

## Desarrollo y validación de los métodos analíticos para el control de calidad del micocilén polvo

### Development and validation of analytical methods for quality control of Micocilen powder

Yania Suárez Pérez<sup>I</sup>; Enilda Salvadora Rosales Gómez<sup>II</sup>; Mayra González Hurtado<sup>II</sup>; Andrés Álvarez Infante<sup>III</sup>; Mirta Castiñeira Díaz<sup>I</sup>

<sup>I</sup>Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Profesora Titular. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

<sup>II</sup>Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Empresa Reinaldo Gutiérrez. Establecimiento "Andrés Berro". La Habana, Cuba.

<sup>III</sup>Licenciado en Ciencias Químicas. Centro de Investigaciones Químicas. La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

El micocilén es un medicamento que se presenta en forma de polvo. Contiene 2 ingredientes farmacéuticos activos: el ácido undecilénico y el undecilinato de zinc. Por su acción fungistática, se ha convertido en un producto de alta demanda en Cuba, ya que las micosis se favorecen en climas cálidos y húmedos. Se realizó el desarrollo y la validación de 2 métodos analíticos para el control de calidad sobre la base de la cuantificación de cada analito presente en la formulación. Se seleccionaron técnicas volumétricas por neutralización acuosa y complejometría. Los resultados fueron satisfactorios, ya que en ambos casos se obtuvo adecuada especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez. Los métodos propuestos se compararon con los aplicados anteriormente y se obtuvieron resultados mucho más confiables, según resultados del análisis estadístico aplicado, sin diferencias significativas entre las réplicas de un mismo lote.

**Palabras clave:** Ácido undecilénico, undecilinato de zinc, volumetría de neutralización, complejometría, control de calidad, validación.

## ABSTRACT

The undecylenic acid (Micocilen) is a drug in powder presentation containing two active pharmaceutical ingredients: undecylenic acid and zinc undecylenate. By its fungistatic action becomes a first line product in Cuba because of mycoses are typical of wet and warm climates. Development and validation of two analytical methods for the quality control on the base of the quantification of each symbol present in the formula. Volumetric techniques were selected by aqueous neutralization and complexometric. Results were satisfactory since in both cases an appropriate specificity, linearity, accuracy, precision and robustness were obtained. Methods proposed were compared to those previously applied obtaining more reliable results, according to results of analytical analysis applied, without significant differences among replica of a same batch.

**Key words:** Undecylenic acid, zinc undecylenate, neutralization volumetry, complexometric, quality control, validation.

---

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha incrementado el número de infecciones de cualquier localización producidas por hongos y su gravedad. Esto se debe fundamentalmente al uso creciente de fármacos inmunodepresores en el tratamiento del cáncer y en la prevención del rechazo en los trasplantes de órganos, la existencia de enfermedad asociada a déficit inmunitario (como el sida) y la utilización, muchas veces no justificada, de antibióticos de amplio espectro durante períodos prolongados de tiempo. En general, las micosis superficiales se tratan con antimicóticos de aplicación tópica, pero los hongos más resistentes, la afectación del pelo y las uñas o las situaciones de riesgo especial, pueden exigir la administración prolongada de fármacos por vía sistémica.<sup>1</sup>

Entre los medicamentos contemplados en la cantera de productos de la Empresa "Reinaldo Gutiérrez", se encuentran las tabletas, los polvos y los granulados. Dentro de los líderes de la forma farmacéutica polvo, se encuentra el micocilén, un polifármaco en el cual se combinan el ácido undecilénico y el undecilinato de zinc. El micocilén se presenta como un polvo casi blanco o grisáceo con olor característico y se clasifica como antimicótico de uso tópico.<sup>2</sup> Es activo contra algunos hongos patógenos incluyendo *epidermophyton*, *trichophyton* y *microsporum sp.* Además se aplica en la prevención y tratamiento de la epidermofitosis común interdigital y en el tratamiento de tinea curtiis, tinea pedis y otras. El undecilinato de zinc actúa como astringente que contribuye a reducir la irritación asociada a la lesión. El micocilén talco es un producto muy popular entre la población cubana, por la gran incidencia de micosis favorecida a causa de la elevada humedad relativa y temperatura que existe durante casi todo el año.<sup>2</sup>

Este medicamento se analizaba mediante métodos desarrollados en el propio laboratorio.<sup>3</sup> Teniendo en cuenta la importancia que reviste actualmente la confiabilidad de los resultados analíticos<sup>4</sup> y la función que desempeña la validación

---

para asegurar estos propósitos,<sup>5</sup> la empresa productora se propone aplicar métodos de control de calidad adaptados a partir de los reportados en monografías oficiales y realizar su validación exhaustiva, a partir de las exigencias regulatorias vigentes.<sup>6</sup>

La cuantificación del undecilinato de zinc se realiza usualmente empleando volumetría ácido-base por un procedimiento indirecto<sup>7</sup> o la complejometría.<sup>8</sup> Sin embargo, para el ácido undecilénico se propone la volumetría de neutralización directa.<sup>7,8</sup>

Teniendo en cuenta la composición de la formulación, se impone desarrollar metodologías extractivas previas a la etapa de cuantificación que garantice la eliminación de posibles interferencias y validar los nuevos procedimientos propuestos, teniendo en cuenta los requisitos establecidos<sup>4-6</sup> y la facilidad de su implementación en las condiciones actuales de la empresa productora.

## MÉTODOS

### Métodos para control de calidad de micocilén polvo

#### *Cuantificación de ácido undecilénico*

A continuación se describe el procedimiento propuesto:

1. Pesar con exactitud 5,0 g de sustancia en ensayo y trasvasar a un frasco Erlenmeyer de 500 mL con tapa.
2. Añadir 80 mL de éter de petróleo.
3. Agitar durante 1 h en una zaranda Netz Störung ajustada en posición media.
4. Filtrar a través de un filtro de vidrio aglomerado No. 4.
5. Lavar el residuo con 4 x 10 mL de éter de petróleo.
6. Añadir 10 mL de etanol previamente neutralizado con hidróxido de sodio 0,1 mol/L y 1 mL de solución indicadora timolftaleína- fenolftaleína (1:1).
7. Valorar con solución de hidróxido de sodio 0,1 mol/L hasta cambio de color.

El contenido de ácido undecilénico se calculó por la siguiente expresión:

$$AU = [(A \times f \times mEq) / m] \times 100$$

donde:

AU: contenido de ácido undecilénico en el micocilén polvo (%).

A: mililitro de valorante consumidos.

f: factor de corrección del valorante.

mEq: miliequivalente= 18,43 mg de ácido undecilénico por cada mL de valorante a la concentración de trabajo (0,1 mol/L).

m: masa de analito que se desea analizar.

### *Cuantificación del undecilenato de zinc*

El procedimiento aplicado fue el siguiente:

1. Pesar con exactitud 2,5 g de sustancia en ensayo y trasvasar a un frasco Erlenmeyer de 250 mL.
2. Añadir 10 mL de solución de ácido clorhídrico 1 mol/L y 50 mL de agua
3. Hervir durante 10 min.
4. Enfriar a temperatura ambiente.
5. Filtrar a través de papel de filtración lenta.
6. Lavar el residuo con 4 x 20 mL de agua.
7. Neutralizar el filtrado con solución de amoníaco 12 % v/v usando papel de tornasol como indicador.
8. Añadir 3 mL de solución de ácido clorhídrico 10 % v/v, 4g de hexamina y una pequeña porción de xilenol como indicador.
9. Valorar lentamente con solución de versenato de sodio 0,05 mol/L hasta cambio de color.

El contenido de undecilenato de zinc se calculó por la misma expresión mostrada con anterioridad para ácido undecilénico, siendo el mEq= 21,60 mg.

### **Validación de los métodos analíticos para control de calidad**

Ambos métodos volumétricos fueron validados según los parámetros exigidos para la categoría I,<sup>8</sup> que incluye las técnicas destinadas a cuantificar principios activos en las formas terminadas. Los parámetros analizados fueron:

*Especificidad:* Se realizó de forma independiente el análisis propuesto por cada método, en presencia de los placebos correspondientes:

- Especificidad para ácido undecilénico: análisis por triplicado del placebo A.
- Especificidad para undecilenato de zinc: análisis por triplicado del placebo B.

Además se cargaron dichos placebos con el 100 % de analito y se valoraron respectivamente por cada método en estudio. Se calculó el % de recobro (R).

*Criterio:* Ninguno de los componentes de la formulación debe dar respuesta cuantificable como interferencia en el método en estudio. El método debe ser específico frente a los excipientes y frente al otro fármaco presente en cada caso.

*Linealidad del sistema:* se realizó mediante el análisis de 5 concentraciones de cada analito por triplicado, en un rango de 50-150 % de la cantidad teórica declarada como 100 %. En ambos casos se construyó una curva de calibración de respuesta analítica (Y) vs. concentración teórica (X). Los resultados se procesaron estadísticamente mediante el programa STATGRAPHICS versión 5.1 (opción regresión lineal múltiple) y

se determinó:  $r$  (coeficiente de correlación lineal),  $r^2$  (coeficiente de determinación),  $a$  (intercepto) y  $b$  (pendiente), para el 99 % de confianza.

*Criterios de aceptación:*

- Ecuación de la recta:  $y = bx + a$ .
- $r \geq 0,99$ .
- $r^2 \geq 0,98$ .
- Prueba de proporcionalidad del método analítico o hipótesis nula de la ordenada en el origen  $a = 0$ .
- Se empleó la prueba estadística  $t$  de Student para  $n-2$  grados de libertad, siendo  $n$  el número total de valores donde:  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$ .
- Prueba de la hipótesis nula de la pendiente:  $b = 0$ .
- Se determinó a partir de una prueba ANOVA de la regresión, o mejor, la probabilidad asociada al valor de la pendiente, es decir, si la  $p < 0,05$ , el valor de "b" difiere significativamente de cero.

Se calcularon los factores de respuesta ( $f$ ) según la expresión:

$$f = \frac{y}{x}$$

donde:

$y$ : respuesta analítica  
 $x$ : cantidad de analito

Con estos resultados se determinó el valor medio ( $\bar{f}$ ) y la desviación estándar (DE) de los factores de respuesta. El coeficiente de variación de los factores de respuesta ( $CV_f$ ) debe ser menor que 5 %.

### **Linealidad y exactitud del método**

Se prepararon 2 placebos diferentes (placebo A: contiene el 100 % de undecilenato de zinc y placebo B: contiene el 100 % de ácido undecilénico). Estos se cargaron con el analito a cuantificar por cada método para obtener 3 niveles de concentración (80, 100 y 120 %), los cuales fueron analizados por triplicado. Con los resultados obtenidos se construyeron curvas de calibración (mililitros consumidos vs. concentración) y de recuperación (cantidad recuperada vs. cantidad añadida), procesadas por regresión lineal de igual forma a la descrita con anterioridad (linealidad del sistema). Adicionalmente se evaluó el porcentaje de recobro ( $R$ ) a través de la fórmula:

$$R = \frac{A}{B} * 100$$

donde:

A: % de analito recuperado.

B: % de analito teórico.

Se incluyó la determinación del recobrado medio ( $\bar{\mathcal{R}}$ ) y del coeficiente de variación total (CV).

Criterios de aceptación:

$\bar{\mathcal{R}}$ : 97-103 %

CV  $\leq$  3,0 %

Además, se realizó la prueba G de Cochran, para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados. El valor de  $G_{\text{tab}}$  se calculó mediante la siguiente expresión:

$$G_{\text{exp}} = \frac{S_{\text{max}}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2}$$

$G_{\text{tab}}$  ( $\alpha = 0,05$ ,  $k = 3$ ,  $n = 3$ )

donde:

$S_{\text{max}}$ : desviación estándar máxima.

$S_{1,2,3}$ : desviación del nivel 1, 2 y 3.

k: grupos experimentales.

n: determinaciones por grupo.

Si  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$ , las varianzas de las 3 concentraciones son equivalentes, o lo que es igual, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Por último se aplicó la prueba t de Student para demostrar que no existen diferencias significativas entre el valor medio de recobro obtenido y el 100 %.

Siendo:  $n-1$  los grados de libertad y  $\alpha = 0,01$ .

$$t_{\text{exp}} = |100 - \bar{\mathcal{R}}| / (n^{1/2} / CV)$$

donde:

$\bar{\mathcal{R}}$ : valor medio del porcentaje de recobro.

CV: coeficiente de variación de la desviación típica del porcentaje de recobro.

N: número de determinaciones.

*Precisión:* incluyó la evaluación de la repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad.

*Repetibilidad:* se analizaron por sextuplicado las mismas muestras (equivalentes al 100 %) con la participación del mismo analista, en el mismo día y laboratorio. Se calculó el CV.

Criterio de aceptación:  $CV < 3,0 \%$ .

*Precisión intermedia:* participaron 2 analistas, en 2 días diferentes, en el mismo laboratorio, que analizaron muestras homogéneas equivalentes al 100% por triplicado en cada caso. Se calculó el CV total. Criterio de aceptación:  $CV < 3,0 \%$ .

Adicionalmente se realizaron otras pruebas para evaluar la influencia del analista y el día en los resultados analíticos, estas fueron:

*Prueba F de Snedecor:* se utilizó para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados de los analistas que emplearon el mismo método y entre los días en que se realizaron los análisis, calculándose según la siguiente expresión.

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

tal que  $F \geq 1$

donde:

$S_1$ : varianza del analista 1, o del día 1.

$S_2$ : varianza del analista 2, o del día 2.

El valor de  $F_{exp}$  se compara con  $F_{tab}$  para  $\alpha = 0,05$ ,  $F_1 = n - 1$  grados de libertad del numerador y  $F_2 = n - 1$  grados de libertad del denominador.

Si  $F_{exp} < F_{tab}$  no existe diferencia significativa entre la precisión alcanzada por los analistas, en dos días de trabajo.

*-Prueba de la t de Student:* se utilizó para comprobar si los valores obtenidos entre los analistas, que emplearon igual método, y los dos días en que realizaron los análisis eran homogéneos, para el nivel de significación  $\alpha = 0,05$  y los grados de libertad seleccionados  $f = (n_1 + n_2) - 2$ .

El valor de  $t_{exp}$  se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$t_{exp} = \frac{X_1 - X_2}{S \left[ \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]^{1/2}}$$

donde:  $X_1$  y  $X_2$ : valores de las medias de los análisis de las series 1 y 2, respectivamente.

S: varianza ponderada que se calcula como:

$$S = \left[ \frac{(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \right]^{1/2}$$

$n_1$  y  $n_2$ : número de determinaciones de las series 1 y 2, respectivamente.

El valor de  $t_{exp}$  se compara con el valor de la  $t_{tab}$  para  $\alpha = 0,05$  y  $f = n_1 + n_2 - 2$ .

*Reproducibilidad:* se evaluó a través de un estudio colaborativo realizado entre el laboratorio de control de calidad de la Empresa "Andrés Berro" y el Centro de Investigaciones Químicas (CIQ). Participaron 2 analistas (uno de cada laboratorio), realizando los análisis por triplicado. Los resultados se procesaron de igual forma que para la precisión intermedia.

*Robustez:* se recurrió al esquema clásico de *Youden y Steiner*,<sup>9</sup> el cual considera 7 factores o variables diferentes en 2 niveles: mayúsculas (corresponde al método en estudio) y minúsculas (representan las condiciones alternativas). Se efectuaron 8 análisis por muestra y cada uno fue una combinación diferente de los 7 factores analizados (tabla 1). Para decidir si un factor tiene influencia importante, se comparó el valor calculado en la tabla de diferencias con la expresión  $\sqrt{S^2}$ , siendo el valor de S la desviación estándar del estudio de repetibilidad. Las diferencias superiores en valor absoluto a  $S\sqrt{2}$  se consideraron significativas.

**Tabla 1.** Factores analizados para cada variable en el ensayo de robustez para los métodos en estudio

Variable	Mayúscula	Minúscula
Determinación del ácido undecilénico (volumetría de neutralización)		
Tiempo de agitación	A-60 min	a-45 min
Medio filtrante (vidrio aglomerado)	B-No. 4	b-No. 5
Número de lavados	C-4 porciones	c-3 porciones
Cantidad de alcohol	D-100 mL	d-80 mL
Cantidad de éter	E-80 mL	e-70 mL
Tiempo de agitación	F-60 min	f-90 min
Volumen de indicador	G-1 mL	g-0,5 mL
Determinación del undecilenato de zinc (complejometría)		
Tiempo de calentamiento	A-10 min	a-15 min
Cantidad de agua añadida	B-50 mL	b-40 mL
Cantidad de hexamina	C-4 g	c-3 g
Número de lavados	D-4 porciones	d-3 porciones
Medio filtrante	E-papel lento	e-papel rápido
Volumen de amoniaco	F-4 mL	f-0,5 mL
Volumen de HCl	G-10 mL	g-7 mL

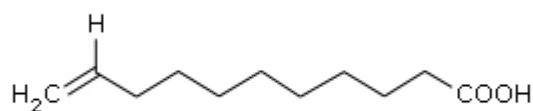
### **Análisis cuantitativo de ácido undecilénico y undecilenato de zinc presentes en el micocilén polvo**

Se procedió a la aplicación de los métodos propuestos y los registrados (métodos desarrollados por el fabricante con anterioridad<sup>3</sup>) a 3 lotes de producto terminado: 4125, 4126 y 4127. Los análisis se realizaron por sextuplicado y los resultados se compararon estadísticamente por análisis de varianza, para establecer si existían diferencias significativas por cada lote, entre réplicas y entre métodos.

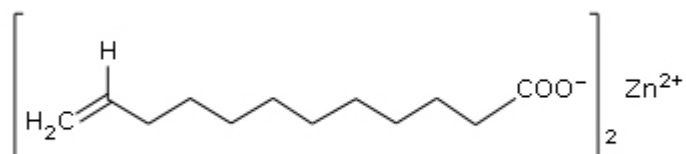
## **RESULTADOS**

Las características estructurales del ácido undecilénico y el undecilenato de zinc, se muestran en las figuras 1 y 2.





**Fig. 1.** Estructura química del ácido undecilénico.



**Fig. 2.** Estructura química del undecilenato de zinc.

En las tablas 2, 3 y 4 se resumen los resultados obtenidos en la validación de los métodos desarrollados. El cumplimiento de los criterios de aceptación establecidos para cada parámetro, avala la adecuada especificidad, linealidad, exactitud y precisión de ambos métodos.

**Tabla 2.** Resultados del parámetro especificidad para ambos métodos analíticos

Réplicas	Resultados (%)			
	Método para cuantificar AU (Volumetría de neutralización)		Método para cuantificar UZ (Complejometría)	
	Placebo A	Placebo A más analito 100%)	Placebo B	Placebo B más analito 100 %)
1	0,30	99,08	0,08	98,56
2	0,30	99,08	0,08	98,30
3	0,30	97,50	0,08	99,42

AU: ácido undecilénico; UZ: undecilenato de zinc.

**Tabla 3.** Resultados del procesamiento estadístico de los parámetros linealidad del sistema, del método y exactitud

Parámetros	Volumetría de neutralización (AU)	Complejometría (UZ)	Criterios
<b>Linealidad del sistema</b>			
Ecuación de la recta r r <sup>2</sup>	y= 0,258x + 0,507 r= 0,9990 r <sup>2</sup> = 0,9980	y = 0,116x - 0,188 r= 0,9998 r <sup>2</sup> = 0,9996	y= bx+a r≥ 0,99 r <sup>2</sup> ≥ 0,98
Significación del intercepto texp ttab	n= 13 1,475 2,16	n= 13 -0,795 2,16	texp< ttab no significativo
Pendiente b t p	0,258 39,528 0,0000	0,116 103,516 0,0000	b≈ 1 t alta, significativa p<< 0,05
CV f	1,78	0,80	CV≤ 5 %
<b>Linealidad del método</b>			
Ecuación de la recta r r <sup>2</sup>	y= 0,268x - 0,213 r= 0,9999 r <sup>2</sup> = 0,9999	y = 0,233x + 0,023 r= 0,9999 r <sup>2</sup> = 0,9999	y= bx+a r≥ 0,99 r <sup>2</sup> ≥ 0,98
Significación del intercepto texp ttab	n= 7 0,646 2,36	n= 7 0,418 2,36	t exp< t tab no significativo
Pendiente b t p	0,268 232,095 0,0027	0,233 417,976 0,0015	b≈ 1 t alta, significativa p<< 0,05
CV f	1,60	0,98	CV≤ 5 %
<b>Exactitud del método</b>			
Ecuación de la recta r r <sup>2</sup>	y= 0,x - 0,0068 r= 0,9996 r <sup>2</sup> = 0,9989	y= 0,0895x + 0,2093 r= 0,9995 r <sup>2</sup> = 0,9943	y= bx+a r≥ 0,99 r <sup>2</sup> ≥ 0,98
Significación del intercepto texp ttab	n= 13 -1,37 2,36	n= 13 2,04 2,36	texp< ttab no significativo
Pendiente b t p	0,0046 109,45 0,0000	0,0895 151,96 0,0000	b ≈ 1 t alta, significativa p << 0,05
CV f	1,53	1,08	CV≤ 5 %
R promedio (%)	R= 98,790	R= 97,910	97-103 %
CV (%)	CV= 0,730	CV= 0,650	C≤ 3 %
Prueba de la t Student	texp= 0,330 ttab= 12,710	texp= 0,430 ttab= 12,71	texp< ttab
Prueba de Cochran	Gexp= 0,3229 Gtab= 0,8709	Gexp= 0,4211 Gtab= 0,8709	Gexp< Gtab; a= 0,05; k= 3, n= 3

AU: ácido undecilénico; UZ: undecilenato de zinc.

**Tabla 4.** Resultados del procesamiento estadístico de los parámetros evaluados como parte de la precisión de los métodos analíticos

Parámetros	Volumetría de neutralización (AU)	Complejometría (UZ)	Criterios
Repetibilidad	CV= 0,54 %	CV= 1,66 %	CV ≤ 3 %
Precisión intermedia			
CV (%)	0,49	1,17	CV ≤ 3 %
Fischer (F) y Student (t) entre días	F <sub>exp</sub> = 1,54 t <sub>exp</sub> = 2,16	F <sub>exp</sub> = 1,35 t <sub>exp</sub> = 2,20	F <sub>exp</sub> < F <sub>tab</sub> t <sub>exp</sub> < t <sub>tab</sub>
Fischer (F) y Student (t) entre analistas	F <sub>exp</sub> = 1,31 t <sub>exp</sub> = 1,27	F <sub>exp</sub> = 5,03 t <sub>exp</sub> = 0,15	F <sub>tab</sub> = 5,05 t <sub>tab</sub> = 2,23
Reproducibilidad			
CV (%)	1,61	0,79	CV ≤ 3 %
Fischer (F) y Student (t) entre analistas	F <sub>exp</sub> = 1,99 t <sub>exp</sub> = 0,15	F <sub>exp</sub> = 2,16 t <sub>exp</sub> = 1,84	F <sub>exp</sub> < F <sub>tab</sub> T <sub>exp</sub> < t <sub>tab</sub>
Fischer (F) y Student (t) entre laboratorios	F <sub>exp</sub> = 3,74 t <sub>exp</sub> = 2,14	F <sub>exp</sub> = 3,66 t <sub>exp</sub> = 0,55	F <sub>tab</sub> = 5,05 t <sub>tab</sub> = 2,23

AU: ácido undecilénico; UZ: undecilenato de zinc.

En el análisis del parámetro robustez para el ácido undecilénico, ninguno de los factores estudiados fue superior a  $S\sqrt{2} = 2,3$ , por lo que los cambios evaluados no afectaron los resultados analíticos. Sin embargo, este estudio aplicado a la complejometría para el undecilenato de zinc, dio diferencias superiores a  $S\sqrt{2} = 1,45$  para 4 de los 7 factores estudiados. Estos fueron C, D, E y F (tabla 1) correspondientes a: cantidad de hexamina, número de lavados, medio filtrante y volumen de amoniaco. Los mejores resultados en cada caso correspondieron a la posibilidad representada por las letras mayúsculas (tabla 1).

En la [tabla 5](#) se muestra la comparación estadística de los resultados de la cuantificación de ambos ingredientes farmacéuticos activos, al aplicar los métodos desarrollados y validados como parte de este trabajo y los empleados anteriormente para el control de calidad. Como se observa, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para los resultados obtenidos por los diferentes métodos en el mismo lote, con excepción del lote 4126 en la determinación de ácido undecilénico. Sin embargo, estos fueron similares entre las réplicas analizadas por cada lote.

**Tabla 5.** Comparación estadística de los resultados obtenidos entre réplicas y entre métodos para cada analito en el micocilén polvo

Lote	Comparación	Resultados (F)
Ácido undecilénico		
4125	Réplicas	0,548 ns
	Métodos	25,772
4126	Réplicas	0,913 ns
	Métodos	3,138 ns
4127	Réplicas	1,010 ns
	Métodos	11,572
Undecilenato de zinc		
4125	Réplicas	3,033 ns
	Métodos	108,226
4126	Réplicas	0,371 ns
	Métodos	122,859
4127	Réplicas	1,646 ns
	Métodos	116,018

## DISCUSIÓN

### Métodos para control de calidad de micocilén polvo

*Cuantificación de ácido undecilénico:* Se seleccionó un método volumétrico basado en la neutralización del analito en medio acuoso, teniendo en cuenta la presencia de un grupo carboxilo libre, que le confiere suficiente acidez al compuesto para ser valorado en este medio (fig. 1). La metodología propuesta difiere de los métodos oficiales reportados para el control de calidad de la materia prima <sup>(7,8)</sup> en la dosis y la composición de la matriz en estudio, la cual corresponde a una forma dosificada. No solo desempeñan una función importante la presencia de excipientes, sino también el otro principio activo que coexiste en la matriz y presenta similitudes estructurales con el analito (fig. 2). Por esta razón, se impone la necesidad de aplicación de un tratamiento extractivo previo a la etapa de cuantificación, que garantice la eliminación de posibles interferencias.

Los resultados obtenidos con anterioridad a partir del método registrado para el control de calidad del ácido undecilénico,<sup>3</sup> mostraban como tendencia la obtención de valores muy próximos al límite inferior de especificación. Estos resultados se atribuían a posibles errores sistemáticos por defecto, a causa de pérdidas del analito en la etapa de filtración empleando papel denso.

En el método propuesto, se recomienda la filtración a través de filtro de vidrio aglomerado No. 4. La reducción en la porosidad del medio filtrante contribuye favorablemente a la recuperación del analito. A su vez, la sustitución de filtración por gravedad por la filtración al vacío, tiene como ventaja la reducción del tiempo necesario para el análisis. Otra etapa importante en el nuevo procedimiento es la agitación mecánica en zaranda en lugar de la agitación manual sugerida con

anterioridad. Además de reducir el esfuerzo del analista en esta operación, mejora la eficiencia de la extracción y reduce los posibles errores asociados a este paso.

*Cuantificación del undecilenato de zinc:* el método consistió en la determinación de zinc mediante complejometría con ácido etilen diamino tetra acético (EDTA) en forma de su sal disódica. Este método es ampliamente utilizado para control de calidad de fármacos que contienen metal en su estructura. En este caso el zinc se encuentra en forma iónica (fig. 2). Las etapas propuestas en el método en estudio que se realizaron antes de la cuantificación, difieren con respecto a los métodos oficiales reportados para la materia prima.<sup>7</sup>

Se plantea la adición de HCl con el objetivo de desplazar el equilibrio a la forma no disociada correspondiente al ácido undecilénico, el cual precipita en solución acuosa y puede ser removido, quedando el zinc libre de interferencias en medio acuoso. El precipitante utilizado también es insoluble en agua.

Con el propósito de mejorar la detección del punto final de la valoración se realizaron modificaciones al método aplicado con anterioridad,<sup>3</sup> las cuales consistieron en:

1. Añadir 4 g de hexamina, cantidad que favoreció la persistencia del cambio de color del indicador por un mayor tiempo.
2. Se sustituyó el xilenol en solución por el xilenol en estado sólido, teniendo en cuenta la escasa estabilidad de la solución en el tiempo.

### **Validación de los métodos analíticos para el control de calidad**

La especificidad para control de calidad se comprobó en primer lugar frente a los placebos correspondientes, los cuales dieron valores muy bajos de porcentaje, corroborando la ausencia de interferencia de los restantes componentes de la matriz (tabla 2). Se comprobó la adecuada recuperación de los analitos correspondientes al valorar por triplicado los placebos cargados con el 100 % de analito, confirmando la ausencia de interferencias analíticas.

Los sistemas y los métodos fueron suficientemente lineales, según se demostró a partir de los valores obtenidos para  $r$  y  $r^2$  muy próximos a la unidad, por lo que existió una elevada correlación lineal entre la respuesta analítica y la concentración de analito en los rangos analizados (de 25,0-74,5 mg/g para el ácido undecilénico y de 100,3-300,05 mg/g para undecilenato de zinc). El valor del intercepto ( $a$ ) con el eje de las ordenadas diferente de cero desde el punto de vista estadístico, indica un error sistemático del método. Sin embargo, para ambos métodos se cumplió la prueba de proporcionalidad ya que los límites de confianza del término independiente del método incluyeron el cero (para ácido undecilénico: 0,0000-1,0147 y para undecilenato de zinc: -0,8844-0,6068), por lo que el intercepto no fue significativo.

El cumplimiento de todos los parámetros asociados a la regresión lineal avaló la elevada correlación entre respuesta y concentración para el ensayo de linealidad del sistema, del método y la exactitud (tabla 3).

Adicionalmente se comprobó para ambos métodos, que se alcanzaron elevados porcentajes de recobro que no difieren significativamente del 100 % y con CV inferiores al 3 % establecido como límite. Como la  $G_{exp} < G_{tab}$ , las varianzas de los 3 niveles de concentración evaluados por ambos métodos, fueron equivalentes, no influyó el factor concentración en la variabilidad de la respuesta medida. De este modo se puede afirmar que las técnicas fueron exactas y no se afectaron por errores

sistemáticos de forma significativa, por lo que se pueden obtener valores experimentales muy próximos al valor verdadero.

Para la repetibilidad del método, se estimó el CV. En todos los casos los CV reportados fueron inferiores al límite establecido de 3,0 % (tabla 4); por lo que los métodos cumplieron con los criterios de aceptación vigentes y fueron suficientemente repetibles. Es decir, se obtuvieron resultados similares al realizar análisis repetidos, a la concentración equivalente al 100 %, por el mismo analista en el mismo laboratorio.

La precisión intermedia también fue evaluada, dando resultados acordes a lo estipulado. Se obtuvieron en ambos casos valores de CV por debajo del 3,0 % establecido como límite, estimados a partir de las mediciones de consumo de valorante (mL) respectivamente. El análisis se complementó con las pruebas de Fischer y de la t de Student (tabla 4).

En ambos métodos fue la  $F_{exp} < F_{tab}$ , por lo que no existieron diferencias significativas entre las precisiones de los analistas, independientemente del día en que se efectuó el ensayo. Los valores de las  $t_{exp}$  resultaron menores que las  $t_{tab}$  en cada caso; no existieron diferencias significativas entre las medias obtenidas por los analistas.

Se observó un comportamiento similar en el estudio de reproducibilidad, considerando el efecto del laboratorio y del analista, en la respuesta analítica. El cumplimiento de los criterios de aceptación para los parámetros repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad, ratificaron la precisión de los 2 métodos, por lo que pueden ser aplicados al control de calidad del micocilén polvo, sin influencia significativa de los errores aleatorios.

El método para cuantificar ácido undecilénico fue robusto para todos los factores ensayados, mientras que para la complejometría para undecilenato de zinc, se debe ser mucho más cuidadoso en el establecimiento de las condiciones experimentales. Se verificó que los mejores resultados en general se presentan para las "mayúsculas" (tabla 1), ya que las diferencias siempre fueron mayor que cero. En los casos de las modificaciones propuestas en este trabajo, se obtuvieron las diferencias  $> S\sqrt{2}$ , para el número de lavados utilizados (3,45), seguido de la cantidad de hexamina (2,12) y luego con igual impacto: el medio filtrante y el volumen de amoniaco (1,70), valores ligeramente superiores al establecido como límite ( $S\sqrt{2} = 1,45$ ). A partir de estos resultados, quedaron definidos estos 4 factores como los de mayor impacto en la calidad de los resultados analíticos.

#### **Análisis cuantitativo de ácido undecilénico y undecilenato de zinc presentes en el micocilén polvo**

Los resultados del análisis cuantitativo demostraron la correcta dosificación en base al ácido undecilénico y el undecilenato de zinc en los lotes 4125, 4126 y 4127. Existieron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para cada fármaco, con el método antes y después de la modificación, siendo superiores los resultados alcanzados con los métodos validados para el control de calidad del micocilén polvo. Estos resultados sugieren las ventajas de las nuevas propuestas que logran mejorar la exactitud de los métodos analíticos. Además se muestra la consistencia de los procesos tecnológicos y analíticos, ya que la ausencia de diferencias significativas entre réplicas, confirmó la elevada precisión de los métodos en estudio y la similitud en la dosis de los lotes analizados por el mismo método.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mediavilla A, Flórez J. Enfermedades infecciosas. Fármacos antifúngicos. En: Flórez J. Farmacología humana. 3ra ed. Barcelona: Masson, SA; 1997. p. 1173.
2. Ministerio de Salud Pública/Centro para el Desarrollo de la Farmacoepidemiología. Formulario Nacional de Medicamentos. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2006. p. 302.
3. Empresa Andrés Berro. Especificaciones de calidad. Micocilén polvo. Procedimiento Normalizado de Operación. L1-419E. La Habana: Empresa Andrés Berro; 2004.
4. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Regulación 37- 2004. Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Medicamentos. La Habana: CECMED; 2004. p. 17.
5. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2(R1). Washington: Food and Drug Administration; 2005. p. 1-2.
6. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Regulación 41-2007. Validación de métodos analíticos. La Habana: CECMED; 2007. p. 6-7.
7. British Pharmacopoeia. Volume I & II Monographs: Medicinal and Pharmaceutical. Versión electrónica. London: The Stationery Office; 2009.
8. United States Pharmacopoeia XXX and National Formulary 25<sup>st</sup>: United States Pharmacopoeial Convention. USP 30. Versión electrónica New York: Pharm Convention Inc.; 2007.
9. Fernández A. Validación de técnicas analíticas. La Habana: Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos; 1995.

Recibido: 30 de noviembre de 2010.

Aprobado: 9 de enero de 2011.

Dra. C. *Yania Suárez Pérez*. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. Ave 23 No. 21 425 e/ 214 y 222, La Coronela, La Lisa, CP 13 600, La Habana, Cuba. Correo electrónico: [yaniasp@ifal.uh.cu](mailto:yaniasp@ifal.uh.cu)