

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA**



**Validación de un método analítico de cromatografía
líquida de alta performance para la cuantificación
de adapaleno en alviera 0,1 % ® crema tópica.
Lima-2012.**

**Tesis para optar el Título Profesional de:
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

**Presentado por:
Bach. FLORES POZO, Marli**

**AYACUCHO - PERÚ
2013**

DEDICATORIA

A Dios, a mi madre y hermanos.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga alma mater de mi Formación Profesional, por acogerme en sus aulas, y a todo el personal docente y administrativo.

A la Facultad de Ciencias Biológicas en, especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica.

A mis asesores Q.F. Maricela López Sierralta, Q.F. Lily Rocío Silva Bolívar, Q.F. Javier Espinoza López por su asesoramiento y su orientación en la elaboración y culminación de presente trabajo.

A los profesores Q.F. Edgar Cárdenas y Q.F. José Diez por su orientación y sabios conocimientos.

A la empresa IQFARMA por brindarme las facilidades para desarrollar el presente trabajo en sus instalaciones.

A todos los que colaboraron de una u otra forma en la realización del presente trabajo

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	01
II. MARCO TEÓRICO	04
2.1. Antecedentes	04
2.2. Cromatografía	06
2.3. Validación de métodos analíticos	14
2.4. Parámetros de validación de métodos analíticos	15
2.5. Adapaleno	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Lugar de ejecución	22
3.2. Diseño de investigación	22
3.2.1. Tipo de estudio	22
3.2.2. Población	22
3.2.3. Muestra	22
3.3. Equipos, materiales y reactivos	22
3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos	24
3.4.1. Procedimiento analítico	24
3.4.2. Desarrollo de los parámetros de validación	25
3.5. Análisis de datos	33
IV. RESULTADOS	43
V. DISCUSIÓN	50
VI. CONCLUSIONES	57
VII. RECOMENDACIONES	58
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	63

Validación de un método analítico de cromatografía líquida de alta performance para la cuantificación de adapaleno en alviera 0,1 % @ crema tópica. Lima-2012.

AUTOR: Bach. FLORES POZO, Marli

ASESORES: Q.F. Maricela López Sierralta, Q.F. Lily Rocío Silva Bolivar y Q.F. Javier Espinoza López.

RESUMEN

La validación de un método analítico establece evidencia documentada de que el método es capaz de cumplir en forma consistente y repetitiva las especificaciones establecidas. En el presente trabajo se demostró la validación del método analítico para la cuantificación de adapaleno en alviera 0,1 % @ crema tópica, utilizando métodos propuestos por la USP 35 y la ICH Q2A, para el desarrollo de los procedimientos de validación se aplicó el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

Para el desarrollo de la validación del método, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia y robustez; resultados que fueron sometidos a evaluación estadística. Definida las condiciones, se inicia los análisis para la evaluación de los parámetros de validación, en el parámetro de la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0,9989$, demostrando que si hay correlación entre la concentración del analito y el área del pico cromatográfico, siendo el valor mínimo permisible 0,995; en el parámetro de la exactitud al aplicar el test de student se obtuvo un t_{exp} (0,594) que es menor al t_{tablas} (2,306), por tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación y la cantidad añadida de analito, en el parámetro de la precisión del método se obtuvieron valores de coeficiente de variación de 0,464 % para repetibilidad y 0,460 % para precisión intermedia, cuando el coeficiente de variación máximo es de 2,0 %; es selectivo porque se demostró que ningún excipiente interfiere en el análisis del adapaleno, finalmente el método es robusto porque se obtuvo resultados reproducibles al cambiar el flujo, obteniendo un coeficiente de variación de 0,160 %, cuando el coeficiente de variación máximo es 2,0 %.

Por lo tanto se concluye que el método es confiable ya que proporciona resultados precisos y exactos.

Palabras claves: Cromatografía líquida de alta performance, validación de métodos analíticos y adapaleno.

I. INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica tiene como fin producir medicamentos de calidad y con total garantía de seguridad. Con los años, se han ido desarrollando recomendaciones e incorporando requerimientos que han evolucionado hasta una reglamentación estricta. Debido a esto, en los últimos años ha tomado fuerza el concepto de aseguramiento de la calidad, que no es otra cosa que demostrar que lo que declara calidad, efectivamente la posea (Bellido, 2007).

La calidad de un producto farmacéutico debe estar completamente probada, esto para cumplir con las exigencias de las autoridades sanitarias y sobre todo por brindar un producto eficaz a la población, tomando relevancia aun mayor por lo que si un medicamento no cuenta con los estándares de calidad adecuados pudiese tener consecuencias que perjudiquen a ésta. Por lo cual, en cualquier empresa es de suma importancia contar con sistemas que demuestren que el producto o servicio final es de calidad, por ello, la industria farmacéutica se ha preocupado en implementar metodologías que intenten garantizarla. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de control y fabricación, se exige una mejora continua y máximas garantías de la calidad y es en el avance para conseguir un total dominio de la calidad, cuando surge el concepto validación (Bellido, 2007).

La validación de métodos analíticos es un tema de actualidad en el ámbito farmacéutico. Según las recomendaciones de diversas entidades tales como la AOAC (Organización Americana de Química Analítica), la OMS (Organización Mundial de la Salud) y las farmacopeas oficiales, entre otras entidades, además del creciente interés de la industria farmacéutica, el aseguramiento de la calidad y búsqueda de la mejora de la productividad, señalan la necesidad de validar los métodos analíticos (DIGEMID, 1999).

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por medio de un estudio y programa documentado que ese método posee todos los requisitos para el uso propuesto. La validación es parte integral de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y del desarrollo de un método de análisis puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumple con las especificaciones exigidas, además, contribuye a garantizar la calidad y asegura las propiedades de calidad de un producto determinado. La calidad de los resultados analíticos debe ser acaparada mediante la fiabilidad y reproducibilidad del método analítico utilizado en su obtención y esta demostración debe estar debidamente documentada con el detalle de la preparación de las muestras efectuadas y datos obtenidos (Medina y Berrocal, 2008).

El análisis de productos farmacéuticos por HPLC, constituye actualmente una necesidad, y debido a sus creciente difusión, representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio de análisis, como es el caso de la industria farmacéutica, debido al consumidor, así como reducir repeticiones analíticas, dando en cambio mayor confiabilidad en los resultados obtenidos (Castro y Col., 2001).

En el presente trabajo se pretende validar un método analítico de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la cuantificación de

adapaleno en alviera 0,1 % ® crema. Las razones de la preferencia de este método son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria y en muchos campos de la ciencia.

El desarrollo y validación del presente método analítico fue realizada en el laboratorio IQFARMA S.A - Departamento de Control de Calidad.

Por todo lo manifestado anteriormente, en el presente trabajo de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Validar un método analítico de cromatografía líquida de alta performance para la cuantificación del adapaleno en alviera 0,1 % ® crema tópica.

Objetivo específico

Demostrar que el método analítico para la cuantificación del adapaleno en alviera 0,1 % ® crema tópica cumple con los parámetros de: linealidad, exactitud, especificidad, robustez, repetibilidad y precisión intermedia del nuevo método de análisis de acuerdo a los parámetros solicitados.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La validación de un método analítico es el proceso que establece mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen los requisitos adecuados de exactitud y confiabilidad para las aplicaciones analíticas previstas. Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación de los tipos de métodos descritos son exactitud, precisión, especificidad, robustez, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo (USP 35, 2012).

Para desarrollar una técnica analítica de cuantificación es necesario, en primer lugar, establecer el método analítico más conveniente a ser utilizado (Valdez y Cuadros, 1999).

La mayoría de los métodos de análisis son en los casos más favorables selectivos, pero no específico. Por ello, cuando se trata de muestras complejas la separación del analito de las posibles interferencias es una etapa esencial. Aún sería mejor la posibilidad de determinar varios analitos después de una separación previa. Es así, que uno de los mejores métodos para conseguir esa separación, y posiblemente, el más utilizado es la cromatografía. Este conjunto de técnicas permite la separación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. La cromatografía en sus orígenes era exclusivamente

una técnica de separación que se transformó en técnica de análisis cuando se acopló un dispositivo para monitorizar las especies químicas que se iban separando. Así, la cromatografía se ha convertido en un método analítico de primer orden para separar, identificar y cuantificar los compuestos presentes en muestras líquidas o gaseosas (Valdez y Cuadros, 1999).

El término cromatografía de líquidos, según se usa en los compendios, es sinónimo de cromatografía líquida de alta precisión y de cromatografía líquida de alta resolución, es así que la cromatografía de líquidos es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por procesos de partición, absorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada (USP 35, 2012).

Siendo esta una técnica de separación y cuantificación de compuestos químicos, la mayoría de las drogas, sean compuestos no volátiles o térmicamente inestables pueden analizarse mediante esta técnica sin riesgo de descomposición. Sólo los compuestos que tienen diferentes factores de capacidad pueden ser separados por HPLC (Valdez y Cuadros, 1999).

Las razones de la preferencia de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria (Skoog y Leary, 1994).

El desarrollo y validación de técnicas analíticas para materias primas y/o productos terminados es una tarea que se viene realizando en diferentes laboratorios farmacéuticos peruanos en los últimos años, debido a las exigencias de calidad y a la mejora de la productividad. Como una muestra de ello se tiene las siguientes tesis realizadas:

Arestegui (2001), en Ayacucho realizó la "Validación de un Método de Análisis Cuantitativo de Ampicilina en Cápsulas por Cromatografía Líquida de alta Resolución".

Meneses (2002), en Ayacucho realizó la "Validación de un Método para el Análisis Cuantitativo de Bromhexina en Ampolla por HPLC".

Romero (2003), en Ayacucho realizó la "Validación del Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la Determinación Cuantitativa de Cisaprida en Tabletas".

Bellido (2007), en Ayacucho realizó la "Validación de Método analítico por Cromatografía de alta resolución para la Determinación Cuantitativa de Ambroxol Clorhidrato en Jarabe".

Enciso (2009), en Ayacucho realizó la "Validación prospectiva de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Pectoflem jarabe".

Mendoza (2011), en Ayacucho realizó la "Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de Levofloxacin 500 mg/100ml inyectable para infusión".

Morales (2004), en Lima realizó el "Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg tabletas recubiertas".

Silva (2004), en Lima realizó la "Validación del método de valoración de Glimpirida presentación comprimido 4 mg por el método de cromatografía líquida de alta resolución".

2.2. Cromatografía

Desde hace muchos años la cromatografía forma parte de los métodos del análisis moderno debido a sus variadas posibilidades de empleo. Los procesos cromatográficos sirven tanto para la purificación y separación de mezclas de

sustancias como para el aislamiento y determinación cuantitativa o cualitativa de los componentes individuales (Merck, 1981).

Según define la IUPAC "La Cromatografía es un método, usado para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una fase móvil y otra estacionaria. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como capa o distribuida como una película (USP 35, 2012).

El proceso de separación se basa en las diversas interacciones entre la fase móvil y estacionaria por un lado y la molécula del problema por otro. La naturaleza de la fase móvil y estacionaria determina por lo tanto los mecanismos en que se basa una separación cromatográfica (Merck, 1981).

2.2.1. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

2.2.1.1. Concepto

La cromatografía de líquidos de alta performance (HPLC), por sus siglas en inglés), también llamada cromatografía de líquidos de alta resolución, es una técnica de separación e identificación cualitativa y determinación cuantitativa de componentes químicos en mezclas complejas, basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada (USP 35, 2012).

Existiendo cuatro tipos principales de técnicas de HPLC que responden a las fuerzas moleculares básicas: fuerzas iónicas, fuerzas polares y fuerzas de dispersión; cada técnica específica a cada una de ellas: las fuerzas polares son el tipo dominante de las interacciones moleculares empleadas en HPLC de fase normal; las fuerzas de dispersión son empleados en HPLC de fase reversa; las fuerzas iónicas son empleados en HPLC de intercambio iónico; y el cuarto tipo

de técnica de HPLC de exclusión de tamaño, se basa en la separación dinámica de las moléculas de acuerdo al tamaño que presente, sin la interacción del analito con la fase estacionaria (Dong, 2006).

2.2.1.2. Ventajas y limitaciones del HPLC

La cromatografía de líquidos de alta performance (HPLC), es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica por las ventajas que la técnica presenta, obteniendo un análisis cuantitativo rápido y preciso, es una operación automatizada, tiene una alta sensibilidad de detección pudiendo detectar nanogramos, picogramos, inclusive niveles de femtogramos; y una de las ventajas más importantes es la susceptibilidad a la detección de un 60% a 80% de todos los componentes existentes (Katz, 1998).

Por otra parte, las limitaciones que presenta son: el sistema no cuenta con un detector universal como en otros sistemas, por lo tanto la detección es problemática si el analito no absorbe haces de luz UV, otra desventaja se da cuando el analito no es fácilmente ionizado; y por último, la técnica por HPLC, tiene muchos parámetros operacionales que lo hace dificultoso para un principiante (Katz, 1998).

2.2.1.3. Partes

2.2.1.3.1. Fase estacionaria y fase móvil

Siendo la cromatografía definida como un método físico de separación por la cual los componentes son separados y distribuidos en dos fases, una estacionaria y la otra móvil que se mueve en una determinada dirección. El sistema de HPLC presenta una gran versatilidad ya que abarca una serie de tipos de separación; teniendo cromatografía por adsorción donde el analito interactúa con una superficie sólida estacionaria y es desplazado por competencia con el eluyente por los sitios activos de la superficie. La separación por partición resulta de una distribución termodinámica entre dos fases líquidas;

mientras que la cromatografía por cambio iónico, está gobernada por la interacción entre los analitos ionizados y la carga opuesta de la superficie de la fase estacionaria. En la cromatografía por exclusión de tamaño, la fuerza de resistencia para la separación es el tamaño físico de los analitos, lo que determina su accesibilidad a los diferentes tamaños de poros en la superficie de la fase estacionaria. Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa (Lough y Wainer, 1996).

El diseño de las columnas para cromatografía de líquidos tiene un doble propósito, el primero separa los solutos individuales apartados por las diferentes fuerzas moleculares que se producen entre los solutos y las dos fases, en segundo lugar, limita la dispersión o difusión de cada banda de soluto a fin de ser separados uno de otro, que van eluyendo discretamente (Medina, 2008).

2.2.1.3.1.1. Selección de la columna

Una buena cromatografía con fases móviles interactivas, requieren de un equilibrio adecuado entre las fuerzas intermoleculares existentes entre los tres participantes activos en el proceso de la separación: el soluto, la fase móvil y la fase estacionaria. En este caso, la fase estacionaria a menudo no puede competir efectivamente por los componentes de la muestra. En resumen, si se quieren obtener buenas separaciones en un tiempo razonable, las polaridades del soluto, de la fase móvil y de la fase estacionaria se han de armonizar cuidadosamente. Sin embargo, las teorías que relacionan las interacciones de la fase móvil y de la fase estacionaria con una serie determinada de componentes de una muestra son imperfectas, y en el mejor de los casos, un científico sólo puede elegir la fase estacionaria de manera general. Una vez hecha la elección, ha de realizar una serie de ensayos tentativos obteniendo los cromatogramas

con varias fases móviles hasta que se llegue a una separación satisfactoria (Skoog y Leary, 1994).

2.2.1.3.1.2. Selección de la fase móvil

En cromatografía de líquidos el factor de capacidad k' se puede manipular fácilmente, debido a que este parámetro depende considerablemente de la composición de la fase móvil, todo esto con la finalidad de mejorar la resolución de una columna cromatográfica. Para una eficiencia óptima, k' debería estar en el intervalo comprendido entre dos y cinco; sin embargo para mezclas complejas, ese intervalo se ha de extender tal vez de 0,5 a 20 para que todos los picos de los componentes tengan tiempo de aparecer (Skoog y Leary, 1994).

2.2.1.3.2. Bomba

El sistema de bombas puede ser considerado como el corazón del HPLC; las características de funcionamiento y rendimiento de la bomba fundamentalmente definen y limitan el tipo de separaciones que pueden ser realizadas; las características más importantes son: a) la reproducibilidad de caudal, b) el rango de caudal, c) la estabilidad de la presión (Cazes, 2005).

2.2.1.3.3. Inyectores

La muestra a analizar debe ser introducida en la fase móvil; una válvula de inyección adecuadamente diseñada y utilizada de manera correcta, asegura máxima eficiencia durante la cromatografía. Hoy en día la inyección manual es poco frecuente y sólo es justificado cuando la cantidad de muestra es limitada; la utilización de inyectores automáticos facilita la transferencia de muestras y el procesamiento automático de variables operativas como el control de volumen, número de inyecciones, el intervalo entre las inyecciones, ciclos de enjuague de las muestras; suprimiendo factor del error humano y mejorando la precisión del método (Lough y Wainer, 1966).

2.2.1.3.4. Detectores

El propósito de un detector en un sistema de HPLC es identificar la presencia de componentes de interés del eluyente proveniente de la columna del HPLC. El analito es reconocido por interacciones fisicoquímicas como por ejemplo la de absorbancia de radiación UV en una cierta longitud de onda (Lough y Wainer, 1996).

2.2.1.3.5. Sistemas de toma y procesamiento de datos

Para toma de datos, procesamiento de datos y el reporte, el uso de un sistema informático integrado es esencial. Este sistema integrado, recibe y almacena la señal de los detectores e imprime cromatogramas completos, e incluso controla la mayoría de variables operativas como selección de muestras, válvulas de muestreo, condiciones del detector, entre otros; simplificando el trabajo tedioso de una selección manual de las condiciones operativas cromatográficas; con el objetivo de obtener el cromatograma con fracciones separadas e identificadas de cuya interpretación puede extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas de mezclas complejas (Fauli, 1996).

2.2.1.4. Parámetros cromatográficos

2.2.1.4.1. Tiempo de retención (t_R)

Se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima. Los tiempos de retención cromatográficos son característicos de los compuestos que representan, pero no son únicos. La coincidencia de los tiempos de retención de una muestra y de una sustancia de referencia puede usarse como un criterio parcial en la construcción de un perfil de identidad, pero es insuficiente por sí misma para establecer la identidad. Los tiempos de retención absolutos de un compuesto dado varían de un cromatograma al siguiente (USP 35, 2012).

Cada analito específico está representado por un pico en el cromatograma; estos picos son simétricos y se asemejan a una curva de distribución normal tipo Gaussiana. La distancia máxima del pico desde el punto de inyección, expresado en unidades de tiempo se llama tiempo de retención (t_R). El tiempo de retención de analito es dependiente del caudal de fase móvil; a mayor velocidad del caudal de flujo, más pequeño es el tiempo de retención de analito (Dong, 2006).

2.2.1.4.2. Tiempo muerto (t_m)

Es el tiempo requerido por un compuesto inerte para migrar desde la inyección en la columna sin retraso por la fase estacionaria. Por consiguiente, el tiempo muerto es idéntico con el tiempo de residencia del compuesto en la fase móvil, mostrando como un pico de aire o de componente no retenido, con la escala de la línea en minutos (Dong, 2006).

2.2.1.4.3. Factor de retención (K)

La retención del analito se compone de dos partes: 1) El tiempo que el analito eluye en la fase móvil; 2) el tiempo que el analito es retenido en la fase estacionaria. La diferencia entre el tiempo total de retención (t_R) y el tiempo de demora, se denomina tiempo de retención reducido (t'_R), y la correspondiente diferencia entre el volumen de retención del analito y el volumen muerto se llama volumen de retención neta (V'_R).

La relación entre el volumen de retención reducido y del volumen muerto da un parámetro adimensional llamado factor de retención, (K) llamado también factor de capacidad (Dong, 2006).

2.2.1.4.4. Selectividad (α)

La capacidad del sistema cromatográfico para discriminar diferentes analitos se llama selectividad (α). La selectividad se determina como la relación de los

factores de retención de dos analitos, o la relación de los tiempos de retención reducida (Katz, 1998).

La retención relativa describe la capacidad de un sistema cromatográfico de discriminar entre dos compuestos; es independiente de la longitud de columna y la velocidad de flujo; por el contrario es dependiente de la temperatura y las propiedades de la fase móvil y la fase estacionaria (Katz, 1998).

2.2.1.4.5. Eficiencia (N)

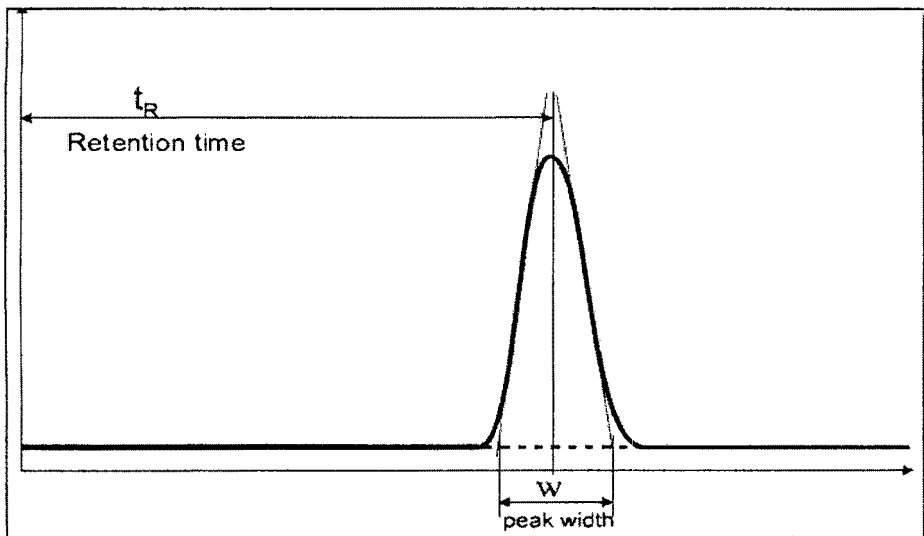
La eficiencia es la medida del ensanchamiento de cinta cromatográfica y el número de los platos teóricos (N) en la columna y por lo general es calculada usando la ecuación siguiente:

$$N = 16(t_R/W)^2$$

Donde:

t_R : tiempo de retención de la sustancia.

W : ancho del pico en su base, que se obtiene extrapolando los lados relativamente rectos hasta la línea de base.



Gráfica 01. Representación esquemática de las mediciones de eficiencia (Número de platos teóricos en la columna) (Valls y del Castillo, 1998).

El número de los platos teóricos caracteriza la calidad de la columna y los fenómenos de transferencia de masas. Valores grandes para N califican la columna para separar mezclas complejas (Valls y Del Castillo, 1998).

2.2.1.4.6. Resolución (R)

La resolución (R) está definida como la proporción de la distancia entre dos picos a la anchura media de los mismos y este descriptor abarca tanto eficacia como selectividad (Dong, 2006).

2.3. Validación de métodos analíticos

2.3.1. Definición

La validación es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos previamente establecidos (Castro y Col., 2001).

2.3.2. Objetivos de la validación

El objetivo de la validación de un método analítico es dejar evidencia, mediante documentación, del cumplimiento de las condiciones de exactitud, precisión y confiabilidad, así como de la integridad y recuperabilidad de los resultados de los ensayos efectuados. De este modo queda demostrado que se puede confiar en un método para producir el resultado esperado dentro de límites definidos (Castro y Col., 2001).

2.3.3. Razones que justifiquen la validación de métodos analíticos

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas, la validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.
- La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos.

- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizar el número de fallas y repeticiones.
- Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de las Buenas Prácticas de Laboratorio con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto (Castro y Col., 2001).

2.4. Parámetros de validación de métodos analíticos

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en función de los parámetros analíticos. Estos parámetros analíticos considerados en la validación son los siguientes:

2.4.1. Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia o de dispersión de los resultados de la prueba, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a muestras múltiples de una muestra homogénea. Es la medida de cuán cerca están los valores unos de otros para un número de mediciones bajo las mismas condiciones analíticas. La precisión de un método analítico generalmente se expresa como la desviación estándar relativa (RSD) cuyo valor debe ser menor o igual al 2% para análisis por HPLC (Coeficiente de Validación).

Los resultados se acompañan del valor medio, desviación estándar que debe ser menor o igual al 2%, coeficiente de variación e intervalo de confianza del valor medio (Castro y Col., 2001), cuya ecuación es:

$$\%CV = \frac{s}{x} \times 100$$

Donde:

x : Media de los resultados

s : Desviación estándar

n : Número de mediciones

La ICH (International Conference of Harmonization), ha utilizado tres componentes para definir la precisión:(USP 35, 2012)

2.4.2. Repetibilidad

Expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por un mismo analista bajo condiciones iguales como equipo, reactivo e intervalos de tiempo. La repetibilidad mide las variaciones dentro de un mismo laboratorio. Se determina analizando un número significativo de muestras tomando de un lote homogéneo (USP 35, 2012).

2.4.3. Precisión intermedia

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones diferente (diferente analista, diferente aparato, diferentes días) en un mismo laboratorio (USP 35, 2012).

2.4.4. Reproducibilidad

Expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por diferentes analistas y bajo condiciones ligeramente diferentes, tales como distintos laboratorios, reactivos de distintas marcas, equipo de trabajo diferente, etc. La reproducibilidad mide las desviaciones interlaboratorios y se determina analizando un número significativo de muestras, tomadas de un lote homogéneo, en diferentes laboratorios, por distintos analistas y utilizando distintos equipos, aplicando el mismo procedimiento analítico (Castro y Col., 2001).

2.4.5. Exactitud

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados obtenidos por ese método y el valor verdadero. La exactitud puede a menudo expresarse como un porcentaje de recuperación, por medio de la valoración de cantidades conocidas agregadas de analitos. Representa el grado en que un método analítico es exacto para los fines propuestos. Para el análisis de un

producto farmacéutico la exactitud es evaluada por el análisis de una mezcla con cantidades conocidas de componentes.

Entre los procedimientos para determinar la exactitud de un método de análisis cabe citar: comparar el método propuesto con otro cuya exactitud haya sido ya establecida; comprobar este parámetro, utilizando como muestra un patrón de calidad certificada; aplicar el método analítico a una muestra o mezcla de excipientes a las que se añaden cantidades conocidas de un analito, mediante este último método se agregan cantidades conocidas de analito o mezcla de excipientes, tanto por encima como por debajo del nivel normal previsto. A partir de los resultados obtenidos luego de aplicar el método propuesto, se calcula la exactitud como el porcentaje de analito recuperado por medio de la valoración mediante la siguiente fórmula (Castro y Col., 2001).

$$\%R = \frac{X}{X_a} \times 100$$

Donde:

%R : Porcentaje de recuperación

X : Cantidad de analito hallado

X_a : Cantidad de analito añadido

Donde el RSD de la cantidad de analito añadido con la cantidad de analito recuperado debe ser menor al 2 %. Se procede según el test "T" de student; El criterio de aceptación es si el "T" experimental es menor al "T" de las tablas, para (n-1) grados de libertad y un nivel de significación del 95 % (p=0,05), entonces no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad de analito añadido. El "T" experimental se calcula mediante la siguiente fórmula (Castro y Col., 2001):

$$t_{\text{exp}} = \frac{100 - R / \bar{n}}{\%RSD}$$

Donde:

R : Porcentaje de Recuperación Promedio de todos los datos

n : Numero de datos o mediciones.

RSD : Desviación estándar relativa o coeficiente de variación del total de mediciones.

2.4.6. Selectividad

Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra (Castro y Col., 2001).

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito como: imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos); distorsionar la respuesta del analito (afecta normalmente a la pendiente y ordenada en el origen de la recta de calibración). Este efecto puede delatar la presencia de interferencias desconocida, aunque también puede ser consecuencia de recuperaciones no lineales (Castro y Col., 2001).

El estudio de la selectividad es uno de los parámetros de mayor importancia dentro de la validación de un método analítico. Atendiendo a criterios técnicos, se deberá establecer, en cada caso, hasta que punto se debe buscar interferencias (con excipientes, impurezas y productos de degradación), debido a la imposibilidad de reflejar todas las situaciones y consideraciones posibles (Castro y Col., 2001).

2.4.7. Límite de detección

El límite de detección es un parámetro de pruebas de límite. Es la concentración más baja de analito que pueda detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas. De esta manera, las pruebas de límites solamente fundamentan que la concentración del analito

está por encima o por debajo de un nivel de seguridad. Este parámetro hace referencia a la mínima concentración del compuesto en estudio que es posible detectar con certeza, es decir que se puede diferenciar la respuesta dado por un blanco, el cual contiene todos los componentes de la muestra menos el compuesto de estudio (Castro y Col., 2001).

2.4.8. Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación es un parámetro de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, como por ejemplo impurezas en materias primas y productos de degradación en productos terminados. Se define como la mínima concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptable en una muestra, bajo las condiciones establecidas (Castro y Col., 2001).

2.4.9. Linealidad

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados que son directamente proporcionales o mediante una transformación matemática bien definida se convierten directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado. La linealidad generalmente se expresa en función de la varianza alrededor de la pendiente de la recta de regresión calculada, según una relación matemática establecida, a partir de los resultados obtenidos mediante el análisis de muestra con diferentes concentraciones de analito, (Castro y Col., 2001). Esta relación matemática se expresa de la siguiente manera:

$$Y = bX + a$$

Dónde:

x : La concentración del analito

y : Valor de la respuesta en el área del pico cromatográfico

b : Valor de la pendiente de la recta

a : Valor del intercepto de la recta con el eje Y

2.4.10. Robustez

La guía ICH, Q2A define la robustez de un método analítico como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o "estabilidad" durante su empleo en rutina. Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto a las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización (Castro y Col., 2001) y (USP 35,2012).

2.5. Adapaleno

El adapaleno ($C_{28}H_{28}O_3$) es un derivado retinoide, que en modelos de inflamación *in vitro* e *in vivo* ha demostrado tener potentes propiedades antiinflamatorias; el adapaleno es esencialmente estable al oxígeno y a la luz y es químicamente no reactivo (Weston y Lane, 2008).

Es un nuevo derivado del ácido naftoico cuya característica principal es una notable estabilidad química y fotoestabilidad, un alto punto de fusión proporcionado por su función adamantil y una ausencia de color u olor. La función adamantil le proporciona gran afinidad por los lípidos cutáneos. Su ingrediente activo principal viene en una suspensión micronizada en vehículo acuoso, por lo tanto es muy bien tolerada y le da al gel un aspecto cremoso. Tiene una capacidad humectante agregada por la presencia de propilenglicol al 4 % (Weston y Lane, 2008).

2.5.1. Mecanismo de acción

Debido a la afinidad selectiva por los receptores gama presentes en la epidermis y la localización preferencial de estos receptores en las células que participan en

la diferenciación terminal, el adapaleno actúa específicamente en la diferenciación queratinocítica terminal que está muy alterada en las lesiones de acné (Herane, 1996).

La acción antiinflamatoria la ejerce mediante una inhibición de la migración de leucocitos polimorfonucleares, actividad comparable a la indometacina, valerato de betametasona y claramente superior de la tretinoína e isotretinoína (Herane, 1996). El adapaleno a diferencia de la isotretinoína no se une a la proteína citosólica de unión al ácido retinoico (CRABP). Esto unido a la selectividad por los receptores gama proporcionaría una acción más eficaz y con menos efectos adversos que la tretinoína (Herane, 1996).

2.5.2. Farmacocinética

La absorción a través de la piel humana es pequeña. En los estudios clínicos realizados, raras veces se pudieron detectar el adapaleno en el plasma y tan solo aparecen trazas después de una aplicación crónica, estando el nivel de detección del fármaco en 0.25 nanogramos/mL. Después de la administración de adapaleno marcado con (¹⁴C) a ratas, conejos y perros, la radioactividad se distribuye en varios tejidos, encontrándose los niveles más altos en el hígado, el bazo, las adrenales y los ovarios. El metabolismo en los animales de laboratorio se lleva a cabo por O-desmetilación, hidroxilación y conjugación, y la eliminación es por vía biliar (Weston y Lane, 2008).

2.5.2. Propiedades físico- químicas

2.5.2.1. Descripción

Es un polvo cristalino blanco ligeramente amarillo, con un punto de ebullición entre 318 °C y 326 °C (Bellido, 2010).

2.5.2.2. Solubilidad

Escasamente soluble en tetrahidrofurano y muy escasamente soluble en dietileter (Bellido, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo se ejecutó entre los meses de setiembre del 2012 a marzo del 2013, en los ambientes del departamento de Control de Calidad del Instituto Quimioterapico S.A (IQFARMA), ubicado en el distrito de Ate Vitarte de la región de Lima.

3.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

3.2.1. Tipo de estudio: Descriptivo

3.2.2. Población: Pilotos de alviera 0,1 % ® crema tópica (Adapaleno) desarrollados en el área de Investigación y Desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA) de la región de Lima.

3.2.3. Muestra: Un piloto de alviera 0,1 % ® crema tópica (Adapaleno) desarrollado en el área de Investigación y Desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA) de la región de Lima.

3.3. EQUIPOS , MATERIALES Y REACTIVOS

3.3.1. EQUIPOS

- **HPLC AGILENT 1200**

Degasser : G1379A Serial# JP 40725027

ISOPUMP : G1379A Serial# DE 43608076

ALS : G1379A Serial # DE 33230296

COLCOM : G1379A Serial# DE 43648493

- Sonicador
- Columna Cromatográfica : LiChrospher ® 100 RP-18 (5µm); 125 mm x 4,0mm.
- Bomba de vacío para filtrar solventes.
- Balanza analítica.
- Baño maría.

3.3.2. MATERIALES

- Probetas de 100 y 1000 ml
- Fiolas de 50,100 y 1000ml
- Pipetas de ,2,3,4, 5 y 6mL
- Viales de 1mL para HPLC
- Membranas de Nylon 0,2 µm
- Jeringas vidrio
- Bombilla
- Viales de vidrio ámbar
- Varillas de vidrio
- Gradillas

3.3.3. REACTIVOS

- Fase móvil:
 - Agua purificada
 - Ácido fosfórico
 - Metanol grado HPLC
- Estándar de Adapaleno
- Tetrahidrofurano

3.4. DISEÑO METODOLÓGICO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

3.4.1. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Fase móvil:

Se preparó una mezcla de metanol: agua purificada: ácido fosfórico (900:100:1) en una probeta de 1000 mL. Luego se filtró por membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad, finalmente se desgasificó en vacío por tres minutos.

Preparación del estándar:

Se pesó aproximadamente 20,0 mg de adapaleno estándar de referencia, luego se transfirió a una fiola de 100 mL, se adicionó 60 mL de tetrahidrofurano, mezcló y sonicó por 10 minutos, luego se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con tetrahidrofurano y mezcló. Luego se transfirió 10,0 mL a una fiola de 100 mL y llevó a volumen con fase móvil. Se filtró por membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad. (Concentración aproximada: 0,02 mg/mL).

Preparación de la muestra:

Se pesó una cantidad equivalente a 20,0 mg de adapaleno (aproximadamente 2,0 g de muestra) en una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y luego se procedió a sonicar por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Se llevó a baño de hielo durante 10 minutos. Se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad. (Concentración aproximada: 0,02 mg/mL).

Condiciones cromatográficas:

Longitud de onda	: 254 nm
Flujo	: 1,5 mL/min
Volumen de inyección	: 20 µL
DSRiny	: No mayor de 2,0 %
Temperatura	: Mantener el horno a 30 °C

3.4.2. DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Los parámetros a estudiar en la validación del método analítico son los siguientes:

3.4.2.1. Linealidad

Para su determinación se preparó una serie de cinco soluciones a concentraciones de 0,010 mg/mL, 0,015 mg/mL, 0,020 mg/mL, 0,025 mg/mL y 0,030 mg/mL correspondientes a 50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 % respectivamente, para el cual se tomó a 0,020 mg/mL como concentración de referencia equivalente al 100 %. Este estudio se realizó para el estándar.

Linealidad del estándar:

Preparación de la solución madre

Se pesó 25,0 mg de adapaleno estándar de referencia, luego se transfirió a una fiola de 100 mL, se adicionó 60 mL de tetrahidrofurano, se mezcló, sonicó por 10 minutos y luego se enfrió a temperatura ambiente. Finalmente se completó a volumen con tetrahidrofurano y mezcló (Concentración aproximada: 0,25 mg/mL).

Estándar 1 al 50 %: de la solución madre se transfirió 2,0 mL a una fiola de 50 mL, se homogenizó y se llevó a volumen con la fase móvil (Concentración aproximada: 0,010 mg/mL).

Estándar 2 al 75 %: de la solución madre se transfirió 3,0 mL a fiola de 50 mL, se homogenizó y se llevó a volumen con la fase móvil (Concentración aproximada: 0,015 mg/mL).

Estándar 3 al 100 %: de la solución madre se transfirió 4,0 mL a fiola de 50 mL, se homogenizó y se llevó a volumen con la fase móvil (Concentración aproximada: 0,020 mg/mL).

Estándar 4 al 125 %: de la solución madre se transfirió 5,0 mL a fiola de 50 mL, se homogenizó y se llevó a volumen con la fase móvil (Concentración aproximada: 0,025 mg/mL).

Estándar 5 al 150 %: de la solución madre se transfirió 6,0 mL a fiola de 50 mL, se homogenizó y se llevó a volumen con la fase móvil (Concentración aproximada: 0,030 mg/mL).

3.4.2.2. Exactitud:

Se preparó tres muestras (placebo más analito) a concentraciones de 80 %, 100 % y 120 %.

Preparación de solución estándar al 100% (0,02mg/mL)

Se pesó aproximadamente 19,1 mg del estándar Adapaleno estándar de referencia, se transfirió a una fiola de 100 mL, se adicionó 60 mL de tetrahidrofurano, se mezcló, sonicó por 10 minutos y luego se enfrió a temperatura ambiente, finalmente se completó a volumen con tetrahidrofurano y mezcló. Se transfirió 10,0 mL a una fiola de 100 mL, se homogenizó y llevó a volumen con fase móvil (Concentración aproximada: 0,020 mg/mL).

Preparación de la solución muestra a concentraciones de 80 %, 100 % y 120%

Para el estudio de este parámetro se preparó una serie de soluciones de concentraciones al 80 %, 100 % y 120 % de adapaleno por triplicado para obtener el coeficiente de variación de cada concentración.

Muestra con el 80% del estándar de adapaleno

Se pesó aproximadamente 2,0 g de placebo y luego se adicionó 16,0 mg de estándar de adapaleno, el que se transfirió a una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Se llevó a baño de hielo durante

10 minutos. Se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad (Concentración aproximada: 0,016 mg/mL).

Muestra con el 100% del estándar de adapaleno

Se pesó aproximadamente 2,0 g de placebo y luego se adicionó 20,0 mg de estándar de adapaleno, el que se transfirió a una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Se llevó a baño de hielo durante 10 minutos. Se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad. (Concentración aproximada: 0,016 mg/mL).

Muestra con el 120% del estándar de adapaleno

Se pesó aproximadamente 2,0 g de placebo y luego se adicionó 24,0 mg de estándar de adapaleno, el que se transfirió a una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Se llevó a baño de hielo durante 10 minutos. Se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad. (Concentración aproximada: 0,016 mg/mL).

3.4.2.3. Precisión

3.4.2.3.1. Repetibilidad

Preparación del estándar

Se pesó aproximadamente 20,0 mg de adapaleno estándar de referencia, luego se transfirió a una fiola de 100 mL, se adicionó 60 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y sonicó por 10 minutos, luego se llevó a temperatura ambiente, se completó a volumen con tetrahidrofurano y mezcló. Luego se transfirió 10,0 mL a una fiola de 100 mL, se llevó a volumen con fase móvil. Se filtró por membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad (Concentración aproximada: 0,02 mg/mL).

Preparación de la muestra

Para determinar este parámetro se tomó seis muestras a 0,020 mg/mL como concentración de referencia equivalente al 100 %, para lo cual se pesó aproximadamente 2,0 g de muestra, se transfirió a una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, completó a volumen con fase móvil y mezcló. Se llevó a baño de hielo durante 10 minutos. Se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad.

3.4.2.3.2. Precisión Intermedia

Preparación del estándar

Se pesó aproximadamente 20,0 mg de adapaleno estándar de referencia, luego se transfirió a una fiola de 100 mL, se adicionó 60 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y sonicó por 10 minutos, luego llevar a temperatura ambiente, se completó a volumen con tetrahidrofurano y mezcló. Luego se transfirió 10,0 mL a una fiola de 100 mL, se llevó a volumen con fase móvil. Se filtró por membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad. (Concentración aproximada: 0,02 mg/mL).

Preparación de la muestra

Para determinar este parámetro se tomó seis muestras a 0,020 mg/mL como concentración de referencia equivalente al 100 %, para lo cual se pesó aproximadamente 2,0 g de muestra, se transfirió a una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, completó a volumen con fase móvil y mezcló. Se llevó a baño de hielo durante 10 minutos. Se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad. En este caso se procedió la evaluación con diferentes analistas.

3.4.2.4. Robustez

Preparación del estándar

Se pesó aproximadamente 20,0 mg de adapaleno estándar de referencia, luego se transfirió a una fiola de 100 mL, se adicionó 60 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y sonicó por 10 minutos, luego llevar a temperatura ambiente, se completó a volumen con tetrahidrofurano y mezcló. Luego se transfirió 10,0 mL a una fiola de 100 mL, se llevó a volumen con fase móvil. Se filtró por membrana de nylon de 0,2 μm de porosidad. (Concentración aproximada: 0,02 mg/mL).

Preparación de la muestra

Se preparó dos muestras a una concentración 0,020 mg/mL como concentración de referencia equivalente al 100 %, para lo cual se pesó aproximadamente 2,0 g de muestra, se transfirió a una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, completó a volumen con fase móvil y mezcló. Se llevó a baño de hielo durante 10 minutos. Se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 μm de porosidad. Luego se procedió a cromatografiar utilizando un flujo de 0,75 mL/min.

3.4.2.5. Selectividad

Se preparó evaluando cada excipiente, el placebo y la muestra con el estándar y así se determinó el tiempo de retención de cada excipiente:

TABLA 01: Cantidad de activo y excipientes para la terminación de la selectividad.

Materia prima	Cantidad: 100 kg		Cantidad: 250 g	
Adapaleno	0,10000	Kg	0,1	mg
Ácido fosfórico	0,15000	L	0,0027	mL
Alcohol bencílico	0,96000	L	0,0192	mL
Propilenglicol	9,61000	L	0,1922	mL
Macrogol cetoestearílico	2,25000	Kg	45,04	mg
Alcohol Cetoestearílico	7,20000	Kg	144	mg
Aceite mineral liviano	6,00000	Kg	120	mg
Petrolato blanco	15,00000	Kg	300	mg
Sodio fosfato dibásico anhidro	0,26500	Kg	5,28	mg
Lutrol F68	0,100000	Kg	2,00	mg

Preparación del estándar

Se pesó aproximadamente 20,0 mg de estándar adapaleno, se transfirió a una fiola de 100 mL y adicionó 60 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y sonicó por 10 minutos, se completó a volumen con tetrahidrofurano y mezcló. Se transfirió 10,0 mL a una fiola de 100 mL, se homogenizó y llevó a volumen con la solución diluyente (Concentración aproximada: 0,020 mg/mL).

Preparación de la muestra con activo

Se pesó aproximadamente 2,0 g muestra en una fiola de de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Luego se llevó a baño de hielo durante 10 minutos, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad.

Preparación del placebo

Se pesó aproximadamente 2,0 g de placebo en una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se

completó a volumen con fase móvil y mezcló. Luego se llevó a baño de hielo durante 10 minutos, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 μm de porosidad.

Preparación de los excipientes

Adapaleno: Se pesó 2,0 mg de estándar adapaleno en una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Luego se llevó a baño de hielo durante 10 minutos, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 μm de porosidad.

Ácido fosfórico: Se midió 0,0027 mL de ácido fosfórico en una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Luego se llevó a baño de hielo durante 10 minutos, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 μm de porosidad.

Alcohol bencílico: Se midió 0,0192 mL de alcohol bencílico en una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Luego se llevó a baño de hielo durante 10 minutos, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 μm de porosidad.

Propilenglicol: Se midió 0,1922 mL de propilenglicol en una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Luego se llevó a

baño de hielo durante 10 minutos, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 μm de porosidad.

Macrogol cetoestearílico: Se pesó 45,04 mg de macrogol cetoestearílico en una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Luego se llevó a baño de hielo durante 10 minutos, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 μm de porosidad.

Alcohol cetoestearílico: Se pesó 144,0 mg de alcohol cetoestearílico en una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Luego se llevó a baño de hielo durante 10 minutos, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 μm de porosidad.

Aceite mineral liviano: Se pesó 120,0 mg de aceite mineral liviano en una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Luego se llevó a baño de hielo durante 10 minutos, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 μm de porosidad.

Petrolato blanco (vaselina sólida): Se pesó 300,0 mg de petrolato blanco en una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Luego se llevó a baño de hielo durante 10 minutos, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 μm de porosidad.

Sodio fosfato dibásico anhidro: Se pesó 5,28 mg de sodio fosfato dibásico anhidro en una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Luego se llevó a baño de hielo durante 10 minutos, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad.

Lutrol F68: Se pesó 2,00 mg de lutrol F68 en una fiola de 100 mL, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano, se mezcló y colocó en baño maría a 60 °C durante 15 minutos y se sonitizó por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se completó a volumen con fase móvil y mezcló. Luego se llevó a baño de hielo durante 10 minutos, se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad.

3.5. ANÁLISIS DE DATOS

3.5.1. Linealidad

1. Cálculo de la recta de regresión:

Ecuación de la recta:

$$y = bx + a$$

Dónde:

x = concentración del analito

y = respuesta (área del pico cromatográfico)

a = término independiente

b = valor de la pendiente

1.1. Término independiente:

$$a = y - bx = \frac{y - b \cdot x}{n} = \frac{10472,40321 - 26082,25648 \times 0,400969472}{20} \\ = 0,7107$$

1.2. Pendiente

$$\begin{aligned}
 b &= \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \\
 &= \frac{236,1315237 - \frac{0,400969472 \times 10472,40321}{20}}{0,009042413 - \frac{0,400969472^2}{20}} \\
 &= 26082,2564
 \end{aligned}$$

1.3. Coeficiente de correlación "r": Refleja el grado de relación entre las variables "X" (concentración) y la "y" (respuesta).

$$\begin{aligned}
 r &= \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}} \\
 &= \frac{236,1315237 - \frac{0,400969472 \times 10472,40321}{20}}{\sqrt{\left(0,009042413 - \frac{0,400969472^2}{20}\right) \left(6167747,55 - \frac{10472,40321^2}{20}\right)}} = 0,9989
 \end{aligned}$$

1.4. Coeficiente de determinación "r²": Indica la proporción de la varianza total de "y".

$$r^2 = \frac{SC_{REG}}{SC_r} = \frac{SC_{REG}}{SC_r} = 0,9979$$

Criterio de aceptación: El coeficiente de correlación mínimo es de 0,995.

2. Test estadístico de la linealidad:

a. Significancia estadística de la varianza (S²) de la pendiente "b":

- Test de hipótesis para la pendiente "b":

Si: Ho: b=0

Ha: b≠0

- Variancia residual

$$\begin{aligned}
 S_{yx}^2 &= \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2} \\
 &= \frac{6167747,55 - 0,7107300 \times 10472,40321 - 26082,25648 \times 236,1315237}{20 - 2} \\
 &= 81,1965
 \end{aligned}$$

- **Variancia de la pendiente**

$$S_b^2 = \frac{S_{xy}^2}{x^2 - \frac{x^2}{n}} = \frac{81,1963}{0,009042413 - \frac{0,400969472}{20}} = 80906,2522$$

- **Desviación estándar de la pendiente:**

$$S_b = \sqrt{80906,2522} = 284,4402$$

- **Desviación estándar relativa de la pendiente:**

$$S_{bR\%} = \frac{S_b}{b} \times 100 = \frac{284,43997}{26082,25648} \times 100 = 1,09056 \%$$

- **Límites de confianza de la pendiente:**

$$\lim_{conf} = b \pm \frac{t_{tabla}}{S_b}$$

Si: $t_{tabla} = 2,101$, para $n-2$ grados de libertad con una probabilidad de $p = 0,05$ (grado de significación del 95 %).

$$\lim_{inf} = 26082,25648 - \frac{2,101}{284,43997} = 25484,6475$$

$$\lim_{sup} = 26082,25648 + \frac{2,201}{284,43997} = 26679,8654$$

Test de t:

$$t_{exp} = \frac{b}{S_b}$$

Dónde:

$$t_{exp} = \frac{26082,25648}{284,43997} = 91,6968$$

Criterio de aceptación: $t_{exp} = 91,6968 > t_{tabla} = 2,101$ para $n-2$ grados de libertad con una probabilidad de $p = 0,05$ (grado de significación del 95 %), este valor tan alto indica que la proporcionalidad de ser $b \neq 0$ es muy elevada igual al 91,70 % y Si fuera $b = 0$ significaría que la recta es paralela al eje de abscisas y no habría regresión.

b. Significancia estadística de la proporcionalidad (intercepto) "a" :

Test de hipótesis para la pendiente "a":

Si: $H_0: a=0$

$H_a: a \neq 0$

- **Variancia del término independiente:**

$$\begin{aligned} S_a^2 &= S_b^2 \times \frac{x^2}{n} = \frac{S_{yx}^2}{x^2 - \frac{x^2}{n}} \times \frac{x^2}{n} \\ &= \frac{81,1963}{0,009042413 - \frac{0,400969472}{20}} \times \frac{0,009042413}{20} \\ &= 36,5794 \end{aligned}$$

- **Desviación estándar del término independiente:**

$$S_a = \sqrt{36,5794} = 6,0481$$

- **Desviación estándar relativa del término independiente:**

$$S_{bR\%} = \frac{S_a}{a} \times 100 = \frac{6,0481}{0,71074} \times 100 = 850,9799 \%$$

- **Límites de confianza del intercepto:**

$$\lim_{conf} = a \pm \frac{t_{tabla}}{S_a}$$

Dónde: $t_{tabla} = 2,101$, para $n-2$ grados de libertad con una probabilidad de $p = 0.05$ (grado de significación del 95 %)

$$\lim_{inf} = 0,7107300 - \frac{2,101}{6,0481} = -11,9963$$

$$\lim_{sup} = 0,7107300 + \frac{2,101}{6,0481} = 13,4178$$

Test de t:

$$t_{exp} = \frac{a}{S_a}$$

Dónde:

$$t_{\text{exp}} = \frac{0,7107300}{6,0481} = 0,1175$$

Criterio de aceptación: $t_{\text{exp}} = 0,1175 < t_{\text{tabla}} = 2,101$ para $n-2$ grados de libertad con una probabilidad de $p = 0,05$ (grado de significación del 95 %), por tanto el valor de "a" es aceptable, demostrando así que la recta no es paralela a la abscisa, rechazando así la $H_0 = 0$ y aceptando la $H_a \neq 0$.

c. Test estadístico del coeficiente de correlación "r":

Para: $H_0: r = 0$; $H_a: r \neq 0$, para $p=0,05$, $n-2$ grados de libertad.

Criterio de aceptación: "r" no debe ser significativamente diferente de 1.

Test de hipótesis para "r":

$$t_r = \frac{r \times \sqrt{n-2}}{1-r^2}$$

Dónde:

$$t_r = \frac{0,9989 \times \sqrt{20-2}}{1-0,9989} = 64,8741$$

Criterio de aceptación: Si: $t_r > t_{\text{tabla}}$, para $n-2$ grados de libertad con una probabilidad de $p = 0,05$ (grado de significación del 95 %, se rechaza la H_0 entonces si hay correlación entre "X" y "Y", por tanto se acepta la H_a cuando $t_{\text{tabla}} = 2,101$.

d. Coeficiente de variación:

$$\%CV = \frac{S_f}{X_f} \times 100$$

Dónde:

$\%CV$: porcentaje del coeficiente de variación.

S_f : desviación estándar del área cromatográficas.

X_f : promedio de las áreas cromatográficas.

$$\%CV = \frac{559,42709}{26121,4445} \times 100 = 2,1416$$

Criterio de aceptación: Coeficiente de variación de los factores de respuesta \leq 5%.

3.5.2. Exactitud

Cálculo del factor del estándar:

$$F_{st} = \frac{w_{st}}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{\%pot}{100} \times 100$$

Dónde:

FSt : factor del estándar

Wst : peso del estándar

%pot : potencia del estándar

$$F_{st} = \frac{19,01}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{99,700}{100} \times 100 = 1,895397$$

Cálculo de la cantidad de analito hallado en cada una de las muestras:

$$\text{mg adapaleno} = \frac{\text{Amp} \times \text{Pst}}{\text{Ast}}$$

Dónde:

Amp : área reportada en el cromatograma, con la solución muestra.

Ast : área reportado en el cromatograma, con la solución estándar.

Pst : peso de estándar de adapaleno, expresado en miligramos.

Cálculo del porcentaje de recuperación de la cantidad de analito que hay en la muestra:

$$R = \frac{x}{X} \times 100$$

Dónde:

R : Porcentaje de recuperación.

X : Porcentaje hallado.

X : Porcentaje agregado.

Aplicación del test de student "t":

$$t_{\text{exp}} = \frac{100 - R}{\text{DSR}} \bar{n}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{100 - 99,957}{0,217} \bar{9} = 0,594$$

Criterio de aceptación: Si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$ para $n-1$ grados de libertad con una probabilidad de $p = 0,05$ (grado de significación del 95 %; esto significa que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad añadida de analito por lo que la exactitud es correcta, para $t_{\text{tablas}} = 2,306$ (para 8 grados de libertad al 95 % de significancia).

Aplicación del test de Cochran:

$$G_{\text{exp}} = \frac{S_{\text{max}}^2}{sS_1^2 + S_2^2 S_3^2}$$

$$G_{\text{exp}} = \frac{0,057}{0,032 + 0,008 + 0,057} = 0,5854$$

Criterio de aceptación: si $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$ cuando $p=0,05$, $k=3$ y $n=3$ grados de libertad donde k es el número de grupos y n el número de determinaciones por grupo; significa que las variaciones de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados, para $G_{\text{tablas}} = 0,8709$.

3.5.3. Precisión

3.5.3.1. Repetibilidad

Cálculo del factor del estándar:

$$F_{\text{st}} = \frac{w_{\text{st}}}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{\%_{\text{pot}}}{100} \times 100$$

Donde:

FSt : factor del estándar

Wst : peso del estándar

%pot : potencia del estándar

$$Fst = \frac{20,40}{100} \times \frac{10}{100} \times \frac{99,700}{100} \times 100 = 0,203388$$

Cálculo del coeficiente de variación:

$$\%CV = \frac{s}{x} \times 100$$

Donde:

s : desviación estándar.

x : media aritmética de los resultados.

$$\%CV = \frac{0,466}{100,487} \times 100 = 0,464$$

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación debe ser menor igual del 2 %.

3.4.4.2. Precisión intermedia

Cálculo del factor del estándar:

$$Fst = \frac{wst}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{\%pot}{100} \times 100$$

Donde:

FSt : factor del estándar.

Wst : peso del estándar.

%pot : potencia del estándar.

$$Fst = \frac{20,40}{100} \times \frac{10}{100} \times \frac{99,700}{100} \times 100 = 0,203388$$

Cálculo del coeficiente de variación:

$$\%CV = \frac{s}{x} \times 100$$

Donde:

s : desviación estándar.

x : media aritmética de los resultados.

$$\%CV = \frac{0,463}{100,701} \times 100 = 0,460$$

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación debe ser menor igual del 2 %.

3.5.4. Robustez:

Cálculo del factor del estándar:

$$Fst = \frac{wst}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{\%pot}{100} \times 100$$

Donde:

Fst : factor del estándar

Wst : peso del estándar

%pot : potencia del estándar

$$Fst = \frac{20,52}{100} \times \frac{10}{100} \times \frac{99,700}{100} \times 100 = 0,2045844$$

Cálculo del coeficiente de variación cuando un flujo de 0,75 mL/min:

$$\%CV = \frac{s}{x} \times 100$$

Donde:

s : desviación estándar.

x : media aritmética de los resultados.

$$\%CV = \frac{0,162}{101,204} \times 100 = 0,160$$

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación debe ser menor igual del 2 %.

3.5.5. Selectividad:

Se comprueba la capacidad de la técnica analítica para medir exacta y específicamente el analito sin interferencia de impurezas, procediendo a cromatografiar el estándar, muestra con activo, placebo y cada uno de los excipientes.

Cálculo del factor del estándar:

$$Fst = \frac{wst}{100} \times \frac{10}{100} \times \frac{\%pot}{100} \times 100$$

Donde:

FSt : factor del estándar

Wst : peso del estándar

%pot : potencia del estándar

$$Fst = \frac{20,40}{100} \times \frac{10}{100} \times \frac{99,700}{100} \times 100 = 2,034$$

Criterio de aceptación: El método debe ser selectivo para diferenciar adapaleno de sus excipientes es decir que ninguno de los excipientes de la formulación debe eluir al mismo tiempo que el analito.

IV. RESULTADOS

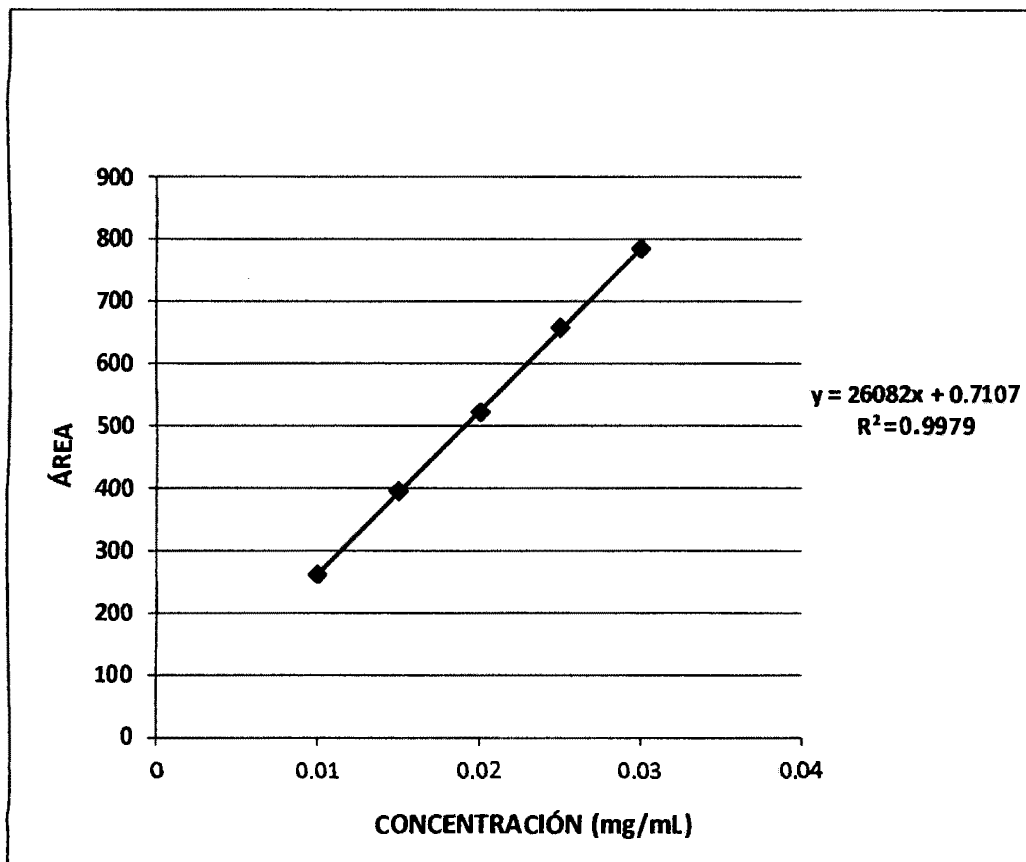


GRÁFICO 02: Variación del área en función de la concentración del estándar del adapaleno en la linealidad. Lima–2012.

TABLA 02: Porcentaje de adapaleno recuperado en función a la cantidad agregada, en la exactitud del método. Lima – 2012.

Muestras	mg Agregados	Área muestra	Cantidad de muestra recuperada (mg)	Promedio muestra recuperada (mg)	% Muestra recuperada	% Recuperada
80%	1,649	454,35162 453,68378	1,64691668 1,64449592	1,64570630	79,840	99,800
	1,589	434,05933 438,44034	1,57336195 1,58924207	1,58130201	79,612	99,516
	1,615	449,8526 440,85031	1,6306088 1,59797764	1,61429322	79,965	99,956
100%	2,032	566,87769 555,61603	2,05479695 2,01397611	2,03438653	100,117	100,117
	2,019	554,10181 560,57324	2,00848742 2,03194482	2,02021612	100,060	100,060
	2,031	553,68671 566,26306	2,00698278 2,05256906	2,02977592	99,940	99,940
120%	2,410	668,47925 661,42944	2,42307847 2,39752458	2,41030152	120,015	100,013
	2,401	663,66138 659,98523	2,40561483 2,39228966	2,39895225	119,898	99,915
	2,400	659,19965 668,9794	2,38944212 2,42487160	2,40715686	120,358	100,298
Promedio del % Recuperación						99,957
Desviación estándar						0,217
Desviación estándar relativa						0,217
Número de datos (n)						9
Grados de libertad (GL)						8
t experimental						0,594
t tabla						2,306
t experimental < t tabla No existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%.						
Número de grupos (k)						3
número de determinaciones por grupo (n)						3
G experimental						0,5854
G tablas						0,8709
G experimental < G tablas Factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados.						

TABLA 03: Variabilidad del porcentaje de recuperación del adapaleno, por el mismo analista y en las mismas condiciones, en el ensayo de precisión (repetibilidad). LIMA-2012.

Muestra	Peso de la muestra (g)	Área	Concentración (g/100g)	% Recuperación
1	4,990	518.69116	0.100358	100,184
		516.89221	0.100010	
2	4,997	520.63368	0.100865	100,526
		517.12330	0.100186	
3	4,987	516.49573	0.099873	100,552
		523.51782	0.101231	
4	4,998	521.36546	0.101037	101,291
		523.98181	0.101544	
5	4,983	517.47632	0.099968	99,903
		516.79480	0.099837	
6	4,996	519.11328	0.100545	100,468
		518.31860	0.100391	
Promedio (X)				100,487
Desviación estándar (S)				0,466
% Coeficiente de variación - DSR %				0,464
Criterio de aceptación: El coeficiente de variación debe ser $\leq 2\%$.				

TABLA 04: Variabilidad del porcentaje de recuperación del adapaleno, realizado por diferentes analistas, en el ensayo de precisión (Precisión intermedia). LIMA-2012.

Muestra	Peso muestra (g)	Peso muestra (g)	% Recuperación	% Recuperación
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	4,990	4,994	100,184	100,955
2	4,997	4,993	100,526	100,444
3	4,987	4,984	100,552	100,064
4	4,998	4,993	101,291	101,417
5	4,983	4,985	99,903	100,762
6	4,996	4,993	100,468	100,567
Promedio (X)			100,487	100,701
Desviación estándar (S)			0,466	0,463
% Coeficiente de variación - DSR %			0,464	0,460
Criterio de aceptación: El coeficiente de variación debe ser $\leq 2\%$.				

TABLA 05: Variabilidad del porcentaje de recuperación del adapaleno en el ensayo de robustez utilizando un flujo de (0,75 mL/min). Lima- 2012.

Muestra	Flujo mL/min	Tiempo de retención	Área	% Recuperación
1	0,75	14,160	954,42488 978,92963	101,090
2	0,75	14,162	963,09521 973,53937	101,319
Promedio (X)				101,204
Desviación estándar (S)				0,162
% Coeficiente de variación - DSR %				0,160
Criterio de aceptación: El coeficiente de variación debe ser $\leq 2\%$.				

TABLA 06: Capacidad de la técnica analítica para medir exacta y específicamente el analito sin interferencia de cada uno de los excipientes.

LIMA-2012.

Nº	MATERIA PRIMA	TIEMPO RETENCIÓN (min)	ÁREA
1	Muestra	7,827	544,1014
2	Placebo	0	0
4	Ácido Fosfórico	0	0
5	Alcohol Bencílico	0	0
6	Propilenglicol	0	0
7	Macrogol Cetoestearílico	0	0
8	Alcohol Cetoestearílico	0	0
9	Aceite Mineral Liviano	0	0
10	Petrolato Blanco	0	0
11	Sodio Fosfato dibásico anhidro	0	0
12	Lutrol F68	0	0
13	Agua purificada	0	0
Criterio de aceptación: Ninguno de los excipientes debe tener el mismo tiempo de retención que la muestra.			

V. DISCUSIÓN

Al realizar la validación de un método analítico de cromatografía líquida de alta performance para la cuantificación de adapaleno en alviera 0,1 % ® crema tópica, se llegó a demostrar que el método presentó ventajas debido a su rapidez de análisis, aceptabilidad, exactitud, fiabilidad y su alta eficacia, en el que se evaluó los parámetros tales como: linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, robustez y especificidad del método requeridas por las normas oficiales, obteniendo resultados que se encuentran dentro de los límites de especificación.

En el Gráfico Nº 02, se muestra la variación del área en función de la concentración en el ensayo de la linealidad, en el que se observa un coeficiente de determinación igual a 0,9979 el que indica una correlación con una probabilidad de un 99,79 % de confianza y un coeficiente de correlación igual a 0,9989, obteniendo así resultados que son directamente proporcionales a la concentración, es así que según Castro y Col. (2001), el valor recomendable para el coeficiente de correlación es \geq a 0,995 el que indica la existencia de correlación con una probabilidad elevada, por lo que podemos decir que los datos obtenidos cumplen con la especificación señalada. Según Bellido (2007), en su trabajo de investigación titulado "Validación de Método analítico por cromatografía de alta resolución para la determinación cuantitativa de ambroxol

clorhidrato jarabe”, se obtuvo un coeficiente de determinación igual a 0,9997 el que indica una correlación con una probabilidad del 99,97 % de confianza, asimismo cabe señalar que Medina y Berrocal (2008), en su trabajo de investigación titulado “Validación de método analítico de valoración de naproxeno sódico 550 mg tableta por cromatografía líquida de alta performance”, en la que trabajo con tabletas, donde la matriz es más compleja que las cremas, aun considerando la complejidad de la matriz se logró un coeficiente de determinación aceptable de 0,9995 que indica una correlación con una probabilidad del 99,95 %, demostrando así que el método cumple con el parámetro de linealidad.

Castro y Col. (2001), señalan que la pendiente de la recta de regresión debe ser significativamente y estadísticamente distinto a cero para un grado de significancia $\alpha = 0,05$ siendo $t_{exp} > t_{tabla}$ el que indica una regresión lineal y que la recta no es paralela a la abscisa, así mismo, los intervalos de confianza no deben incluir al cero, por ello en los resultados obtenidos se demuestra que la pendiente de la regresión es estadísticamente distinta a cero, siendo la $t_{exp} = 91,6968 > t_{tabla} = 2,101$, por lo que existe la evidencia para afirmar que a un 95,00% de confianza y n-2 grados de libertad, el coeficiente de correlación es significativamente diferente de cero demostrando así que existe una correlación lineal significativa entre las variables dependiente e independiente, parámetro que también se demuestra según Capcha y Llanos (2007), en su trabajo de investigación titulado “Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de dexametasona y clotrimazol en crema, por HPLC y análisis de productos comercializados en el Perú”, donde la pendiente de la recta de regresión obtenida es estadísticamente distinta de cero, al realizar la aplicación del test de hipótesis nula ($b=0$) y obteniendo un valor $t_{exp} = 705,381$ y $t_{tabla} = 2,160$ (valor t para n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza de

95%), demostrando así que al ser $t_{exp} > t_{tabla}$ significa que la probabilidad de ser $b \neq 0$ es muy elevada, incluso superior al 99,9 %.

Según USP 35 (2012), la exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero y el valor experimental encontrado, es así que en la Tabla N° 02 se expresa el porcentaje de recuperación a diferentes concentraciones del adapaleno en función a la cantidad agregada donde el resultado que se obtuvo fue satisfactoriamente con un porcentaje de recuperación global igual a 99,957 %, el que se encuentra dentro de lo especificado. En la prueba estadística del test de Student se obtuvieron resultados como $t_{exp} = 0,594$ y siendo el $t_{tabla} = 2,306$, según Castro y Col. (2001), indica que si $t_{exp} < t_{tablas}$ (cuando $p=0,05$, $n-1$ grados de libertad) significa que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100 %, por lo que la exactitud es correcta, tales resultados conducen a considerar que los errores sistemáticos del método no fueron significativos. Así mismo, cabe mencionar que según Capcha y LLanos (2001), en su trabajo de investigación titulado "Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de dexametasona y clotrimazol en crema, por HPLC y análisis de productos comercializados en el Perú", el porcentaje de recuperación que se obtuvo fue satisfactorio del 100,30 %, valor que se confirmó aplicando el test de Student donde $t_{exp} = 1,923$ y $t_{tabla} = 2,306$, es así que al ser $t_{exp} < t_{tablas}$ se demostró que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100 %, confirmándose que el método es exacto.

En los cálculos estadísticos del test de Cochran que es el test de igualdad de varianzas para determinar si el factor de concentración tiene alguna influencia en los resultados, se obtuvo un $G_{exp} = 0,5854$ y siendo el $G_{tabla} = 0,8709$ (cuando $p=0,05$, $k=3$ y $n=3$ grados de libertad donde k es el número de grupos y n el número de determinaciones por grupo), Castro y Col. (2001), indica que de

acuerdo al criterio de aceptación $G_{exp} < G_{tablas}$ significa que el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultado, por tal motivo se afirma que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, Capcha y Llanos (2001), en su trabajo de investigación titulado Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de dexametasona y clotrimazol en crema, por HPLC; al aplicar el test de igualdad de varianzas para determinar si el factor de concentración tiene alguna influencia en los resultados, se obtuvo un valor $G_{exp} = 0,5789$ y $G_{tabla} = 0,8709$ al ser $G_{exp} < G_{tablas}$ significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

En la Tabla N° 03, se observa el porcentaje de recuperación del adapaleno en función a la cantidad agregada en el ensayo de repetibilidad, por un mismo analista y en las mismas condiciones; dando como resultado un coeficiente de variación de 0,464 % para un criterio de aceptación máximo de 2,0 % para determinaciones independientes a concentración equivalente al 100 %. Según Castro y Col. (2001), el criterio de aceptación debe estar en función a la concentración ya que uno de los factores que más puede influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, tal es el caso para los principios activos debe ser menor al 2,0 %, comprobando de esta manera con los resultados obtenidos que no difieren significativamente. Parámetro que se demuestra según Morales (2004), en su trabajo de investigación titulado "Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el enalapril 10 mg tabletas recubiertas", en el que se demostró una buena repetibilidad de los resultados, obteniéndose un coeficiente de variación de 0,464 % para un valor no mayor del 2,0 %, demostrando así que el método es preciso.

En la Tabla N° 04, se observa la variabilidad del porcentaje de recuperación del adapaleno, realizado por dos analistas en el ensayo de precisión intermedia, los resultados obtenidos demuestran que no existe diferencia significativa entre los resultados alcanzados por los analistas: analista 01 obtuvo un promedio del % de recuperación de 100,487 % y el analista 2 de 100,701 %, con un coeficiente de variación de 0,464 % para el analista 1 y 0,460 % para el analista 2, para un criterio de aceptación máximo de 2,0 % para determinaciones independientes a concentración equivalente al 100 %. Según Castro y Col. (2001), el criterio de aceptación debe estar en función a la concentración ya que uno de los factores que más puede influir en la precisión intermedia del método de análisis son los típicos factores como el día, el analista, el instrumento u otros factores que pueden afectar la variabilidad del método, tal es el caso para los principios activos debe ser menor al 2,0 %, comprobando de esta manera con los resultados obtenidos por los diferentes analistas no difieren significativamente, por lo tanto, el método es preciso, porque obtiene resultados repetitivos y además reproducibles, los datos obtenidos pueden ser concertados según Azaña y Comelio (2007), en el proyecto de investigación titulado "Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la cuantificar clonixinato de lisina 125 mg y pargoverina clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas", en el análisis de precisión intermedia por dos analistas diferentes a las concentraciones de 80 %, 100 % y 120 %, se obtuvo como resultado una desviación estándar relativa para el clonixinato de lisina entre ambos de 1,49 % y 1,87 % para la pargoverina para un valor máximo de 2,0 %, demostrando así que al someter a un análisis de precisión intermedia por diferentes analistas se obtuvo un coeficiente de variación dentro de lo especificado.

Mendoza (2011), afirma que la robustez del método es la medida de la capacidad de un método analítico para permanecer inalterado ante pequeños variaciones en ciertos parámetros proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo rutinario, en la Tabla N° 5 queda demostrado que la prueba de robustez de esta técnica analítica da resultados reproducibles efectuando algunos cambios o ajustes como es el caso del cambio de flujo en que se obtuvo un coeficiente de variación de 0,160 el que se encuentra dentro de lo especificado menor a 2,0 %.

Castro y Col. (2001), menciona que la selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analito de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra, parámetro que se observa en la Tabla N° 6 en donde se comprueba la selectividad del método al trabajar con la muestra, placebo y los excipientes bajo las mismas condiciones, demostrando así que este método es selectivo, porque los excipientes de la formulación no interfieren en la determinación del principio activo ya que no se detecte ninguna respuesta significativa en el cromatograma respecto al activo, obteniéndose una lectura de 0% siendo el máximo 0,5 %, además el método, diferencia el principio activo de sus compuestos relaciones. Así mismo, los tiempos de retención son similares tanto para el estándar como para la muestra, parámetro que se contrasta según Morales (2004), en su trabajo de investigación titulado “Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el enalapril 10 mg tabletas recubiertas”, en el que el método analítico es selectivo, porque los excipientes de la formulación no interfirieron en la determinación del enalapril ya que no se detectó ninguna respuesta significativa en el cromatograma, obteniéndose una lectura de 0 % de los excipientes, además el método, diferencia el principio activo de sus

compuestos relacionados, así mismo los tiempos de retención que se obtuvieron fueron similares para el estándar y la muestra (6,3 minutos), cabe mencionar que según Bellido (2007), en su trabajo de investigación titulado "Validación de Método analítico por cromatografía de alta resolución para la determinación cuantitativa de ambroxol clorhidrato en jarabe", se observan el cromatograma, isograma y topograma del estándar ambroxol clorhidrato, placebo y fase móvil respectivamente sin interferencia alguna con un tiempo de elución de 3,5 minutos respectivamente.

VI. CONCLUSIONES

1. El método analítico de cromatografía líquida de alta performance para la cuantificación del adapaleno en alviera 0,1 % ® crema tópica, está validado para cumplir con los parámetros de validación solicitados.
2. El método analítico para la cuantificación del adapaleno en alviera 0,1 % ® crema tópica cumple con los parámetros de linealidad, exactitud, especificidad, robustez, repetibilidad y precisión intermedia del nuevo método de análisis de acuerdo a los parámetros solicitados.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con las investigaciones de nuevas técnicas analíticas para principios activos y productos terminados, en especial técnicas aplicadas por cromatografía líquida de alta performance (HPLC).
2. Fomentar el empleo de técnicas analíticas aplicadas al HPLC, lo cual permite realizar análisis rápidos y con mínimo de errores.
3. En los departamentos de control de calidad de los diferentes laboratorios deben considerarse entre sus prioridades efectuar la validación de sus técnicas analíticas, y sobre todo, las técnicas consideradas como "técnica propia".

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Arestegui K.** 2001. Validación de un método de análisis cuantitativo de Ampicilina en cápsulas por cromatografía líquida de alta resolución. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
2. **Azaña, Y. y Cornelio, J.** 2007. Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar Clonixinato de lisina 125 mg y Pargeverina Clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
3. **Bellido, N.** 2007. Validación de método analítico por cromatografía de alta resolución para la determinación cuantitativa de Ambroxol Clorhidrato en jarabe. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
4. **Bellido, N.** 2010. Protocolo de análisis de materia prima. IQFARMA, Lima: Perú.
5. **Castro, M.; Gastón, S.; Pujol, M.** 2001. Validación de métodos analíticos, Madrid: A.E.F.I. sección catalana.
6. **Capcha, H. y Llanos, G.** 2001. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de Dexametasona y Clotrimazol en crema, por HPLC. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
7. **Cazes, J.** 2005. Ewing's Analytical Instrumentation Handbook. (3th ed.). New York: Marcel Dekker Inc.
8. **DIGEMID,** 1999. Manual de buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos. Ministerio de Salud Lima: Perú.

9. **Dong, M.** 2006. Modern HPLC for Practicing Scientists. New Jersey: Jhon Wiley & Sons Inc.
10. **Enciso, M.** 2009. Validación prospectiva de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Pectoflem jarabe. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
11. **Fauli, T.** 1996. Tratado de Farmacia Galénica; Validación de Procesos y Analítica de Medicamentos. (Cap. 7, pp. 115-123), Madrid: España.
12. **Herane, M.** 1996. Jornadas Interandinas de Dermatología, Universidad de Chile, Santiago: Chile.
13. **Katz, E.** 1998. Handbook of HPLC– Chromatographic Science Series. (Vol. 78). New York: Marcel Dekker Inc.
14. **Lough, W. y Wainerl, W.** 1996. High Performance Liquid Chromatography– Fundamental principles and practice, New York: Chapman & Hall.
15. **Mayorda, G. y Del Castillo, C.** 2010. Validación de una técnica de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para cuantificar Norfloxacin y Fenazopiridina clorhidrato en cápsulas orales. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
16. **Medina, J. y Berrocal, J.** 2008. Validación de método analítico de valoración de Naproxeno Sódico 550 mg tableta por cromatografía líquida de alta performance. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
17. **Mendoza, M.** 2011. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de Levofloxacin 500 mg/100ml inyectable para infusión. Tesis para optar el

- Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
18. **Meneses L.** 2002. Validación de un método para el análisis cuantitativo de Bronhexina en ampolla por HPLC. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
 19. **Merck, E.** 1981. Productos para cromatografía líquida reactivos MERCK – Darmstadt, Alemania.
 20. **Morales, C.** 2004. Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg tabletas recubiertas. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
 21. **Romero, R.** 2003. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de Cisaprida en tabletas. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
 22. **Silva, G.** 2004. Validación del método de valoración de Glimepirida presentación comprimido 4 mg por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
 23. **Skoog, D. y Leary L.** 1994. Análisis Instrumental. (4ta ed.). Madrid: Mc Graw- Hill Interamericana España S.A.
 24. **USP 35,** 2012. United States Pharmacopeia 35, National formulary 30 edition. The United States Pharmacopeia Convention Inc, Maryland: USA.
 25. **Valdez, A. y Cuadros, E.** 1999. Validación del método de valoración de Loratadina en tabletas por HPLC. Tesis para optar el Título Profesional de

Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.

26. **Valls, O. y Del Castillo, B.** 1998. Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud. (4ta ed.), Barcelona: Ediciones Piro.
27. **Weston, W. y Lane A.** 2008. Dermatología pediátrica. (4^{ta} ed.).Barcelona: España: Edit. Masson.

ANEXOS

ANEXO Nº 01

Linealidad del estándar: regresión lineal de soluciones de adapaleno en un rango de 50 % a 150 %. Lima – 2012.

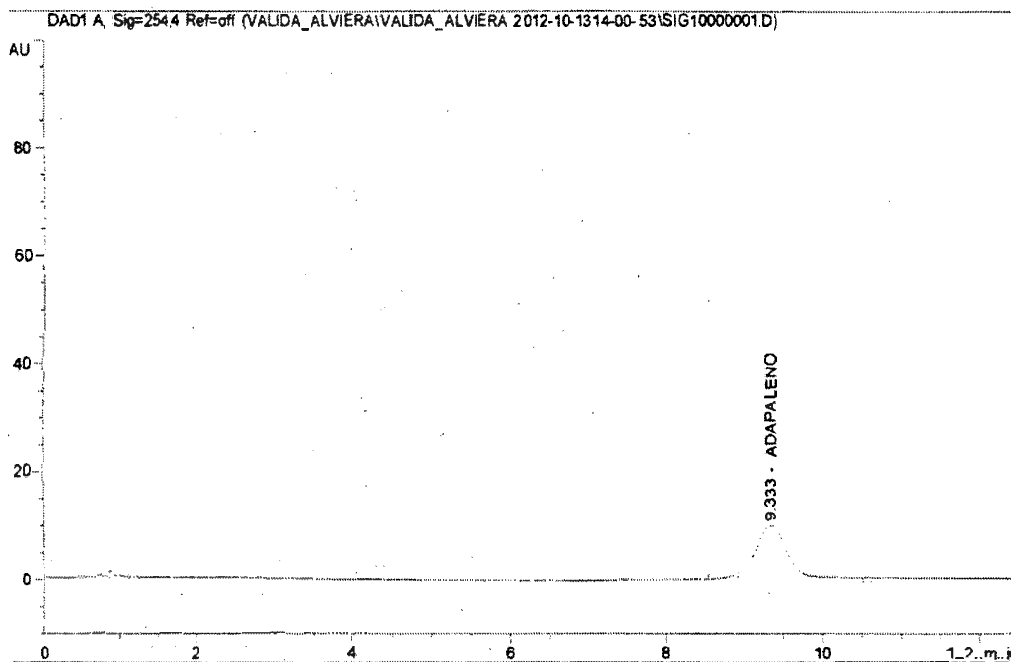
Muestra (x)		Área	X_i^2	Y_i^2	Xy	f(y/x)
%	(mg/mL)					
50	0,01001786	276,62448	0,000100357	76521,10294	2,771184207	27613,1419737
	0,01001786	254,57521	0,000100357	64808,53755	2,550297795	25412,1450738
	0,01001786	251,54938	0,000100357	63277,09058	2,519985466	25110,1014029
	0,01001786	262,6554	0,000100357	68987,85915	2,631243975	26218,7238467
75	0,01502678	394,29108	0,000225804	155465,4558	5,924926892	26239,2192501
	0,01502678	390,75635	0,000225804	152690,5251	5,871811268	26003,9906077
	0,01502678	401,37241	0,000225804	161099,8115	6,031336509	26710,4664578
	0,01502678	392,40201	0,000225804	153979,3375	5,896540245	26113,5057242
100	0,02009952	511,14264	0,000403991	261266,7984	10,27372172	25430,5893872
	0,02009952	515,05432	0,000403991	265280,9526	10,35234461	25625,2049800
	0,02009952	527,33392	0,000403991	278081,0632	10,59915867	26236,1449428
	0,02009952	532,42023	0,000403991	283471,3013	10,70139106	26489,2012347
125	0,02504464	647,51013	0,000627234	419269,3685	16,2166581	25854,2398693
	0,02504464	647,63428	0,000627234	419430,1606	16,21976739	25859,1970178
	0,02504464	662,17114	0,000627234	438470,6186	16,58383782	26439,6349878
	0,02504464	671,56293	0,000627234	450996,769	16,81905182	26814,6369842
150	0,03005357	793,93915	0,000903217	630339,3739	23,86070423	26417,4673037
	0,03005357	777,54865	0,000903217	604581,9031	23,36811123	25872,0911274
	0,03005357	777,25745	0,000903217	604129,1436	23,35935963	25862,4017621
	0,03005357	784,60205	0,000903217	615600,3769	23,58009106	26106,7853907
suma	0,400969472	10472,40321	0,009042413	6167747,55	236,1315237	522428,8893
Número de datos (n)						20
Grados de libertad (GL)						18
t experimental						91,6968
t tabla						2,101
t experimental < t tabla						

ANEXO N°02

Cromatograma de la linealidad del estándar al 50 %. Lima-2012.

```

=====
Operator   : M.FLORES/F.ROMERO           Seq. Line :    1
Instrument : IQFARMA AT-1200 DAD       Location  : Vial 1
Injection Date : 10/13/2012 2:01:08 PM Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20.0 µl
Method     : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDA_ALVIERA\VALIDA_ALVIERA 2012-10-13 14-00-53\
           : VALIDA_ALVIERA.M
changed    : 10/13/2012 2:13:31 PM by M.FLORES/F.ROMERO
           : (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDA_ALVIERA\VALIDA_ALVIERA 2012-10-13 14-00-53\
           : VALIDA_ALVIERA.M (Sequence Method)
changed    : 10/18/2012 6:08:20 PM by M.FLORES/F.ROMERO
Sample Info : LINEALIDAD DE LA VALORACION DE ALVIERA 0,1% CREMA
=====
    
```



External Standard Report

```

=====
Created By      : Signal
Data Modified  : Thursday, October 18, 2012 5:44:50 PM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

File 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

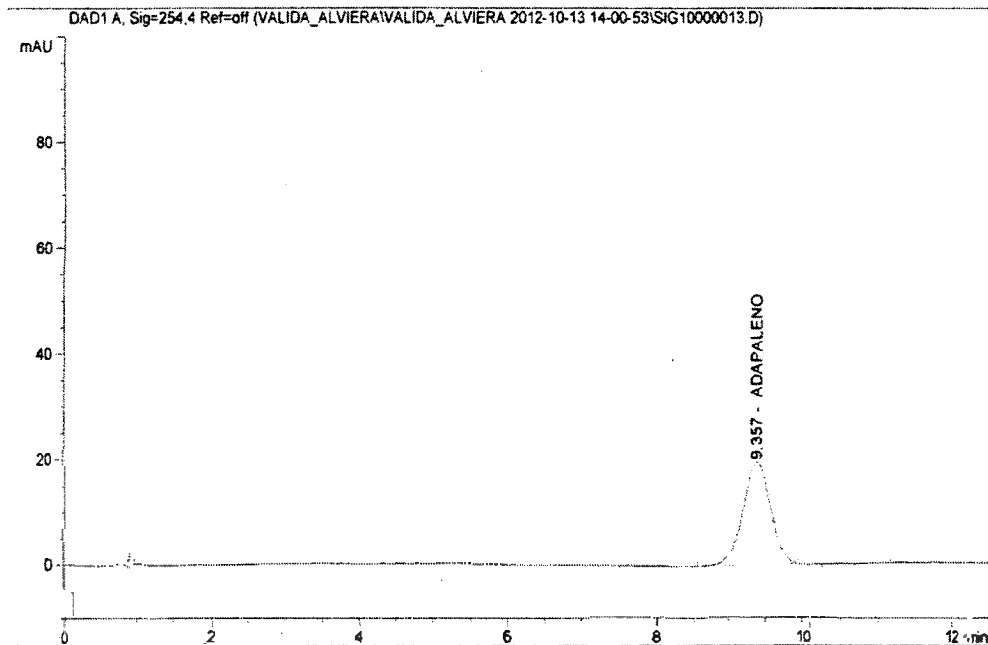
Time	Type	Area	Amt/Area	Amount	Grp	Name
9.333		[mAU*s]				

ANEXO N°04

Cromatograma de la linealidad del estándar al 100 %. Lima-2012.

```

=====
1. Operator   : M.FLORES/F.ROMERO           Seq. Line : 13
2. Instrument : IQFAPMA AT-1200 DAD        Location  : Vial 5
Injection Date : 10/13/2012 4:55:00 PM      Inj       : 1
                                           Inj Volume: 20.0 µl
3. Method    : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDA_ALVIERA\VALIDA_ALVIERA 2012-10-13 14-00-53\
              VALIDA_ALVIERA.M
4. Method changed : 10/13/2012 2:13:31 PM by M.FLORES/F.ROMERO
              (modified after loading)
5. Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDA_ALVIERA\VALIDA_ALVIERA 2012-10-13 14-00-53\
              VALIDA_ALVIERA.M (Sequence Method)
6. Method changed : 10/18/2012 6:08:20 PM by M.FLORES/F.ROMERO
7. Method Info  : LINEALIDAD DE LA VALORACION DE ALVIERA 0,1% CREMA
=====
    
```



External Standard Report

```

=====
Reported By      : Signal
Library Data Modified : Thursday, October 18, 2012 5:44:50 PM
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

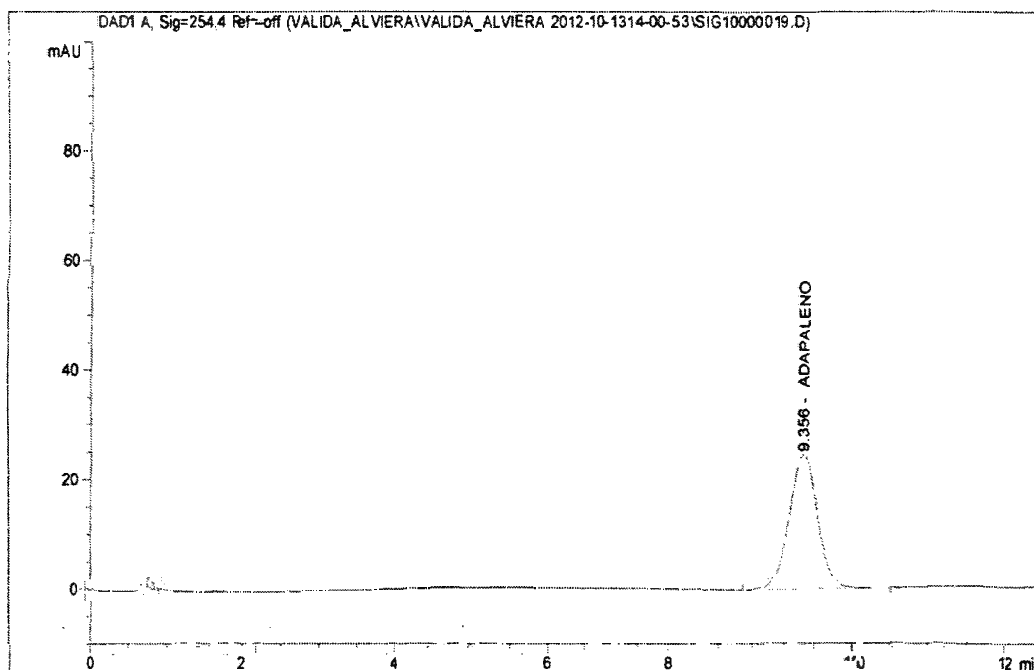
Time (min)	Type	Area (mAU*s)	Amt/Area	Amount	Grp	Name
9.357	ADAPALENO					

ANEXO N° 05

Cromatograma de la linealidad del estándar al 125 %. Lima-2012.

```

=====
Acq. Operator   : M.FLORES/F.ROMERO           Seq. Line : 19
Acq. Instrument : IQPARMA AT-1200 DAD        Location  : Vial 7
Injection Date  : 10/13/2012 6:21:58 PM     Inj       : 1
                                           Inj Volume: 20.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDA_ALVIERA\VALIDA_ALVIERA 2012-10-13 14-00-53\
                  VALIDA_ALVIERA.M
Last changed    : 10/13/2012 2:13:31 PM by M.FLORES/F.ROMERO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\2\DATA\VALIDA_ALVIERA\VALIDA_ALVIERA 2012-10-13 14-00-53\
                  VALIDA_ALVIERA.M (Sequence Method)
Last changed    : 10/18/2012 6:08:20 PM by M.FLORES/F.ROMERO
Method Info     : LINEALIDAD DE LA VALORACION DE ALVIERA. 0,1% CREMA
=====
    
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : ThursGay, October 18, 2012 5:44:50 PM
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Hmt/Area	Amount	Grp	Name
9.356						

Validación de un método analítico de cromatografía líquida de alta performance para la cuantificación de adapaleno en alviera 0,1 % @ crema tópica. Lima-2012.

Marli Flores Pozo¹, Maricela López Sierralta¹, Lily Rocio Silva Bolívar², Javier Espinoza López²

¹ Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.

² Laboratorio, Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA), Lima, Perú.

RESUMEN

La validación de un método analítico establece evidencia documentada de que el método es capaz de cumplir en forma consistente y repetitiva las especificaciones establecidas. En el presente trabajo se demostró la validación del método analítico para la cuantificación de adapaleno en alviera 0,1 % @ crema tópica, utilizando métodos propuestos por la USP 35 y la ICH Q2A, para el desarrollo de los procedimientos de validación se aplicó el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC), el presente estudio descriptivo se realizó en el área de investigación y desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. Lima, durante los meses de setiembre 2012 a marzo 2013. Se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia y robustez; resultados que fueron sometidos a evaluación estadística. En el análisis del parámetro de la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0,9989$, siendo el valor mínimo permisible 0,995; en la exactitud al aplicar el test de student se obtuvo un t_{exp} (0,594) que es menor al t_{tablas} (2,306), por tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación y la cantidad añadida de analito, en la precisión del método se obtuvieron valores de coeficiente de variación de 0,464 % para repetibilidad y 0,460 % para precisión intermedia, cuando el coeficiente de variación máximo es de 2,0 %; es selectivo porque se demostró que ningún excipiente interfiere en el análisis del adapaleno, es robusto porque se obtuvo resultados reproducibles al cambiar el flujo, obteniendo un coeficiente de variación de 0,160 %, cuando el coeficiente de variación máximo es 2,0 %.

Palabras clave: Cromatografía líquida de alta performance, validación de métodos. Analíticos y adapaleno.

ABSTRACT

The validation of an analytical method provides documented evidence that the method is able to perform consistently the specifications and make them repetitively. In this research it's demonstrated that the validation of the analytical method for the quantification of adapalene in alviera 0.1% @ topical cream, using methods made by the USP 35 and ICH Q2A, for the development of validation procedures, applied the method of high performance liquid chromatography (HPLC), this descriptive study was realized in the Research and Development area of The Chemotherapeutic Institute SA. Lima, during September 2012 to March 2013. It took the following parameters: selectivity, linearity, accuracy, repeatability, intermediate precision and robustness, the results were subjected to statistical evaluation. The linearity parameter was analyze and the correlation coefficient obtained was $r = 0.9989$ being the minimum permissible value 0.995, in the accuracy in applying the student test was obtained t_{exp} (0.594) which is lower than t tables (2.306), therefore there isn't significant difference between the recovery and the added amount of analyte, the accuracy of the method were obtained a variation coefficient values of 0.464 % to 0.460 % for repeatability and intermediate precision, when the variation coefficient maximum is 2.0% is selective because it showed that any excipient interferes adapalene analysis, because it is robust and reproducible results were obtained by changing the flow, obtaining a coefficient of variation of 0.160 % when the maximum variation coefficient is 2,0 %.

Key words: High performance liquid chromatography, analytical method validation and adapalene.

INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica tiene como fin producir medicamentos de calidad y con total garantía de seguridad. Con los años, se han ido desarrollando recomendaciones e incorporando requerimientos que han evolucionado hasta una reglamentación estricta (Bellido, 2007).

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por medio de un estudio y programa documentado que ese método posee todos los requisitos para el uso propuesto. La validación es parte integral de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y del desarrollo de un método de análisis puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumple con las especificaciones exigidas, además, contribuye a garantizar la calidad y asegura las propiedades de calidad de un producto determinado (Medina y Berrocal, 2008).

El análisis de productos farmacéuticos por HPLC, constituye actualmente una necesidad, y debido a sus creciente difusión, representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio de análisis, como es el caso de la industria farmacéutica, debido al consumidor, así como reducir repeticiones analíticas, dando en cambio mayor confiabilidad en los resultados obtenidos (Castro y Col, 2001).

Las razones de la preferencia del método de cromatografía líquida de alta performance son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias

que son de primordial interés en la industria y en muchos campos de la ciencia

Por tal motivo, se plantea el presente trabajo de investigación teniendo en cuenta los siguientes objetivos:

Objetivo General

- Validar un método analítico de cromatografía líquida de alta performance para la cuantificación del adapaleno en alviera 0,1 % @ crema tópica.

Objetivo Específico

- Demostrar que el método analítico para la cuantificación del adapaleno en alviera 0,1 % @ crema tópica cumple con los parámetros de: linealidad, exactitud, especificidad, robustez, repetibilidad y precisión intermedia del nuevo método de análisis de acuerdo a los parámetros solicitados.

MATERIALES Y MÉTODOS

LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo se ejecutó entre los meses de setiembre del 2012 a marzo del 2013, en los ambientes del departamento de Control de Calidad del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA), ubicado en el distrito de Ate Vitarte de la región de Lima.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio: Descriptivo

Población: Pilotos de alviera 0,1 % @ crema tópica (Adapaleno) desarrollados en el área de Investigación y Desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA) de la región de Lima.

Correspondencia:

Marli Flores Pozo: maryerb_07@hotmail.com
Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
Fac. Ciencias Biológicas - Av. Independencia s/n.
Ciudad Universitaria

Muestra: Un piloto de alviera 0,1 % @ crema tópica (Adapaleno) desarrollado en el área de Investigación y Desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA) de la región de Lima.

DISEÑO METODOLÓGICO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

Linealidad

Se preparó una serie de cinco soluciones de estándar a concentraciones de 0,010 mg/mL, 0,015 mg/mL, 0,020 mg/mL, 0,025 mg/mL y 0,030 mg/mL correspondientes a 50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 % respectivamente.

Exactitud

Se preparó tres muestras (placebo más analito) a concentraciones de 80 %, 100 % y 120 %.

Precisión:

Repetibilidad

Se preparó seis muestras a 0,020 mg/mL como concentración de referencia equivalente al 100 %.

Precisión Intermedia

Se tomó seis muestras a 0,020 mg/mL como concentración de referencia equivalente al 100 %, con diferentes analistas.

Robustez

Se preparó dos muestras a una concentración 0,020 mg/mL como concentración de referencia equivalente al 100 %, se cambió de flujo de 0,75 mL/min.

Selectividad

Se preparó evaluando cada excipiente, el placebo y la muestra con el estándar y así se determinó el tiempo de retención de cada excipiente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos resultantes se mostraran aplicando tablas y gráficas de control y serán procesados estadísticamente mediante el análisis de varianza, utilizando los software adecuados, evaluando estadísticamente la reproductividad de los resultados obtenidos.

RESULTADOS

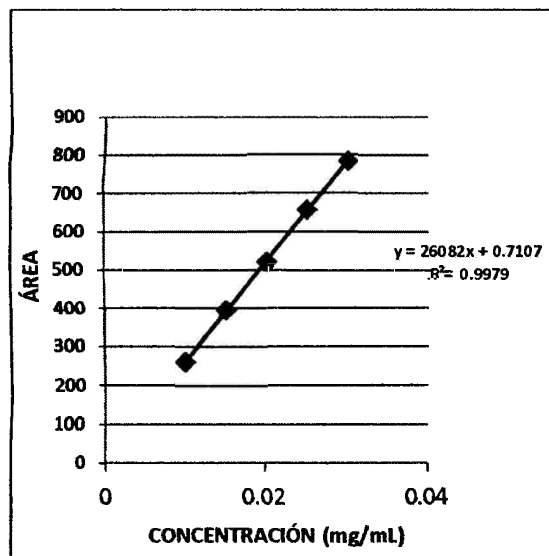


Gráfico 02: Variación del área en función de la concentración del estándar del adapaleno en la linealidad. Lima - 2012.

TABLA 02: Porcentaje de adapaleno recuperado en función a la cantidad agregada, en la exactitud del método. Lima - 2012.

Muestra	mg Agregados	Área muestra	% Muestra recuperada	% Recuperada
80%	1,649	454,3516 453,6837	79,840	99,800
	1,589	434,0593 438,4403	79,612	99,516
	1,615	449,8526 440,8503	79,965	99,956
100%	2,032	566,8776 555,6160	100,117	100,117
	2,019	554,1018 560,5732	100,060	100,060
	2,031	553,6867 566,2631	99,940	99,940
120%	2,410	668,4793 661,4294	120,015	100,013
	2,401	663,6614 659,9852	119,898	99,915
	2,400	659,1996 668,9794	120,358	100,298
Promedio del % Recuperación				99,957
Desviación estándar				0,217
Desviación estándar relativa				0,217
t experimental				0,594
t tabla				2,306
t experimental < t tabla				
Número de grupos (k)				3
número de determinaciones por grupo (n)				3
G experimental				0,5854
G tablas				0,8709
G experimental < G tablas				

TABLA 03: Variabilidad del porcentaje de recuperación del adapaleno, por el mismo analista y en las mismas condiciones, en el ensayo de precisión (repetibilidad). LIMA-2012.

Muestra	Peso de la muestra (g)	Área	Concentración (g/100g)	% Recuperación
1	4,990	518.6912 516.8922	0.100358 0.100010	100,184
2	4,997	520.6337 517.1233	0.100865 0.100186	100,526
3	4,987	516.4957 523.5178	0.099873 0.101231	100,552
4	4,998	521.3655 523.9819	0.101037 0.101544	101,291
5	4,983	517.4763 516.7948	0.099968 0.099837	99,903
6	4,996	519.11328 518.3186	0.100545 0.100391	100,468
Promedio (X)				100,487
Desviación estándar (S)				0,466
% Coeficiente de variación - DSR %				0,464
Criterio de aceptación: El coeficiente de variación debe ser ≤ 2%.				

TABLA 04: Variabilidad del porcentaje de recuperación del adapaleno, realizado por diferentes analistas, en el ensayo de precisión (Precisión intermedia). LIMA-2012.

Muestra	Peso muestra (g)	Peso muestra (g)	% Recuperación	% Recuperación
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	4,990	4,994	100,184	100,955
2	4,997	4,993	100,526	100,444
3	4,987	4,984	100,552	100,064
4	4,998	4,993	101,291	101,417
5	4,983	4,985	99,903	100,762
6	4,996	4,993	100,468	100,567
Promedio (X)			100,487	100,701
Desviación estándar (S)			0,466	0,463
% Coeficiente de variación - DSR %			0,464	0,460
Criterio de aceptación: El coeficiente de variación debe ser $\leq 2\%$				

TABLA 05: Variabilidad del porcentaje de recuperación del adapaleno en el ensayo de robustez utilizando un flujo de (0,75 mL/min). Lima- 2012.

Muestra	Flujo mL/min	Tiempo de retención	Área	% Recuperación
1	0,75	14,160	954,42488 978,92963	101,090
2	0,75	14,162	963,09521 973,53937	101,319
Promedio (X)				101,204
Desviación estándar (S)				0,162
% Coeficiente de variación - DSR %				0,160
Criterio de aceptación: El coeficiente de variación debe ser $\leq 2\%$.				

TABLA 06: Capacidad de la técnica analítica para medir exacta y específicamente el analito sin interferencia de cada uno de los excipientes. LIMA-2012.

Nº	MATERIA PRIMA	TIEMPO RETENCIÓN (min)	ÁREA
1	Muestra	7,827	544,1014
2	Placebo	0	0
4	Ácido Fosfórico	0	0
5	Alcohol Bencílico	0	0
6	Propilenglicol	0	0
7	Macrogol Cetosteárilico	0	0
8	Alcohol Cetosteárilico	0	0
9	Aceite Mineral Liviano	0	0
10	Petrolato Blanco	0	0
11	Sodio Fosfato dibásico anhidro	0	0
12	Lutrol F68	0	0
13	Agua purificada	0	0
Criterio de aceptación: Ninguno de los excipientes debe tener el mismo tiempo de retención que la muestra.			

DISCUSIÓN

Al realizar la validación de un método analítico de cromatografía líquida de alta performance para la cuantificación de adapaleno en alviera 0,1 % @ crema tópica, se llegó a demostrar que el método presentó ventajas debido a su rapidez de análisis, aceptabilidad, exactitud, fiabilidad y su alta eficacia, en el que se evaluó los parámetros tales como: linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, robustez y especificidad del método requeridas por las normas oficiales, obteniendo resultados que se encuentran dentro de los límites de especificación. En el Gráfico Nº 02, se muestra la variación del área en función de la concentración en el ensayo de la linealidad, en el que se observa un coeficiente de determinación igual a 0,9979 el que indica una correlación con una probabilidad de un 99,79 % de confianza y un coeficiente de correlación igual a 0,9989, obteniendo así resultados que son directamente proporcionales a la concentración, es así que según Castro y Col. (2001), el valor recomendable para el coeficiente de correlación es $\geq 0,995$ el que indica la existencia de correlación con una probabilidad elevada, por lo que podemos decir que los datos obtenidos cumplen con la especificación señalada. Según Bellido (2007), en su trabajo de investigación titulado "Validación de Método analítico por cromatografía de alta resolución para la determinación cuantitativa de ambroxol clorhidrato jarabe", se obtuvo un coeficiente de determinación igual a 0,9997 el que indica una correlación con una probabilidad del 99,97% de confianza, asimismo cabe señalar que Medina y Berrocal (2008), en su trabajo de investigación titulado "Validación de método analítico de valoración de naproxeno sódico 550 mg tableta por cromatografía líquida de alta performance", en la que trabajo con tabletas, donde la matriz es más compleja que las cremas, aun considerando la complejidad de la matriz se logró un coeficiente de determinación aceptable de 0,9995 que indica una correlación con una probabilidad del 99,95 %, demostrando así que el método cumple con el parámetro de linealidad. Castro y Col. (2001), señalan que la pendiente de la recta de regresión debe ser significativamente y estadísticamente distinto a cero para un grado de significancia $\alpha = 0,05$ siendo

$t_{exp} > t_{tabla}$ el que indica una regresión lineal y que la recta no es paralela a la abscisa, así mismo, los intervalos de confianza no deben incluir al cero, por ello en los resultados obtenidos se demuestra que la pendiente de la regresión es estadísticamente distinta a cero, siendo $t_{exp} = 91,6968 > t_{tabla} = 2,101$, por lo que existe la evidencia para afirmar que a un 95,00% de confianza y $n-2$ grados de libertad, el coeficiente de correlación es significativamente diferente de cero demostrando así que existe una correlación lineal significativa entre las variables dependiente e independiente, parámetro que también se demuestra según Capcha y Llanos (2007), en su trabajo de investigación titulado "Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de dexametasona y clotrimazol en crema, por HPLC y análisis de productos comercializados en el Perú", donde la pendiente de la recta de regresión obtenida es estadísticamente distinta de cero, al realizar la aplicación del test de hipótesis nula ($b=0$) y obteniendo un valor $t_{exp} = 705,381$ y $t_{tabla} = 2,160$ (valor t para $n-2$ grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%), demostrando así que al ser $t_{exp} > t_{tabla}$ significa que la probabilidad de ser $b \neq 0$ es muy elevada, incluso superior al 99,9 %.

Según USP 35 (2012), la exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero y el valor experimental encontrado, es así que en la Tabla N° 02 se expresa el porcentaje de recuperación a diferentes concentraciones del adapaleno en función a la cantidad agregada donde el resultado que se obtuvo fue satisfactoriamente con un porcentaje de recuperación global igual a 99,957 %, el que se encuentra dentro de lo especificado. En la prueba estadística del test de Student se obtuvieron resultados como $t_{exp} = 0,594$ y siendo el $t_{tabla} = 2,306$, según Castro y Col. (2001), indica que si $t_{exp} < t_{tablas}$ (cuando $p=0,05$, $n-1$ grados de libertad) significa que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100 %, por lo que la exactitud es correcta, tales resultados conducen a considerar que los errores sistemáticos del método no fueron significativos. Así mismo, cabe mencionar que según Capcha y Llanos (2001), en su trabajo de investigación titulado "Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de dexametasona y clotrimazol en crema, por HPLC y análisis de productos comercializados en el Perú", el porcentaje de recuperación que se obtuvo fue satisfactorio del 100,30 %, valor que se confirmó aplicando el test de Student donde $t_{exp} = 1,923$ y $t_{tabla} = 2,306$, es así que al ser $t_{exp} < t_{tablas}$ se demostró que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100 %, confirmando que el método es exacto.

En los cálculos estadísticos del test de Cochran que es el test de igualdad de varianzas para determinar si el factor de concentración tiene alguna influencia en los resultados, se obtuvo un $G_{exp} = 0,5854$ y siendo el $G_{tabla} = 0,8709$ (cuando $p=0,05$, $k=3$ y $n=3$ grados de libertad donde k es el número de grupos y n el número de determinaciones por grupo), Castro y Col. (2001), indica que de acuerdo al criterio de aceptación $G_{exp} < G_{tablas}$ significa que el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados, por tal motivo se afirma que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, Capcha y Llanos (2001), en su trabajo de investigación titulado "Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de dexametasona y clotrimazol en crema, por HPLC; al aplicar el test de igualdad de varianzas para determinar si el factor de concentración tiene alguna influencia en los resultados, se obtuvo un valor $G_{exp} = 0,5789$ y $G_{tabla} = 0,8709$ al ser $G_{exp} < G_{tablas}$ significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

En la Tabla N° 03, se observa el porcentaje de recuperación del adapaleno en función a la cantidad agregada en el ensayo de repetibilidad, por un mismo analista y en las mismas condiciones; dando como resultado un coeficiente de variación de 0,464 % para un criterio de aceptación máximo

de 2,0 % para determinaciones independientes a concentración equivalente al 100 %. Según la Castro y Col. (2001), el criterio de aceptación debe estar en función a la concentración ya que uno de los factores que más puede influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, tal es el caso para los principios activos debe ser menor al 2,0 %, comprobando de esta manera con los resultados obtenidos que no difieren significativamente. Parámetro que se demuestra según Morales (2004), en su trabajo de investigación titulado "Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el enalapril 10 mg tabletas recubiertas", en el que se demostró una buena repetibilidad de los resultados, obteniéndose un coeficiente de variación de 0,464 % para un valor no mayor del 2,0 %, demostrando así que el método es preciso.

En la Tabla N° 04, se observa la variabilidad del porcentaje de recuperación del adapaleno, realizado por dos analistas en el ensayo de precisión intermedia, los resultados obtenidos demuestran que no existe diferencia significativa entre los resultados alcanzados por los analistas: analista 01 obtuvo un promedio del % de recuperación de 100,487 % y el analista 2 de 100,701 %, con un coeficiente de variación de 0,464% para el analista 1 y 0,460% para el analista 2, para un criterio de aceptación máximo de 2,0 % para determinaciones independientes a concentración equivalente al 100 %. Según Castro y Col. (2001), el criterio de aceptación debe estar en función a la concentración ya que uno de los factores que más puede influir en la precisión intermedia del método de análisis son los típicos factores como el día, el analista, el instrumento u otros factores que pueden afectar la variabilidad del método, tal es el caso para los principios activos debe ser menor al 2,0 %, comprobando de esta manera con los resultados obtenidos por los diferentes analistas no difieren significativamente, por lo tanto, el método es preciso, porque obtiene resultados repetitivos y además reproducibles, los datos obtenidos pueden ser concertados según Azaña y Comelio (2007), en el proyecto de investigación titulado "Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la cuantificación de clonixinato de lisina 125 mg y pargoverina clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas", en el análisis de precisión intermedia por dos analistas diferentes a las concentraciones de 80 %, 100 % y 120%, se obtuvo como resultado una desviación estándar relativa para el clonixinato de lisina entre ambos de 1,49% y 1,87% para la pargoverina para un valor máximo de 2,0 %, demostrando así que al someter a un análisis de precisión intermedia por diferentes analistas de obtuvo un coeficiente de variación dentro de lo especificado.

Mendoza (2011), afirma que la robustez del método es la medida de la capacidad de un método analítico para permanecer inalterado ante pequeños variaciones en ciertos parámetros proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo rutinario, en la Tabla N° 5 queda demostrado que la prueba de robustez de esta técnica analítica da resultados reproducibles efectuando algunos cambios o ajustes como es el caso del cambio de flujo en que se obtuvo un coeficiente de variación de 0,160 el que se encuentra dentro de lo especificado menor a 2,0 %.

Castro y Col. (2001), menciona que la selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analito de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra, parámetro que se observa en la Tabla N° 6 en donde se comprueba la selectividad del método al trabajar con la muestra, placebo y los excipientes bajo las mismas condiciones, demostrando así que este método es selectivo, porque los excipientes de la formulación no interfieren en la determinación del principio activo ya que no se detecte ninguna respuesta significativa en el cromatograma respecto al activo, obteniéndose una lectura de 0% siendo el máximo 0,5 %, además el método, diferencia el principio activo de sus compuestos relaciones. Así mismo, los tiempos de retención son similares tanto para

el estándar como para la muestra, parámetro que se contrasta según Morales (2004), en su trabajo de investigación titulado "Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el enalapril 10 mg tabletas recubiertas", en el que el método analítico es selectivo, porque los excipientes de la formulación no interfirieron en la determinación del enalapril ya que no se detectó ninguna respuesta significativa en el cromatograma, obteniéndose una lectura de 0% de los excipientes, además el método, diferencia el principio activo de sus compuestos relacionados, así mismo los tiempos de retención que se obtuvieron fueron similares para el estándar y la muestra (6,3 minutos), cabe mencionar que según Bellido (2007), en su trabajo de investigación titulado "Validación de Método analítico por cromatografía de alta resolución para la determinación cuantitativa de amroxol clorhidrato en jarabe", se observan el cromatograma, isograma y topograma del estándar amroxol clorhidrato, placebo y fase móvil respectivamente sin interferencia alguna con un tiempo de elución de 3,5 minutos respectivamente.

CONCLUSIONES

1. El método analítico de cromatografía líquida de alta performance para la cuantificación del adapaleno en alviera 0,1 % @ crema tópica, está validado para cumplir con los parámetros de validación solicitados.
2. El método analítico para la cuantificación del adapaleno en alviera 0,1 % @ crema tópica cumple con los parámetros de linealidad, exactitud, especificidad, robustez, repetibilidad y precisión intermedia del nuevo método de análisis de acuerdo a los parámetros solicitados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Árestegui K.** 2001. Validación de un método de análisis cuantitativo de Ampicilina en cápsulas por cromatografía líquida de alta resolución. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
2. **Azaña, Y. y Cornelio, J.** 2007. Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar Clonixinato de lisina 125 mg y Pargeverina Clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
3. **Bellido, N.** 2007. Validación de método analítico por cromatografía de alta resolución para la determinación cuantitativa de Ambroxol Clorhidrato en jarabe. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
4. **Castro, M.; Gastón, S.; Pujol, M.** 2001. Validación de métodos analíticos, Madrid: A.E.F.I. sección catalana.
5. **Capcha, H. y Llanos, G.** 2001. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de Dexametasona y Clotrimazol en crema, por HPLC. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
6. **Medina, J. y Berrocal, J.** 2008. Validación de método analítico de valoración de Naproxeno Sódico 550 mg tableta por cromatografía líquida de alta performance. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
7. **Mendoza, M.** 2011. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de Levofloxacin 500 mg/100ml inyectable para infusión. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
8. **Morales, C.** 2004. Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg tabletas recubiertas. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
9. **USP 35,** 2012. United States Pharmacopeia 35, National formulary 30 edition. The United States Pharmacopeia Convention Inc, Maryland: USA.
10. **Enciso, M.** 2009. Validación prospectiva de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Pectoflem jarabe. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
11. **Fauli, T.** 1996. Tratado de Farmacia Galénica; Validación de Procesos y Análisis de Medicamentos. (Cap. 7, pp. 115-123), Madrid: España.
12. **Herane, M.** 1996. Jornadas Interandinas de Dermatología, Universidad de Chile, Santiago: Chile.
13. **Katz, E.** 1998. Handbook of HPLC- Chromatographic Science Series. (Vol. 78). New York: Marcel Dekker Inc.
14. **Lough, W. y Wainerl, W.** 1996. High Performance Liquid Chromatography – Fundamental principles and practice, New York: Chapman & Hall.
15. **Mayorda, G. y Del Castillo, C.** 2010. Validación de una técnica de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para cuantificar Norfloxacin y Fenazopiridina clorhidrato en cápsulas orales. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
16. **Medina, J. y Berrocal, J.** 2008. Validación de método analítico de valoración de Naproxeno Sódico 550 mg tableta por cromatografía líquida de alta performance. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
17. **Mendoza, M.** 2011. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de Levofloxacin 500 mg/100ml inyectable para infusión. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
18. **Meneses L.** 2002. Validación de un método para el análisis cuantitativo de Bronhexina en ampolla por HPLC. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
19. **Merck, E.** 1981. Productos para cromatografía líquida reactivos MERCK-Darmstadt, Alemania.
20. **Morales, C.** 2004. Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg tabletas recubiertas. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
21. **Romero, R.** 2003. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de Cisaprida en tabletas. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho: Perú.
22. **Silva, G.** 2004. Validación del método de valoración de Gimepirida presentación comprimido 4 mg por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
23. **Skoog, D. y Leary L.** 1994. Análisis Instrumental. (4ta ed.). Madrid: Mc Graw- Hill Interamericana España S.A.
24. **USP 35,** 2012. United States Pharmacopeia 35, National formulary 30 edition. The United States Pharmacopeia Convention Inc, Maryland: USA.
25. **Valdez, A. y Cuadros, E.** 1999. Validación del método de valoración de Loratadina en tabletas por HPLC. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: Perú.
26. **Valls, O. y Del Castillo, B.** 1998. Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud. (4ta ed.), Barcelona: Ediciones Piros.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R. D. N° 024 – 2013 – FCB – D

Bach. MARLI FLORES POZO


En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día viernes tres de mayo del año dos mil trece, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas reunidos los docentes bajo la presidencia del Magister José Manuel Diez Macavilca, en representación del decano y miembro del jurado calificador y con la asistencia de los docentes Magister Hugo Roberto Luna Molero (cuarto jurado calificador), y Magister Maricela López Sierralta quien además actuará como secretaria docente para representar la tesis titulada "Validación de un método de cromatografía líquida de alta performance para la cuantificación de adapaleno en alviera 0,1 % ® crema tópica. Lima-2012, presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica Marli Flores Pozo de la escuela de formación profesional de Farmacia y Bioquímica, quien pretende optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica.

El presidente inicia el acto solicitado a la secretaria Docente para la revisión de los documentos en mesa y lectura de la RD N° 024-13-UNSCH-FCB-D, luego del cual invita a la sustentante la exposición de sus trabajo de investigación en el tiempo correspondiente para proceder luego a las observaciones, preguntas o aclaraciones al jurado calificador.

Luego solicita a la sustentante y al público en general para que abandone el auditorio dejando a los miembros del jurado calificar para que ellos pudieran deliberar sobre el trabajo de investigación expuesto y las respuestas de la Bachiller para proceder a la calificación correspondiente como sigue:

Miembros del jurado	Exposición	Respuestas a preguntas	Promedio
Mg. José Manuel Diez Macavilca	18	18	18
Mg. Maricela López Sierralta	19	19	19
Mg. Hugo Roberto Luna Molero	18	18	18
		Promedio total =	18

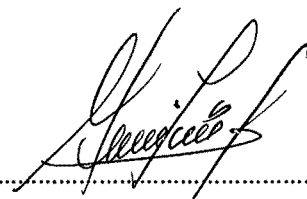
De la evaluación realizada por los miembros del jurado calificador, la sustentante obtuvo la nota promedio de dieciocho (18) de lo cual dan fe los miembros, estampando su tema al pie de la presente. Culmina el acto de sustentación siendo las seis de la noche.



Mg. José Manuel Diez Macavilca

Presidente

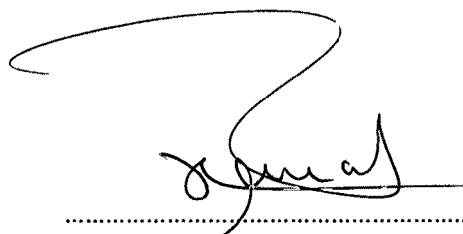
Miembro



Mg. Maricela López Sierralta

Secretaría Docente

Miembro -Asesor



Mg. Hugo Roberto Luna Molero

Miembro

Cuarto Jurado Calificador