

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Aplicación de un método analítico revalidado por cromatografía líquida para la cuantificación de permetrina 1 %

Alicia Tarinas Reyes,<sup>I</sup> Rolando D. Tápanes Peraza,<sup>II</sup> Ditter Fernández Rangel,<sup>III</sup> Natividad Hernández Contreras<sup>IV</sup>

### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** en Cuba, al igual que en otros países, la infestación por *Pediculus capitis* se ha incrementado notablemente a partir de la década de los setenta, por lo que se desarrolla un intenso programa dirigido a su control y prevención, en el cual se incluyen estudios sobre la calidad de la permetrina, que es un piretroide sintético, activo frente a una amplia gama de parásitos, con actividad pediculicida a 1 % y escabicida a 5 %. Dada su baja toxicidad y por responder favorablemente a la relación riesgo/beneficio, constituye uno de los pediculicidas de elección para disminuir la infestación por piojos. **OBJETIVO:** revalidación de una metodología analítica por cromatografía líquida de alta resolución y su aplicación en la cuantificación de 12 muestras de 2 lotes de loción de permetrina 1 %, de producción nacional. **MÉTODOS:** los parámetros evaluados fueron linealidad, precisión y exactitud. Se prepararon 7 estándares de calibración y soluciones de trabajo con concentraciones que se encontraban entre 100 y 15 000 µg/mL. Estos parámetros de validación fueron verificados a través del coeficiente de correlación, el coeficiente de variación y el error relativo porcentual. **RESULTADOS:** la especificidad del método fue corroborada a través de los cromatogramas realizados, en los cuales los tiempos de retención fueron entre 8,8 y 9,2 min para el isómero *trans* y entre 10,7 y 11,2 min para el isómero *cis*. El coeficiente de correlación determinado para ambos isómeros fue mayor que 0,99; el coeficiente de variación fue menor que 3 % y el error relativo porcentual estuvo entre -3 y 1 %, tanto para los estudios interdía como intradía. Se determinó que la media de la concentración de permetrina en lotes de solución tópica 1 % resultó de 6 780,14 µg/mL. **CONCLUSIONES:** el método revalidado fue lineal, preciso y exacto dentro del rango de concentraciones estudiadas. La concentración de permetrina calculada estuvo por debajo de lo esperado según la información de la composición de la solución de permetrina 1 % (9 100-10 900 µg/mL). Este método resulta útil para la cuantificación de solución de permetrina 1 % en los estudios de calidad del producto farmacológico que se distribuye a la población.

**Palabras clave:** permetrina, HPLC, revalidación, método analítico, pediculosis.

### INTRODUCCIÓN

En Cuba, al igual que en otros países, la *Pediculus capitis* se ha incrementado de modo notable a partir de la década de los años setenta, por lo que se desarrolla un intenso programa dirigido a su control y prevención, particularmente en

estudiantes de escuelas primarias y sus convivientes. Se realizaron diversos trabajos entre los cuales se propusieron estudios sobre la calidad de la permetrina, como producto farmacológico que se distribuye a la población.<sup>1-4</sup>

De los 2 fármacos utilizados en Cuba para la pediculosis, la permetrina se considera el trata-

<sup>I</sup> Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Investigadora Auxiliar. Laboratorio de Farmacología Clínica, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). La Habana, Cuba.

<sup>II</sup> Doctor en Ciencias Químicas. Investigador Titular. Profesor Titular. Laboratorio de Farmacología Clínica, IPK. La Habana, Cuba.

<sup>III</sup> Ingeniero Químico. Especialista. Grupo de Ingeniería Ambiental UCTB Ambiental y Corrosión, Centro de Investigaciones del Petróleo (CEINPET).

<sup>IV</sup> Ingeniera Química. Máster en Entomología Médica y Control de Vectores. Investigadora Auxiliar. Profesor Agregado. Departamento Control de Vectores, IPK. La Habana, Cuba.

miento de primera elección,<sup>5</sup> dada su baja toxicidad, además de responder favorablemente a la relación riesgo/beneficio. No obstante su amplio uso en solución al 1 % continúan sucediendo los brotes, fundamentalmente en la población infantil.<sup>6</sup> Es por ello que se hizo necesario la cuantificación de la permetrina en esta solución y la búsqueda de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para esta cuantificación.

La permetrina (PMT) (3-[2,2-diclorovinil]-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de n-fenoxibencilo) es un piretroide sintético activo frente a una amplia gama de parásitos en los que se incluyen piojos, garrapatas, pulgas, ácaros y otros artrópodos. Actúa sobre la membrana de la célula nerviosa, bloqueando la corriente de los canales de sodio y como consecuencia de esta alteración se produce un retraso en la repolarización y la consiguiente parálisis del insecto. La permetrina actúa por tanto como una neurotoxina. No surte efectos sobre las neuronas de mamíferos, ni en las aves, por lo que tiene poca toxicidad, con la excepción de reacciones de hipersensibilidad en mamíferos, incluidos los humanos.<sup>7</sup>

En medicina humana, se indica la PMT para erradicar la pediculosis en la cabeza (piojos), el área pubiana (ladillas) y la escabiosis (sarna). Se plantea que este insecticida mata tanto a los parásitos como a sus huevos.<sup>8</sup> Aunque estudios recientes aluden a la resistencia genética en poblaciones de piojos.<sup>9,10</sup> En Cuba, no se dispone de estudios de piojos en humanos, sobre la susceptibilidad y(o) resistencia de la permetrina.

La permetrina 1 % es pediculicida y a 5 % es escabicida. Los insecticidas piretroides existen en diferentes formas isoméricas y la acción insecticida es extremadamente estereoespecífica. Los isómeros *cis* suelen ser mejores insecticidas que los *trans*, y la magnitud de la diferencia depende de la especie y del estadio estudiado. En los últimos años se ha manifestado una tendencia hacia la identificación y comercialización de los isómeros más activos de los piretroides, enfoque que permite disminuir la cantidad de principio activo en los tratamientos insecticidas y evita la aplicación de moléculas con baja actividad biológica.<sup>11</sup>

Para la revalidación de este método analítico se modificaron algunas condiciones cromatográficas:

como el flujo de la fase móvil, la columna cromatográfica y el rango de concentraciones evaluadas, de lo reportado en la literatura por *Modamio* y otros.<sup>12</sup>

El rango de concentraciones de trabajo de nuestro interés (de 100 a 15 000 µg/mL) estaba muy por encima del estudiado (de 3 a 125 µg/mL),<sup>12</sup> por tal motivo fue necesaria la revalidación del método analítico con un rango de concentraciones más alto. Se escogió este rango de concentraciones de trabajo porque la solución tópica de permetrina 1 % debe tener una concentración teórica de 10 000 µg/mL. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo experimental fue la revalidación de una metodología analítica<sup>12</sup> por HPLC para realizar estudios de calidad de la loción de permetrina 1 % producida en el país.

## MÉTODOS

### *Instrumental y reactivos*

El metanol grado HPLC, las columnas cromatográficas LiChrospher RP-18, 150 × 4 mm (ID) de 5 µm y las precolumnas LiChroCART® 4 × 4 con cartridge ODS (KKS-015326) fueron suministrados por la firma KONIK-HI-TECH (Barcelona, España).

La permetrina grado técnico fue suministrada por los laboratorios Medilip (Bayamo, Granma, Cuba) con No. lote 07/115.

Los frascos de solución de permetrina 1 % fueron suministrados por la farmacia del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" con No. Lote 9057 y 9062 (6 frascos de cada lote).

El equipo de HPLC 560 consistió en una bomba Beta 10 v.1.7 ECOM, un detector UV variable Flash 06 DAD V.2.8 ECOM y un inyector automático "Robokrom", todo de la firma KONIK-HI-TECH (Barcelona, España).

### *Condiciones cromatográficas*

Para la revalidación de este método analítico las condiciones cromatográficas más adecuadas resultaron ser las siguientes, tanto el flujo, como la

columna y el rango de concentraciones evaluadas, fueron modificadas del reportado en la literatura:<sup>12</sup>

- Columna: LiChrospher RP-18, 150 × 4 mm (ID) de 5 µm con precolumnas Cartridge ODS (KKS-015326).
- Longitud de onda:  $\lambda = 272$  nm.
- Flujo: 1,3 mL/min.
- Fase móvil: metanol:agua (83:17, v/v).
- Tiempo de corrida: 20 min.
- Volumen de inyección: 50 µL

#### Preparación de estándares

La materia prima de PMT fue pesada y diluida con metanol para preparar las soluciones madres de 10 000 y 15 000 µg/mL, a partir de las cuales se realizaron diluciones para obtener el resto de los estándares de calibración necesarios. Los estándares de calibración obtenidos correspondieron a las concentraciones siguientes: 100, 500, 1 000, 2 500, 3 000, 10 000 y 15 000 µg/mL. Alícuotas de estos estándares fueron guardadas en viales a - 25 °C hasta su análisis.

Una vez validado el método se realizaron determinaciones de permetrina en 12 frascos correspondientes a 2 lotes de loción al 1 % como forma farmacéutica terminada (6 frascos de cada lote), se cogieron 3 réplicas por frasco (n= 3) correspondiente a 50 µL, para introducirla directamente en la columna analítica del HPLC mediante un inyector automático.

#### Validación del método analítico

El rango de concentraciones de PMT estudiado comprenden 7 valores de concentración entre 100 y 15 000 µg/mL. La revalidación del método analítico se llevó a cabo mediante la realización de los ensayos de linealidad, precisión y exactitud intradía e interdía.

Para la realización de la curva de calibración en el ensayo de linealidad se utilizaron las 7 concentraciones de permetrina con 5 réplicas de cada valor de concentración (n= 5). La linealidad se verificó mediante el tratamiento estadístico de los datos a través del coeficiente de correlación (r). La ecuación de las curvas se empleó para calcular

la concentración adecuada en los controles y las muestras de los lotes.

Los ensayos de precisión y exactitud intradía e interdía se basaron en el análisis de patrones estándares a varios niveles de concentración dentro del rango establecido. Para los ensayos de precisión y exactitud intradía se utilizaron 4 concentraciones con n= 5 y para el interdía 3 concentraciones con n= 3. La exactitud fue expresada como error relativo porcentual (ER%) y la precisión se verificó mediante el coeficiente de variación (CV%) de la serie de medidas, dados por las ecuaciones siguientes:<sup>13</sup>

$$ER (\%) = \frac{\text{Concentración calculada} - \text{Concentración teórica}}{\text{Concentración teórica}} \times 100$$

$$CV (\%) = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{media}} \times 100$$

## RESULTADOS

Se determinaron los parámetros de validación linealidad, precisión y exactitud.

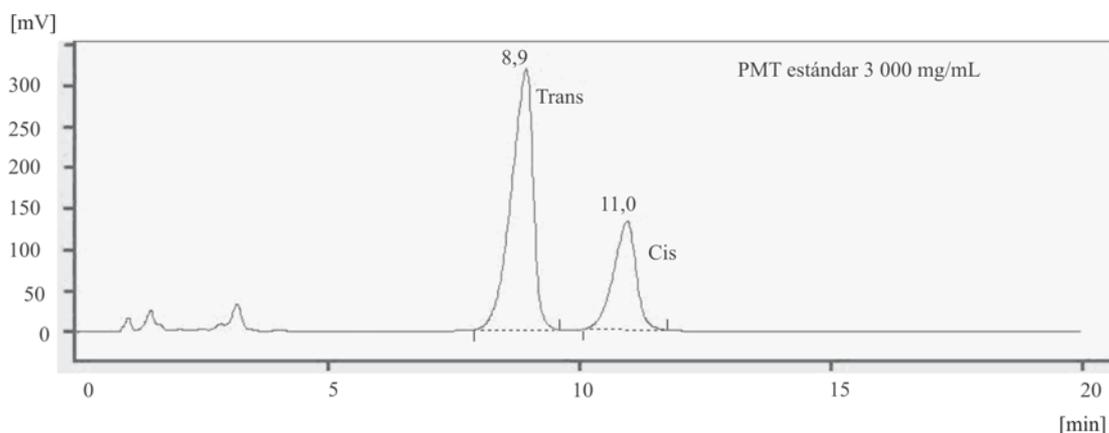
Un cromatograma representativo de PMT, isómero *trans* y *cis*, a la concentración de 3 000 µg/mL, obtenido con el método analítico detallado se muestra en la figura. Los tiempos de retención ( $t_R$ ) fueron de 8,9 y 11,0 min, para cada uno de ellos, respectivamente.

Los resultados de los parámetros de validación en el método cromatográfico se muestran en la tabla 1.

En el ensayo de linealidad se obtuvieron coeficientes de correlación de  $r = 0,9991$  para el isómero *trans* y  $r = 0,9988$  para el isómero *cis*.

La precisión se demostró a través del CV% de la serie de medidas con un valor de 2,48 y 2,0 % para el ensayo interdía de los isómeros *trans* y *cis* y de 2,62 y 2,90 % para el intradía, respectivamente. La exactitud se comprobó por el ER% con valores de -1,02% y -2,71% para los isómeros *trans* y *cis* en el ensayo interdía, 0,59 y - 0,94 % para el intradía, respectivamente.

Los resultados del estudio de la determinación de permetrina en una loción al 1 % se observan en la tabla 2. Se determinó la concentración de los isómeros *trans* y *cis* de la permetrina en 2 lotes,



**Fig.** Cromatograma representativo de los isómeros *trans* y *cis* de un estándar de permetrina a una concentración de 3 000  $\mu\text{g/mL}$ .

**TABLA 1.** Resultados de los parámetros de validación de la permetrina (100-15 000  $\mu\text{g/mL}$ )

Parámetros	PMT ( <i>trans</i> )	PMT ( <i>cis</i> )
$t_R$ (min)	8,8 – 9,2	10,7 – 11,2
r (n= 5)	0,9991	0,9988
Ecuación de la curva	$y = 3,38458 * x$	$y = 1,44227 * x$
Interdía (n= 3)	1 000 – 10 000 ( $\mu\text{g/mL}$ )	1 000 – 10 000 ( $\mu\text{g/mL}$ )
Precisión CV (%)	2,48	2,00
Exactitud ER (%)	- 1,02	- 2,71
Intradía (n= 5)	100 – 10 000 ( $\mu\text{g/mL}$ )	100 – 10 000 ( $\mu\text{g/mL}$ )
Precisión CV (%)	2,62	2,90
Exactitud ER (%)	0,59	- 0,94

PMT: permetrina;  $t_R$ : tiempo de retención; r: coeficiente de correlación; CV: coeficiente de variación; ER: error relativo porcentual.

**TABLA 2.** Determinación de concentración de permetrina en la loción tópica 1 % (concentración nominal posible calculada en 110 mL= 10 000  $\mu\text{g/mL}$ ; n= 3)

Isómero de permetrina	% de cada isómero	Media de la concentración calculada ( $\mu\text{g/mL}$ )	DE	EE	CV (%)
<i>Trans</i>	73,2	4 963,51	87,65	25,30	1,77
<i>Cis</i>	26,8	1 816,63	50,43	14,56	2,78
Permetrina total	100	6 780,14	126,31	36,46	1,86

DE: desviación estándar; EE: error estándar; CV: coeficiente de variación.

de solución tópica al 1 % (con 6 frascos de cada lote), que resulta la concentración calculada por debajo de la esperada y fuera del rango de concentración permitido para las especificaciones de calidad (9 100-10 900  $\mu\text{g/m}$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados del ensayo de linealidad mostraron una buena correlación entre el área y la

concentración dentro del rango estudiado dado por los coeficientes de correlación (r), que es  $r > 0,99$  para ambos isómeros y cumple con lo establecido en la literatura,<sup>13</sup> aunque por debajo de lo obtenido por *Modamio* y otros ( $r = 0,9998$  y  $r = 0,9997$  para el isómero *trans* y *cis*, respectivamente).<sup>12</sup> Esto demuestra que existe regresión (relación lineal) entre las variables concentración y sus respuestas.

El método es también exacto y preciso dentro del rango de concentraciones estudiado, y aunque los CV obtenidos fueron superiores a lo referido

por *Modamio* y otros (2,07 y 1,73 % para el interdía y 2,1 y 0,73 % para el intradía),<sup>12</sup> están por debajo de 20 % que es lo aceptado por la literatura.<sup>13</sup> Los valores de ER% también estuvieron superior a lo obtenido por *Modamio* y otros (- 0,2 % y -2,05 % para el interdía para los isómeros trans y cis y - 0,37 y -0,3 % para el intradía, respectivamente)<sup>12</sup> pero están dentro del rango aceptado (-10 a 10 %).<sup>13</sup> Estos resultados muestran una baja dispersión en cuanto a los datos y un resultado experimental cercano al valor real, como se plantea en la literatura.<sup>14</sup>

La cuantificación realizada a los 12 frascos de 2 lotes de loción de permetrina 1 % demostró que la concentración obtenida (6 780,14 µg/mL) estaba por debajo de lo esperado (10 000 µg/mL) y fuera del rango de concentración permitido para las especificaciones de calidad (9 100-10 900 µg/mL). Este método puede ayudar a la cuantificación de permetrina en estudios de la loción tópica al 1 % y dar un resultado concluyente acerca de la calidad, en un muestreo a mayor escala, como producto farmacéutico producido por los Laboratorios Medilip en Bayamo que se distribuye a la población.

#### AGRADECIMIENTOS

Al estudiante Ramón Caro Barrios del Tecnológico "Mártires de Girón" de Ciudad de La Habana, por su constancia y dedicación en la realización de su tesis de grado en parte del tema tratado.

A la doctora Caridad O' Farril del Ministerio de Salud Pública y al doctor Dagnis Lobaina de los Laboratorios Farmacéuticos "Saúl Delgado" por la solicitud y donación de la permetrina para realizar los ensayos.

#### High performance liquid chromatography-validated analytical method for 1 % permethrin quantification

#### ABSTRACT

INTRODUCTION: in Cuba, as well as in other countries, *Pediculus capitis* infestation has increased since the 70's; this is the reason why a program aimed at controlling and preventing this infestation was designed. This program includes quality control studies of the active synthetic pyrethroid Permethrin and its activity at 1 % on lice and 5 % on scabies. Due to its low toxicity and positive risk/benefit ratio, Permethrin is a pediculicide of

choice to decrease *Pediculus capitis* infestation. OBJECTIVE: to validate an analytical method using high performance liquid chromatography and its application in the quantification of 12 samples from 2 batches of Cuban-made 1 % permethrin pediculicidal preparation. METHODS: linearity, precision and accuracy parameters were determined. Seven calibration standards and working solutions with concentrations ranging from 100 to 15000 µg/mL were prepared. These validation parameters were verified through the correlation coefficient, the variation coefficient and the percentage relative error. RESULTS: the specificity of this method was proved in the chromatograms that showed retention times of 8,8 to 9,2 min for the isomer *trans* and 10,7 to 11,2 min for the isomer *cis*. The correlation coefficient for both isomers was higher than 0,99; the variation coefficient was under 3% and the percentage relative error was - 3 and 1 % for the inter-day and intraday studies, respectively. The mean permethrin concentration in 1% solution batches was estimated at 6 780,14 µg/mL. CONCLUSIONS: the validated method was linear, precise and exact within the range of the studied concentrations. The estimated concentration of permethrin was below the expected rate according to the composition of 1 % permethrin solution (9 100-10 900 µg/mL). This method may be useful for the quantification of 1 % permethrin solutions in the quality studies of the product sold to the population.

**Key words:** permethrin, HPLC, validation, analytical methods, pediculosis

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castex M, Suárez S, de la Cruz AM. Presencia de pediculosis en convivientes con niños positivos a *Pediculus capitis* (Anoplura:Pediculidae). Rev Cubana Med Trop. 2000;52(3):225-7.
2. Cruz de la AM, de Rojas V. Conocimientos y prácticas sobre la pediculosis en un área de salud. Rev Cubana Med Trop. 2001;52(1):1-5.
3. Hernández N, Menéndez Z, Montada D, Molejón A, Finlay CM. Consideraciones sobre transmisión de *Pediculus capitis* (De Geer, 1778) en instituciones escolares. Rev Panam Infectol. 2004;6(4):21-2.
4. Hernández N, Chang Y, Santana Y, Machado E, Martínez AM, Pui L de la C. Uso deliberado de diversos productos para el control de *Pediculus capitis* (De Geer, 1778), por padres o tutores de niños de escuelas primarias. Rev Cubana Med Trop. 2010;62(2):119-24.
5. Chang Y, Hernández N, Sautié M, Santana Y, Fernández B. Forma de aplicación y efectividad de la Permetrina al 1 % para controlar la pediculosis en escolares parasitados con *P. capitis* (Linneus, 1758). Rev Cubana Med Trop. 2008;60(2):162-71.
6. MINSAP. Análisis del comportamiento probable de algunos problemas de Salud, seleccionados para el 2005. Ciudad de La Habana: MINSAP; 2005.
7. Yazar S, Sahin I. Treatment of *Pediculus capitis* infested children with 1 % permethrin shampoo in Turkey. Ethiop Med J. 2005;43(4):270-83.
8. Tanyuksel M, Araz RE, Albay A, Aycicek H. Prevalence and treatment of *Pediculus humanus capitis* with 1 % permethrin and 0.4 % d-phenothrin in Turkey. Acta Medica (Hradec Kralove). 2003;46(2):73-5.
9. Durand R, Millard B, Bouges-Michel C, Bruel C, Bouvresse S, Izri A. Detection of pyrethroid resistance gene in head lice in schoolchildren, Med Entomol. 2007;44:796-8.
10. Kwon DH, Yoon KS, Strycharz JP, Clark JM, Lee SH. Determination of permethrin resistance allele frequency of human head louse populations by quantitative sequencing. J Med Entomol. 2008. Sep;45(5):912-20.

11. Sfara V, Alzogaray RA, Zerba EN. Sept 2001. XII Congreso Argentino de Ecotoxicología y Toxicología de Medioambiente. Toxicity of geometric isomers of permethrin in first instar of the german cockroach, *Blattella germanica*. Disponible en: <http://www.ataonline.org.ar/bibliotecavirtual/xiicongreso/trabajos/ecotoxicologia/18.htm>
12. Modamio P, Fernández C, Papiol C, Mariño EL. Validación de un método analítico de HPLC para la determinación de permetrina y estudio de estabilidad. Tecnología Farmacéutica 315. Memorias XXVIII Congreso Internacional de la Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino; 2008-2009.
13. Calpena AC, Escribano E, Fernández C. Validación de los métodos analíticos. Farm Clin. 1991;7(9):749-58.
14. Marchei E, Valvo L, Pacifici R, Pellegrini M, Tossini, Zuccaro P. Simultaneous determination of zidovudine and nevirapine in human plasma by RP-LC. J Pharm Biomed Anal. 2002;29:1081-8.

Recibido: 31 de mayo de 2010. Aprobado: 14 de octubre de 2010.  
*Alicia Tarinas Reyes*. Autopista Novia del Mediodía, Km 6½.  
Marianao 13. AP 601. La Habana, Cuba. Correo electrónico:  
ali@ipk.sld.cu