

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS



**Departamento de Farmacia
Facultad de Química y Farmacia**

“Desarrollo y Validación de una Técnica de Cromatografía de Gases para la Determinación de G-1 en un Concentrado Emulsionable”

Tesis de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas.

Autora: Gerga Ivis Meneses Martínez

**Tutores: M.C. Miguel Ángel Alba de Armas
Dr.C. Luis Ramón Bravo Sánchez**

2006

Pensamiento

La ciencia de las palabras no tiene fin, la vida es corta y los obstáculos son muchos. Es preciso, pues tomar lo sustancial de las cosas desechando lo inútil, como hace el cisne que toma la leche del medio del agua.

Panchatantra

Dedicatoria

A todos los que con su cariño, esfuerzo y dedicación han colaborado en la inmensa satisfacción que es hoy mi graduación:

- ✓ *A mis padres en un principio por darme ese maravilloso tesoro que es la vida. A mi padre por su intransigencia con mis estudios y a mi madre por ser mi sostén día tras día, por su amor y por permitirme ser quien soy*
- ✓ *A mi hermano por formar parte de mis seres más queridos.*
- ✓ *A mis abuelos por su inmenso esfuerzo y dedicación hacia mi persona durante todos estos años.*
- ✓ *A mis tíos y primos: Carmen, Catalina, Inocencio, Alexei, Taimí, Yusa, por haber aportado tanto no solo a este sueño, también a la vida.*
- ✓ *A mi novio, por su ayuda y apoyo en este trabajo de Diploma.*
- ✓ *A mis amigos: Yaíma, Saylín. Yulema, Yilena, Katia, Yaima, Damaris, Lilian, Arianna, Grettel, y a los que no mencioné, que con su amistad han sabido ganarse un lugarcito en mi corazón.*
- ✓ *A la dirección de la facultad, al Departamento de Farmacia, que me ha enseñado a dar lo mejor de mi y especialmente mis dos tutores Miguel Ángel Alba y Luis Ramón Bravo por su grandiosa colaboración en el desarrollo de este trabajo.*

Para todos es esta dedicatoria, incluso para aquellos con los que simplemente tuve la dicha de conversar e intercambiar, porque de todo, incluso de lo peor, podemos aprender cosas buenas.

¡Los quiero!

Agradecimientos

Quisiera agradecer en el presente trabajo a todos mis familiares, en especial aquellos que han colaborado directamente con el mismo.

A mis amistades de todos estos años porque, aunque no lo crean han ayudado a la realización de este sueño.

A mi novio, por su grandiosa ayuda.

A todo el departamento de Farmacia de la facultad de Química y Farmacia, particularmente a mis tutores, sin los cuales no hubiera sido posible el desarrollo del presente trabajo.

Al personal del CBQ y del CIAP, especialmente a Amalia y a Mollineda.

A todos muchas gracias.

Resumen.

Se desarrolló y validó una técnica de Cromatografía de Gases para la determinación cuantitativa del G-1 en el concentrado emulsionable, para reconstituir al inicio del tratamiento de la piodermatitis y micosis cutáneas, cuya formulación está compuesta por dicho ingrediente activo, el span 20 como emulgente y el aceite mineral como vehículo, con vistas a su futuro control de calidad. Se utilizó para la separación cromatográfica una columna rellena de baja polaridad, nitrógeno como gas portador y un detector de ionización por llama. Dicha técnica cumplió con los principales parámetros de desempeño analítico: linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud, sensibilidad y especificidad, lo cual demostró su fiabilidad.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. Características y propiedades del G-1.....	3
1.1.1. Actividad biológica.....	3
1.1.2. Propiedades químico-físicas.....	4
1.2. Formulaciones que se han desarrollado y técnicas descritas para su análisis, tanto para materias primas como en formas terminadas	5
1.3. Los métodos cromatográficos. Cromatografía de gases: novedades y aplicaciones.....	8
1.4. Aspectos relacionados con la validación de técnicas analíticas.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1 Técnica de elaboración del concentrado emulsionable de G-1.....	15
2.2 Método analítico empleado para la cuantificación del G1 en el concentrado emulsionable	15
2.3 Validación de la técnica de cromatografía de gases empleada en la determinación del contenido G-1 en el concentrado emulsionable.....	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
3.1 Determinación del contenido de G-1 el concentrado emulsionable.....	19
3.2 Validación de la técnica de determinación, por cromatografía gaseosa, del contenido de G1 en el concentrado emulsionable	23
CONCLUSIONES.....	29
RECOMENDACIONES.....	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

INTRODUCCION:

La industria farmacéutica cubana ha jugado un papel fundamental en la búsqueda de nuevos productos, a partir de materias primas existentes en el país, con el propósito de sustituir importaciones. Con este fin el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas ha realizado estudios de obtención de compuestos bioactivos, entre los cuales se encuentra el 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno, conocido como G-1. [1].

Al G-1, producto bioactivo utilizado en este trabajo, se le han realizado numerosos estudios encaminados a comprobar la acción fungicida y bactericida de amplio espectro que posee, con resultados positivos en este sentido, debiéndose destacar la amplia actividad antifúngica de este principio activo, lo cual permite su aplicación en el tratamiento de un gran número de patologías. [1].

En ensayos clínicos fase III de una crema de este fármaco al 0,125% (Dermofural) se ha demostrado su utilidad en el tratamiento de la Pitiriasis versicolor, candidiasis en piel y la dermatomycosis, sin embargo, estudios de estabilidad efectuados a este medicamento, muestran un período de vida útil insuficiente para su producción industrial, se utilizó para su análisis la espectrofotometría uv-visible [1].

Por otra parte se preparó una solución en alcohol bencílico del G-1 al 1% con vistas a ser utilizada en el tratamiento de la onicomycosis, desarrollándose para su control de la calidad, una técnica de análisis cuantitativo por cromatografía de gases [2], los estudios de estabilidad de estante de dicha formulación, muestran un período de vida útil de 1 año, utilizando para su análisis la cromatografía líquida de alta eficacia [3]. Sin embargo, el vehículo utilizado resulta, por sus características organolépticas, desagradable en el momento de su aplicación.

Una de las formas farmacéuticas utilizadas en el tratamiento de afecciones en la piel son las emulsiones líquidas. Teniendo en cuenta los problemas de estabilidad del G-1 y la mayor estabilidad en vehículos grasos [2], sería conveniente expendirlo en forma de un concentrado oleoso que se emulsione en el momento de inicio del tratamiento.

Se desarrolló un concentrado emulsionable de G-1 empleando como vehículo aceite mineral y como emulgente el span 20, con una estabilidad de 1 año, determinada por

métodos acelerados por temperatura, considerada suficiente para su comercialización y uso. La emulsión reconstituida a partir de dicho concentrado, resultó ser estable por un período de tiempo de 16 días, lo cual se considera adecuado para el uso que se le propone (tratamiento de la piodermitis y micosis cutánea). Para el análisis de ambas formulaciones se desarrolló y validó una técnica analítica de cromatografía en capa fina con elución [4], sin embargo resulta ser una técnica bastante trabajosa y extensa al aplicarla. Por todo lo anterior en el presente trabajo se proponen los siguientes objetivos:

1. Desarrollar una técnica analítica de cromatografía de gases para la determinación cuantitativa de G-1 en el concentrado emulsionable.
2. Validar la técnica desarrollada según los parámetros de fiabilidad vigentes.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Características y propiedades del G-1.

1.1.1. Actividad biológica.

El derivado furánico G-1 es un agente antibacteriano y antifúngico de amplio espectro, ha sido empleado y registrado en forma de ungüento oftálmico de uso veterinario (Queratofural) para el tratamiento de la queratitis y otras oftalmias infecciosas [5].

En ensayos clínicos fase III se comparó la crema Dermofural con la de Gentamicina y la de Ketoconazol para el tratamiento de piodermatitis primaria y Pitiriasis versicolor, dermatomicosis y candidiasis en piel, respectivamente; se concluyó que el Dermofural es un medicamento de utilidad en el tratamiento de estas patologías. [1].

Considerando la eficacia y el tiempo promedio del tratamiento con la crema Dermofural, puede ser usada como medicamento local en la onicomycosis por *Candida* previendo un tratamiento a largo plazo como terapéutica de soporte en la dermatomicosis por dermatofitos tomando en cuenta que el tiempo necesario para la curación es prolongado [6].

Se reporta que el G-1 produce toxicidad ocular en animales de laboratorio (conejos albinos) y el valor de su dosis letal media administrada por vía oral en ratones hembras es de 152 mg/Kg de peso vivo, lo que permite clasificarlo como muy tóxico, además, el producto es capaz de inducir las enzimas microsomales hepáticas [7].

El G-1 posee una potente acción antifúngica "in vitro" frente a diferentes especies de *Candida* con una acción similar a la del Anfotericin B y superior a la del Miconazol, de mínima concentración inhibitoria (MCI) para las diferentes cepas que fluctuaron en el intervalo de 0,78 µg / mL a 6,25 µg / mL para el G-1, entre 0,78 µg / mL a 12,5 µg / mL para el Anfotericin B y entre 0,78 µg / mL y 25 µg / mL para Miconazol [8]. Además, posee una fuerte actividad fungicida contra hongos filamentosos dermatofitos evaluado frente a 17 cepas de hongos dermatofitos de tres especies (*Trichophyton rubrum* 7, *Microsporum gypseum* 5, y *Microsporum canis*). El 76,5% de las cepas alcanzó una MCI de 3,125 µg / mL coincidiendo este resultado con la

mínima concentración evaluada. La MCI₅₀ en la totalidad de las cepas no sobrepasó el rango 2,54 µg / mL coincidiendo estos resultados con la MCI₅₀ y la MCI₉₀ [9].

También fue evaluado frente a 40 cepas de otras 7 especies de hongos filamentosos: *Aspergillus* sp., *Microsporium canis*, *Tricophytom mentagrophytes* y *Tricophytom rubrum*. El 30% y el 37,5% del total de las cepas ensayadas tuvieron una MCI de 12,5 µg / mL y 25 µg / mL respectivamente y el 7,5% fueron resistentes. Según los resultados, el *Microsporium canis* y el *Tricophytom rubrum* fueron más sensibles que el *Tricophytom mentagrophytes* y el *Aspergillus* sp [10].

González y colaboradores (1993) evaluaron simultáneamente el comportamiento del G-1 contra bacterias y levaduras del género *Candida*. En la mayor frecuencia de estas cepas fluctuó entre 3,125 µg / mL y 6,25 µg / mL [10].

1.1.2. Propiedades químico-físicas.

El derivado furánico G-1 es el 1-(5-bromofur-2 il)-2-bromo-2-nitroeteno (bactericida-fungicida de amplio espectro con DCI en estudio) de estructura:

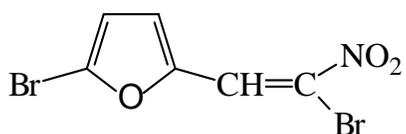


Figura 1. Estructura química del G-1.

Dicha estructura química fue elucidada mediante las técnicas espectroscópicas: ultravioleta visible, infrarroja, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y difracción de rayos X, por la cual se determinó, además, su configuración espacial en estado cristalino y en solución [11], lo cual también permitió realizar un estudio teórico sobre la relación estructura actividad [12].

La fórmula global del G-1 es C₆H₃Br₂NO₂ y su masa molar de 296,924 [13]. Su obtención se realizó a partir del 2-fur-2-il-2-nitroeteno el cual aparece reportado como inhibidor del crecimiento de bacterias y hongos. En 1987 a esta materia prima se le realizó la bromación en disulfuro de carbono obteniéndose dos productos en dependencia de las relaciones molares, se identificaron como el 1-(5-bromofur-2 il)-2-nitroeteno (monobromado) y el 1-(5-bromofur-2 il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1). En la síntesis de ambos productos se encontró que es difícil la obtención de los mismos

con un alto grado de pureza, ya que en cada caso aparece el otro como impureza [14].

El G-1 es un sólido cristalino de color amarillo naranja y de olor característico. Su temperatura de fusión se encuentra entre 89 y 92°C. Es muy fácilmente soluble en dimetilformamida, fácilmente soluble en éter etílico, cloroformo, dimetilsulfóxido y benceno, soluble en tetracloruro de carbono y polietilenglicol-400 (PEG-400), poco soluble en metanol absoluto, etanol absoluto y etanol 90°, difícilmente soluble en etanol 70°, éter de petróleo 40-60°, n-hexano y muy difícilmente soluble en agua [13]. Posee características de ácido débil con un pKa estimado en el rango de 9-10. De acuerdo al valor experimental de su coeficiente de reparto expresado como log P en octanol/agua igual a 2,927, se afirma que es una sustancia fuertemente liposoluble [14].

1.2. Formulaciones que se han desarrollado y técnicas descritas para su análisis, tanto para materias primas como en formas terminadas.

A partir del año 1990 se encaminaron una serie de estudios con el ingrediente activo G-1, por sus interesantes aplicaciones. En numerosos trabajos se comprobó que este producto (G1) es eficaz frente a nematodos gastrointestinales, como acaricida en la sarna auricular de los conejos, frente a bacterias fundamentalmente Gram. Negativas y frente a diversos tipos de candidas donde presentan gran acción antifúngica. [9, 10].

En el año 1991 se realizaron estudios preliminares de estabilidad de algunas formulaciones semisólidas de G-1 y para la cuantificación se trabajaron las formulaciones con disolventes orgánicos, de forma tal que el G-1 quedara disuelto en estos y en condiciones de ser analizado por espectroscopía ultravioleta. Los solventes usados fueron el cloroformo puro para análisis, tetracloruro de carbono puro para análisis y etanol comercial. Se obtuvieron los mejores resultados en las formulaciones donde se empleaba el ungüento hidrófilo y el petrolato blanco como base, descartándose la posibilidad de empleo de la base de Polietilenglicol por inestabilidad química. [15].

En el año 1992, se evaluaron las propiedades tecnológicas del G-1 en forma de polvo farmacéutico para uso externo y se realizó una valoración preliminar de su

estabilidad. Se evaluaron las materias primas de uso tradicional en las formulaciones de polvo farmacéutico de uso externo, para lo que se propusieron; la formulación de G-1-almidón de maíz-aerosil; G-1-almidón de maíz-estearato de magnesio; G1-lactosa-caolín-estearato de magnesio que fueron evaluados tecnológicamente; y a mezclas de G-1 con sus vehículos correspondientes, cuantificadas utilizando el método de espectroscopia UV-Visible. La separación de G-1 de las formulaciones se realizó utilizando el etanol comercial como solvente, con posterior filtración de los excipientes insolubles de las formulaciones. Como resultado se obtuvo, que aunque las tres formulaciones propuestas poseen propiedades tecnológicas adecuadas, existen incompatibilidades químicas entre el G-1 y estos vehículos, limitando la posibilidad de formularlos en forma de polvos farmacéuticos de uso externo [16].

En el año 1993 se realizó un estudio de estabilidad química acelerada de una solución alcohólica (alcohol bencílico) del ingrediente activo G-1, recomendada para el tratamiento de infecciones fungosas en uñas, por un método cinético isotérmico. La cuantificación del G-1 en esta formulación en el tiempo se realizó por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia y el análisis cualitativo por cromatografía de capa delgada, cromatografía gas-líquido y espectrofotometría uv- visible. El método de cromatografía gaseosa resultó ser exacto y reproducible, para su uso en el control de la calidad de dicha formulación. Se obtuvo una fecha de vencimiento provisional de 1,2 años, cuando el producto se almacena en un rango de temperatura de 2 a 8 °C [2]. En el año 1994 se trabajaron en las especificaciones de calidad, métodos de control y fecha de vencimiento definitiva de esta solución alcohólica de G-1, donde se pusieron a prueba una serie de técnicas analíticas; determinación de características organolépticas; determinación del peso específico de la solución de G-1 (método del picnómetro), identificación por espectroscopia UV-VIS y cuantificación del G-1 en solución por cromatografía de gases. Se determinó que la fecha de vencimiento definitiva de esta formulación es de un año, con lo cual se concluyó el estudio previo que requiere la prueba clínica para la posterior comercialización del producto. [3].

También en el año 1994 se realizó un estudio de preformulación del G-1 para su dosificación oral. Se propusieron dispersiones sólidas de este ingrediente activo con diferentes portadores de uso farmacéutico, de los cuales el PEG-6000 resultó ser el

más adecuado, sometiendo la dispersión PEG 6000-G-1 30% a un estudio de estabilidad de estante durante siete meses, mediante las técnicas de análisis: espectrofotometría uv-visibles y cromatografía de gases. Dicha dispersión resultó ser estable y no se detectaron por ninguna de las técnicas empleadas, evidencias de degradación. [17].

En el año 1995 se estudió el G-1 Materia Prima, estableciéndose los métodos de control y las especificaciones de calidad. La Cromatografía de Gases fue la técnica empleada específicamente en la determinación del contenido de G-1, según el método de patrón interno, pero además fue utilizada para determinar la pureza del G-1 en todos los lotes de dicha sustancia activa, basada en la separación del G-1 de sus impurezas, usando para ello una columna de vidrio rellena con SE-30 al 6% sobre Chromosorb W y su detección para la cuantificación mediante ionización por llama [18].

En el año 1996 se estudió la formación de dispersiones sólidas del principio activo G-1 con Polietilenglicoles de alto peso molecular y la formación de complejos de inclusión de este principio activo con la β ciclodextrina como vías para aumentar su solubilidad y/o velocidad de disolución en medio acuoso. Como resultado la velocidad de disolución del G-1 a partir de sus dispersiones sólidas en matrices de PEG 6000 y PEG 20 000 aumenta considerablemente en relación con el ingrediente activo puro micronizado. La velocidad de disolución y solubilidad del G-1 acomplejado (complejo G-1/ β ciclodextrina) aumenta considerablemente en relación con el ingrediente activo puro micronizado y disuelto/disperso en PEG 6000 y PEG 20000. [19].

En el año 2002 se estudió la Influencia de los Factores Degradativos en la Estabilidad de la Dispersión Sólida de G-1/30% en PEG 6000. Se establecieron los métodos de Control y Especificaciones de Calidad de esta formulación. Excelentes resultados se han obtenido a partir de la misma, de allí, que se encuentre registrado como el Vitrofural en el Registro Central de Plaguicidas del Ministerio de la Agricultura de Cuba. La determinación de G-1 presente en esta dispersión sólida se realizó por cromatografía gaseosa, a través del método de patrón interno basado en la separación del G-1 del PEG 6000 y de sus impurezas. [20].

Teniendo en cuenta: la pobre estabilidad que presenta el Dermofural (crema de G-1 con base hidrófila) [15], las características organolépticas no adecuadas que presenta la solución de G-1 en alcohol bencílico [2;3], el hecho de que una de las formas farmacéuticas utilizadas en el tratamiento de afecciones en la piel son las emulsiones líquidas [21], los problemas de estabilidad del G-1 y la mayor estabilidad en vehículos grasos, resultó conveniente la formulación del G-1 en forma de un concentrado oleoso que se emulsione en el momento de inicio del tratamiento (Piodermatitis y micosis cutánea), el cual se formuló en el año 2000 a base de G-1, span 20 y aceite mineral, evaluándose su estabilidad por métodos acelerados por temperatura, llegándose a establecer que el mismo era estable durante un año cuando se almacena a temperaturas entre 2-8 °C y se envasa en frascos de vidrio ámbar con tapas de baquelita de rosca. [4]. La técnica analítica empleada para la cuantificación del G-1 en este concentrado fue la Cromatografía en Capa Delgada con elución, la cual a pesar de ser fiable, resultó ser una técnica bastante trabajosa y extensa al aplicarla. La emulsión reconstituida a partir de dicho concentrado, resultó ser estable por un período de tiempo de 16 días, suficiente para el tratamiento que se propone [4].

1.3. Los métodos cromatográficos. Cromatografía de gases: novedades y aplicaciones.

La cromatografía en sus variadas modalidades [22] se ha convertido en la técnica por excelencia en los estudios de control de calidad y estabilidad de medicamentos debido a su gran selectividad, ya que permite la separación del analito del resto de los componentes de la formulación con lo que pueden ser identificados y cuantificados no solo los diferentes principios activos sino también los productos de descomposición. [3].

Una de las variantes cuyo empleo es fundamental en un laboratorio de estabilidad es la cromatografía en capa delgada, la que se puede combinar con la espectrofotometría ya que esto complementa los resultados obtenidos no solo desde el punto de vista cualitativo.

No obstante, el desarrollo de métodos de detección como la densitometría y técnicas instrumentales como la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta

eficacia, han permitido ampliar las posibilidades analíticas mucho más que los métodos espectrofotométricos o de cromatografía en capa fina usuales, ya que con ellos es permisible la cuantificación de cantidades que pueden caer incluso en el nivel de picogramos.

La cromatografía está compuesta por un grupo de métodos para la separación molecular de mezclas que dependen de la afinidad diferencial de los solutos entre dos fases inmiscibles. Una de las fases es un lecho fijo de gran área superficial mientras que la otra es un fluido el cual se mueve a través o sobre la superficie de la fase fija. Los componentes de la mezcla deben estar en solución o en estado de vapor. La afinidad relativa de los solutos hacia cada fase debe ser reversible para asegurar la transferencia de masa que ocurre durante la separación cromatográfica.

La fase fija es llamada fase estacionaria y la otra fase móvil. La fase estacionaria debe ser un sólido dividido finamente o poroso, o un líquido que tiene que ser distribuido en una fina película sobre el material inerte de soporte. Es necesario que las partículas de la fase estacionaria sean tan pequeñas como sea posible para que posean un área superficial grande y para que la absorción o adsorción y la desorción de los solutos ocurra frecuentemente. La fase móvil debe ser un líquido o mezcla de soluciones puras (buffer) o un gas (puro o mezcla homogénea).

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil y estacionaria. Si la fase estacionaria es un sólido el proceso es llamado Cromatografía Adsorción, mientras que si la fase estacionaria es un líquido es Cromatografía de Partición. La diferencia entre ellos se debe a la naturaleza de las fuerzas que influyen en la distribución de los solutos entre las dos fases. [22 - 24].

En 1941 Martin y Synge propusieron la técnica de la Cromatografía Gaseosa estableciendo que muchas separaciones finas de sustancias volátiles deben ser posibles en una columna en la cual un gas permanente fluye a través del gel impregnado con un solvente no volátil en el cual las sustancias se separan obedeciendo aproximadamente la Ley de Raoult [22].

Diez años después Martin retomó lo anterior y con James desarrollaron la primera separación usando cromatografía gaseosa. Una vez que el método fue validado y utilizado, otros autores rápidamente lo aceptaron y la Cromatografía Gaseosa se

convirtió en el más rápido, amplio y exacto campo para la investigación científica desarrollado hasta ese momento. Cientos de artículos usan esta técnica y cientos son los instrumentos que se utilizan en los laboratorios del mundo. [22 - 25].

En la cromatografía de gases la fase móvil esta integrada por la mezcla a resolver y por un gas no retenible o inerte adicional que sirve para llevar en si o para empujar la mezcla y los componentes después de su separación. Este gas inerte recibe el nombre de gas portador.

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido que actúe como soporte. La separación se realiza en el tiempo, en la cromatografía de gases, emergiendo las sustancias de la columna por separado.

A la salida de la columna cromatográfica se encuentra un dispositivo de análisis o uno de recolección, capaces de realizar sus funciones respectivas también en el tiempo. [23,24].

La cromatografía de gases se ha impuesto actualmente, como método de separación en los campos analíticos y preparativos por ser simple su fundamento y desarrollo, por la sencillez de su manejo, por la rapidez con que se efectúan las separaciones, su bajo costo y porque en la mayor parte de los casos la separación y la precisión alcanzables son altamente satisfactorios [22].

La cromatografía gaseosa es fundamentalmente usada como una técnica cuantitativa, pero además tiene valor en el análisis cualitativo de sustancias desconocidas. Para ambos métodos se efectúa una comparación de los parámetros de retención de los componentes conocidos y desconocidos y por separación de efluentes, estos abandonan la columna y pueden conocerse por procedimientos de identificación espectroscópicos. [22 - 25].

El parámetro que es proporcional a la concentración de un componente en el eluato es el área bajo el pico de elución a partir del punto donde este abandona la línea base al punto donde retorna. Mediante el uso de técnicas computarizadas esta integral puede ser determinado exactamente pero debido a que esto requiere equipamiento especializado, a veces se emplean un grupo de métodos de integración manual. En caso de picos cromatográficos simétricos y estrechos puede usarse la altura para la evaluación cuantitativa.

Una vez determinadas las áreas relativas a los picos en el cromatograma se deben usar estos datos para la determinación exacta de las concentraciones. Esto se puede hacer por uno de los siguientes métodos.

1. Normalización del área
2. Estandarización externa
3. Estandarización interna

Este último es el método empleado, para eliminar fundamentalmente los errores de inyección. El estándar interno es normalmente una sustancia la cual eluye en condiciones cercanas a la sustancia de análisis y es bien resuelta. [3, 22 -25].

1.4. Aspectos relacionados con la validación de técnicas analíticas.

Se han descrito numerosas definiciones de validación que expresan un mismo parecer. Según la “Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria” se define como: “el proceso establecido para la obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que un proceso de fabricación o método de control es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos” [26].

Las características de funcionamiento o desempeño de un método analítico comprenden todos los datos y resultados experimentales que demuestran su aptitud para el uso al que se destina. Se consideran los siguientes grupos de características de funcionamiento:

- Características de practicabilidad: son las que deciden si el procedimiento analítico es fácil o difícilmente realizable en la práctica.
- Características de idoneidad: son el conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde, en el momento del análisis, a los requisitos fijados en la validación del método.
- Características de fiabilidad: son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo criterios fundamentales de validación. La fiabilidad comprende los cinco criterios fundamentales de validación no necesariamente aplicables en todos los casos: linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad [26, 27].

Linealidad

Se entiende como linealidad, la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado [26, 27].

Dentro de este término se incluye el intervalo o rango de concentración de analito para el cual el método es satisfactorio. Debe definirse la linealidad para concentraciones que cubran el ámbito total de interés.

Criterios para evaluar la linealidad: [27]

r (coeficiente de correlación lineal) $\geq 0,99$

F – Fischer (F calculada < F tabulada)

QC – Coeficiente de calidad < 2,5 %

Exactitud

La exactitud es el grado de concordancia entre el valor hallado en el análisis con el valor verdadero. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores determinados que debían corregirse [26, 27].

Criterios para evaluar la exactitud:

$98 \% \leq X \leq 102 \%$

X- % recobrado

Precisión

La precisión es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea, o expresado de otra forma, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media. Es la estimación de la variabilidad de las mediciones. Expresa la capacidad del método analítico para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra [26, 27].

Dentro del término precisión del método se pueden distinguir tres tipos de estudio:

- Repetibilidad: Es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones; sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo

laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuado en un corto intervalo de tiempo (generalmente el mismo día).

Criterio: $CV \leq 3 \%$ para formas terminadas. CV- coeficiente de variación

- Precisión Intermedia: Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.).

Criterios: $CV \leq 5 \%$ para formas terminadas.

Se pueden tener en cuenta como criterios de precisión intermedia: la prueba de homogeneidad de varianzas entre días por medio del cálculo de la C de Cochran, otro criterio de precisión del método puede ser la comparación entre el coeficiente de variación entre días y el de Horwitz, debiendo ser el primero siempre menor que el segundo [27].

Sensibilidad

Este parámetro se relaciona con la cantidad de analito requerida para dar un resultado significativo, cualitativo o cuantitativo. La sensibilidad es la capacidad de un método analítico de registrar ligeras variaciones de la concentración. Como medida de la sensibilidad se pueden calcular los límites de detección y cuantificación según los criterios 3S y 10S [28].

Especificidad y selectividad

Algunas bibliografías actualizadas consideran equivalentes los términos y se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito, sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados o excipientes que pueden estar presentes en la matriz de la muestra.

Otros autores diferencian ambos términos y así consideran la selectividad como la capacidad de detectar simultánea o aisladamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y la especificidad como la capacidad de detectar el analito sin interferencias de ningún producto [26 - 28].

La técnica analítica desarrollada en este trabajo se someterá a validación, según los parámetros de fiabilidad descritos con anterioridad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Materiales y reactivos**

- materia prima G-1 (calidad farmacéutica)
- aceite mineral (calidad farmacéutica)
- span 20 (calidad farmacéutica)
- n-hexano (p.a.) (Merck)
- benzoato de bencilo (p.a.) (Merck)

- **Equipos, utensilios e instrumentos.**

- Cromatógrafo de Gases PYE UNICAN serie 304. Philips. (Holanda).
- Balanza Analítica Digital Sartorius. (Alemania)
- Refrigerador INPUD (Cuba)
- Baño ultrasónico Branson (México)
- Cristalería común de laboratorio

2.1 Técnica de elaboración del concentrado emulsionable de G-1.

Se pesa en balanza analítica, con exactitud, 1,9634g de Span 20, 0,0699g de G-1 y 27,9666g de Aceite mineral. Una vez pesados se lleva el G-1 y el Aceite Mineral al recipiente contenedor del Span y se le aplica ultrasonido en baño ultrasónico por 30 min, hasta lograr la homogeneidad del producto.

2.2 Método analítico empleado para la cuantificación del G1 en el concentrado emulsionable.

El G-1 contenido en la formulación se determinó por la cromatografía gaseosa, a través del método de patrón interno, el cual se basa en la separación del G-1 (principio activo) del resto de los componentes de la formulación así como de sus impurezas, usando para ello una columna de vidrio rellena con SE-30 al 6% sobre Chromosorb W y su detección para la cuantificación mediante la ionización por llama.

- **Condiciones Cromatográficas**

- Columna SE-30 al 1,5% sobre Chromosorb W 80-100 mesh de 1,5m de longitud y 4mm de diámetro interno.
- Temperatura del horno: 210° C
- Temperatura del inyector: 230° C

- Temperatura del detector (ionización por llama): 280° C
- Flujo de nitrógeno (gas portador): 38mL/min
- Flujo de hidrógeno (gas auxiliar): 40mL/min
- Flujo de aire (gas auxiliar): 400mL/min
- Sensibilidad: atenuación 4, Rango: 10
- Volumen de inyección: 2 µL

• **Procedimiento**

Preparación de la solución estándar interno.

Se toman 0,05mL de benzoato de bencilo, se trasvasan a un matraz de 25 mL, se completa el volumen con n-hexano y se homogeniza la solución. Solución A.

Preparación del Patrón de G-1. Muestra de referencia.

Se pesan con exactitud aproximadamente 0,050g de G-1, sustancia de referencia, se lleva a un matraz de 25 mL, se completa con n-hexano y se homogeniza la solución. Solución B. Debe protegerse de la luz.

Luego se toman 0,2 mL de la solución A y 2mL de la solución B, se trasvasan a un matraz aforado de 10mL, se completa volumen con n-hexano y se homogeniza la solución. Solución Patrón. Debe protegerse de la luz.

Preparación de la solución de la muestra de ensayo.

Se pesan con exactitud aproximadamente 2mL de concentrado emulsionable, se toman 0,2 mL de solución A y se trasvasan a un matraz aforado de 10 mL, se completa volumen con n-hexano y se homogeniza la solución. Debe protegerse de la luz. Una vez registrado el cromatograma los cálculos se realizan mediante la siguiente expresión:

$$C\% = \frac{Cp.Rm}{Rp.Pm}$$

Donde:

C%: concentración en por ciento de G-1

Cp: concentración del patrón en mg/mL

Pm: peso de la muestra en gramos

Rp: cociente de la respuesta del patrón

Rm: cociente de la respuesta de la muestra

2.3 Validación de la técnica de cromatografía de gases empleada en la determinación del contenido G-1 en el concentrado emulsionable.

Linealidad.

Se construyen una curva de calibración en el intervalo de concentraciones de 0,1mg/mL a 0,5mg/mL con puntos intermedios en 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0; 1,1mg/mL. Se inyecta por duplicado. Para ello se pesa con exactitud aproximadamente 0,1000g de G-1 y se transfieren a un matraz aforado de 10 mL, se le añaden 0,2mL de la solución A, se completa el volumen con n-hexano y se toman alícuotas de:

Alícuotas (mL)	Volumen (mL)	C (X) – mg/mL
0,3	10	0,12
0,5	10	0,20
0,7	10	0,28
0,9	10	0,36
1,0	10	0,40
1,1	10	0,44

Teniendo en cuenta todos los valores experimentales, se calcula el coeficiente de correlación lineal (r), la F-Fischer para la adecuación del modelo lineal y el coeficiente de calidad (QC) para la linealidad a través de las expresiones siguientes [26, 27].

$$r = \frac{\sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2 \sum (Y - \bar{Y})^2}}$$
$$QC = \sqrt{\frac{\sum_i^n \left(\frac{y_i - \bar{y}}{\bar{y}} \right)^2}{n-1}}$$

Criterios:

$$r \geq 0,99 \text{ [26, 27]}$$

$$F_{cal} < F_{tab} \text{ [27]}$$

$$QC \leq 2,5 \text{ [27]}$$

Precisión.

Repetibilidad.

Se realizan 6 réplicas a las muestras, según lo descrito en el epígrafe 2.2, en condiciones homogéneas y se calcula el coeficiente de variación (CV).

Criterio:

$$CV \leq 3\% [26]$$

Precisión intermedia.

Se realiza el experimento anterior, tres días y por dos analistas diferentes y se calcula el coeficiente de variación (CV) de todos los datos. Se calcula además la F de Fisher para comparar los conjuntos de datos en cuanto a homogeneidad de varianzas. Se determina, además, la C de Cochran y el coeficiente de variación de Horwitz, como criterios adicionales de precisión intermedia.

Criterios:

$$CV \leq 5\% [26]$$

$$C \leq 0,707 \text{ (tres días y seis réplicas) [27]}$$

$$CV < CV_{Horwitz} [27]$$

Exactitud

Se prepara la muestra con las pesadas lo más exactas posible, según se describe en el epígrafe 2.1. Se realizan ocho réplicas según la técnica de análisis descrita en el epígrafe 2.2 y se inyectan por duplicado; una vez registrado el cromatograma, los cálculos se realizan mediante la expresión que allí aparece.

Criterio:

$$98\% \leq \text{Recobrado} \leq 102\% [26].$$

Selectividad y Especificidad.

Se comparan los tiempos de retención de las sustancias presentes en la muestra y el patrón. Se mide, el ancho de la semialtura y se calculan los factores de simetría de los picos en los cromatogramas correspondientes a cinco inyecciones de patrón y cinco de muestras; se determina la media y la varianza del patrón y de la muestra, se halla la T de Student y se calcula la F de Fisher, se comparan los valores de T y de F con los tabulados, con el objetivo de descartar posibles solapamientos de picos.

Sensibilidad

Como una medida de la sensibilidad se toma el valor de la pendiente de la curva así como los límites de detección (LD) y límite de cuantificación (LC), los cálculos se realizan por el criterio de 3S y 10S [28]

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Determinación del contenido de G-1 el concentrado emulsionable.

El desarrollo de la técnica analítica y la determinación de las condiciones cromatográficas óptimas se efectuó basado en los estudios realizados a la materia prima [18] y la técnica de cromatografía en capa fina con elución, desarrollada previamente para la cuantificación de G-1 en esta formulación [4].

Basados en los estudios de miscibilidad realizados y los antecedentes de la técnica de capa fina [4], se determinó que el n-hexano podía ser un solvente adecuado para llevar a cabo la inyección.

Se partió de las condiciones cromatográficas optimizadas en el primero de los estudios [18] y se fueron variando hasta optimizar las condiciones propias del presente trabajo, como se muestra a continuación.

Se realizaron mediciones de flujo hasta lograr establecer un valor óptimo, en base al máximo de eficacia alcanzable, de 38mL/min. y una velocidad de carta (papel cromatográfico de registro) de 10 mm/min.

Primeramente se inyectó un blanco, con el objetivo de determinar alguna interferencia a los posibles tiempos de retención de las sustancias que componen la muestra, véase figura 2:



Figura 2. Cromatograma de blanco de solvente a las condiciones iniciales de análisis (temperatura de columna 210°C, inyector 230°C, detector 280°C, flujo 38mL/min).

Como se observa en la figura 2, no hay interferencia alguna que pueda influir en el registro de la muestra pues solo se registra el pico característico del solvente (n-hexano)

Luego se inyectó una disolución de patrón de G-1 sin el estándar interno, para ver si existía alguna interferencia al tiempo de retención de este último, véase la figura 3.

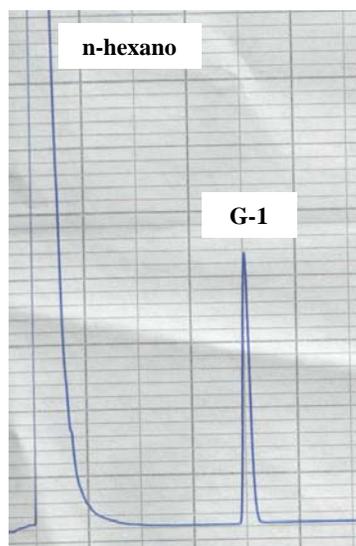


Figura 3. Cromatograma de patrón de G-1 a las condiciones iniciales de análisis (temperatura de columna 210°C, inyector 230°C, detector 280°C, flujo 38mL/min).

Como se puede apreciar, al tiempo de retención del G-1 ($t_R = 3,7$ min.) se muestra un pico con muy buena resolución, altura y simetría. Al ser estrecho puede ser medible a través de su altura; no se observan otros picos en el cromatograma, por lo que no existen interferencias potenciales al tiempo de retención del estándar interno.

Posteriormente se inyectó el patrón de G-1 con el estándar interno seleccionado que en este caso es el benzoato de bencilo, véase figura 4.

Como se observa en la figura 4, los picos quedan bien separados, con una buena altura para ser medibles y no interfieren uno sobre el otro. El tiempo de retención del benzoato de bencilo es de 4,5 min.

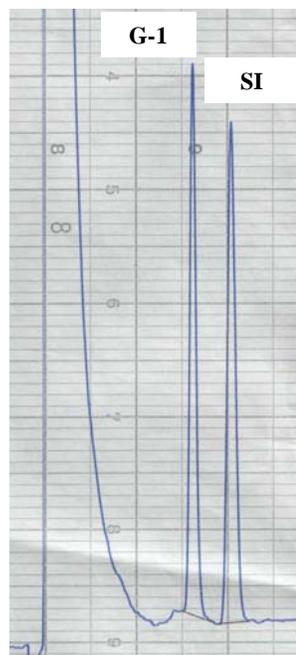


Figura 4. Cromatograma de patrón de G-1 y su estándar interno (SI) a las condiciones iniciales de análisis (temperatura de columna 210°C, inyector 230°C, detector 280°C, flujo 38mL/min).

A continuación se preparó la muestra a evaluar (Figura 5).

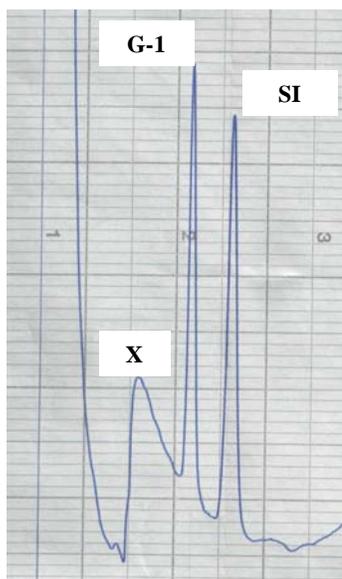


Figura 5. Cromatograma del concentrado emulsionable de G-1 y su estándar interno (SI) a las condiciones iniciales de análisis (temperatura de columna 210°C, inyector 230°C, detector 280°C, flujo 38mL/min). X – impureza desconocida.

Como se puede observar, a un tiempo de retención de 2,5 min. eluye una sustancia cuyo pico no se separa completamente del correspondiente al G-1, por tanto se decidió hacer la misma inyección variando la temperatura a 200°C, véase figura 6.

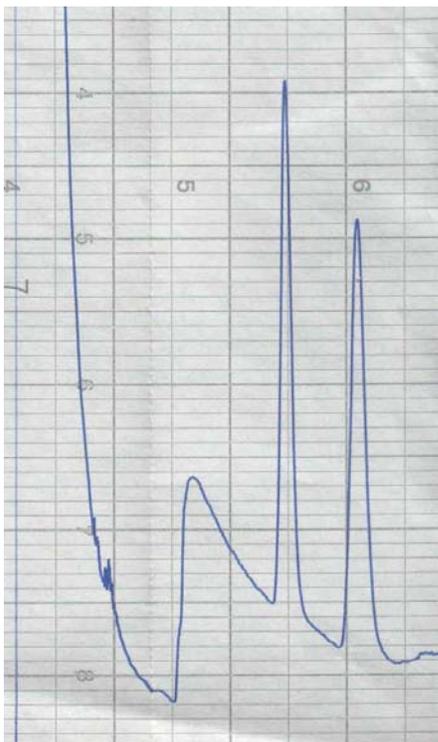


Figura 6. Cromatograma del concentrado emulsionable de G-1 y su estándar interno (SI) a las condiciones de análisis: temperatura de columna 200°C, inyector 230°C, detector 280°C, flujo 38mL/min). X – impureza desconocida.

Como se puede observar en la figura 6, no hay diferencia significativa entre uno y otro cromatograma en cuanto a resolución de picos, solo que el tiempo de retención de los componentes es mayor, lo cual prolongaría el tiempo de análisis y a la hora de realizar el control rutinario de la calidad de dicha formulación, no sería justificable económicamente, por ello se decidió mantener la temperatura a 210°C y medir el G-1 y su estándar interno desde su propia base, tal y como describe en la literatura la forma de evaluar picos que no estén completamente resueltos [22].

De esta manera se llegó a las condiciones óptimas de análisis descritas en 2.2. Se recomienda realizar los análisis por duplicado.

Si se compara la metodología analítica desarrollada en este trabajo y la anteriormente reportada en la literatura para esta misma formulación [4] se pueden enumerar toda una serie de ventajas, entre las que se destaca la mayor facilidad de aplicación y el tiempo de análisis inferior.

3.2 Validación de la técnica de determinación, por cromatografía gaseosa, del contenido de G-1 en el concentrado emulsionable.

Linealidad

A continuación se relacionan los datos experimentales y la curva de calibración obtenida Tabla I, figura 6:

Tabla I. Parámetros de la recta de regresión.

Parámetro	Valor experimental	Criterio
Coeficiente de correlación (r)	0,9984	$r \geq 0,99$
Coeficiente de determinación (r^2)	0,9969	-
Pendiente (b)	3,654	-
Ordenada en el origen (a)	0,1999	-
F de Fisher	1,200	$F_{tab} = 3,581$
Coeficiente de Calidad (QC)	2,47	$QC < 5\%$

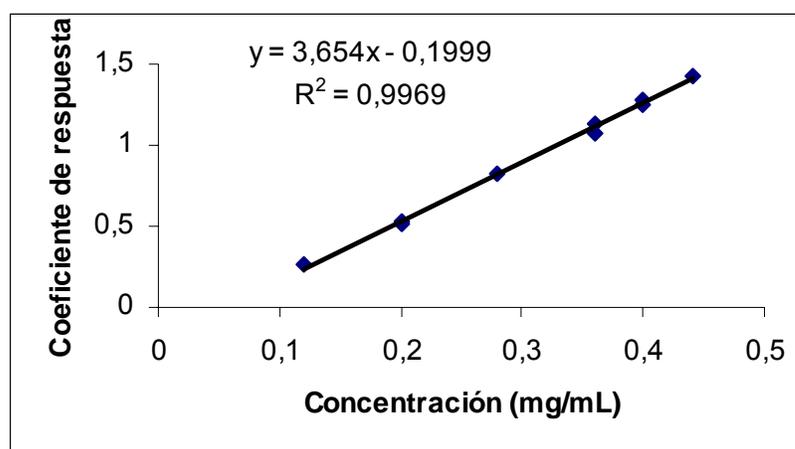


Figura 7. Curva de calibración para determinar linealidad del método de cromatografía de gases para la cuantificación de G-1 en el concentrado emulsionable.

Como puede observarse los parámetros evaluados cumplen con los criterios de aceptación establecidos, demostrándose que la técnica de determinación del contenido de G1 en el concentrado emulsionable, por cromatografía de gases, es lineal en el intervalo de concentraciones de 0,1 a 0,5 mg/mL.

Precisión

Repetibilidad

Los resultados de las réplicas realizadas, en condiciones homogéneas se muestran en la tabla II.

Tabla II. Réplicas realizadas para la determinación de la repetibilidad del método.

Determinaciones	Contenido de G-1 (%)
1	0,177
2	0,183
3	0,180
4	0,185
5	0,180
6	0,182

Según estos valores de concentraciones se determinaron los parámetros siguientes:

Media $\bar{X} = 0,181\%$

Desviación estándar $S = 0,00279\%$

Coefficiente de variación $CV = 1,54\%$

Si se comparan los valores del coeficiente de variación obtenido experimentalmente y el valor máximo aceptado $CV \leq 3\%$ se puede comprobar la repetibilidad del método analítico.

Precisión intermedia

Para la determinación de este parámetro relacionado con la precisión del método, bajo las condiciones descritas, se utilizaron los resultados de las réplicas que se observan en la tabla III:

Tabla III. Réplicas realizadas para la determinación de la precisión intermedia del método.

Día 1	Día 2	Día 3
0,176	0,174	0,177
0,212	0,175	0,183
0,174	0,179	0,18
0,188	0,174	0,185
0,18	0,188	0,18
0,186	0,183	0,182
0,176	0,174	0,177
0,212	0,175	0,183
0,174	0,179	0,18

Teniendo en cuenta los valores de concentración obtenidos se determinaron los siguientes parámetros:

Media $\bar{X} = 0,180 \%$

Desviación estándar $S = 0,005\%$

Coefficiente de variación $CV = 2,59 \%$

El coeficiente de variación obtenido es menor que el valor máximo permisible ($CV \leq 5\%$) [26].

El valor de la C de Cochran calculado para los datos experimentales mostrados en la tabla III es de: 0,463, el cual satisface el criterio establecido ($C \leq 0,707$) para el número de resultados por grupo y el número de varianzas a comparar (tres días y seis réplicas cada día) [27]

El valor del coeficiente de variación de Horwitz, que tiene en cuenta entre otros factores el nivel de concentración del analito en la muestra, es de 5,18 %. Si se analiza el criterio relacionado con este coeficiente de variación ($CV < CV_{Horwitz}$), puede decirse que se cumple con la condición establecida, ya que el coeficiente de variación entre los tres días es de 2,59 % [27]

Todos los resultados anteriormente discutidos demuestran que el método cumple con la precisión intermedia y si se tiene en cuenta que el método cumple también con lo establecido para la repetibilidad, entonces se puede considerar preciso.

Exactitud

Los resultados obtenidos para demostrar la exactitud del método se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV. Réplicas realizadas para la determinación de la exactitud del método

Réplicas	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Concentración	0,212	0,235	0,227	0,225	0,207	0,227	0,210	0,209

Teniendo en cuenta los valores de concentración obtenidos se determinó el promedio que fue de 0,219 %. Se determinó entonces el por ciento de recobro (recobrado) para el cual se tuvo en cuenta el valor teórico de la concentración de G-1 que fue de 0,220%. El recobrado calculado fue de 99,54%.

Como el recobrado calculado se encuentra dentro del intervalo reportado o permisible (98 -102%) [26] la recuperación es satisfactoria. Por tanto la técnica se puede considerar exacta.

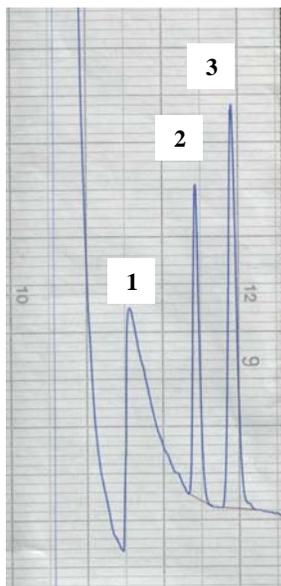
Selectividad y Especificidad

Como se pudo observar anteriormente la inyección del blanco solo, demostró la no existencia de interferencias al tiempo de retención de las sustancias presentes en la muestra. Véase la figura 2.

Si se compara patrón y muestra bajo las condiciones óptimas de análisis (Figura 8) no se observan a simple vista colas, frentes difusos u hombros que puedan ser indicativos de solapamientos de picos [22]. Tampoco se observan variaciones significativas en los tiempos de retención, los cuales se mantienen dentro de un intervalo de $\pm 2\%$.

No obstante se determinaron los anchos en las semialturas y los factores de simetría [22] de todos los picos, tanto en las inyecciones de las disoluciones de referencia (patrones) y las muestras analizadas y se compararon estadísticamente con vistas a demostrar que ninguno de estos factores experimentaba variaciones significativas.

A.



B.

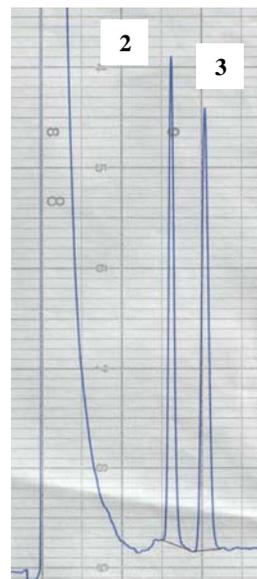


Figura 8. Comparación de los picos cromatográficos con vistas a la evaluación de la especificidad. A- Muestra. B. Patrón de G-1. (1-impureza desconocida, 2- G-1, 3- estándar interno).

El cálculo de T de Student, referente al ancho de la semialtura, dio como resultado una T experimental de 0,042 para el G-1 y un valor de este estadígrafo de 0,047 para el estándar interno. Ambos valores son menores que el valor crítico o tabulado que es de 1,83, para 95 % de confianza y 9 grados de libertad.

El cálculo de la F de Fisher, referente al ancho de la semialtura dio como resultado una F experimental para el G-1 de $F_{\text{exp}} = 0,043$ (comparando inyecciones de patrón y de muestra). Este mismo cálculo respecto al estándar interno arrojó un valor de $F_{\text{exp}} = 0,542$. Ambos resultados son menores que la F de Fischer crítica o tabulada: $F_{\text{tab}} = 6,39$, para 95 % de confianza y 4 grados de libertad.

Por lo anterior se puede decir que este factor (ancho en la semialtura) no experimenta diferencias significativas, ya que tanto los valores medios como las dispersiones se comportan de manera homogénea.

El cálculo de T de Student, referente a los factores de simetría dio como resultado una T experimental de 0,011 para el G-1 y un valor de este estadígrafo de 0,018 para el estándar interno. Ambos valores son menores que el valor crítico o tabulado que

es de 1,83, para 95 % de confianza y 9 grados de libertad. En cuanto a la F de Fischer para este parámetro calculado se obtuvo como resultado una $F_{\text{exp}} = 0,511$ para el estándar interno y una $F_{\text{exp}} = 3,00$ para el G-1, ambos valores son menores que el crítico o tabulado $F_{\text{tab}} = 6,39$.

En resumen puede decirse que los factores de simetría no experimentan diferencias significativas, demostrado por el análisis estadístico comparativo entre los valores medios y las dispersiones.

Los resultados discutidos hasta el momento demuestran que no existen interferencias de ninguna naturaleza que puedan afectar la determinación confiable del G-1 en la muestra (concentrados emulsionables). Con todos estos resultados se puede concluir entonces que el método es específico.

Sensibilidad

Como se sabe, la sensibilidad esta estrechamente relacionada con la pendiente, que en este caso tiene un valor de 3,654 así como con los límites de detección y de cuantificación. Como resultado del cálculo de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC), según los criterios 3S y 10 S [28], se obtuvo que el LD=0,072mg/mL y el LC=0,112 mg/mL con lo que se puede concluir que el método empleado para la cuantificación del G1 en el concentrado emulsionable es sensible.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los principales parámetros de validación de la técnica analítica puede afirmarse que la misma es fiable.

CONCLUSIONES

1. La técnica analítica de cromatografía de gases desarrollada para la determinación cuantitativa de G-1 en el concentrado emulsionable es capaz de arrojar resultados satisfactorios al igual que la técnica precedente de cromatografía en capa fina con elución.
2. La técnica desarrollada resulta fiable de acuerdo a los parámetros vigentes.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar la técnica analítica desarrollada y validada en este estudio para el control de la calidad del concentrado emulsionable de G-1.
2. Valorar la posibilidad de utilizar dicha técnica en los estudios de estabilidad de esta formulación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centro de Bioactivos Químicos. Registro del Dermofural. Resúmenes de la información química, preclínica y clínica. 1993.
2. Sarduy, D. Estudio de la estabilidad acelerada de la solución alcohólica del ingrediente activo G-1. Trabajo de Diploma. Facultad de Química – Farmacia. UCLV. 1993.
3. Del Pino, E. Especificaciones de calidad, métodos de control y fecha de vencimiento definitiva de la solución alcohólica de G-1. Trabajo de Diploma. Facultad de Química-Farmacia. Universidad Central de Las Villas. 1994.
4. Alba, M. A. Diseño y desarrollo de una emulsión oleoacuosa de G-1. Evaluación de su estabilidad física, química y microbiológica. Tesis de Maestría. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. 2000.
5. Queratofurfural. Registro de medicamentos de uso veterinario No.211. Laboratorio de Control Estatal. Instituto de Medicina Veterinaria. Ministerio de la Agricultura. La Habana. 1993.
6. Lugo, E.; Silveira, E. A; Pérez, Y.; Correa, Z.; González, D.; Mayor, S.; Soto, G.; Sánchez, C. Informe final de la evaluación clínica del Dermofural al 0,25% en los pacientes con onicomicosis. 1993.
7. García, O.; Alba, M. A.: Determinación de la irritabilidad ocular, DL₅₀ y actividad de las enzimas microsomales hepáticas después de la aplicación del bioactivo G-1. Trabajo de Diploma. Facultad Química-Farmacia. UCLV. 1989.
8. Torriente, J. J.: Susceptibilidad "in vitro" e "in vivo" del G-1 frente a *Candidas*. Trabajo de Diploma. Facultad Química-Farmacia. UCLV. 1990.
9. Silveira, E.; Medina, R; Machado, R.; Delgado, M.; Castañedo, N. MCI del G-1 frente a bacterias y levaduras del género *Candida*. Registro de medicamentos. Dermofural. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas. Grupo de Microbiología. 1993; 1-2.
10. González, O.; Ramirez, T.; Silveira, E. A.; Herrada, N.; Machado, R. Estandarización de la técnica para la evaluación "in vitro" de la actividad

antifúngica del producto G-1 frente a hongos dermatofitos. Registro de Medicamentos. Dermofural. Centro de Bioactivos Químicos. UCLV. Grupo de Microbiología, p. 1-5. 1993.

11. Estrada, E.; Castañedo, N.; Poméz, R. Análisis estructural del G-1. En: Dermofural. Centro Estatal para el control de la calidad de los medicamentos (CECMED). 1996.
12. Estrada, E.; Rodríguez, L. Estudio asistido por computadoras de la relación entre la estructura molecular y la actividad genotóxica de nitrocompuestos utilizando técnicas de reconocimiento de patrones de redes neuronales. En: Dermofural. Centro Estatal para el control de la calidad de los medicamentos (CECMED). 1996.
13. Monteagudo, D. Evaluación de propiedades químico – físicas del G-1 que pueden afectar su biodisponibilidad por vía oral. Trabajo de Diploma. Facultad de Química – Farmacia. Universidad Central de Las Villas. 1993.
14. Jiménez, I. Síntesis y Caracterización de un producto con propiedades medicamentosas a partir del furfural. Trabajo de Diploma. Facultad de Química – Farmacia. Universidad Central de Las Villas. 1989.
15. Pérez, M.; Melendis, D. Estudio preliminar de estabilidad de algunas formulaciones semisólidas del G-1. Trabajo de Diploma. Facultad de Química – Farmacia. Universidad Central de Las Villas. 1991.
16. Vento, M. Evaluación de propiedades tecnológicas de formulaciones del G-1 en forma de polvo farmacéutico para uso externo y valoración preliminar de su estabilidad. Trabajo de Diploma. Facultad de Química – Farmacia. Universidad Central de Las Villas. 1992.
17. Cueto, M; Vargas T. Estudio de preformulación de una forma farmacéutica de dosificación sólida oral del principio activo de G1. Trabajo de diploma. Facultad de Química – Farmacia. Universidad Central de Las Villas. 1994.

18. Jorge, E; Jiménez I; Calvo A; Morales S; Bravo, L; Carta A; Ramos T; Aguilera O; Tristá, M. G1 Materia Prima. Métodos de Control de G-1. Centro de Bioactivos Químicos. Laboratorio de Control de la Calidad. 1995.
19. Leandro, E; Ramos, M. Estudio de preformulación del principio activo G1: Dispersiones sólidas y complejos de inclusión con β ciclodextrina. Trabajo de diploma. Facultad de Química – Farmacia. Universidad Central de Las Villas. 1996.
20. González, L.E. Influencia de Factores Degradativos en la estabilidad de la dispersión sólida de G1 30%/ PEG 6000. Métodos de Control y especificaciones de Calidad. Tesis de Maestría. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. 2002.
21. Faulí C. Tratado de Farmacia Galénica. Barcelona. España. 1993.
22. Dierksmeyer, G. Métodos Cromatográficos. Editorial Científico – Técnica. La Habana. Cuba. 2005.
23. Braithwaite, A. and Smith, F.J. "Chromatographic methods". Chapman and Hall, Ltd., London (1985).
24. Remington's Pharmaceutical Sciences. Partes 3, 4 y 5 p 593-628.
25. Grob, R. L. "Modern Practice of Chromatography" Ed. John Wiley & Sons, New York (1985).
26. Castro, M; Gascón, S; Pujol, M; Vicente, L. "Validación de Métodos Analíticos " Septiembre 1989.
27. Apers, S.; Pieters, L, Vlietinck, A. Validation of Physicochemical Methods. PNO Laboratorio de Farmacognosia. Universidad de Amberes. Bélgica. 2003.
28. EURACHEM Guide. "The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". ISBN: 0-948926-12-0. Reino Unido. 1998.