}$  es menor que la  $t_{\text{tab}}$ ; y en el intervalo de confianza se encuentra el valor de cero.

**PENDIENTE**

$$H_0 : m = \alpha$$

$$H_1 : m \neq \alpha \quad \text{donde } \alpha = 1$$

$$t_{\text{cal}} = 0.00049$$

$$t_{\text{tab}(14,0.975)} = 2.145$$

$$\text{Intervalo de confianza} = 0.0027 \pm 1.0015$$

$$\text{Limite superior} = 1.0043$$

$$\text{Limite inferior} = -0.9988$$

$$\text{Criterio: } |t_{\text{cal}}| < t_{\text{tab}}$$

Limites de confianza deben incluir a 1

La pendiente es estadísticamente igual a 1, ya que, el valor de  $t_{\text{cal}}$  es menor al de  $t_{\text{tab}}$  : y en el intervalo de confianza se encuentra el valor de 1.

**4.3 Precisión del sistema.**

La precisión del sistema se realizó con seis muestras de una misma disolución estándar al nivel de 100% del procedimiento normal de análisis, la cuál corresponde a 150  $\mu\text{g/mL}$ .

En la tabla No. 4 se representan los datos de absorbancia de las seis disoluciones para calcular la precisión del sistema.

[mcg/mL]	ABSORBANCIA
150	0.421
150	0.424
150	0.425
150	0.424
150	0.434
150	0.428

Tabla No. 4

En la tabla No. 5 se presentan los resultados obtenidos para la precisión del sistema, además del criterio de aceptación para dicho parámetro.

	RESULTADOS	CRITERIO
n	6	
promedio	0.426	
D.E	0.00451	
CV	1.06%	CV ≤ 1.5%

Tabla No. 5

#### 4.4 Linealidad del método.

La linealidad del método de determinó por triplicado utilizando placebos cargados de ketoconazol a concentraciones de 120, 150 y 180  $\mu\text{g/mL}$ .

La tabla No. 6 muestra la cantidad de ketoconazol adicionado a placebos y la cantidad recuperada. En el gráfico No. 2 se observa la tendencia lineal de los datos.

CANTIDAD ADICIONADA ( $\mu\text{g}$ )	CANTIDAD RECUPERADA ( $\mu\text{g}$ )
121.0	122.2
120.0	121.2
122.0	123.8
150.0	150.3
152.0	154.0
153.0	153.3
182.0	180.4
184.0	184.1
181.0	177.7

Tabla No. 6

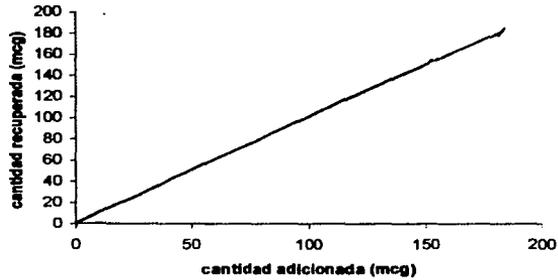


Gráfico No. 2 Linealidad del método.

La tabla No. 7 muestra los resultados obtenidos para la linealidad del método, además de los criterios para su aceptación.

	CRITERIO
$r = 0.9990$ $r^2 = 0.9980$ pendiente (m) = 0.9529 ordenada (b) = 0.7410 CV = 1.080% % recobro = 99.70	$r \geq 0.99$ $r^2 \geq 0.98$  CV $\leq$ 3% 97 - 103%

Tabla No. 7

A continuación se muestran los resultados de las pruebas estadísticas realizadas:

### ORDENADA AL ORIGEN

$$H_0 : b = \beta$$

$$H_1 : b \neq \beta \quad \text{donde } \beta = 0$$

$$t_{\text{cal}} = 0.0133$$

$$t_{\text{tab}(7,0.975)} = 2.365$$

$$\text{Intervalo de confianza} = 0.7410 \pm 130.98$$

$$\text{Limite superior} = 131.721$$

$$\text{Limite inferior} = -130.239$$

$$\text{Criterio: } |t_{\text{cal}}| < t_{\text{tab}}$$

Limites de confianza deben incluir a cero

La ordenada al origen es estadísticamente igual a cero, ya que, el valor de la  $t_{\text{cal}}$  es menor que la  $t_{\text{tab}}$ ; y en el intervalo de confianza se encuentra el valor de cero.

**PENDIENTE**

$$H_0 : m = \alpha$$

$$H_1 : m \neq \alpha \quad \text{donde } \alpha = 1$$

$$t_{\text{cal}} = 0.1307$$

$$t_{\text{tab}(7,0.975)} = 2.365$$

$$\text{Intervalo de confianza} = 0.9529 \pm 0.8518$$

$$\text{Limite superior} = 1.8047$$

$$\text{Limite inferior} = 0.0982$$

$$\text{Criterio: } |t_{\text{cal}}| < t_{\text{tab}}$$

Limites de confianza deben incluir a 1

La pendiente es estadísticamente igual a 1, ya que, el valor de  $t_{\text{cal}}$  es menor al de  $t_{\text{tab}}$ ; y en el intervalo de confianza se encuentra el valor de 1.

**4.5 Repetibilidad del método.**

La repetibilidad al 100% se determinó con seis placebos cargados al nivel de 100%. Es decir a una concentración de 150  $\mu\text{g/mL}$  de ketoconazol.

En la tabla No. 8 se presentan los porcentajes de recobro en cada una de las muestras analizadas.

MUESTRA	% RECOBRO
1	101.07
2	100.84
3	99.19
4	98.89
5	100.04
6	99.92

Tabla No. 8

$$n = 6$$

$$\bar{X} = 99.99\%$$

$$S_x = 0.86$$

$$CV = 0.86\%$$

**Criterio: Para métodos espectrofotométricos:**

$$CV \leq 3\%$$

**Cálculo para la determinación de "t" de Student para la media.**

$$H_0: R = \mu$$

$$H_1: R \neq \mu \quad \text{donde } \mu = 100\%$$

$$t_{\text{cal}} = 0.0284$$

$$t_{\text{tab}(5,0.750)} = 2.571$$

$$\text{Intervalo de confianza} = 99.99 \pm 0.9026$$

$$\text{Limite superior} = 100.89\%$$

$$\text{Limite inferior} = 99.08\%$$

Criterio:  $|t_{\text{cal}}| < t_{\text{tab}}$

Límites de confianza deben incluir a 100%

La  $t_{\text{cal}}$  es menor a la  $t_{\text{tab}}$  además el intervalo de confianza contiene el valor del 100% por lo que el porcentaje de recuperación es estadísticamente igual al 100%

#### 4.6 Reproducibilidad del método.

La reproducibilidad del método se realizó valorando por triplicado, por dos analistas y en diferentes días, muestras de producto (crema) aproximadamente equivalente al 100% del nivel de análisis.

La tabla No. 9 muestra los resultados de porcentaje recuperado, para los dos analistas y en ambos días.

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1	104.96	102.29
	102.29	103.30
	102.21	102.85
DIA 2	102.92	100.78
	100.27	101.89
	104.95	100.21

Tabla No. 9

$$n = 12$$

$$Y = 102.41$$

$$DE = 1.5193$$

$$CV = 1.51 \%$$

Criterio:

$CV \leq 3\%$  para métodos espectroscópicos.

La tabla No. 10 muestra el análisis de varianza.

Fuente de variación (FV)	Grados de Libertad (GL)	Suma de Cuadrados (SC)	Media de Cuadrados (MC)	F calculada	F tablas (0.05, $GL_{num}/GL_{den}$ )
Analista A A <sub>i</sub>	1	3.29	3.29	2.20	161.40
Día (D) D <sub>i</sub>	1	5.44	5.44	3.65	161.40
Interacción analista-Día (A-D) A <sub>i</sub> -D <sub>j</sub>	1	1.49	1.49	0.66	5.32
Error experimental (E) E <sub>ijk</sub>	8	17.85	2.23	-----	-----

Tabla No. 10 Tabla de Análisis de Varianza

Analizando los resultados anteriores, se puede afirmar lo siguiente:

- En el caso de la variación por los analistas  $F_{cal}$  es menor a  $F_{tab}$  el método es reproducible por los analistas.
- En el caso de la variación por los días  $F_{cal}$  es menor a  $F_{tab}$  el método es reproducible en distintos días por un mismo analista.

- En el caso de la variación analista - día  $F_{cal}$  es menor a  $F_{tab}$  el método es reproducible en distintos días por diferentes analistas.

#### 4.7 Estabilidad de la muestra analítica.

La tabla No. 11 muestra los resultados del porciento de recobro para cada una de las condiciones establecidas.

INICIAL $T_0$	TEMPERATURA AMBIENTE (3h)	PROTECCIÓN A LA LUZ (24 h)	REFRIGERACIÓN (24 h)
99.78	99.56	99.78	99.34
99.34	99.78	99.78	99.57
98.03	97.82	99.03	98.69

Tabla No. 11

La tabla No. 12 muestra los resultados obtenidos de los IC (intervalos de confianza), así como los valores de las medias para el Factor I para cada una de las condiciones establecidas.

	INTERVALO DE CONFIANZA	MEDIA DEL FACTOR I
T. ambiente (3 h) (25°C)	-1.8964 a 1.8964	99.99%
Oscuridad (24 h)	-1.6924 a 1.9724	100.14%
Refrigeración (24 h) (4°C)	-1.2219 a 1.5219	100.15%

Tabla No. 12

La muestra es estable a las tres condiciones ya que los intervalos de confianza incluyen al valor de cero.

La muestra es estable a las tres condiciones ya que los valores de la media para el factor I se encuentran entre 97-103%, que es el límite establecido para métodos espectrofotométricos.

**CAPITULO V**

**CONCLUSIONES**

En base a los resultados obtenidos al efectuar el procedimiento analítico propuesto para cuantificar ketoconazol en la presentación comercial de crema, se plantean las siguientes conclusiones.

### **5.1 Especificidad**

El método propuesto para la cuantificación de ketoconazol en crema es específico, ya que el espectro de absorción obtenido al desarrollar el procedimiento en el placebo muestra una lectura de absorbancia prácticamente despreciable en comparación con el principio activo, por lo que puede decirse que el placebo de la formulación no interfiere en el análisis.

Por otra parte, los espectros de absorción correspondientes a la disolución de la muestra de referencia y la disolución de la muestra problema (crema), son semejantes, lo cual corrobora que la absorbancia de la muestra problema es debida únicamente al ketoconazol.

### **5.2 Linealidad del sistema**

Respecto a la linealidad del sistema, en el gráfico No. 1 se muestra la tendencia lineal del sistema, en un intervalo de concentraciones de 30 a 270  $\mu\text{g/mL}$  de muestra de referencia de ketoconazol.

Lo anterior se comprobó con la determinación del coeficiente de correlación obtenido experimentalmente, el cual es mayor a 0.99 por lo que se afirma que existe una relación altamente significativa entre la concentración y la propiedad medida.

### **5.3 Precisión del sistema**

El sistema es preciso ya que se obtuvo un coeficiente de variación menor a 1.5%.

### **5.4 Linealidad del método**

Con respecto a la linealidad del método, el gráfico No. 2 muestra la linealidad del método al cuantificar el ketoconazol en la presentación farmacéutica de crema, en un intervalo de concentraciones de 80, 100 y 120%.

Esto se comprobó al realizar la prueba de "t de Student", en donde los valores obtenidos para la ordenada al origen y para la pendiente, no son significativamente diferentes de 0 y 1, respectivamente.

En lo que se refiere al coeficiente de correlación obtenido experimentalmente, es mayor a 0.99, por lo que se afirma que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

### **5.5 Repetibilidad del método.**

El método de cuantificación propuesto para ketoconazol en presentación de crema es repetible ya que el resultado de la prueba de "t de Student" demuestra que el valor de la media experimental no es significativamente diferente del 100%, y el coeficiente de variación obtenido es menor del 3.0%.

### **5.6 Reproducibilidad del método.**

Al realizar las pruebas de reproducibilidad de ketoconazol en la presentación de crema, se obtuvieron resultados que cumplen con los criterios de aceptación especificados para un método espectrofotométrico, coeficiente de variación menor al 3.0%.

En cuanto al análisis de varianza efectuado, se observa que no existe efecto alguno por analista, por día, ni por interacción día - analista. Por lo anterior se concluye que el método propuesto para la cuantificación de ketoconazol en crema es reproducible.

### **5.7 Estabilidad de la muestra analítica**

Por los resultados obtenidos al evaluar este parámetro, se concluye que la disolución de la muestra que contiene el ketoconazol, es estable por 24 horas en cualquiera de las tres condiciones propuestas (luz blanca, oscuridad y refrigeración) por lo que la muestra para el análisis puede ser guardada en la condición que se prefiera, para ser cuantificada posteriormente, dentro del intervalo de tiempo seleccionado.

### **5.8 Conclusión final**

Los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros evaluados en el método analítico propuesto cumplen satisfactoriamente con los criterios de aceptación establecidos en la validación de métodos analíticos para control de calidad por lo tanto se concluye que el método analítico propuesto para la cuantificación de ketoconazol en presentación comercial crema, está validado, lo que asegura que es confiable y satisface los requerimientos para los que fué desarrollado.

# APÉNDICE

## APÉNDICE

### LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO

Las hipótesis y las expresiones para la "t de Student" son:

Ordenada al origen.

$$H_0 : b = \beta$$

$$H_1 : b \neq \beta$$

$$\text{Donde } \beta = 0$$

$$t_{cal} = \frac{(b - \beta)}{S_{y/x} \left[ \frac{\sum Xi^2}{n \sum (Xi - \bar{X})^2} \right]^{1/2}}$$

Desviación estándar en la dirección Y ( $S_{y/x}$ )

$$S_{y/x} = \left[ \frac{\sum (Yi - \bar{Y})^2}{n - 2} \right]^{1/2}$$

Desviación estándar para la ordenada al origen ( $S_b$ ).

$$S_b = S_{y/x} \left[ \frac{\sum X_i^2}{n \left[ \sum (X_i - \bar{X})^2 \right]} \right]^{1/2}$$

Límites de confianza para la ordenada al origen.

$$LCb = b \pm [t_{ub}(n-2, 0.975)] [S_b]$$

Pendiente:

$$H_0: m = \alpha$$

$$H_1: m \neq \alpha$$

$$\text{Donde } \alpha = 1$$

$$t_{cal} = \frac{[(m - \alpha)] [S_x] [(n-1)]^{1/2}}{S_{y/x}}$$

Desviación estándar para la pendiente ( $S_m$ ).

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\left[ \sum (X_i - \bar{X})^2 \right]^{1/2}}$$

Límites de confianza para la pendiente.

$$LCm = m \pm [t_{\alpha/2} (n-2, 0.975)] [Sm]$$

Donde:

B = valor de la ordenada al origen experimental

$\beta$  = valor de la ordenada al origen teórica

m = valor de la pendiente experimental

$\alpha$  = valor de la pendiente teórica

$X_i$  = cantidad adicionada

$Y_i$  = cantidad recuperada

$\bar{X}$  = media de las cantidades adicionadas

$S_x$  = desviación estándar de las cantidades adicionadas

n = número de determinaciones

N = número de replicaciones

## REPETIBILIDAD

Cálculo para la determinación de "t de Student" para la media.

$$H_0 : R = \mu$$

$$H_1 : R \neq \mu$$

Donde  $\mu = 100\%$

$$t_{cal} = \frac{R - \mu}{\sigma_y}$$

Donde:

$$\sigma y = \frac{S}{(N)^{1/2}}$$

Intervalo de confianza del porcentaje encontrado (I.C)

$$I.C. = R \pm (n - 1, 0.975) [\sigma y]$$

### REPRODUCIBILIDAD

Los resultados obtenidos en ésta determinación se tabulan de acuerdo a la tabla 1, para evaluar la reproducibilidad; posteriormente se realiza un análisis de varianza para conocer las interacciones entre analistas, días y analista - día.

% DE RECOBRO		
Día (j)	Analista No. 1 (i)	Analista No. 2 (i)
1	Y <sub>111</sub>	Y <sub>211</sub>
	Y <sub>112</sub>	Y <sub>212</sub>
	Y <sub>113</sub>	Y <sub>213</sub>
2	Y <sub>121</sub>	Y <sub>221</sub>
	Y <sub>122</sub>	Y <sub>222</sub>
	Y <sub>123</sub>	Y <sub>223</sub>

Tabla No. 1

Donde:

"Y" primer subíndice es el resultado de cada analista.

"Y" segundo subíndice es en cada día.

"Y" tercer subíndice para cada replicación.

Se calculan las siguientes sumatorias para realizar la tabla de análisis de varianza.

$$1.- \Sigma Y_{ijk} = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + \dots + Y_{223})$$

$$2.- \Sigma Y_i^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$3.- \Sigma Y_j^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$4.- \Sigma Y_{ij}^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$5.- \Sigma Y_{ijk}^2 = [(Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + (Y_{121})^2 + \dots + (Y_{223})^2]$$

Proceder conforme la Tabla No. 2 de análisis de varianza.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Fuente de variación (FV)	Grados de Libertad (GL)	Suma de Cuadrados (SC)	Media de Cuadrados (MC)	F calculada	F tablas $\left(0.05, \frac{GL_{num}}{GL_{den}}\right)$
Analista (A) Ai	(i - 1)	$\frac{\sum Y_i^2}{jk} - \frac{(\sum Y_{ijk})^2}{ijk}$	$\frac{SC_A}{(i-1)}$	$\frac{MC_A}{MC_{AD}}$	$\left(0.05, \frac{(j-1)}{(j-1)}\right)$
Día (D) Dj	(j - 1)	$\frac{\sum Y_{ij}^2}{k} - \frac{\sum Y_i^2}{jk}$	$\frac{SC_D}{(j-1)}$	$\frac{MC_A}{MC_{AD}}$	$\left(0.05, \frac{(j-1)}{(i-1)(j-1)}\right)$
Interacción Analista-Día (A-D) Ai-Dj	(i - 1)(j - 1)	$\frac{\sum Y_{ij}^2}{k} - \frac{\sum Y_i^2}{jk} - \frac{\sum Y_j^2}{ik} + \frac{(\sum Y_{ijk})^2}{ijk}$	$\frac{SC_{AD}}{(i-1)(j-1)}$	$\frac{MC_{AD}}{MC_E}$	$\left(0.05, \frac{(i-1)(j-1)}{ij(k-1)}\right)$
Error experimental (E) Eijk	ij(k - 1)	$\sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum ij^2}{k}$	$\frac{SC_E}{ij(k-1)}$		

i= número de analista

j= número de días

k= número de repeticiones

# BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Abdel-Gawad F. M., "Spectrophotometric determination of some pharmaceutical piperazine derivatives through charge-transfer and ion-pair complexation reaction," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, **15** (11), 1679-1685.
- 2.- Bergers M., "Mechanism of action of antifungal drugs with special reference to the imidazole derivates," *Infect.*, **2**, 534-550.
- 3.- Castillo A. B. y González H. R., "Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos". *Farm.*, **30** (1).
- 4.- Comité de Guías de Validación. "Requisitos mínimos para la validación de un método analítico". Colegio Nacional de Químico Farmacéutico Biólogo., Secretaría de Salud. México 1991.
- 5.- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Edición 40 Ediciones PLM S. A. de C. V., México D.F. 1994 pp 1180.
- 6.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7ª. Edición México D. F. 2000, pp 830-831.
- 7.- Goodman & Gilman A. y cols. "Las bases Farmacológicas de la Terapéutica", 9ª edición. Editorial Mac Graw Hill Interamericana. Vol. 1 México D. F. 1996 pp. 698-678.
- 8.- Harris C. D. "Análisis Químico Cuantitativo", 2ª. Edición. Editorial Reverté. Barcelona España 2001, pp 561-578.
- 9.- Inman, E., Frischmann J. K., Jiménez P. J. y cols. "General meted validation guidelines for pharmaceutical samples". *Journal of chromatographic science*, 1987 **25**, 252-256.

- 10.- Guía para los laboratorios que realizan validaciones de métodos de análisis químicos. (notas personales del asesor).
- 11.- Khashaba P. Y., El-Shabouri S. R., Emara K. M y Mohamed A. M., "Analysis of some antifungal drugs by spectrophotometric and spectrofluorimetric methods in different pharmaceutical dosage forms". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000, 22, 363-376.
- 12.- Low A. S. y Wangboonskul J. "An HPLC assay for the determination of ketoconazole in common pharmaceutical preparations". *Analyst*. 1999, 124 (11), 1589-1593.
- 13.- Mcvan F. B. "Índice de Medicamentos". Editorial. El manual moderno pp. 878-880.
- 14.- Remington's Pharmaceutical Sciences. 19<sup>o</sup> edition Editorial Médica Panamericana S. A. de C. V. Buenos Aires Argentina, 1995, pp 1847.
- 15.- Sadegui S. y Shamsipur M., "A new extractive - spectrophotometric method for the determination of ketoconazole from pharmaceutical preparations". *Anal. Lett.*, 1998, 31 (15), 2691-2705.
- 16.- Shamsipur M. y Farhadi K., "Adsorptive stripping voltammetric determination of ketoconazole in pharmaceutical preparations and urine using carbon paste electrodes". *Analyst*. 2000, 125 (9), 1639-1643.
- 17.- Skiba M., Skiba-Lahiani, Marchais H. Duclos R. y Arnaud P., "Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations". 2000 *International Journal of Pharmaceutics*. 198 1-6.
- 18.- Skoog D. A., West M. D. y Holler F. J. "Química Analítica". Editorial McGraw- Hill. México D. F. pp 384 - 402.

- 19.- Smith - Reynard "Farmacología". Ed. Panamericana. pp. 847-828.
- 20.- The Merck Index. 9a. edición, Editorial Merck & CO., Inc., Rahway, N.J., U.S.A. 1976.
- 21.- The Pharmacopoeia of the United States of América XXIII. United States Pharmacopoeial Convention. Inc. U. S. A. 1999, pp 864 - 865.
- 22.- Thienpont A., Gal J., Aeschlimann C. y Félix G. " Studies on stereoselective separations of the "azole" antifungal drugs ketoconazole and itraconazole using HPLC and SFC on silica-based polysaccharides". *Analisis* 1999, 27 (8) 713-718
- 23.- Zarpkar S.S. y Halkar U. P. "Simple extractive colorimetric determination of ketoconazole from pharmaceutical preparations." *Indian Drugs*. 1991, 28 (6) 265-269.