



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desarrollo de un nuevo medicamento por vía tópica para el tratamiento del melasma

Fanny Galimany i Rovira

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DESARROLLO DE UN NUEVO MEDICAMENTO POR VÍA TÓPICA PARA EL TRATAMIENTO
DEL MELASMA

FANNY GALIMANY ROVIRA

Barcelona, 2016

UNIVERSITAT DE BARCELONA FACULTAT

DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE MEDICAMENTS

DESARROLLO DE UN NUEVO MEDICAMENTO POR VÍA TÓPICA PARA EL TRATAMIENTO
DEL MELASMA

Memòria presentada per Fanny Galimany Rovira per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Director de Tesi

Director de Tesi

Prof. Dr. Josep M^a Suñé Negre

Prof. Dra. Pilar Pérez Lozano

Tutor

Doctorand

Prof. Dra. Pilar Pérez Lozano

Fanny Galimany Rovira

FANNY GALIMANY ROVIRA
2016

Al meu pare, Jaume, la meva estrella polar

Agraïments

En primer lloc, agraeixo especialment al Prof. Dr. Josep M^a Suñé i a la Prof. Dra. Pilar Pérez la seva dedicació, ajudant-me sempre que ho he necessitat i gràcies al quals ha estat possible realitzar aquesta tesis.

Al Dr. Isidre Casals i a la Dra. Olga Jáuregui per la seva col·laboració i ajuda en el desenvolupament i identificació mitjançant LC-MS.

A la Roser Fusté per iniciar-me en la galènica de semi-sòlids aportant-me els seus coneixements i experiència.

A totes aquelles persones que he conegut al llarg de la meva trajectòria professional i, que d'una manera o altre, m'han ajudat a créixer com a professional i com a persona. Molt especialment, a aquelles persones que, en diferents moments, m'han ajudat a tirar endavant aquesta recerca.

Als meus amics per tots els bons moments que hem passat junts.

A totes aquelles persones que he conegut al llarg de la meva vida, en diferents moments, i que m'han ajudat a seguir endavant; especialment, aquells qui en certs moments em van ajudar a tenir una segona oportunitat a la vida: l'hospital de Bellvitge i l'Institut Guttman.

A la meva família, en primer lloc als meus pares, pels valors i l'educació que m'heu donat; a la meva mare, perquè sempre que ho necessitat has estat al meu costat. Als meus tiets, per donar-me suport i ajudar-me en alguns moments durs. Molt especialment a la memòria del meu pare, qui em va recolzar i guiar constantment en els meus primers passos per arribar a ser qui sóc avui.

Al Joan, perquè junts ho fem realitat. Gràcies pels teus consells i estar sempre al meu costat al llarg d'aquests anys ... i fer-me tocar sempre de peus a terra!

Als meus fills, l'Uriel i la Berta, per ensenyar-me que és la felicitat cada dia i, de forma inconscient, donar-me l'última empenta per acabar la tesis.

Publicaciones y ponencia derivadas de la tesis doctoral:

1. Artículo (Anexo VI)

Título: Development and validation of a new RP-HPLC method for the simultaneous determination of hydroquinone, kojic acid, octinoxate, avobenzone, BHA and BHT in skin-whitening cream

Autores: Fanny Galimany-Rovira,* Pilar Pérez-Lozano, Josep M^a Suñé-Negre, Encarna García-Montoya, Montserrat Miñarro, Josep R. Ticó

Revista: Analytical Methods

Factor de impacto: 1.821

Fecha de publicación: 5 de enero de 2016

2. Artículo

Título: Optimiztion and validation of a fast UPLC method for simultaneous determination of hydroquinone, kojic acid, octinoxate, avobenzone, BHA and BHT

Autores: Fanny Galimany-Rovira*, Pilar Pérez-Lozano, Encarna García-Montoya, Montserrat Miñarro, Josep R. Ticó, Josep M^a Suñé-Negre

Revista: The Journal of AOAC International

Factor de impacto: 1.385

Fecha de publicación: Pendiente de aceptación

Y la ponencia en un congreso:

3. Ponencia

Título: Desenvolupament de metodiques analítiques (HPLC/UPLC) per a la determinació i control d'hydroquinona, coadjuvants i productes de degradació en una crema medicamentosa

Ponente: Fanny Galimany-Rovira. Unitat de Tecnologia Farmacèutica.

Congres: III Jornada de Recerca a la Facultat de Farmàcia. Barcelona. 26 de febrer de 2010

ÍNDICE

OBJETIVOS	1
PARTE BIBLIOGRÁFICA	5
1. FISIOPATOLOGIA DEL MELASMA	7
1.1. FISIOLÓGIA DE LA PIEL	7
1.1.1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1.1.1. <i>Epidermis</i>	7
1.1.1.2. <i>Dermis</i>	9
1.1.1.3. <i>Hipodermis</i>	10
1.2. EL SISTEMA PIGMENTARIO	11
1.2.1. INTRODUCCIÓN	11
1.2.2. SÍNTESIS DE LA MELANINA: MELANOGÉNESIS.....	12
1.2.3. REGULACIÓN DE LA MELANOGÉNESIS	16
1.3. TRASTORNOS DE LA PIGMENTACIÓN: MELASMA	17
1.3.1. INTRODUCCIÓN	17
1.3.2. EPIDEMIOLOGIA	18
1.3.3. PATOGÉNESIS	19
1.3.3.1. <i>Factores genéticos</i>	19
1.3.3.2. <i>Radiación UV</i>	19
1.3.3.3. <i>Hormonas sexuales femeninas</i>	20
1.3.4. TRATAMIENTO.....	21
1.3.4.1. <i>Tratamientos tópicos</i>	21
1.3.4.2. <i>Tratamientos físicos</i>	26
2. HIDROQUINONA (HQ)	29
2.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	29
2.2. MECANISMO DE ACCIÓN	29
2.3. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS Y CLÍNICOS [47,48]	30
2.3.1. INDICACIONES TERAPÉUTICAS	30
2.3.2. FARMACOCINÉTICA	30
2.3.3. POSOLOGÍA	30
2.3.4. EFECTOS ADVERSOS	31
2.3.5. INTERACCIONES.....	31
2.3.6. EMBARAZO Y LACTANCIA	31
2.3.7. SOBREDOSIS	31
2.3.8. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	32
2.4. FORMULACIÓN	32
2.5. ANTECEDENTES Y PARONAMA ACTUAL	32

2.5.1.	REVISIÓN DE LA SEGURIDAD	32
2.5.2.	LEGISLACIÓN	33
3.	ÁCIDO KÓJICO (KA) Y DIPALMITATO KÓJICO (DPK)	35
3.1.	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	35
3.2.	MECANISMO DE ACCIÓN	35
3.3.	ASPECTOS FARMACOLÓGICOS Y CLÍNICOS	36
3.3.1.	INDICACIONES TERAPÉUTICAS	36
3.3.2.	FARMACOCINÉTICA	37
3.3.3.	POSOLÓGIA	37
3.3.4.	EFFECTOS ADVERSOS.....	37
3.3.5.	INTERACCIONES.....	37
3.3.6.	EMBARAZO Y LACTANCIA.....	37
3.3.7.	SOBREDOSIS	38
3.3.8.	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	38
3.4.	FORMULACIÓN	38
4.	FORMAS FARMACÉUTICAS DE ADMINISTRACIÓN TÓPICA	39
4.1.	INTRODUCCIÓN.....	39
4.2.	CREMAS	40
4.2.1.	DEFINICIÓN	40
4.2.2.	COMPONENTES DE LAS CREMAS	41
4.2.2.1.	<i>Fase acuosa</i>	41
4.2.2.2.	<i>Fase oleosa</i>	42
4.2.2.3.	<i>Emulgentes</i>	43
4.2.3.	PROCESO DE ELABORACIÓN	45
4.2.4.	PROPIEDADES DE LAS CREMAS	46
4.2.4.1	<i>Tamaño de gotita: distribución de tamaños</i>	47
4.2.4.2	<i>Aspecto</i>	47
4.2.4.3	<i>Viscosidad</i>	48
4.2.4.4	<i>pH</i>	49
4.2.5.	ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES.....	49
4.2.5.1	<i>Estabilidad física de las cremas</i>	49
4.2.5.2	<i>Estabilidad química de las cremas</i>	51
4.2.5.3	<i>Estabilidad microbiológica</i>	52
	PARTE EXPERIMENTAL	53
5.	PREFORMULACIÓN	55
5.1.	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.....	55
5.1.1.	INTRODUCCIÓN	56
5.1.2.	MATERIALES	58
5.1.2.1.	<i>Principios activos y patrones</i>	58
5.1.2.2.	<i>Reactivos y soluciones</i>	58

5.1.2.3.	<i>Aparatos y utillaje</i>	60
5.1.3.	MÉTODOS	61
5.1.3.1.	<i>Aspecto</i>	61
5.1.3.2.	<i>Identificación IR: espectrofotometría infrarrojo</i>	62
5.1.3.3.	<i>Identificación UV-Vis: espectrometría UV-Vis</i>	62
5.1.3.4.	<i>Punto de fusión</i>	62
5.1.3.5.	<i>Humedad</i>	62
5.1.3.6.	<i>Residuo de incineración</i>	63
5.1.3.7.	<i>Metales pesados</i>	63
5.1.3.8.	<i>Arsenio</i>	63
5.1.3.9.	<i>Valoración</i>	64
5.1.3.10.	<i>Tamaño de partícula</i>	64
5.1.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
5.1.4.1.	<i>Aspecto</i>	65
5.1.4.2.	<i>Identificación IR: espectrofotometría infrarrojo</i>	65
5.1.4.3.	<i>Identificación UV-Vis: espectrometría UV-Vis</i>	66
5.1.4.4.	<i>Punto de fusión</i>	69
5.1.4.5.	<i>Humedad</i>	69
5.1.4.6.	<i>Residuo de incineración</i>	70
5.1.4.7.	<i>Metales pesados</i>	70
5.1.4.8.	<i>Arsenio</i>	70
5.1.4.9.	<i>Valoración</i>	70
5.1.4.10.	<i>Tamaño de partícula</i>	73
5.1.5.	CONCLUSIONES	75
5.2.	ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD CON EXCIPIENTES	76
5.2.1.	INTRODUCCIÓN	76
5.2.2.	MATERIALES	77
5.2.2.1.	<i>Principios activos y patrones</i>	77
5.2.2.2.	<i>Reactivos y soluciones</i>	78
5.2.2.3.	<i>Aparatos y utillaje</i>	78
5.2.3.	METODOLOGÍA	79
5.2.3.1.	<i>Muestras involucradas en el estudio</i>	79
5.2.3.2.	<i>Condiciones de almacenamiento y frecuencia de análisis</i>	81
5.2.3.3.	<i>Ensayos a realizar</i>	81
5.2.3.4.	<i>Métodos analíticos</i>	82
5.2.4.	RESULTADOS Y DISCUSION	83
5.2.5.	CONCLUSIONES	92
6.	DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN	95
6.1.	INTRODUCCIÓN	95
6.2.	MATERIALES	95
6.2.1.	MATERIAS PRIMAS	95

6.2.2.	REACTIVOS Y SOLUCIONES	96
6.2.3.	APARATOS Y UTILLAJE	97
6.3.	MÉTODOS.....	99
6.3.1.	MÉTODO ELABORACIÓN CREMA.....	99
6.3.2.	DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	100
6.3.2.1.	<i>Observación en el estereoscopio.....</i>	100
6.3.2.2.	<i>Observación en el microscopio</i>	101
6.3.3.	DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD DE LA CREMA	101
6.3.3.1.	<i>Viscosímetro rotacional Brookfield</i>	101
6.3.3.2.	<i>Viscosímetro rotacional Haake Thermo Scientific</i>	101
6.3.4.	DETERMINACIÓN DEL pH DE LA CREMA	102
6.3.5.	DETERMINACIÓN DE LA EXTENSIBILIDAD	102
6.3.6.	ENSAYO DE SEPARACIÓN DE FASES POR CENTRIFUGACIÓN	103
6.3.7.	ENSAYO DE VALORACIÓN DE HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA y BHT.....	103
6.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	103
6.4.1.	PROTOTIPO Nº 1	104
6.4.2.	PROTOTIPO Nº 2	105
6.4.3.	PROTOTIPO Nº 3	107
6.4.4.	PROTOTIPO Nº 4	109
6.4.5.	PROTOTIPO Nº 5	110
6.4.6.	PROTOTIPO Nº 6	112
6.4.7.	PROTOTIPO Nº 7	114
6.4.8.	PROTOTIPO Nº 8	115
6.4.9.	PROTOTIPO Nº 9	117
6.4.10.	PROTOTIPO Nº 10	118
6.4.11.	PROTOTIPO Nº 11	120
6.4.12.	PROTOTIPO Nº 12	121
6.4.13.	PROTOTIPO Nº 13	123
6.4.14.	PROTOTIPO Nº 14	124
6.4.15.	PROTOTIPO Nº 15	126
6.4.16.	PROTOTIPO Nº 16	128
6.4.17.	PROTOTIPO Nº 17	130
6.4.18.	PROTOTIPO Nº 18	134
6.4.19.	PROTOTIPO Nº 19	136
6.4.20.	PROTOTIPO Nº 20	138
6.4.20.1.	<i>Aspecto y color</i>	144
6.4.20.2.	<i>Ensayo de separación de fases por centrifugación</i>	144
6.4.20.3.	<i>pH</i>	144
6.4.20.4.	<i>Extensibilidad y viscosidad.....</i>	145
6.4.20.5.	<i>Valoración de HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA y BHT.....</i>	145
6.5.	CONCLUSIONES	145

7. INDUSTRIALIZACIÓN	147
7.1. ESTUDIO DE LA TECNOLOGIA DE FABRICACIÓN: ESCALADO	148
7.1.1. INTRODUCCIÓN	148
7.1.2. MATERIALES	148
7.1.2.1. <i>Materias primas</i>	148
7.1.2.2. <i>Patrones</i>	172
7.1.2.3. <i>Equipos de producción y aparatos</i>	172
7.1.2.4. <i>Utillaje y EPIs</i>	173
7.1.3. METODOS.....	174
7.1.3.1. <i>Fórmula</i>	174
7.1.3.2. <i>Diagrama de proceso</i>	176
7.1.3.3. <i>Proceso de fabricación: lotes de escalado</i>	177
7.1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	181
7.1.5. CONCLUSIONES	185
7.2. VALIDACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN	186
7.2.1. OBJETIVO.....	186
7.2.2. ALCANCE	186
7.2.3. MATERIALES	186
7.2.3.1. <i>Materias primas</i>	186
7.2.3.2. <i>Material de acondicionado</i>	186
7.2.3.3. <i>Patrones</i>	188
7.2.3.4. <i>Equipos y aparatos</i>	188
7.2.3.5. <i>Utillaje y EPIs</i>	188
7.2.4. METODOS.....	188
7.2.4.1. <i>Fórmula</i>	188
7.2.4.2. <i>Diagrama de proceso</i>	190
7.2.4.3. <i>Proceso de fabricación: lotes de validación</i>	191
7.2.4.4. <i>Muestras</i>	195
7.2.4.5. <i>Análisis</i>	196
7.2.4.6. <i>Especificaciones</i>	197
7.2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	197
7.2.5.1. <i>Fase final emulsionado</i>	197
7.2.5.2. <i>Fase final envasado</i>	206
7.2.6. CONCLUSIONES	207
8. CONTROL DE PRODUCTO TERMINADO.....	209
8.1. INTRODUCCIÓN.....	209
8.2. MATERIALES.....	213
8.2.1. PATRONES	213
8.2.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	213
8.2.3. APARATOS Y UTILLAJE.....	214
8.3. MÉTODOS	215

8.3.1.	ASPECTO	215
8.3.2.	VISCOSIDAD	215
8.3.3.	pH	216
8.3.4.	EXTENSIBILIDAD	216
8.3.5.	CONTENIDO EFECTIVO DEL ENVASE	217
8.3.6.	CONTROL DE LA ESTANQUEIDAD	217
8.3.7.	VALORACIÓN del CONTENIDO en HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT	218
8.3.8.	CONTROL MICROBIOLÓGICO	218
8.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	220
8.4.1.	ASPECTO	220
8.4.2.	VISCOSIDAD	220
8.4.3.	pH	221
8.4.4.	EXTENSIBILIDAD	221
8.4.5.	CONTENIDO EFECTIVO DEL ENVASE	221
8.4.6.	CONTROL DE LA ETANQUEIDAD	222
8.4.7.	VALORACIÓN del CONTENIDO en HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA, BHT y sustancias relacionadas	222
8.4.8.	CONTROL MICROBIOLÓGICO	223
8.5.	CONCLUSIONES	223
9.	ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO	225
9.1.	INTRODUCCIÓN	225
9.2.	MATERIALES	229
9.2.1.	PATRONES	229
9.2.2.	REACTIVOS Y SOLUCIONES	230
9.2.3.	APARATOS Y UTILLAJE	230
9.3.	METODOLOGÍA.....	231
9.3.1.	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	231
9.3.2.	PERIODICIDAD DE ANÁLISIS	232
9.3.3.	PARÁMETROS A CONTROLAR	232
9.3.4.	MÉTODOS DE ANÁLISIS	233
9.3.5.	ESPECIFICACIONES	233
9.3.6.	EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS	235
9.3.6.1.	<i>Variación del aspecto de la crema</i>	<i>235</i>
9.3.6.2.	<i>Variación del pH de la crema</i>	<i>235</i>
9.3.6.3.	<i>Control de la viscosidad de la crema</i>	<i>235</i>
9.3.6.4.	<i>Control de la extensibilidad de la crema</i>	<i>235</i>
9.3.6.5.	<i>Valoración de los APIs, filtros solares, antioxidantes y sustancias relacionadas</i>	<i>235</i>
9.3.6.6.	<i>Control microbiológico</i>	<i>235</i>
9.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	236
9.4.1.	RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD A LARGO PLAZO	237

9.4.2.	RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD INTERMEDIA	240
9.4.3.	RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD ACELERADA	243
9.4.4.	DISCUSIÓN.....	245
9.4.4.1.	<i>Aspecto</i>	245
9.4.4.2.	<i>pH</i>	246
9.4.4.3.	<i>Viscosidad</i>	247
9.4.4.4.	<i>Extensibilidad</i>	249
9.4.4.5.	<i>Valoración de los APIs</i>	251
9.4.4.6.	<i>Valoración de los filtros solares</i>	254
9.4.4.7.	<i>Valoración de los antioxidantes</i>	257
9.4.4.8.	<i>Valoración de las sustancias relacionadas</i>	259
9.4.4.9.	<i>Control microbiológico</i>	262
9.5.	CONCLUSIONES	263
10.	DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	265
10.1.	DETERMINACIÓN DE HQ Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN POR HPLC ..	271
10.1.1.	INTRODUCCIÓN	271
10.1.2.	MATERIALES	272
10.1.2.1.	<i>Patrones</i>	272
10.1.2.2.	<i>Reactivos y soluciones</i>	272
10.1.2.3.	<i>Aparatos y utillaje</i>	274
10.1.3.	METODOLOGIA.....	275
10.1.3.1.	<i>Degradaciones forzadas</i>	275
10.1.3.2.	<i>Análisis de las degradaciones forzadas: desarrollo del método</i>	278
10.1.3.3.	<i>Estudios MS/TOF y LC-MS/TOF</i>	279
10.1.3.4.	<i>Validación del método</i>	279
10.1.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	284
10.1.4.1.	<i>Desarrollo del método</i>	284
10.1.4.2.	<i>Preparación muestra</i>	287
10.1.4.3.	<i>Degradaciones forzadas</i>	288
10.1.4.4.	<i>Cinética de degradación</i>	296
10.1.4.5.	<i>Estudios de las degradaciones forzadas mediante LC-MS/TOF</i>	297
10.1.4.6.	<i>Validación del método</i>	307
10.1.5.	CONCLUSIONES.....	316
10.2.	DETERMINACIÓN DE DPK POR GPC.....	319
10.2.1.	INTRODUCCIÓN	319
10.2.2.	MATERIALES	320
10.2.2.1.	<i>Patrones</i>	320
10.2.2.2.	<i>Reactivos y soluciones</i>	320
10.2.2.3.	<i>Aparatos y fungibles</i>	321
10.2.3.	METODOLOGIA.....	322
10.2.3.1.	<i>Validación del método</i>	322

10.2.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	327
10.2.4.1.	<i>Estudio de solubilidad</i>	327
10.2.4.2.	<i>Desarrollo del método</i>	328
10.2.4.3.	<i>Validación del método</i>	332
10.2.5.	CONCLUSIONES.....	346
10.3.	DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE HQ, KA, OCT, AVB, BHA Y BHT	
	POR HPLC.....	347
10.3.1.	INTRODUCCIÓN	347
10.3.2.	MATERIALES	348
10.3.2.1.	<i>Patrones</i>	348
10.3.2.2.	<i>Reactivos y soluciones</i>	348
10.3.2.3.	<i>Aparatos y utillaje</i>	349
10.3.3.	METODOLOGIA.....	350
10.3.3.1.	<i>Estudio LC-MS/TOF</i>	350
10.3.3.2.	<i>Validación del método</i>	351
10.3.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	358
10.3.4.1.	<i>Desarrollo del método</i>	358
10.3.4.2.	<i>Optimización de la preparación de la muestra</i>	362
10.3.4.3.	<i>Análisis mediante LC-MS/TOF</i>	364
10.3.4.4.	<i>Validación del método</i>	368
10.3.5.	CONCLUSIONES.....	387
10.4.	DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE HQ, KA, OCT, AVB, BHA Y BHT POR	
	UPLC	389
10.4.1.	INTRODUCCIÓN	389
10.4.2.	MATERIALES	390
10.4.2.1.	<i>Patrones</i>	390
10.4.2.2.	<i>Reactivos y soluciones</i>	390
10.4.2.3.	<i>Aparatos y utillaje</i>	390
10.4.3.	METODOLOGIA.....	392
10.4.3.1.	<i>Validación del método</i>	392
10.4.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	397
10.4.4.1.	<i>Preparación de la muestra</i>	397
10.4.4.2.	<i>Estudio de compatibilidad del filtro</i>	400
10.4.4.3.	<i>Método de referencia</i>	401
10.4.4.4.	<i>Transferencia de las condiciones cromatográficas</i>	402
10.4.4.5.	<i>Estudio de comparación de la eficacia cromatográfica</i>	402
10.4.4.6.	<i>Validación del método</i>	404
10.4.4.7.	<i>Comparación de los métodos: HPLC versus UPLC</i>	415
10.4.5.	CONCLUSIONES.....	417
10.5.	DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA, BHT Y	
	SUSTANCIAS RELACIONADAS POR HPLC	419
10.5.1.	INTRODUCCIÓN	419
10.5.2.	MATERIALES	420

10.5.2.1. Patrones.....	420
10.5.2.2. Reactivos y soluciones	420
10.5.2.3. Aparatos y utillaje	421
10.5.3. METODOLOGIA.....	423
10.5.3.1. Validación del método.....	423
10.5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	430
10.5.4.1. Desarrollo del método	430
10.5.4.2. Optimización de la preparación de la muestra.....	435
10.5.4.3. Validación del método.....	437
10.5.5. CONCLUSIONES.....	467
DISCUSIÓN GLOBAL.....	469
CONCLUSIONES.....	493
BIBLIOGRAFIA	497
ANEXO I	521
ANEXO II	527
ANEXO III	533
ANEXO IV	545
ANEXO V	557
ANEXO VI.....	571

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es la investigación y el desarrollo de un nuevo medicamento, administrado por vía tópica, para el tratamiento del melasma. Para ello se deberán seguir las especificaciones indicadas en la Ley de Garantías y Uso racional de los Medicamentos y Productos Sanitarios, donde se establecen los requisitos técnico-sanitarios que deben cumplir los medicamentos para garantizar su calidad, seguridad y eficacia.

Asimismo también se debe seguir las recomendaciones realizadas por parte de International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) sobre “Pharmaceutical Development” ICH Q8 (R2), en donde se establecen las bases para completar el apartado 3.2.P.2 del desarrollo farmacéutico del documento de registro según el formato *Common Technical Document* (CTD).

Para la consecución de este objetivo general – obtener un nuevo medicamento en una forma farmacéutica semisólida – se debe llevar a cabo una investigación completa para lograr que el medicamento sea seguro, eficaz, estable y de calidad. Esta investigación multidisciplinaria consta de diferentes estudios: estudio de preformulación, estudio galénico, estudio tecnológico y estudio de estabilidad, todos ellos soportados por una caracterización analítica adecuada y profunda que no pueden separarse entre sí ya que se condicionan entre ellos. Es decir, el estudio de preformulación – estudio de las características físico-químicas del principio activo, su estabilidad inherente y las interacciones con otros principios activos y excipientes – condicionará el estudio galénico, el estudio galénico – desarrollo de la formulación de la forma farmacéutica semisólida más adecuada – condicionará la tecnología de fabricación a utilizar y conjuntamente dotarán al medicamento de unas características de estabilidad determinadas que demostrarán su calidad. La importancia de desarrollar una formulación adecuada que vehicule el principio activo para hacer posible su administración por vía tópica con la estabilidad óptima, es trascendental en cualquier medicamento.

Para ello, se plantean una serie de objetivos parciales que sin la consecución de los cuales no sería posible la obtención del nuevo medicamento. Los objetivos específicos son:

OBJETIVOS

- Investigación de las características y propiedades físico-químicas y biofarmacéuticas de los principios activos y su compatibilidad con otros principios activos y los posibles excipientes con el fin de escoger los más idóneos.
- Diseño y desarrollo de la formulación galénica más idónea (eficaz y segura), robusta y estable que contenga los principios activos y sea aplicable a la administración tópica deseada, manteniendo la estabilidad de todos sus componentes y del conjunto a lo largo del tiempo.
- Establecimiento de la tecnología de elaboración más adecuada en función de la formulación desarrollada, definiendo las condiciones idóneas de fabricación y la validación de la técnica establecida. Esto implica el correspondiente estudio de transposición a escala industrial para poder fabricar lotes comerciales.
- Investigación y desarrollo de nuevas metodicas analíticas para la detección y cuantificación de los principios activos, coadyuvantes, antioxidantes, filtros solares y productos de degradación a lo largo de las diferentes fases del desarrollo farmacéutico de la crema con el fin de discernir los resultados obtenidos.
- Establecimiento de la metodología analítica adaptada al nuevo medicamento que sea útil y fiable para desarrollar el control de calidad rutinario del nuevo medicamento, lo que implica la correcta validación del mismo.
- Investigación de la estabilidad de la formulación seleccionada, según las recomendaciones de las guías ICH, durante un mínimo de 2 años, para definir su tiempo de caducidad y condiciones de almacenamiento, para garantizar de esta forma que el nuevo medicamento desarrollado mantiene su calidad, eficacia y seguridad durante toda su vida útil.

PARTE BIBLIOGRÁFICA

1. FISIOPATALOGIA DEL MELASMA

1.1. FISIOLOGIA DE LA PIEL

1.1.1. INTRODUCCIÓN

La piel es la cubierta externa del cuerpo humano siendo el órgano más grande del organismo y forma una barrera que separa al organismo del medio ambiente externo. Por lo tanto, la piel desempeña una gran variedad de funciones tales como la protección frente a las agresiones externas ya sean mecánicas, químicas, tóxicas, térmicas o microbiológicas. Además, la piel es esencial para la impermeabilización, el control de la temperatura corporal, la absorción de radiación ultravioleta así como la detección de estímulos sensoriales [1].

La piel tiene una estructura heterogénea tal y como se muestra en la Figura 1.1, compuesta de tres capas de diferente origen embriológico que desde fuera hacia dentro son: la epidermis, la dermis y la hipodermis [2].

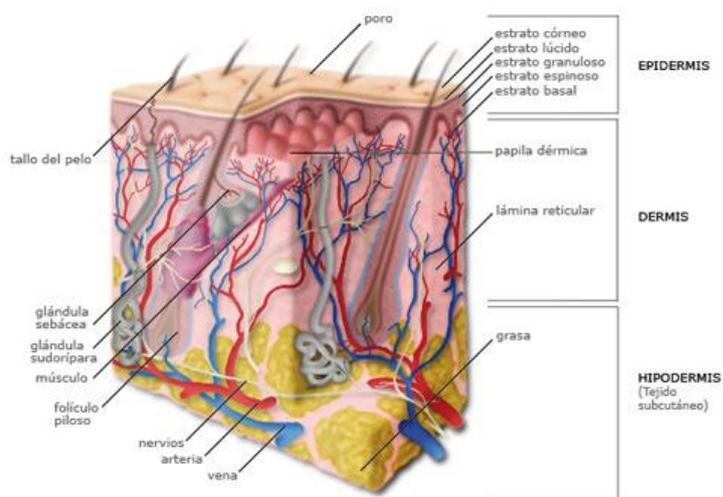


Figura 1.1 Estructura de la piel [2]

1.1.1.1. Epidermis

La epidermis es un epitelio poliestratificado y queratinizado que cubre la totalidad de la superficie corporal y del que surgen los folículos polisebáceos, las glándulas sudoríparas y las uñas. Es la capa con mayor número de células y está en renovación constante. Presenta un espesor variable, con un valor medio de 0,1 mm, pudiendo alcanzar hasta 1 o 2 mm. Se compone de cuatro capas principales diferentes (Figura

CAPÍTULO 1: FISIOPATOLOGIA DEL MELASMA

1.2), que desde el interior hacia el exterior son: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo [3].

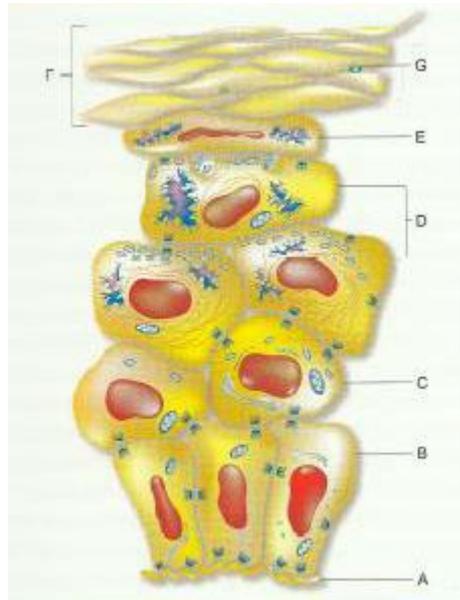


Figura 1.2 Estratos de la epidermis [3]

*A: membrana basal; B: estrato germinativo; C: estrato espinoso;
D: estrato granuloso; E: estrato lúcido; F: estrato córneo; G: corneodesmosomas*

El estrato basal es la zona proliferativa que está constituida por una sola capa de células de las cuales cerca del 50% se encuentran en mitosis. Las nuevas células formadas, llamado estrato germinativo, también son capaces, transitoriamente, de dividirse; y gradualmente migran hacia el exterior para reemplazar a las células que se desprenden de la superficie cutánea formando así los sucesivos estratos.

El estrato espinoso es la capa más gruesa y está formado generalmente de tres a ocho capas de queratinocitos poligonales, de contornos irregulares debido a la compresión, y sólidamente unidas entre sí por desmosomas. La función de este estrato es la de dar consistencia así como la de formar queratina a partir de las tonofibrillas. A medida que avanzan hacia la superficie, las células se diferencian bioquímicamente y desarrollan una actividad de síntesis cada vez mayor.

El estrato granular está formado por entre tres y cinco capas de células fusiformes – inicialmente poliédricas y que más tarde se aplanan debido a la compresión –. Se caracterizan por presentar unos gránulos basófilos de queratohialina, sustancia precursora de la queratina y la cual se acumula en gránulos en el citoplasma, y unos gránulos lamelares que contienen glicosaminoglicanos y fosfolípidos siendo estas sustancias liberadas al espacio intracelular formando una especie de cemento intracelular en el estrato córneo.

Formando parte del estrato granular, se encuentra el denominado estrato lúcido que es la capa de transición entre el estrato granuloso formado por células todavía vivas y el estrato córneo constituido por células muertas. En el transcurso de la queratinización las células vivas se aplanan y pierden el núcleo para transformarse en corneocitos, que constituyen el siguiente estrato.

El estrato córneo es la capa más superficial de la epidermis y está en contacto directo con el ambiente externo. Está formado por corneocitos que son células muertas desprovistas de núcleo y formadas casi exclusivamente de queratina confiriéndole unas propiedades estructurales y bioquímicas totalmente diferentes. Las células de este estrato se descaman, continuamente, de la superficie de la piel por un proceso llamado descamación. La muda de las células de la piel sana está en equilibrio con los procesos de proliferación y diferenciación [4].

Existen distintos tipos de células en la epidermis, siendo las células mayoritarias denominadas queratinocitos (~85%), el resto son células de Langerhans (~5%), melanocitos (~2-3%) y células de Merkel (~3-5%).

Los queratinocitos son las células mayoritarias que constituyen el epitelio y su finalidad es su transformación en corneocitos para constituir el denominado estrato córneo.

Las células de Langerhans son células que derivan de la médula ósea y en la piel están dispersas por toda la epidermis pero principalmente localizadas en el estrato espinoso. Su función es reconocer, captar, procesar y presentar antígenos procesados a linfocitos T, que pueden iniciar una respuesta inmune primaria. Al realizar esta tarea, estas células protegen al individuo de infecciones superficiales.

Los melanocitos son células productoras de melanina que se encuentran principalmente en el estrato basal. La función más importante de la melanina es proteger a las células de las capas más profundas de la epidermis y a la dermis subyacente de los efectos nocivos de la luz ultravioleta excesiva.

Las células de Merkel son mecanorreceptores – receptor sensorial que reacciona ante la presión mecánica o las distorsiones – encontrándose intercaladas entre los queratinocitos del estrato basal de la epidermis [5].

1.1.1.2. Dermis

La dermis está formada por tejido conjuntivo fibroelástico. Por tanto, no se trata de capas de células superpuestas tal y como sucede en la epidermis, sino de una densa

CAPÍTULO 1: FISIOPATOLOGIA DEL MELASMA

red de fibras de elastina y colágeno, en la que se encuentran los fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, embebidos de una sustancia denominada sustancia fundamental. La sustancia fundamental está compuesta por proteínas y glucosaminoglucanos asociados, que son macromoléculas complejas de polisacáridos (polímeros hidrófilos), que absorben gran cantidad de agua formando un gel.

La dermis es el mayor componente estructural de la piel y es la capa situada inmediatamente por debajo de la epidermis que está firmemente conectado a ella. Es una estructura termorreguladora y sensorial importante ya que en esta capa se encuentran las células y estructuras encargadas de los sentidos, que contribuye significativamente al almacenamiento del agua en el cuerpo (entre el 20 y el 40% de agua de todo el cuerpo). Además, al ser un tejido vascularizado, sirve de soporte y alimento de la epidermis. Tiene un grosor máximo de 1 mm y se divide en dos grandes zonas: dermis papilar y dermis reticular.

La dermis papilar está constituida por las papilas dérmicas que son fibras de colágeno y elastina dispuestas perpendicularmente hacia el estrato basal de la epidermis conteniendo tanto capilares como melanocitos.

La dermis reticular o profunda contiene la mayoría de los anexos de la piel. Está constituida por tejido conectivo con fibras de elastina que se disponen en todas las direcciones y se ordenan en forma compacta, dando resistencia y elasticidad a la piel [5,6].

1.1.1.3. Hipodermis

Es la capa más interna de la piel y está constituida por un tejido conjuntivo laxo que posee una estructura similar a la dermis encontrándose fibras de colágeno embebidas en la sustancia fundamental. Las células de la hipodermis se llaman adipocitos, que se disponen inmersos en la red de fibras de colágeno, que acumulan grasa en el interior de unas grandes vacuolas.

Su función es almacenar grasa, reservarla y ponerla a disposición del organismo cuando haga falta un aporte energético superior al ingerido en la alimentación así como construir una barrera de protección térmica [1,6].

1.2. EL SISTEMA PIGMENTARIO

1.2.1. INTRODUCCIÓN

La coloración de la piel es el resultado de la reflexión de la luz visible que incide sobre ella y por tanto, es función de las longitudes de onda absorbidas por los diferentes cromóforos que se encuentran en ella. En la dermis se localizan los vasos sanguíneos por los que circula la hemoglobina, tanto la hemoglobina reducida como la oxihemoglobina responsables de una coloración azul y roja, respectivamente. En la epidermis se encuentran los carotenos y la melanina responsables de las coloraciones amarillo-naranja y marrón-negra, respectivamente.

La melanina es el pigmento endógeno más importante de la piel y es producida por unas células dentríticas llamadas melanocitos que representan el 2-3% de la población total de la epidermis. Se encuentran a nivel de la capa basal distribuidos entre los queratinocitos basales. También se encuentran melanocitos en la parte inferior de los folículos pilosos así como en el oído interno, el iris y el sistema nervioso central. Los melanocitos derivan del mismo tejido embrionario que origina las células nerviosas (crestas neurales) en forma de precursores indiferenciados y no pigmentados, los melanoblastos. Durante la embriogénesis, estos melanoblastos migran hacia su destino final, la epidermis y los folículos pilosos, donde se diferencian y se convierten en melanocitos [7,8].

Los melanocitos producen unas estructuras especializadas llamadas melanosomas en las que se sintetiza y almacena la melanina. Los melanosomas forman parte de la familia de los lisosomas secretores. Resultan de la asociación de proteínas de estructura membranosa y de las diferentes enzimas melanogénicas. Esquemáticamente, las proteínas estructurales se sintetizan en el retículo endoplasmático y se ensamblan para formar premelanosomas. Las enzimas, contenidas en vesículas procedentes del trans-Golgi, se fusionan después con estos premelanosomas y se activan, para dar lugar a la síntesis de melanina [7,9].

Una vez los melanosomas están llenos, éstos son transferidos a los queratinocitos vecinos tal y como se muestra en la Figura 1.3. Cada melanocito está en contacto con 10 queratinocitos por medio de sus prolongaciones. Esta conexión del melanocito con los queratinocitos se denomina unidad melano-epidérmica y se define como la unidad funcional de la pigmentación de la piel. Los gránulos de melanina pasan del melanocito al queratinocito por un mecanismo de inoculación denominado donación de melanina.

CAPÍTULO 1: FISIOPATOLOGIA DEL MELASMA

El extremo de las prolongaciones de los melanocitos es fagocitado por los queratinocitos. Este tipo de secreción se llama secreción citocrina [10].

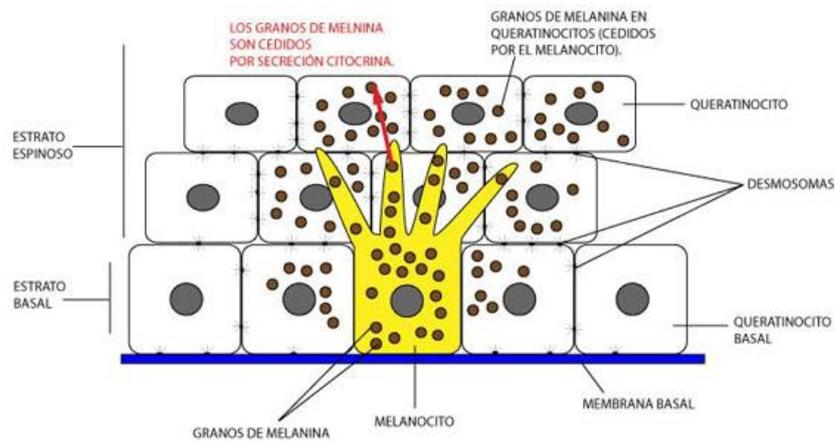


Figura 1.3 Secreción citocrina de melanina [10]

El color de la piel viene definido por dos componentes: un componente constitutivo (genético) y un componente facultativo (dependiente del ambiente). Como consecuencia, la diferencia de color de las distintas razas humanas es básicamente debido al número y tipo de melanosomas producidos y su distribución dentro de los queratinocitos, no al número de melanocitos presentes [7].

La función principal de la melanina es proteger al organismo frente a la radiación solar y minimizar sus efectos nocivos. Para ello, en las células epiteliales, los melanosomas transferidos a los queratinocitos se posicionan encima del núcleo – fenómeno de *capping* – dando máxima protección al ADN de las células.

1.2.2. SÍNTESIS DE LA MELANINA: MELANOGENÉISIS

Las melaninas son polímeros quinoides de dos tipos: feomelaninas de color amarillo o rojo-pardusco responsables de las coloraciones claras y las eumelaninas de color marrón o negro que proporcionan las coloraciones oscuras. Las melaninas se sintetizan a partir del aminoácido tirosina, por acción de una enzima, la tirosinasa, mediante una serie de reacciones químicas encadenadas iniciadas a consecuencia de un estímulo inductor que es captado por un receptor de membrana. Su síntesis y el conjunto de mecanismos que la regulan constituyen la melanogénesis (Figura 1.4)[11].

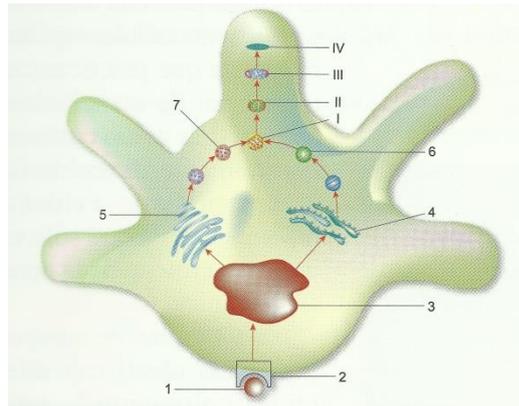


Figura 1.4 Melanogénesis y biogénesis del melanosoma [3]

1: estímulo inductor de la respuesta melánica; 2: receptor específico; 3: núcleo; 4: RER; 5: aparato de Golgi; 6: premelanosoma; 7: vesículas cargadas de tirosinasa. I: melanosoma estadio I; II: melanosoma estadio II; III: melanosoma estadio III; IV: melanosoma estadio IV

▪ Etapa I: Síntesis de la tirosinasa

La tirosinasa junto con una serie de polipéptidos son sintetizados por los ribosomas del melanocito y de aquí transportados, primero al interior del retículo endoplasmático (RE) y posteriormente al aparato de Golgi donde la tirosinasa es activada por la presencia de Cu. Una vez activada se acumula junto a los polipéptidos en forma pequeñas vesículas citoplasmáticas esféricas.

▪ Etapa II: Formación de los melanosomas [7,8,11]

Los melanosomas son el resultado de la asociación de proteínas de estructura membranosa y de las diferentes enzimas melanogénicas. Su biogénesis es un proceso complejo y altamente regulado.

Las proteínas estructurales sintetizadas en el retículo endoplasmático se ensamblan para formar estructuras vesiculares con membranas internas – similares en morfología a los orgánulos endosomales tempranos – llamadas premelanosomas.

Estudios morfológicos de este proceso realizados en el microscopio electrónico han conducido al establecimiento de 4 etapas en el desarrollo y maduración de los melanosomas como se observa en la Figura 1.5 [11,12].

- **Estadio I:** son los premelanosomas de forma esférica, de matriz amorfa y vesículas internas que se forman como consecuencia de las invaginaciones de la membrana y que recuerdan los endosomas tardíos. Ya contienen la glucoproteína Pmel17 pero ésta requiere procesamiento adicional para convertirse en un componente de la matriz fibrilar final.

- **Estadio II:** los melanosomas del estadio I son transportados, primero al interior del retículo endoplasmático rugoso (RER) y posteriormente al aparato de Golgi donde sufren un proceso de maduración transformándolos en premelanosomas de forma ovalada y con matriz filamentosa –proteínas estructurales con una estructura espiral –. Estos premelanosomas se fusionan con las vesículas procedentes del aparato de Golgi, cargadas de tirosinasa, que empiezan a llegarle. En este estadio, la tirosinasa se encuentra en forma de protirosinasa, enzima inactivo.
- **Estadio III:** una vez formado el melanosoma por fusión de las vesículas de protirosinasa con los pre-melanosomas, la protirosinasa se transforma en tirosinasa, activándose y empezando la síntesis de melanina. En estos melanosomas ya se encuentran depósitos matriciales opacos de melanina.
- **Estadio IV:** son melanosomas maduros con matriz uniformemente opaca. Poco a poco, el melanosoma va cargándose de melanina volviéndose más oscuro. Llegará un punto en el que los precursores de la melanina, fundamentalmente el aminoácido inicial de la ruta, la tirosina se agote y la melanogénesis irá decayendo. Al final, el melanosoma está cargado de melanina y la tirosinasa acaba por inactivarse. La estructura fibrilar de soporte resulta inapreciable.

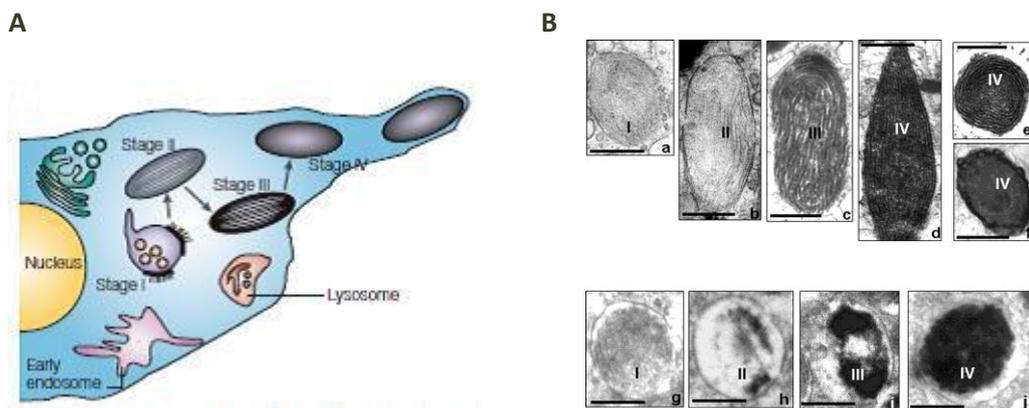


Figura 1.5 Maduración de los melanosomas

A: Diagrama esquemático de la maduración de los melanosomas en los diferentes estadios [12]

B: Imagen por microscopía electrónica durante el desarrollo de los eumelanosomas (a-f) y de los feomelanosomas (g-j) [11]

▪ Etapa III: Síntesis de melanina en los melanosomas

Conforme avanza la maduración, dentro de los melanosomas iniciales se producen los distintos tipos de melanina a partir de la L-tirosina, aminoácido aportado por los dictiosomas del aparato de Golgi, por una serie de reacciones enzimáticas como se observa en la Figura 1.6 [13].

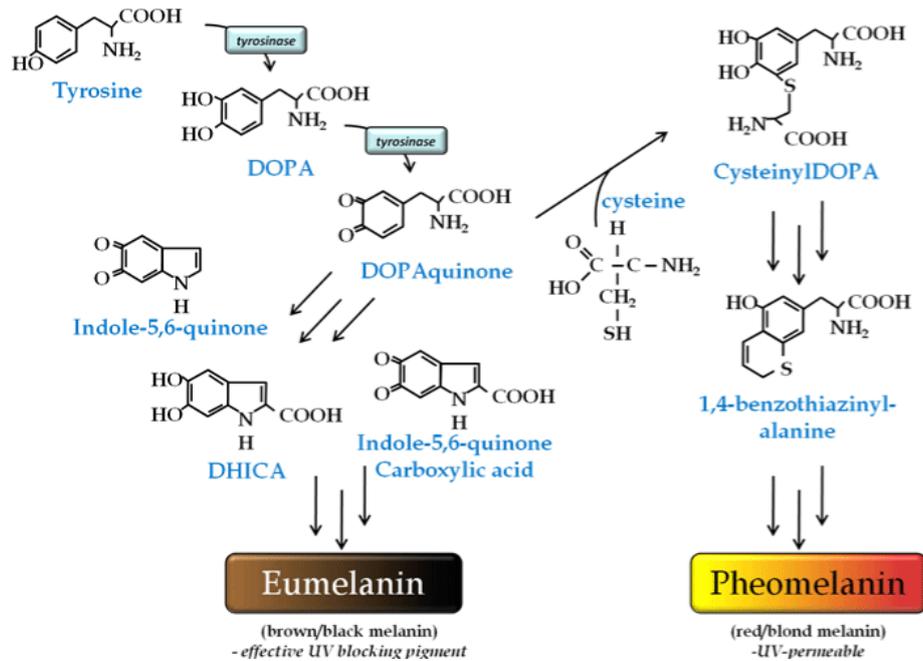


Figura 1.6 Rutas de síntesis de eumelanina y feomelanina [14]

El primer paso es la hidroxilación de la L-tirosina a L-β-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y la oxidación de la L-DOPA a DOPA-quinona. Esta doble oxidación es catalizada por la enzima tirosinasa llevándose a cabo con consumo de oxígeno. En este punto la ruta diverge en dos grandes ramas que darán lugar a los dos grandes grupos de melaninas.

Por un lado, la DOPA-quinona sufre una ciclación intramolecular espontánea debido a su alta reactividad que conduce a la formación de leucodopacromo, que posteriormente es convertido en DOPA-cromo. Este es oxidado conduciendo a la formación de compuestos tales como 5,6-dihidroxiindol (DHI) y ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA), catalizados por las enzimas TRP-1 y TRP-2. La polimerización de radicales fenólicos procedentes de estos compuestos y de sus correspondientes quinonas dirige a la formación de las eumelaninas.

Por otro lado, la DOPA-quinona puede reaccionar con la cisteína, aminoácido rico en azufre, liderando la formación de intermediarios cisteinil-DOPA que tras varias transformaciones conducirá a la formación de las feomelaninas [10].

1.2.3. REGULACIÓN DE LA MELANOGÉNESIS

La melanogénesis es un proceso altamente regulado (Figura 1.7), estimulado principalmente por la radiación UV para proteger al organismo. La regulación de este proceso es liderado por la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH) que es producida por proteólisis de un polipéptido precursor multicomponente codificado por el gen proopiomelanocortina (POMC).

La exposición de los queratinocitos a la radiación UV da como resultado la activación del supresor tumoral p53. Como factor de transcripción, la proteína p53 se une directamente al promotor del gen POMC en estos queratinocitos e induce su transcripción y como consecuencia, la producción de α -MSH.

La unión de α -MSH con el receptor de melanocortina 1 (MC1R) de la membrana plasmática de los melanocitos provoca la activación de la adenilato ciclasa – enzima que cataliza la síntesis de AMPc a partir de ATP –. Esto provoca un aumento de la concentración de AMPc intracelular que desencadena en la activación de la proteína quinasa A (PKA) y la posterior activación del factor de transcripción CREB, que así mismo conduce al aumento del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF). Éste activa la transcripción de algunas proteínas melanocitarias, incluidas las enzimas claves de la melanogénesis, la tirosinasa y la TRP1, provocando un aumento de la síntesis de melanina [11-15].

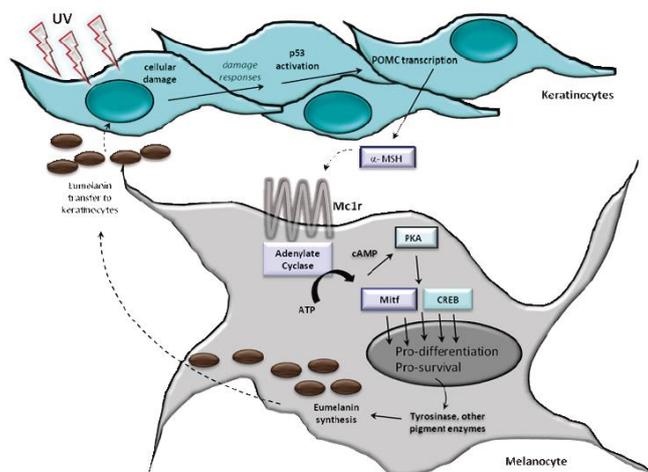


Figura 1.7 Regulación de la melanogénesis por parte de la radiación UV [14]

1.3. TRASTORNOS DE LA PIGMENTACIÓN: MELASMA

1.3.1. INTRODUCCIÓN

Las alteraciones de la pigmentación natural de la piel se llaman discromías. Pueden clasificarse de diferente forma pero la más sencilla es dividir las en hipocromías o hipopigmentación (defecto de coloración) e hiperpigmentación (exceso de coloración). Tal y como se ha dicho anteriormente, la pigmentación cutánea es principalmente función de la cantidad y del tipo de melanina presente en los melanocitos que posteriormente es transferida a los queratinocitos. Por tanto, la mayoría de discromías son causadas por alteraciones de la pigmentación melánica.

Las hipopigmentaciones se deben a un déficit en la producción de melanina a causa de disminución en el número de melanocitos, de la cantidad de melanina o de la dispersión de ésta en los queratinocitos. Se pueden manifestar de forma generalizada en todo el cuerpo o bien localizada en algún punto concreto. Las causas pueden ser muy variadas siendo las más comunes: quemaduras, infecciones, uso de ciertos medicamentos o alteraciones endocrinas, genéticas, nutricionales o metabólicas. Existen muchas patologías de hipopigmentación tales como vitíligo, albinismo, fenilcetonuria, piebaldismo entre otros [16,17].

Por otro lado, las hiperpigmentaciones son trastornos caracterizados por el aumento de la producción de melanina, incremento en la cantidad de melanocitos o de melanosomas que originan manchas oscuras en la piel. Las causas más comunes de hiperpigmentación son los antecedentes de inflamación de la piel, uso de ciertos medicamentos, enfermedades endocrinas y exposición al sol. Las hiperpigmentaciones más frecuentes son las relacionadas con la exposición al sol: lentigo, efélides, melasma entre otras [17,18].

El melasma es uno de los trastornos más frecuentes de la pigmentación. Es una hiperpigmentación adquirida caracterizada por máculas irregulares, bien delimitadas y simétricas de color marrón claro u oscuro, pudiendo llegar a ser nevocitas en función del fototipo del paciente, localizadas en áreas expuestas a la luz solar tales como en la frente, pómulos, labio superior y mentón [19-21].

Clínicamente, existen tres patrones: centofacial, malar y mandibular. Histológicamente, existen tres tipos de melasma, en función de la profundidad a la que se encuentre la melanina:

CAPÍTULO 1: FISIOPATOLOGIA DEL MELASMA

- Melasma Epidérmico: la melanina se encuentra localizadas en la capa basal, suprabasal y el estrato córneo de la epidermis. Presenta los bordes bien delimitados y suele distribuirse por el área centro-facial.
- Melasma Dérmico: la melanina se encuentra ubicada a nivel de la dermis superficial. Suele presentar bordes difusos y de forma habitual, se distribuye en los pómulos.
- Melasma Mixto: combina las características del melasma dérmico y epidérmico.
- Melasma indeterminado: se da en personas con piel de fototipo VI.

El diagnóstico se realiza utilizando la lámpara de Wood – instrumento que emite luz UV de longitud de onda larga entre 330 y 365 nm –. Además permite hacer un diagnóstico diferencial para distinguir el melasma epidérmico (que se oscurece más a la exposición de la luz de Wood) frente al dérmico, que se aclara bajo la luz de Wood. Mientras que el melasma indeterminado no se puede diagnosticar mediante examen bajo la luz de Wood ya que no se distingue.

Es considerado un trastorno común entre las mujeres en edad reproductiva con tonos de piel oscura aunque también puede aparecer en adolescentes, mujeres mayores y hombres.

Diferentes estudios han demostrado que causa una considerable angustia psicológica y por tanto, afectar negativamente a la calidad de vida del paciente en aspectos tales como bienestar emocional, la vida social, y actividades de ocio.

1.3.2. EPIDEMIOLOGIA

Afecta a unos 45-50 millones de personas en todo el mundo, pero es más común en las mujeres [22]. En el 90% de los casos, afecta a mujeres de entre 20 y 50 años, raramente antes de la pubertad. Existe también una relación entre melasma y embarazo conociéndose, en estos casos, como cloasma. Afecta a todas las razas pero con una mayor prevalencia sobre población con pieles más oscuras con fototipos entre III y V. Afecta a más de 5 millones de personas en EUA, entre el 0,25 y 4% de los pacientes atendidos en clínicas dermatológicas en países del sudeste asiático y es el trastorno más común entre la población de India [20,23]. En Brasil, entre el 5,9 y 9,0% de consultas dermatológicas realizadas en 2006 eran referentes a melanodermias (entre ellas el melasma) y según un estudio realizado el 2008 en Nepal, el melasma fue el cuarto trastorno pigmentario [24,25].

1.3.3. PATOGÉNESIS

El origen del melasma es, todavía hoy, desconocido. Sin embargo, existen varios factores relacionados con su desarrollo. Algunos de ellos de orden intrínseco tales como los antecedentes genético- raciales, factores metabólicos, endocrinos y nutricionales entre los más comúnmente observados. Otros de origen extrínseco, de suma importancia, como la exposición a la radiación UV, el uso de ciertos cosméticos y medicinas, especialmente agentes fotosensibilizadores y anticonvulsivos [25-28].

1.3.3.1. *Factores genéticos*

Varios estudios apuntan que el desarrollo de melasma tiene una predisposición genética ya que frecuentemente se observa en varios miembros de una misma familia. En un estudio sobre melasma en las mujeres embarazadas iraníes se encontró que aproximadamente un 55% tenían antecedentes familiares de melasma [29]. Un estudio multicéntrico realizado en India reportó aproximadamente un 30% de antecedentes familiares [24]. El factor racial fue reportado debido a la alta incidencia de melasma en los pacientes hispanos [30]. Aunque la tasa de ocurrencia en diferentes países e incluso dentro del mismo país puede variar ampliamente, la historia familiar está asociada con su aparición.

1.3.3.2. *Radiación UV*

El factor más importante en el desarrollo del melasma es indudablemente la exposición solar, especialmente la radiación UV, tal como demuestra el hecho que las lesiones se localicen exclusivamente en zonas expuestas al sol como la cara. Así, el uso regular de un protector solar de amplio espectro ayuda a la prevención del desarrollo del melasma y mejora de la eficacia de los tratamientos tópicos obstaculizando su progresión. Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que pieles lesionadas por el melasma muestran características propias de la piel dañada por el sol.

La melanogénesis inducida por la radiación UV es mediada por los efectos directos de la radiación UV tanto sobre el ADN como sobre las membranas de los melanocitos. La consecuencia sobre el ADN es una regulación positiva del gen de la tirosina, enzima limitante de la síntesis de melanina. Mientras que el resultado sobre las membranas de melanocitos es la liberación de diacilglicerol (DAG) y ácido araquidónico. El DAG interviene en la activación de la proteína quinasa C (PKC), que es una importante vía de transducción de señal para la regulación de la melanogénesis.

Indirectamente, la radiación UV actúa estimulando la síntesis y liberación de factores epidérmicos derivados de los queratinocitos tales como bFGF, NGF, endotelina-1 y los péptidos derivados de POMC como α -MSH y ACTH. Estos factores provocan variablemente la mitosis de los melanocitos, aumentan la melanogénesis, mejoran la densidad y evitan la muerte celular por apoptosis después de la lesión UV. Por lo tanto, los procesos que se dan dentro de la unidad melano-epidérmica intentan mantener o aumentar el número de melanocitos, aumentar la producción de melanina por célula, y mejorar la transferencia de melanina a través de la epidermis [24,28,31-33].

1.3.3.3. Hormonas sexuales femeninas

El melasma se da más frecuentemente en mujeres que en hombre aunque de los datos epidemiológicos se extraiga que la relación entre mujeres y hombre depende del país: 21: 1 en Singapur [34] y 4: 1 en la India [24]. Este claro predominio en mujeres junto al empeoramiento durante el embarazo y con el uso de anticonceptivos orales sugiere un rol importante de las hormonas sexuales femeninas sobre el origen y evolución del melasma.

En el embarazo, especialmente en el tercer trimestre, el aumento de los niveles de hormonas de la placenta, ovario y pituitaria puede justificar la aparición o empeoramiento del melasma. Así mismo, el aumento de la hormona estimulante de melanocitos (MSH), estrógeno y la progesterona conducen al aumento de la transcripción de la tirosinasa y dopacromo, que pueden estar implicados en el desarrollo de la pigmentación en esta fase.

Los efectos biológicos de los estrógenos y de la progesterona están mediados por sus respectivos receptores que se expresan en la piel humana. Los estudios sugieren que los estrógenos actúan sobre los receptores, de una manera no genómica, en los melanocitos, induciendo la pigmentación. Aumentan la expresión de tipo melanocortina 1 receptores (MC1R) en melanocitos cultivados implicado en la patofisiología del melasma. Además, promueven el aumento de la expresión del gen PDZK1, lo que conduce a la transcripción de la tirosinasa, a pesar de que no cambian el número de melanocitos y / o queratinocitos.

En los hombres, altos niveles de hormona luteizante (LH) y niveles bajos de testosterona fueron identificados en un estudio clínico con 15 hombres con melasma en India [35]. En Francia, se informó del caso de un hombre con hipogonadismo, con

altos niveles de LH y FSH y bajos niveles de testosterona, que desarrolló melasma facial [25].

1.3.4. TRATAMIENTO

El tratamiento del melasma está dirigido a la protección de la radiación UV, a la inhibición de la proliferación de melanocitos y tanto a la síntesis de melanina como su eliminación. Existen diferentes modalidades terapéuticas para el tratamiento del melasma que se pueden dividir en dos categorías: tratamientos tópicos y tratamientos físicos, los cuales deberán incluir la fotoprotección [23,36-37].

1.3.4.1. Tratamientos tópicos

En general, los tratamientos tópicos están dirigidos a la interrupción de una o más etapas del complejo proceso que da como resultado la pigmentación: proceso enzimático de la síntesis de melanina en los melanocitos, formación de los melanosomas y su transferencia a los queratinocitos (Figura 1.8, Tabla 1.1) [38-40].

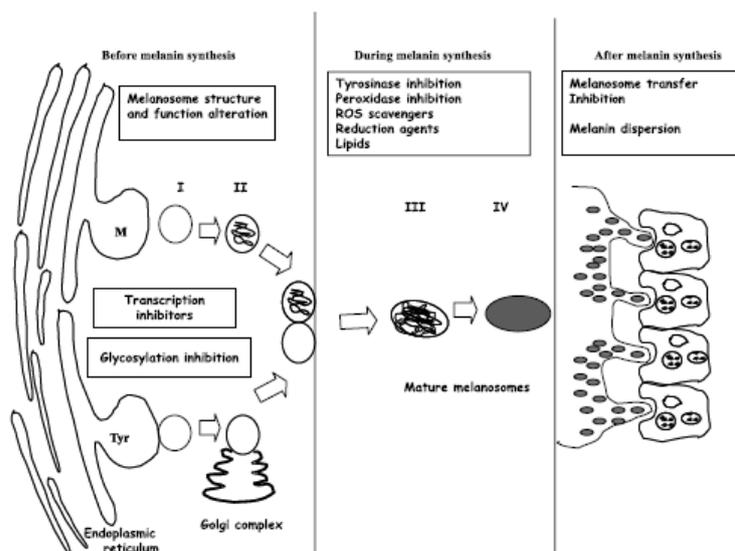


Figura 1.8 Ilustración esquemática de las posibles rutas de interferencia con la melanogénesis [39]
 Tyr, tirosinasa; M, melanosomas; ROS, especies reactivas de oxígeno.

I. Antes de la regulación de la melanina

a. Regulación de la transcripción de la tirosinasa

La transcripción de genes que codifican la tirosinasa y la TRP-1 está controlada por factor de transcripción microftalmia (MITF). El MITF está regulado por diferentes vías de señalizado. Entonces, cualquier agente que potencialmente pueda regular estas

CAPÍTULO 1: FISIOPATOLOGIA DEL MELASMA

vías de señalización también podrá afectar al MIFT y por tanto, a la melanogénesis. Algunos de estos agentes son TGF- β 1, TNF- α , C2-ceramidas, ácido lisofosfatídico, tretinoína [39,40].

Tabla 1.1 Relación entre compuestos y su mecanismo de despigmentación

Mecanismo de acción	Compuesto
Inhibición de la síntesis de melanina	
<i>Antes</i>	
Regulación de la transcripción de la tirosinasa	Tretinoína, ácido lisofosfatídico, TGF- β 1, TNF- α , C2-ceramidas
Inhibición de la maduración de la tirosinasa	Glucosamina, glutatión
<i>Durante</i>	
Inhibición de la actividad de la tirosinasa mediante sustratos alternativos	Hidroquinona y derivados, mequinol, ácido gentístico, N-acetil-4-S-cisteaminifenol, arbutina/desoxiarbutina, ácido azelaico, aloesina
Inhibición de la actividad de la tirosinasa mediante quelación del Cu del sitio activo	Ácido kójico, flavanoides, ácido ascórbico, vitaminas B, C y E
Inhibición de la actividad de la tirosinasa mediante degradación de la tirosinasa	Ácido elágico, resveratrol/desoxiresveratrol
<i>Después</i>	
Control post-transcripcional de la tirosinasa	Ácidos grasos insaturados
Inhibición de la transferencia de melanosomas del melanocito al queratinocito	Retinoides, niacinamida, inhibidores de PAR-2, lectinas y neoglicoproteínas, centauredin y methylopiopogonanone B
Otros mecanismos	
Agentes antioxidantes	Ácido ascórbico, α -tocoferol
Estimulación de la recambio epidérmico	Retinoides, α -hidroxiácidos, ácido salicílico, ácido linoleico, liquirtin

b. Inhibición de la maduración de la tirosinasa

La principal modificación post-translacional de la tirosinasa es la glicosilación durante la translocación en el RE, siendo crítica para su correcta maduración. El tratamiento

con varios agentes inhibidores de la glicosilación puede dar como resultado una regulación negativa de la actividad enzimática en el melanosoma así como una reducción en la maduración del melanosoma.

La glucosamina, inhibidor específico de la glicosilación de lípidos de la proteína, da como resultado una reducción de la pigmentación así como aberraciones tanto estructurales como bioquímicas en los melanosomas.

El glutatión induce la inhibición de la glicosilación bloqueando la maduración y transferencia de la tirosinasa desde (RE-aparato de Golgi) al premelanosoma. Otro mecanismo de acción propuesto para el glutatión es la directa inactivación de la tirosinasa mediante la quelación del Cu en el sitio activo de la tirosinasa [39-41].

II. Durante la síntesis de melanina

a. Inhibidores de la actividad de la tirosinasa

La tirosinasa es una enzima que cataliza los dos primeros pasos de la melanogénesis: la hidroxilación de L-tirosina a L-DOPA y la oxidación de ésta a DOPA-quinona, utilizando como oxidante el oxígeno molecular.

Es una cuproglicoproteína en la que en su centro activo hay una pareja de iones Cu acoplados y unidos a la proteína mediante 6 histidinas. El Cu puede encontrarse en dos estados de oxidación que en función de si la enzima se encuentra unida a un O o no, puede dar lugar a 3 especies de tirosinasa: oxi-tirosinasa, met-tirosinasa y deoxi-tirosinasa [39-41].

La inhibición de la tirosinasa puede realizarse mediante los siguientes sustancias:

- Compuestos polifenólicos, con estructuras similares a la tirosina, actúan como sustratos alternativos de la tirosinasa: hidroquinona, monobenzil éter de hidroquinona, mequinol, ácido gentístico, N-acetil-4-S-cisteaminilfenol, arbutina/deoxiarbutina, ácido azeláico, aloesina.
- Compuestos que inactivan la tirosinasa mediante la quelación de los átomos de Cu existentes en el sitio activo de la enzima: ácido kójico, flavanoides, vitamina C, vitamina E, vitamina B, antioxidantes y agentes reductores
- Compuestos que degradan la tirosinasa: ácido elágico, hidroxiestilbenos tales como resveratrol y desoxiresveratrol.

III. Después de la síntesis de la melanina

a. Control post-transcripcional de la tirosinasa

El control post-transcripcional de las enzimas melanógenas es probablemente ejercido por sustancias capaces de regular la síntesis de melanina sin afectar a la expresión de las proteínas melanógenas. Es decir, mediante un aumento de la degradación de las proteínas de la tirosinasa.

Los ácidos grasos insaturados, tales como ácido oleico, ácido linoleico y ácido α -linolénico, eliminan la pigmentación disminuyendo la cantidad de la tirosinasa mediante el aumento de la tirosinasa ubiquitinación y la degradación por el proteasoma. Simultáneamente favorecen la descamación de la melanina de la epidermis [42].

b. Inhibidores de la transferencia del melanosoma al queratinocito

El proceso pigmentario depende de la síntesis de melanina pero también de procesos críticos posteriores que se dan dentro del melanosoma como son la transferencia de los melanosomas de los melanocitos a los queratinocitos y su comportamiento dentro de los queratinocitos receptores. El éxito de la transferencia de los melanosomas a los queratinocitos vecinos obedece a la formación de las dendritas del melanocito y su extensión hacia los queratinocitos que requerirán de la reorganización, por parte de las GTPasas Rho, Rac Cdc42, de los elementos del citoesqueleto de los melanocitos tales como los filamentos de actina y los microtúbulos [39].

Los compuestos que inducen la inhibición de la transferencia son [38,39,41]:

- Retinoides: tretinoína. Los retinoides son agentes hipopigmentantes debido a que inducen la dispersión de los gránulos de melanina, interfieren en la transferencia de melanina, aceleran el recambio epidérmico, reducen la cohesión de los corneocitos e inducen la descamación.
- Centaureidin y Methylophiopogonanone B: estos dos compuestos activan la proteína Rho (familia de pequeñas GTPasas) que actúa como regulador de la formación de dendritas y de la reorganización de la actina del citoesqueleto dando lugar a la retracción dendrítica.
- Niacinamida: actúa como precursor de las dos coenzimas más importantes (NAD y NADP) del organismo. Interviene en numerosas reacciones de óxido-reducción en las que actúa fundamentalmente como antioxidante. Además,

disminuye la transferencia de los melanosomas de los melanocitos hacia los queratinocitos. Esta inhibición es un proceso reversible y dependiente de la dosis de niacimanida.

- Inhibidores de PAR-2: la inhibición de PAR-2 (receptores activados por proteasa 2) en los queratinocitos conduce a la acumulación de melanosomas en el melanocito. Por lo tanto, la inhibición de este receptor puede bloquear la transferencia entre estas células y por lo tanto la dispersión de pigmento a los queratinocitos.
- Lectinas y neoglicoproteínas: las lectinas y sus glicoconjugados interfieren la maduración de los melanosomas e inhiben la transferencia de los melanosomas evitando el necesario tráfico intracelular, la endocitosis y el reconocimiento celular entre melanocitos y queratinocitos.

IV. Otros mecanismos

a. Agentes antioxidantes

Los antioxidantes, y en general los compuestos con propiedades redox, muestran efectos despigmentantes debido a la interacción con las o-quinonas, evitando así la polimerización oxidativa de los intermedios de la melanina, o con el Cu del sitio activo de la tirosinasa. Además, estos compuestos pueden regular el proceso de señalización de la melanogénesis mediante el barrido de especies reactivas de oxígeno (ROS), formados en la piel a consecuencia de la exposición a los rayos UV. Entre otros, la vitamina C (ácido ascórbico) puede interferir en la melanogénesis debido a la interacción con los iones Cu de la tirosinasa, la reducción de la DOPA-quinona y el bloqueo de la oxidación de DHICA. Las propiedades oxidantes de α -tocoferol afectan a la peroxidación lipídica de las membranas y aumenta el contenido de glutatión intracelular [42].

b. Aumento del recambio epidérmico

La pérdida de melanina en la epidermis también se puede obtener mediante la estimulación de la descamación de las células del estrato córneo. La familia de compuestos retinoides son la más importante ya que su mecanismo de acción involucra la interrupción de la transferencia de melanosomas, inhibiendo la dispersión de los melanosomas en los queratinocitos y reduciendo la cohesión de los corneocitos, lo que acelera el recambio epidérmico por descamación. Otros compuestos que actúan

de la misma forma son los α -hidroxiácidos como el ácido láctico y el ácido glicólico, ácido salicílico, ácido linoleico y liquirtin, procedente del extracto de licorice [36,39].

1.3.4.2. Tratamientos físicos

Son exfoliaciones profundas que pretenden eliminar la melanina existente en epidermis y la dermis. Una de las diferencias entre los distintos métodos de exfoliación, es el grado de profundidad al que pueden llegar en este barrido: algunos lo hacen sólo a nivel de la epidermis y otros llegan hasta la capa media, la dermis [36-39].

I. Peelings

Los peelings químicos pueden mejorar los trastornos de hiperpigmentación eliminando la melanina existente. Generalmente, se usan peelings superficiales que no llegan a destruir la dermis. En los casos en que se realizan peelings profundos pueden causar irritación que puede conducir a hiperpigmentación postinflamatoria y eritema persistente. Este efecto es especialmente común en pacientes de pieles oscuras (fototipos V- VI) ya que puede darse incluso con peeling superficiales. Los peelings más usados son los de ácido glicólico, ácido salicílico, tricloroacético, tretinoína, ácido kójico y la solución Jessner. Todos estos se deben combinar con un tratamiento despigmentante tópico para maximizar el beneficio y minimizar el riesgo de la aparición de la hiperpigmentación postinflamatoria.

II. Láser

Diferentes tipos de láseres y fuentes de luz pulsada intensa han sido probados para el tratamiento del melasma. Se ha demostrado un empeoramiento del melasma al usar los láseres de rubí Q-switched y de Nd:YAG. Tampoco parece ser beneficiosa la combinación del láser de dióxido de carbono con el láser de alejandrita Q-switched comportando además un riesgo significativo de empeoramiento de la hiperpigmentación en pacientes de piel más oscura. El único láser aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento del melasma es el láser fraccionado con fibra de erbio siendo su mecanismo la eliminación de melanina así como de los melanocitos en las áreas de piel tratadas.

III. Dermoabrasión

En los últimos tiempos la microdermoabrasión se está utilizando con muy buenos resultados. La microdermoabrasión consigue cambios similares a los peeling

superficiales pero de una manera menos agresiva permitiendo retornar a las tareas habituales inmediatamente.

2. HIDROQUINONA (HQ)

La HQ ha sido el despigmentante más popular durante más de 50 años, introducido en su uso clínico desde 1961. Se ha utilizado con éxito para tratar melanosos.

2.1. CARACTERÍSTICAS FISICO-QUÍMICAS

La HQ, p-dihidroxifenol o quinol, es un compuesto orgánico aromático fenólico, de fórmula molecular $C_6H_6O_2$ y su número CAS es 123-31-9. Su estructura química (Figura 2.1) contiene dos grupos hidroxilo unidos a un anillo bencénico en posición para.

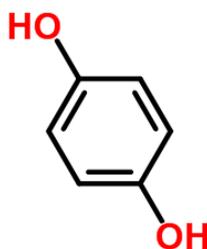


Figura 2.1 Estructura molecular HQ [43]

- Es un sólido cristalino blanco cuyo peso molecular es 110,11 g/mol, con una temperatura de fusión de 170 °C. Químicamente, tiene un carácter ácido con una pK_a :10,33 y es muy polar con $\log P$:0,62. De solubilidad elevada en agua, soluciones acuosas (independientemente de pH) y disolventes orgánicos polares [43,44].
- La HQ aparece descrita como monografía en United States Pharmacopeia – National Formulary (USP-NF) [45] y en Clarke's [46].

2.2. MECANISMO DE ACCIÓN

- Tal y como se ha dicho en el capítulo anterior, la HQ actúa como sustrato alternativo de la tirosinasa debido a la similitud estructural entre ella y los precursores melanogénicos siendo el requisito principal para ser un sustrato alternativo de tirosinasa la presencia de un grupo hidroxilo y un grupo donador de electrones en posición *para* [38].

- La HQ interacciona con la tirosinasa de los melanocitos epidérmicos hiperactivos impidiendo la conversión de L-DOPA en melanina. Esta interacción regula la inhibición de la tirosinasa a través del enlace covalente con histidinas o con el Cu del sitio activo de la enzima. Los productos de oxidación son las quinonas y los ROS que conducen a un daño oxidativo de las membranas de lípidos y proteínas, como la tirosinasa. El glutatión, como antioxidante celular, intenta minimizar este daño oxidativo conduciendo a su agotamiento lo que contribuye a la acción despigmentante de la HQ. Asimismo, la HQ también puede interferir en la pigmentación a través de la inhibición de la síntesis de ADN y ARN, la alteración de la formación de melanosomas y la dispersión de melanina [38,39].

2.3. ASPECTOS FARMACOLOGICOS Y CLÍNICOS [47,48]

2.3.1. INDICACIONES TERAPEUTICAS

- Hiperpigmentaciones cutáneas: melasma, cloasma, léntigo senil, pecas (efélides).

2.3.2. FARMACOCINÉTICA

- Administración por vía tópica: la aplicación de HQ sobre pequeñas superficies cutáneas, su absorción lenta a través de la piel ($0,55 \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) y su rápida excreción urinaria no hacen previsible que la absorción pueda producir efectos sistémicos.

2.3.3. POSOLOGIA

No utilizar en niños menores de 12 años. En adultos y niños mayores a 12 años:

- HQ 2%: aplicar una pequeña cantidad de producto 2 veces al día (mañana y noche) exclusivamente sobre la mancha o zona afectada, hasta obtener el efecto deseado, para lo que pueden ser necesarias varias semanas de tratamiento. Evitar siempre el contacto con los ojos y mucosas.
- HQ 4%: aplicar una pequeña cantidad de producto 2 veces al día (mañana y noche) exclusivamente sobre la mancha o zona afectada, duración recomendada, 60-90 días. Si no mejoría tras 2 meses de tratamiento, interrumpir. Duración máxima 6 meses. Evitar siempre el contacto con los ojos y mucosas.

2.3.4. EFECTOS ADVERSOS

- Frecuentes: eritema (enrojecimiento), escozor y, menos frecuentemente, sensibilización cutánea. Si estas manifestaciones no desaparecen en el término de una semana, debe suspenderse el tratamiento.
- Ocasionales: hipersensibilidad cutánea. Si estas manifestaciones no desaparecen en el término de una semana, debe suspenderse el tratamiento. Si se utilizara en tratamientos muy prolongados, podría darse una reacción de hiperpigmentación cutánea.
- Raras: en tratamientos prolongados (más de 6 meses), se ha observado ocronosis, principalmente en individuos de raza negra. En casos aislados se ha observado leucodermia. No se han descrito efectos adversos sistémicos.

2.3.5. INTERACCIONES

Puede producir coloración temporal de piel con peróxidos (agua oxigenada, peróxido de benzoilo, etc.).

2.3.6. EMBARAZO Y LACTANCIA

Los estudios en animales no han revelado efectos teratogénicos a dosis atóxicas para las madres. De todas formas, evitar ya que no se ha establecido la seguridad del uso tópico de HQ en el embarazo ni en la lactancia.

2.3.7. SOBREDOSIS

Si se utiliza más producto del necesario, debido a su uso externo, no es probable que se produzcan cuadros de intoxicación.

En caso de ingestión accidental pueden producirse manifestaciones serias de toxicidad sistémica similares a las del fenol. La ingestión oral de 5-15 g de HQ producen temblores, convulsiones y anemia hemolítica. Se recomienda realizar un lavado de estómago.

En caso de sobredosis o ingestión accidental, consultar al Servicio de Información Toxicológica. Teléfono 91 562 04 20, indicando el medicamento y la cantidad ingerida.

2.3.8. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

- Mantener el envase fuera del alcance y de la vista de los niños. Mantener el envase perfectamente cerrado después de cada aplicación. Conservar protegido de la luz.
- No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en la caja y en el envase.

2.4. FORMULACIÓN

Debido a los riesgos de efectos adversos tales como ocronosis exógena y leucodermia después de su uso a largo plazo, la HQ fue prohibida por el Comité Europeo (24th Commission Directive 2000/6/CE). Las formulaciones cosméticas fueron retiradas y solo está disponible en formulaciones de prescripción médica [49].

La concentración de HQ en formulaciones va desde el 2% al 5% pero aunque es más efectiva a más alta concentración, también causa más irritación.

Aunque la monoterapia de HQ puede ser efectiva en tratamientos despigmentantes, la mayoría de formulaciones contienen otros componentes que promueven un efecto sinérgico para aumentar la eficacia. Una de estas formulaciones es la compuesta por HQ y un corticosteroide para reducir la inflamación, tretinoína, que muestra una reducción de la atrofia asociada y elimina la pigmentación mediante el aumento del recambio de queratinocitos y la penetración de la HQ [36,50]. Y triples combinaciones como la de HQ con tretinoína y acetónido de fluocinolona [50] o con furoato de mometasona [51-55].

2.5. ANTECEDENTES Y PARONAMA ACTUAL

2.5.1. REVISIÓN DE LA SEGURIDAD

Algunos autores defienden la detención del uso de la HQ como agente despigmentante basándose en el riesgo de efectos cancerígenos a largo plazo [56,57].

Otros autores, en cambio, revisaron los datos referentes a la seguridad del tratamiento de la hiperpigmentación con HQ. No encontraron ningún dato que evidenciase un peligro real concluyendo que los datos disponibles hasta el momento sugieren el uso razonable de la HQ para el tratamiento de la hiperpigmentación [58,59].

2.5.2. LEGISLACIÓN

Por todo lo explicado anteriormente, en el marco de la Unión Europea el uso de HQ en productos cosméticos está prohibido desde marzo de 2000 por la Directiva 2000/6/CE, quedando su uso restringido a medicamentos [49].

En 2006 la FDA rescindió el término GRASE (generalmente reconocida como segura y eficaz) propuesto para la HQ. Así proponían la prohibición de todas las formulaciones OTC y que todas las nuevas formulaciones que contenían HQ tendrían que someterse a la revisión como todos los nuevos medicamentos. En el 2009, la FDA recomienda llevar a cabo estudios preclínicos (con animales pigmentados) de fertilidad y toxicidad para la reproducción, la absorción dérmica, carcinogenicidad y la ocurrencia de ocrónosis exógena ya que los datos hasta la fecha eran insuficientes para tomar una determinación final sobre el riesgo toxicológico de la HQ. En términos de cáncer y mutaciones genéticas, la FDA no mencionó estudio alguno o revisión adicional para apoyar sus inquietudes actuales o anteriores, y señaló que la evidencia en estudios con modelo animal fue contradictoria. Además, la propia FDA reconoció que en un examen se mostró que únicamente 789 casos de ocrónosis habían sido reportados en todo el mundo desde 1955 hasta 2006. Por tanto, la condición de efectos adversos raros fue apoyada. A día de hoy, la FDA aún tiene que tomar una decisión al respecto [60,61].

3. ÁCIDO KÓJICO (KA) Y DIPALMITATO KÓJICO (DPK)

El ácido kójico es una de las sustancias despigmentantes más usadas en la industria cosmética y farmacéutica. Es usado siempre en combinación con otras sustancias despigmentantes gracias a su efecto sinérgico y en algunas ocasiones alguna de estas combinaciones es utilizada como estándar positivo en estudios de descubrimiento de nuevos inhibidores de la tirosina por su comprobada eficacia [40,62-65].

3.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

El ácido kójico (KA), 5-hidroxi-4-piran-4-ona-2-metil, es un metabolito fúngico derivado de diversas especies fúngicas tales como *Acetobacter*, *Aspergillus*, *Penicillium* [40,66]. Es un compuesto aromático fenólico de estructura similar a los sustratos alternativos para tirosinasa (Figura 3.1). Es utilizado como antioxidante y despigmentante alternativo a la HQ [39]. Sin embargo, el KA se oxida lábilmente frente a luz y temperatura (mayor a 40 °C), provocando un cambio de color de blanco a rosado [62,67]. Para evitar este problema, se empieza a usar un derivado más estable: dipalmitato kójico (DPK) (Figura 3.2) con propiedades despigmentantes, de carácter liposoluble y estable frente a temperatura y luz [62].

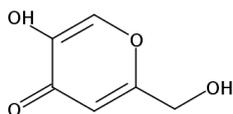


Figura 3.1 Estructura molecular de KA [68]

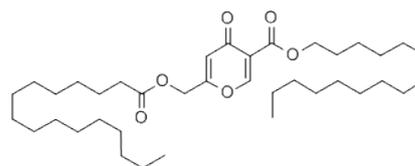


Figura 3.2 Estructura molecula de DPK [69]

Las propiedades de cada uno de estos compuestos [68,69] se sintetizan en la Tabla 3.1. Ninguno de los dos compuestos esta descrito en ninguna farmacopea o compendio de sustancias de uso farmacéutico.

3.2. MECANISMO DE ACCIÓN

La tirosinasa es una cuproglicoproteína que contiene dos iones Cu unidos a tres histidinas en el centro activo y una larga cadena lipofílica cerca de éste. El KA inhibe la actividad de la tirosinasa formando un quelato con el ion Cu a través de los grupos 5-

CAPÍTULO 3: ÁCIDO KÓJICO Y DIPALMITATO KÓJICO

hidroxil y 4-carbonil. También actúa como antioxidante y previene la conversión de L-DOPA en melanina a través de la inhibición de la actividad catecolasa de la tirosina implicando la supresión de la tautomerización de DOPA-cromo a DHICA. Asimismo, los melanocitos tratados con ácido kójico no desarrollan las dendritas, y su contenido en melanina es inferior. Además, se neutralizan las ROS liberadas en exceso de las células epiteliales [70-72].

Tabla 3.1 Características físico-químicas de KA y DPK [68,69]

Propiedades	KA	DPK
CAS	501-30-4	79725-98-7
F. Molecular	C ₆ H ₆ O ₄	C ₃₈ H ₆₆ O ₆
Pm (g/mol)	142,11	618,93
T _{melting} (°C)	154	96
pKa	8,05	-
logP	-0,66	13,97
Solubilidad	Solubilidad elevada en agua, soluciones acuosas (independientemente de pH) y disolventes orgánicos polares	Liposoluble

Por otra parte, para superar el problema de la inestabilidad del KA, se ha diseñado un profármaco del KA modificándolo por enlace éster: dipalmitato kójico. La penetración en la piel es mejor debido a su alta lipofiliidad y consecuentemente, su difusión en el estrato córneo, mayor. Inmediatamente después es hidrolizado a KA por las carboxiesterasas. En consecuencia, se da una liberación in situ de KA y por tanto, quien actúa como despigmentante es el KA [73,74].

3.3. ASPECTOS FARMACOLOGICOS Y CLÍNICOS [63,75-78]

Todos los aspectos farmacológicos y clínicos indicados a continuación son válidos tanto para el KA como para el DPK.

3.3.1. INDICACIONES TERAPEUTICAS

Hiperpigmentaciones cutáneas: melasma, cloasma, léntigo senil, pecas (efélides).

3.3.2. FARMACOCINÉTICA

Administración por vía tópica: aplicación de KA sobre pequeñas superficies cutáneas. La absorción dérmica es de 0,75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Mientras que el DPK debido a su naturaleza lipofílica y a su grupo éster es más fácilmente absorbido por la piel [75-77].

3.3.3. POSOLOGIA

- Concentración de KA en productos cosméticos: 1-4%
- Concentración de DPK en productos cosméticos: 1-4%

Aplicar una pequeña cantidad de producto 2 veces al día (mañana y noche) exclusivamente sobre la mancha o zona afectada. Debe aplicarse durante al menos 3 meses para que su efecto sea completo, empezando a observarse los resultados en las dos o tres primeras semanas.

3.3.4. EFECTOS ADVERSOS

Durante las dos primeras semanas de aplicación es posible que las manchas oscurezcan transitoriamente por el efecto de limpieza que ejerce el producto en la piel. Evitar el contacto con los ojos y si ocurre, lavarse inmediatamente con agua.

Las personas de piel morena son más sensibles a la aplicación de cremas que contienen KA. En estos casos, se recomienda mezclar en la yema de los dedos un par de gotas de crema de KA con una crema hidratante y un filtro solar y aplicar esta mezcla sobre las manchas.

Además, puede causar prurito, eritema, descamación y sequedad de la piel, siendo éste un fenómeno atípico. En estos casos se recomienda discontinuar el tratamiento o aplicar solo una vez por día.

3.3.5. INTERACCIONES

Puede producir coloración temporal de piel con peróxidos (agua oxigenada, peróxido de benzoilo, etc.) o ciertos abrasivos como el ácido salicílico o la tretinoína.

3.3.6. EMBARAZO Y LACTANCIA

No existen datos reportados que determinen el potencial carcinogénico ni mutagénico del KA. De todos modos, no se recomienda el uso de KA durante el embarazo o lactancia por no existir a la fecha estudios que lo avalen.

3.3.7. SOBREDOSIS

Si se utiliza más producto del necesario, debido a su uso externo, no es probable que se produzcan cuadros de intoxicación.

En caso de sobredosis o ingestión accidental, consultar al Servicio de Información Toxicológica. Teléfono 91 562 04 20, indicando el medicamento y la cantidad ingerida.

3.3.8. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

- Mantener el envase fuera del alcance y de la vista de los niños. Mantener el envase perfectamente cerrado después de cada aplicación. Conservar en un lugar fresco y seco, entre 15 y 30 °C.
- No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en la caja y en el envase.

3.4. FORMULACIÓN

Actualmente se comercializan diferentes formulaciones de KA y DPK en combinación con otras sustancias despigmentantes llamados cosmeceúticos, algunas de las cuales [78]:

- Kojicol® crema despigmentante SPF20 Sesderma: DPK 2%, glucosamina 1%, otros.
- Kojicol® gel despigmentante Sesderma: ácido glicólico 4%, ácido kójico 3%, otros.
- Kojicol® Plus Gel despigmentante Sesderma: ácido glicólico 8%, ácido kójico 5%, otros.
- Martiderm® crema despigmentante SPF50: ácido elágico, ácido kójico y otros.
- Neostrata® gel despigmentante: ácido glicólico, ácido kójico y otros.
- La Roche Posay Mela D SPF15: ácido kójico, filtros UVB y otros.
- Pack despigmentante Crema puntual + serum aclarador Atache®: glabridina, DPK y otros.
- Melastar® crema SPF15: DPK, gayuba y otros.
- Ten Image® crema despigmentante: DPK, gayuba y otros.

4. FORMAS FARMACEUTICAS DE ADMINISTRACIÓN TÓPICA

4.1. INTRODUCCIÓN [79-84]

Las formas farmacéuticas de administración tópica se aplican sobre la piel o sobre ciertas mucosas, con el fin de ejercer una acción local o dar lugar a la penetración percutánea/absorción cutánea de principios activos, como en el caso de los sistemas terapéuticos transdérmicos (TTS). Las formas farmacéuticas tópicas de acción local (no sistémica), se utilizan para tratamiento de trastornos en la superficie de la piel y las capas más profundas, como es el caso del melasma.

Éstas se presentan en diferentes formas de dosificación tales como pomadas, pastas, geles, ungüentos y cremas, todas ellas de aspecto homogéneo [83].

- Pomadas: son preparaciones formadas por una base de una sola fase, principalmente de naturaleza grasa (>50%) y conteniendo como máximo un 20% de agua y compuestos volátiles, en la que se pueden dispersar sustancias sólidas o líquidas.
- Pomadas: constan de una base en una sola fase en la que se pueden dispersar sustancias sólidas o líquidas y se clasifican según la cantidad de agua que pueden absorber: pomadas hidrófobas < pomadas que emulsionan agua < pomadas hidrófilas.
- Geles: están formados por líquidos gelificados con la ayuda de agentes gelificantes apropiados. Se clasifican en dos grandes grupos: geles lipófilos (constituidos por sustancias oleosas) y geles hidrófilos (constituidos por agua).
- Cremas: preparaciones multifásicas constituidas por una fase lipófila y una fase acuosa, estabilizados generalmente por unos agentes adecuados (emulgentes).

4.2. CREMAS

4.2.1. DEFINICIÓN [81-88]

Las cremas son emulsiones semisólidas para la aplicación externa. Una emulsión es un sistema disperso de dos líquidos inmiscibles entre ellos, uno de los cuales es dispersado en forma de gotitas (fase interna o discontinua) dentro del otro (fase externa o continua) y estabilizado mediante la adición de un agente emulgente adecuado. El tamaño de las gotitas de la fase interna varía entre 0,5 y 100 μm .

Las emulsiones son sistema termodinámicamente inestables ya que su formación es el resultado de dos procesos competidores: la dispersión de un líquido en otro en forma de gotitas mediante agitación y la unión de estas gotitas para formar los dos líquidos inmiscibles iniciales. El primer proceso, la subdivisión de la fase dispersa en forma de gotitas, incrementa de forma notable la superficie y consecuentemente, la energía libre del sistema – energía de Gibbs – de la siguiente forma:

$$\Delta G_f = \gamma A - T\Delta S_f$$

La energía asociada con el gran aumento de área interfacial de las gotitas en el interior de la emulsión viene dada por el factor $\gamma \cdot A$; donde A es la superficie total de las gotitas y γ la tensión interfacial entre las dos fases (entre 1-10 mN/m). Mientras que la entropía de formación de una emulsión es relativamente pequeña, a menos que las gotas sean muy pequeñas y numerosas. Esto hace que $\Delta G_f > 0$, por lo que el proceso no es espontáneo, es decir, necesita la aportación de energía.

El segundo proceso es espontáneo. Las gotitas dispersas en la fase externa tenderán a unirse ya que las fuerzas de atracción entre moléculas de un mismo tipo son mucho más grandes que las fuerzas de atracción entre moléculas diferentes. El resultado será la separación de fases, estado de menor energía libre superficial, flotando la fase lipófila sobre la hidrófoba debido a su menor densidad.

Para favorecer la formación y estabilidad de una emulsión se debe adicionar uno o varios emulgentes a la formulación. Los emulgentes son compuestos anfipáticos que tienen una cabeza polar (parte hidrófila) y una cola apolar (parte lipófila). Estos compuestos se adsorben a la superficie de contacto de las gotitas disminuyendo la tensión de la interfase (Figura 4.1).

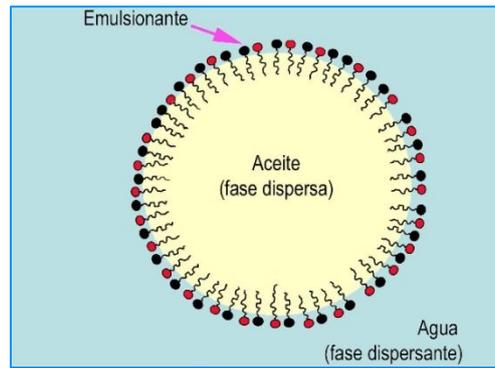


Figura 4.1 Emulsión O/W [89]

Las cremas tienen aspecto semisólido, opaco y homogéneo. De consistencia blanda y flujo newtoniano o pseudoplástico por su alto contenido en agua. Sus propiedades dependerán del tipo de emulsión, básicamente de la fase externa:

- Hidrófilas (emulsiones O/W o de fase externa acuosa): las gotitas oleosas de la preparación se sitúan dentro de la fase acuosa y los emulgentes utilizados son del tipo o/w (jabones sódicos, trietilamina, alcoholes grasos sulfatados). Se absorben rápidamente en la piel con facilidad, la parte acuosa se evapora generando un efecto refrescante, la fase oleosa engrasa la piel, levemente oclusivas, lavables y son un vehículo para sustancias hidrosolubles. Tienen un efecto emoliente, refrescante y humectante. Cosméticamente aceptable.
- Hidrófobas (emulsiones W/O o de fase externa oleosa): La fase interna consiste en gotitas de agua rodeadas por la fase oleosa. Actúan como los aceites contribuyendo a la hidratación de la piel: no se absorben con tanta rapidez en la piel y tienen un efecto oclusivo que reduce la pérdida transepidérmica de agua en la piel. No son lavables, pueden aplicarse sobre áreas pilosas y son vehículos para sustancia liposolubles.

4.2.2. COMPONENTES DE LAS CREMA [86,87,90,91]

4.2.4.1 Fase acuosa

La fase acuosa es la parte de la emulsión constituida por el agua y por los demás ingredientes hidrofílicos de la emulsión. En ella se incorporan:

- La mayoría de agentes humectantes (glicerina, propilenglicol, sorbitol, etc.) que reducen o impiden la pérdida de agua por evaporación en las emulsiones del tipo O/W principalmente.

- Espesantes, generalmente coloides hidrófilos, que incrementan la consistencia de las emulsiones tipo O/W y mejoran, asimismo, la estabilidad del producto.
- Conservantes ya que hongos y bacterias se propagan y reproducen preferentemente en medios acuosos. Esto no excluye la incorporación de otros conservantes en la fase oleosa.
- Antioxidantes que son necesarios cuando alguno de los componentes de la fase oleosa o principio activo es sensible a la oxidación.
- Otros componentes pueden ser: electrolitos, reguladores de pH, promotores de absorción, etc.

4.2.4.2 Fase oleosa

Constituida por un grupo de sustancias lipófilas de diferente naturaleza y polaridad que definen el *feeling* de la formulación una vez aplicada sobre la piel y cuya función es aportar emolencia, es decir, suavidad a la piel. Debido a que esta fase queda adherida a la piel, otras de sus funciones son la de actuar como modulador del grado de oclusividad de la emulsión y como disolvente transportador de principios activos liposolubles.

Entre los posibles componentes de la fase oleosa, deben resaltarse los siguientes:

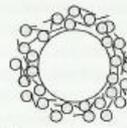
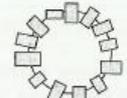
- Parafinas y vaselinas: son diluyentes de otros componentes de naturaleza poco polar que confieren a la formulación oclusividad y emolencia.
- Aceites vegetales: integrados por triglicéridos, ácidos grasos libres saturados o insaturados poseen acción emoliente.
- Ceras: aumentan considerablemente la viscosidad de la fase.
- Alcoholes grasos: agentes estabilizadores de la emulsión con buenas propiedades emolientes.
- Ácidos grasos y sus ésteres: son buenos emulgentes y aumentan la consistencia de la fase oleosa de forma patente.
- Siliconas: dimeticonas de diferentes grados de polimerización que confieren propiedades muy oclusivas e hidrorrepelentes.

4.2.4.3 Emulgentes

Los emulgentes son compuestos que se adsorben a la superficie de contacto de las gotitas de forma que reducen la tensión superficial entre ellos (fase dispersa o interna) y la fase continua o externa formando una barrera mecánica de separación.

Los emulgentes más importantes son tensioactivos, coloides hidrófilos y ciertas partículas sólidas (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Tipos de emulgentes [86]

TIPO DE EMULGENTE	TIPO DE PELICULA	EJEMPLOS	TIPO EMULSION
Tensioactivos		Aniónicos: estearatos, sulfatos	O/A
		Catiónicos: bromuro de cetiltrimetilamonio	O/A
		No iónicos: derivados del sorbitano	O/A y A/O
Coloides hidrófilos		Naturales: goma arábiga, tragacanto Sintéticos: metilcelulosa	Favorecen O/A
Partículas sólidas		Arcillas coloidales: Bentonita, Veegum Hidróxidos metálicos: Hidróxido de aluminio, Hidróxido de magnesio	-

- Tensioactivos: son sustancias anfífilas con cierta afinidad tanto por la fase dispersa como por la fase continua. Forman una película monomolecular y flexible alrededor de las gotitas de la fase dispersa. Existen 2 tipos de tensioactivos:
 - Iónicos: se forma una doble capa cargada originando repulsión electrostática entre las superficies de los glóbulos que impide su acercamiento y colisión (coalescencia).
 - No iónicos: impiden el acercamiento entre los glóbulos de la fase dispersa por efecto estérico, impidiendo de esta forma la posible coagulación de la fase. Al no ser iónicos son compatibles con los emulgentes aniónicos, catiónicos y anfóteros.
- Coloides hidrófilos: son coloides protectores como gelatina, caseína, acacia, derivados de celulosa entre otros. Todos ellos demuestran poca actividad superficial, se dispersan o se hinchan en agua formando soluciones coloidales que se adsorben en la superficie de contacto formando multicapas

viscoelásticas, resistentes a la ruptura y forman barreras mecánicas contra la fusión de los glóbulos.

- Partículas sólidas: algunos sólidos finamente divididos pueden actuar como emulgentes si son humedecidos preferentemente por una de las fases y poseen suficiente adhesión mutua para formar una película alrededor de los glóbulos dispersos.

Los tensioactivos forman una capa monomolecular que actúa como una barrera interfacial reduciendo la tensión de la interfase debido a que son moléculas que tienen propiedades tanto hidrófilas como hidrófobas. Así, una barrera interfacial más hidrófila favorece las emulsiones O/W, mientras que una barrera más lipófila favorece las emulsiones W/O. Esta propiedad se expresa en el número de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) que puede variar entre valores de 1 (ácido oleico) y 40 (dodecil sulfato sódico). Generalmente, el emulgente utilizado es una combinación de dos emulgentes que poseen un valor medio de HLB entre 9 y 13 para emulsiones O/W y un HLB entre 4 y 7 para emulsiones W/O (Tabla 4.2). Cuando se utiliza un tensioactivo con un valor de HLB igual que el valor de HLB requerido por la fase lipófila se obtiene una emulsión óptima con un tamaño de gota inferior a 0,5 μm , viscosidad mínima y estabilidad máxima.

Para que un coloide hidrófilo o una partícula sólida sean activos como emulgentes tiene que adsorberse o adherirse, respectivamente, en la interfase. Esto implica que deben tener una afinidad equilibrada por ambas fases. Las películas multicapas formadas por los coloides hidrófilos están en solución y por tanto, deben ser parcialmente solubles e insolubles al mismo tiempo porque de no ser así, no se adsorberían sobre la interfase. En el caso de las partículas, si son predominantemente hidrofílicas o hidrofóbicas no funcionan como agente humectante efectivo.

CAPÍTULO 4: FORMAS FARMACÉUTICAS SEMISÓLIDAS

Tabla 4.2 Clasificación y aplicaciones de los tensioactivos

HLB	Características dispersión acuosa	Aplicaciones	Ejemplos
0-4	No se dispersa en agua	Antiespumante	Ácido oleico (HLB:1,0)
4-6	Poco dispersable	Emulsificantes W/O	Monooleato de sorbitano (HLB:4,3)
6-9	Dispersión de aspecto lechoso; tienden a separarse las fases	Agentes humectantes	Monopalmitato de sorbitano (HLB:6,7)
9-10	Dispersión estable de aspecto lechoso	Emulsificante O/W	Monolaureato de sorbitano (HLB:8,6)
10-13	Dispersión translúcida o clara	Detergentes	Polisorbato 85 (HLB:11,0)
13-40	Disolución transparente	Agentes solubilizantes	Lauril sulfato sódico (HLB: 40)

4.2.3. PROCESO DE ELABORACIÓN [87,90-92]

Una vez seleccionados los componentes dependiendo del tipo de emulsión a preparar (O/W o W/O), se procede a preparar la emulsión de la siguiente forma:

- Pesar los componentes de la fase oleosa e introducirlos en un recipiente o reactor.
- Pesar los componentes de la fase acuosa e introducirlos en otro recipiente o reactor.

NOTA: Los emulgentes se pesan en la fase externa del sistema (según regla de Bancroft).

- Calentar la fase oleosa como mínimo a la temperatura de fusión del componente con mayor punto de fusión, bajo agitación moderada para asegurar su homogeneidad.
- Calentar la fase acuosa a la misma temperatura que la fase oleosa, bajo agitación moderada para garantizar su homogeneidad.
- Emulsionar: la preparación de emulsiones se realiza por diferentes métodos en función del tipo de emulsión y de la escala de preparación (Figura 4.2).

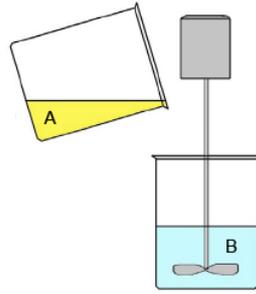


Figura 4.2 Esquema general de elaboración de emulsiones [93]

- Método continuo simple: mezcla directa de las dos fases (A+B).
- Método directo: agregar lentamente la fase interna (A) sobre la externa (B).
- Método de inversión de fases: añadir lentamente la fase acuosa (A) sobre la fase oleosa (B) hasta que se invierte el signo de la emulsión.

La velocidad de adición, velocidad de agitación y la duración del proceso de adición dependerá de las características de cada formulación (Figura 4.3).

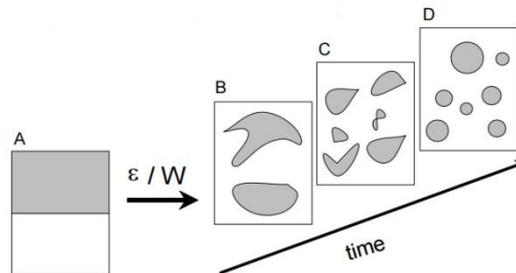


Figura 4.3 Formación de las gotitas de una emulsión [94]

- f) Mantener la agitación durante toda la fase de enfriamiento para estabilizar el sistema.

NOTA: Aquellos componentes termolábiles o volátiles de la fórmula deberán añadirse a la fórmula al final del proceso de enfriamiento.

4.2.4. PROPIEDADES DE LAS CREMAS [88,90, 95-97]

El tipo de emulsión en sí mismo es la propiedad más importante de la propia emulsión ya que como vehículo utilizado para fármacos de aplicación tópica, influye en la liberación y penetración de los principios activos en la piel.

El comportamiento de las emulsiones viene marcado por su composición. Así, las propiedades de las emulsiones pueden variar en función de las cantidades relativas de fase interna/externa y del porcentaje de emulgente usado. Las propiedades más importantes son: tamaño de gotita, aspecto, viscosidad y pH.

4.2.4.1 *Tamaño de gotita: distribución de tamaños*

La distribución de tamaños de gotita de la fase interna es un parámetro muy importante para la estabilidad de las emulsiones. Cuanto menor es el tamaño de gotita y más estrecha su distribución, mayor es la estabilidad de la emulsión. Las gotitas de las emulsiones utilizadas como vehículo de fármacos de aplicación tópica, tienen diámetros que varían entre 1 y 100 μm . Este parámetro define claramente a otras propiedades relacionadas como el aspecto, la viscosidad y la estabilidad, las cuales dependen de ella.

4.2.4.2 *Aspecto*

Las emulsiones tienden a tener un aspecto turbio ya que a medida que la luz pasa a través de la emulsión, atraviesa muchas interfases entre las gotitas y fase externa que la dispersan. Así, el aspecto de las emulsiones depende principalmente del diámetro de la gotita de la fase interna y su concentración en la emulsión debido a que estas gotitas dispersan la luz reflejándola y refractándola creando efectos ópticos conocidos como efecto Tyndall (Tabla 4.3). Este fenómeno es tanto más intenso cuanto menor sea la longitud de onda de la luz; de ahí que del conjunto de los colores que constituyen la luz solar, el azul y violeta son los preferentemente difractados.

El color básico de las emulsiones es el blanco. Si la emulsión es diluida, se da el efecto Tyndall que dispersa la luz siendo la más dispersada (difractada) la luz de menor longitud de onda, por lo que el color de la luz dispersada tiene un tono azulado. Por el contrario, si la emulsión es muy concentrada, el color se distorsiona hacia el amarillo.

Tabla 4.3 Aspecto de la emulsión en función del diámetro de gotita

Tamaño de gota (μm)	Aspecto
> 500	Macroglóbulos visible
500 – 1	Blanca
1 – 0,1	Blanca azulada
0,1 – 0,05	Gris semitransparente
< 0.05	Transparente

4.2.4.3 Viscosidad

La viscosidad es la propiedad que caracteriza la resistencia de un fluido a desplazarse. Es un parámetro importante en la preparación de emulsiones para uso farmacéutico debido a que influye directamente sobre estabilidad y la aceptabilidad estética del medicamento ya que variaciones de viscosidad son obvias para el paciente.

La viscosidad es función del tamaño de gotita siendo la viscosidad menor cuanto mayor sea el tamaño de gotita y más amplia su distribución. Así, una disminución de la viscosidad a lo largo del tiempo refleja un aumento del tamaño de gotita debido a la coalescencia indicando de una *shelf-life* limitada. Pero ésta también puede verse afectada por otros factores como:

- Viscosidad de la fase externa: existe una relación directa entre la viscosidad de una emulsión y la viscosidad de la fase externa cuando la proporción de fase interna es baja y la presencia de las gotitas de la fase interna sólo producen interacciones adicionales menores.
- Viscosidad de la fase interna: a mayor contenido de gotitas, mayores interacciones entre gotitas y por tanto, mayor viscosidad.

Cuando una emulsión tiene exceso de fase externa, la viscosidad es la viscosidad de dicha fase. Al incrementar la proporción de fase interna, aumenta la viscosidad de la emulsión hasta que ésta deja de ser líquida. Cuando la fase interna sobrepasa a la fase externa, las partículas de la emulsión se aglomeran y su viscosidad es la viscosidad estructural.

- Concentración volumétrica de la fase interna: la viscosidad de la emulsión sería mayor que la viscosidad de la fase externa sola a medida que aumenta la concentración de gotitas de fase interna. El porcentaje no puede superar el 60% ya que podría darse la inversión de fases.
- Naturaleza y concentración del emulsionante: en el caso de los coloides hidrófilos que forman películas multimoleculares, al aumentar la concentración de este tipo de emulgente, también lo hará la viscosidad. Por otro lado, los tensioactivos que forman películas monocapa condensadas forman enlace entre las gotitas adyacentes, creando una estructura tipo gel que implica un aumento de la viscosidad en función de la concentración de tensioactivo.

4.2.4.4 pH

Las emulsiones de aplicación tópica deben tener el pH ajustado en el rango de pH de la piel, 4-6. Varios estudios han demostrado que el pH de la piel y el pH del vehículo son importantes para la penetración y difusión de fármacos en la piel.

4.2.5. ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES [84,85,87,98,99]

Para que una crema esté bien formulada debe cumplir varios requisitos. La consideración más importante es la estabilidad del producto acabado tanto fisicoquímicamente como microbiológicamente.

4.2.4.5 Estabilidad física de las cremas

Toda crema es una emulsión y éstas son sistemas termodinámicamente inestables cuyas gotitas tienden a unirse para disminuir la superficie de contacto y así, reducir su energía. Se considera que una emulsión es estable cuando las gotitas de fase interna conservan sus características iniciales y el sistema es homogéneo. Si se pierden estas características se da la ruptura de la emulsión y por tanto, la separación de las fases. Los fenómenos asociados a la estabilidad física son los siguientes (Figura 4.4 y Figura 4.5):

I. Separación gravitacional

En general, las gotitas de fase interna de una emulsión tienen una densidad diferente a la del líquido que las rodea, fase externa, y como consecuencia, una fuerza gravitacional neta actúa sobre ellas. Su consecuencia más importante es la pérdida de homogeneidad.

- a. **Creaming:** la formación de crema se da como consecuencia del movimiento hacia arriba de gotitas de fase interna con respecto a la fase externa debido a su menor densidad.
- b. **Sedimentación:** es el proceso inverso del cremado desplazando las gotitas de fase interna, más densa, hacia abajo.

La causa de ambos fenómenos es la acción de la gravedad y la diferencia de densidades entre la fase interna y externa. De acuerdo con la ley de Stokes, la velocidad de sedimentación/cremado es proporcional al cuadrado del radio de la partícula, que se da de forma preponderante cuando el tamaño de la gotita es de 2-5 μm .

$$v = \frac{2g \cdot r^2 \cdot (\rho_{f.int} - \rho_{f.ext})}{9\eta}$$

Si $\rho_{f.int} > \rho_{f.ext} \rightarrow v > 0$ *Sedimentación*

Si $\rho_{f.int} < \rho_{f.ext} \rightarrow v < 0$ *Creaming*

Así, modificando adecuadamente las densidades y viscosidades se puede modificar dicho proceso. Si la diferencia entre las densidades disminuye o aumenta la viscosidad de la fase externa, el proceso de formación de crema se ralentiza.

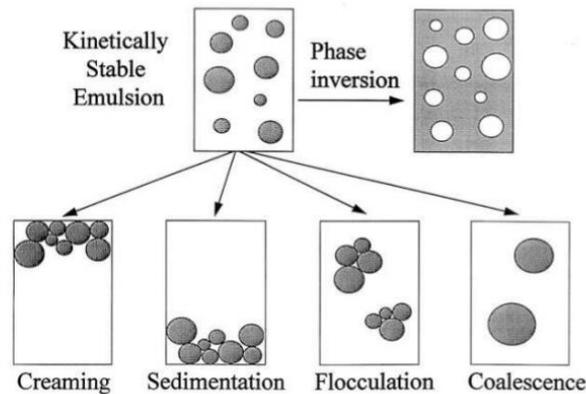


Figura 4.4 Algunos fenómenos asociados a la estabilidad física de las emulsiones [100]

II. Inversión de fases

Es el proceso por el que se da la inversión del signo de la emulsión. Esto es, una emulsión inicial W/O se transforma en una emulsión O/W o viceversa. En general, este proceso es estimulado por alguna alteración en la composición (porcentaje de la fase interna muy elevado, concentración y tipo de emulgente) o las condiciones ambientales de la emulsión (cambios de temperatura y/o agitación mecánica, condiciones de disolvente).

III. Floculación

Es la agrupación de las gotitas pero sin llegar a unirse y sin modificar su tamaño. Este proceso está controlado por un equilibrio global entre las fuerzas de atracción electrostáticas de Van der Waals y la fuerzas repulsivas de tipo estérico y de hidratación. Es un proceso reversible ya que la emulsión original puede recuperarse mediante agitación suave.

IV. Coalescencia

Es el proceso por el que las gotas de una emulsión se unen para formar gotas más grandes. La consecuencia final es que las dos fases se separaran y finalmente, se producirá la ruptura de la emulsión siendo este proceso irreversible.

V. Maduración de Ostwald

Es el proceso por el cual las gotitas grandes crecen a expensas de las más pequeñas, hasta que éstas últimas prácticamente desaparecen, a causa del transporte de masa de la fase interna de una gotita a otra a través de la fase externa. La velocidad a la que ocurre es función de la solubilidad de la fase interna en la fase externa y es consecuencia de la presión interna de las gotas (presión de Laplace) que es mayor al disminuir el tamaño de las gotitas.



Figura 4.5 Maduración de Ostwald en emulsiones [101]

4.2.4.6 *Estabilidad química de las cremas*

La estabilidad química de las emulsiones es tan importante como la estabilidad física ya que pueden darse cambios tanto en la solubilidad en cada una de las fases como cambios polimórficos de los componentes, migración de componentes de una fase a otra y degradación química de algunos componentes. La migración de componentes de una fase a otra puede afectar a la estabilidad física, química o microbiológica del producto dependiendo de los componentes migratorios.

La degradación del principio activo conduce a la pérdida de su concentración a través de una o más reacciones químicas en condiciones normales o de estrés. En consecuencia:

- Se da una reducción de la potencia del producto.
- Puede implicar cambios significativos en el olor o color haciendo que el producto sea estéticamente inaceptable.
- Los productos de degradación generados pueden ser sustancias tóxicas.

CAPÍTULO 4: FORMAS FARMACÉUTICAS SEMISÓLIDAS

Las diversas vías de degradación química de un principio activo dependen de las características estructurales de la molécula pudiendo implicar hidrólisis, deshidratación, isomerización/racemización, descarboxilación/eliminación, oxidación, fotodegradación, interacciones entre principio activo (API) y los excipientes.

La aplicación de los principios cinéticos bien establecidos tales como la ley de masas y la teoría de Arrhenius entre otros puede aclarar el rol de cada variable en la cinética de degradación y proporcionar información valiosa sobre el mecanismo de degradación de los componentes individuales dentro de un sistema de emulsión que puede ser muy diferente de su inherente estabilidad

Algunos de los factores más importantes en el caso de las cremas son:

- **Oxidación**: los aceites y grasas usadas en la formulación pueden ser oxidados por parte del oxígeno atmosférico o de algunos microorganismos. Como consecuencia puede generar olores o sabores desagradables. Para evitar este proceso, de forma general, se añaden conservantes antimicrobianos y agentes reductores a la fórmula.
- **Compatibilidad química entre los componentes de la fórmula**: en una formulación pueden haber componentes que, aunque no sean incompatibles con el principio activo, si pueden serlo entre ellos. Por ejemplo, la incompatibilidad entre emulgentes de signo opuesto, aniónicos y catiónicos.
- **Hidratación de los emulgentes**: este fenómeno es debido a cambios en el pH del sistema o a la adición de electrólitos. Puede darse la precipitación de los emulgentes y la inversión de fases.

4.2.4.7 *Estabilidad microbiológica*

Las bases de cremas de aplicación tópica contienen una fase acuosa y una oleosa y son susceptibles al ataque de bacterias y hongos. El crecimiento microbiano deteriora la formulación y puede suponer un riesgo tóxico. Por lo tanto, las formulaciones tópicas necesitan conservantes apropiados para prevenir el crecimiento microbiano para conservar su calidad y *shelf-life*.

PARTE EXPERIMENTAL

5. PREFORMULACIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

Se debe desarrollar un medicamento para el tratamiento del melasma por vía tópica. Esto implica que no debe haber absorción del API o bien la velocidad de absorción debe ser despreciable, de tal modo que nunca se alcanzan en sangre niveles suficientes para que aparezca cualquier tipo de respuesta farmacológica; es decir, se persigue conseguir el efecto terapéutico localizado cerca del punto de aplicación.

La fase de preformulación es la primera etapa en el proceso de desarrollo de un nuevo medicamento y su objetivo es obtener información útil para el correcto desarrollo de la formulación – forma de presentación del API, excipientes, composición, etc. –, para el estudio del proceso de elaboración del producto acabado, el desarrollo de métodos analíticos y conseguir medicamentos con comportamientos biofarmacéuticos concretos.

Se realiza una búsqueda bibliográfica extensiva de sustancias despigmentantes y se decide que el API de la formulación será la hidroquinona (HQ) que es la sustancia despigmentante más utilizada durante los últimos 50 años. Para mejorar su eficacia se estudiará la viabilidad de una triple combinación de HQ con otras sustancias despigmentantes en las que se ha observado un efecto sinérgico con otras sustancias despigmentantes [63-65]: ácido kójico (KA) y dipalmitato kójico (DPK).

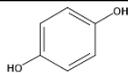
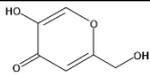
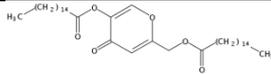
La caracterización del API es uno de los pasos fundamentales durante la preformulación e incluye el estudio de diferentes parámetros según la forma farmacéutica a desarrollar tales como las propiedades espectrales, solubilidad intrínseca, contenido en humedad, propiedades cristalinas y existencia de polimorfos, tamaño de partícula, perfil de estabilidad química inherente del API y cuando se combina con excipientes. De esta información depende el diseño de la forma farmacéutica y su posterior formulación [102, 103].

CAPÍTULO 5: PREFORMULACIÓN

5.1.1. INTRODUCCIÓN

Con el fin de enfocar y desarrollar de forma correcta el estudio e investigación de la fórmula más adecuada se realiza la caracterización físico-química de los tres posibles principios activos (APIs) en base a la documentación existente (Tabla 5.1). De los tres APIs en estudio, sólo la HQ está descrita en farmacopea: monografía de USP [45].

Tabla 5.1 Resumen de características físico-químicas de los tres principios activos

	HQ	KA	DPK
Fórmula estructural			
Fórmula empírica	C ₆ H ₆ O ₂	C ₆ H ₆ O ₄	C ₃₈ H ₆₆ O ₆
CAS	[123-31-9]	501-30-4	79725-98-7
Peso molecular	110,11 g/mol	142,11	618,93
pKa	10,33	8,05	-
T_{fusion}	170-172 °C	152-153 °C	92-96 °C
Conservación	En un envase bien cerrado, protegido de la luz	En un envase bien cerrado, protegido de la luz y de la humedad	En un envase bien cerrado, protegido de la humedad

La HQ se caracteriza según monografía de USP. El KA y el DPK se caracterizan en base a requisitos propios y a las especificaciones de los proveedores. Además, otros ensayos se efectúan para completar dicha caracterización: tamaño de partícula y espectro IR (Tabla 5.2, 5.3 y 5.4).

Tabla 5.2 Especificaciones de HQ principio activo

Ensayo	Especificación	Método
Aspecto	Sólido blanco cristalino	Organoléptico
Identificación		
	a. IR	Mismas bandas que espectro de referencia
	b. UV-Vis	Max. 293 ± 2 nm
Temperatura de fusión	172 – 174 °C	USP37 <197> Monografía 3279
Humedad	≤ 0,5%	USP37 <741> USP37 <921>
Residuo de incineración	≤ 0,5%	USP37 <281>
Valoración	98,0 – 100,5%	Monografía 3279
Difractograma RX	Informativo	-
Tamaño de partícula	Informativo	-

Tabla 5.3 Especificaciones de KA principio activo

Ensayo	Especificación	Método
Aspecto	Sólido cristalino de color blanco a amarillo claro	Organoléptico
Identificación		
	a. IR	Mismas bandas que espectro de referencia
	b. UV-Vis	A determinar
Temperatura de fusión	151 – 155 °C	USP37 <197> USP37 <197>
Metales pesados	≤ 20 ppm	USP37 <741> USP37 <231>
Arsénico	≤ 2 ppm	USP37 <211>
Residuo de incineración	≤ 0,1%	USP37 <281>
Valoración	98,0 – 101,0%	Propio
Difractograma RX	Informativo	-
Tamaño de partícula	Informativo	-

CAPÍTULO 5: PREFORMULACIÓN

Tabla 5.4 Especificaciones de DPK principio activo

Ensayo	Especificación	Método
Aspecto	Sólido blanco cristalino	Organoléptico
Identificación		
a. IR	Mismas bandas que espectro de referencia	USP37 <197>
b. UV-Vis	A determinar	USP37 <197>
Temperatura de fusión	92 – 96 °C	USP37 <741>
Pérdida por desecación	≤ 0,5%	USP37 <731>
Metales pesados	≤ 10 ppm	USP37 <231>
Valoración	≥ 98,0%	Propio
Difractograma RX	Informativo	-
Tamaño de partícula	Informativo	-

5.1.2. MATERIALES

Para facilitar su localización se ha agrupado el material en: principios activos y patrones, reactivos y soluciones, aparatos y utillaje.

5.1.2.1. Principios activos y patrones

HQ, *European pharma* Grade. Eastman/Fagron (Barcelona, España). Lote TS40736000

KA. CMS (Oxfordshire, Reino Unido). Lote K13360701

DPK. CMS (Oxfordshire, Reino Unido). Lote K16330603

HQ (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

KA (analytical standard ≥99.0%). Fluka (Buchs, Switzerland)

DPK (≥98.0%). Sino Lion (Massó, Barcelona)

5.1.2.2. Reactivos y soluciones

Reactivos:

Bromuro potásico (IR) PAI. Panreac (Barcelona, España) (KBr)

Metanol (HPLC-gradiente) PAI-ACS. Panreac (Barcelona, España) (MeOH)

Diclorometano (estabilizado con ~ 20 ppm de amileno; USP-NF, BP, Ph. Eur.; puro, grado farma). Panreac (Barcelona, España) (DCM)

Agua (HPLC). Obtenida a partir de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

Aquameetric composite 5 RV. Panreac (Barcelona, España)

Metanol according to Karl Fischer. Panreac (Barcelona, España)

Ácido sulfúrico 95-98% (USP-NF, BP, Ph.Eur.) PRS-CODEX. Panreac (Barcelona, España).

Acetato de amonio (Reag. Ph.Eur.) PA-ACS. Panreac (Barcelona, España).

Ácido clorhídrico 37% (RFE, BP, Ph.Eur.) PRS-CODEX. Panreac (Barcelona, España).

Hidróxido sódico lentejas (RFE, USP-NF, BP, Ph. Eur.) PRS-CODEX. Panreac (Barcelona, España).

Concentrate to make Lead solution (100 ppm). Reagecon (County Clare, UK)

Thioacetamide solution (Reag. Ph.Eur.). Reagecon (County Clare, UK)

Glycerol solution 85% (tested according to Ph.Eur.). Fluka (Buchs, Switzerland)

Ácido nítrico fumante (Reag. Ph.Eur.) PA. Panreac (Barcelona, España).

Difenilamina (Reag. Ph.Eur.) PA-ACS. Panreac (Barcelona, España).

Ácido Acético glacial (RFE, USP, BP, Ph. Eur.) PRS-CODEXC

Sulfato de cerio (IV) 0,1 M (0,1 N) Volumetric solution $Ce(SO_4)_2$. Fluka (Buchs, Switzerland)

Amoniaco 30% (en NH_3) (RFE, USP-NF, BP, Ph. Eur.) PRS-CODEX. Panreac (Barcelona, España)

Aceite de girasol Koipesol

Soluciones preparadas en el laboratorio:

- Ácido sulfúrico 0,05 M (0,1 N): En un matraz aforado de 1 l, que contenga unos 700 ml de agua destilada, diluir 2,8 ml de ácido sulfúrico 95-98% (USP-NF, BP, Ph.Eur.). Enrasar a 1 l con agua destilada.

CAPÍTULO 5: PREFORMULACIÓN

- Hidróxido sódico 1 M (1 N): Pesar 40,0 g de hidróxido sódico (lentejas) y disolver en 1 l de agua destilada.
- Ácido clorhídrico 6 N: En un matraz aforado de 1 l, que contenga unos 300 ml de agua destilada, diluir 498 ml de ácido clorhídrico 37% (RFE, BP, Ph.Eur.). Enrasar a 1 l con agua destilada.
- Hidróxido amónico 6 N: En un matraz aforado de 1 l, echar 381 ml de amoníaco al 30% (en NH₃) (RFE, USP-NF, BP, Ph. Eur.) y, añadir agua destilada lentamente. Si se calienta, enfriar con un baño de agua-hielo. Enrasar a 1 l con agua destilada.
- Ácido acético 1 N: En un matraz aforado de 1 l, que contenga unos 700 ml de agua destilada, diluir 57,14 ml de ácido acético glacial (RFE, USP, BP, Ph. Eur.). Enrasar a 1 l con agua destilada.

5.1.2.3. *Aparatos y utillaje*

Aparatos:

Balanza analítica BP211D Sartorius

Estufa T5028Heraeus

Espectrofotómetro FT-IR 1600Perkin Elmer

Espectrofotómetro UV-Visible HP8452A DAD Hewlett Packard

Agitador magnético MR Hei-Tec Heindolph

Aparato para determinación del punto de fusión IA9100Stuart

Valorador volumétrico Karl Fischer 890 Tritando Metrohm

Mufla Selecta

Difractómetro PANalytical X`Pert PRO MRD

Analizador tamaño de partícula LS13320 módulo ULM Beckman Coulter

HPLC 1200 Agilent que consiste en un horno de columna, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de red de diodos (DAD), controlado por el software Chemstation versión B04.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Utillaje:

Mortero y mano de ágata

Espátula acero inoxidable

Vidrio de reloj

Pesasustancias

Matraces aforados de 50 y 100 ml

Imán

Capilares de vidrio Marienfeld (de diámetro 0,5 mm)

Crisol de sílice

Desecador

Mechero de laboratorio

Erlenmeyer de 250 ml

Bureta de 25 ml

Pipeta de doble aforo de 10 ml

Capilar de vidrio Lindemann (de diámetro 0,5 mm)

Vaso de precipitados de 100 ml

Columna cromatográfica Phenogel™ 5 µm 50 Å, 4,6 x 300 mm

Pre-columna cromatográfica Phenogel™ 4,6 x 30 mm

Columna cromatográfica Zorbax SB-Phenyl 5 µm, 80 Å, 4,6 x 250 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

5.1.3. MÉTODOS

5.1.3.1. *Aspecto*

En un lugar bien iluminado, sobre papel blanco, describir el aspecto, color y posibles defectos.

5.1.3.2. Identificación IR: espectrofotometría infrarrojo

Se realiza según el método general de Ph.Eur. 2.2.24, equivalente a capítulo general de USP-NF <197> [123,124]. El aparato empleado para esta determinación es un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo FT-IR 1600, con el fin de comprobar la pureza de la sustancia utilizada como principio activo, así como verificar su identidad mediante la obtención del espectro IR.

Se pesan aproximadamente 2 mg de API previamente desecado y mezclar con aproximadamente 200 mg de KBr, previamente desecado, en un mortero de ágata. Una vez realizada la mezcla, poner una pequeña parte en el troquel y presionar entre 700 y 1000 kg/cm² hasta obtener un disco transparente.

5.1.3.3. Identificación UV-Vis: espectrometría UV-Vis

Se prepara una solución de concentración 10 µg/ml (1 mg en 10 ml) de cada principio activo individualmente en MeOH. El aparato empleado para esta determinación es un espectrofotómetro HP modelo 8452A DAD, en el que se realiza un espectro de barrido general desde 200 hasta 700 nm, rango correspondiente UV-Visible.

5.1.3.4. Punto de fusión

Para determinar el punto de fusión de los APIs se utiliza el equipo para determinar punto de fusión de la marca Stuart modelo IA9100 y se realiza según el capítulo general de USP-NF <741> [124].

Se moltura una cantidad suficiente de principio activo en un mortero e introducir en el tubo capilar la cantidad suficiente para llenar unos 3 mm. Programar el equipo a unos 10 °C por debajo de la temperatura de fusión. Se introduce capilar en el equipo y realizar la determinación a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min. Se toma como temperatura de fusión la temperatura a la que se observa la primera gota de líquido.

5.1.3.5. Humedad

I. Valoración por el método de Karl Fischer

Para determinar humedad de HQ se pesan alrededor de 200 mg y se procede según el capítulo general de USP-NF <921> método I [124], utilizando el valorador Karl Fischer 890 Tritando Metrohm.

II. Pérdida por desecación

Para determinar la pérdida por desecación de DPK se utiliza la estufa T5028 Heraeus y se realiza según el capítulo general de USP-NF <731> [124]. Se pesa alrededor de 1,000 g de DPK en un pesafiltros, previamente secado durante 30 minutos, y se introduce, con el pesafiltros abierto, en la estufa a una temperatura de 80 °C durante 2 horas. Al cabo de 2 horas, se deja atemperar en un desecador con el pesafiltros tapado y a continuación, se pesa. Continuar secando hasta peso constante, es decir, hasta que la diferencia entre 2 pesadas consecutivas no sea mayor de 0,5 mg, en procesos de secado de 1 hora.

5.1.3.6. Residuo de incineración

Para la realización de este ensayo, según el capítulo general de USP-NF <281> [124] se utiliza una mufla Selecta. Se toma un crisol de sílice y se incinera a 600 ± 50 °C durante 30 minutos. Seguidamente se deja enfriar en un desecador y una vez a temperatura ambiente, se pesa. A continuación, se pesa 1,0 g del API en el crisol y añadir 2 ml de ácido sulfúrico 95-98%. Calentar suavemente a una temperatura tan baja como sea posible hasta que la muestra se carboniza a fondo, hasta observar la completa desaparición de partículas negras. Dejar enfriar y añadir unas gotas de ácido sulfúrico 95-98%. Calentar suavemente hasta que no se desprendan humos blancos. Incinerar a 600 ± 50 °C hasta que el residuo este completamente incinerado, asegurar que no se producen llamas durante este proceso. Enfriar el crisol en un desecador y pesar con precisión. Repetir este último paso hasta peso constante. Calcular el porcentaje de residuos.

5.1.3.7. Metales pesados

La influencia de este parámetro sobre las propiedades físico-químicas y reológicas del API es nula. Por lo que se decide no realizar el análisis, solamente coger el valor del certificado de análisis del proveedor.

5.1.3.8. Arsenio

Igual que con la determinación de metales pesados, se coge el valor del certificado de análisis del proveedor.

5.1.3.9. Valoración

I. Valoración de HQ

Para la valoración de HQ API según la monografía hidroquinona de USP-NF [45], se disuelven unos 250 mg de la sustancia a examinar en una mezcla de 100 ml de agua destilada y 10 ml de ácido sulfúrico 0,1 N y se añaden unas 3 gotas de difenilamina TS. Se valora con sulfato de cerio 0,1 N hasta que se alcanza el punto final detectado con un cambio de color a rojo-violeta. Realizar una determinación de blanco, y hacer cualquier corrección necesaria. Cada ml de sulfato de cerio 0,1 N equivale a 5,506 mg de HQ.

Los cálculos a realizar para valorar la riqueza del principio activo es el siguiente:

$$\% = \frac{V \times 5,506}{P \times (100 - h)} \times 100$$

Donde,

V: volumen de sulfato de cerio 0,1 N gastados en la valoración de la muestra en ml

P: peso de HQ en g

h: contenido en agua, expresado en %, resultado de la determinación de humedad por Karl Fischer

Adicionalmente, la valoración de HQ también se realiza siguiendo el método cromatográfico por HPLC desarrollado para dar soporte analítico a la fase de preformulación descrito en el anexo I.

II. Valoración de KA y DPK

Para la valoración de KA y DPK principio activo se siguen los métodos cromatográficos por HPLC y GPC desarrollados y descritos en los anexos III y II, respectivamente.

5.1.3.10. Tamaño de partícula

Se determina el tamaño de partícula de los tres APIs ya que es un parámetro que puede afectar de forma significativa a la dispersión del API en su fase durante proceso de elaboración de los semi-sólidos.

El aparato utilizado para esta determinación es un analizador de tamaño de partícula por difracción laser Malvern Mastersize 2000 con módulo hydro SM dispersion unit.

El vehículo de dispersión utilizado es aceite de girasol, el intervalo de medida de 0,04 a 2000 μm y el modelo óptico de análisis es el Fraunhofer PIDS included.

5.1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.4.1. Aspecto

Los tres APIs son polvos de naturaleza cristalina de color blanco (HQ y DPK) o blanco-vainilla (KA) tal y como se muestra en la Figura 5.1.

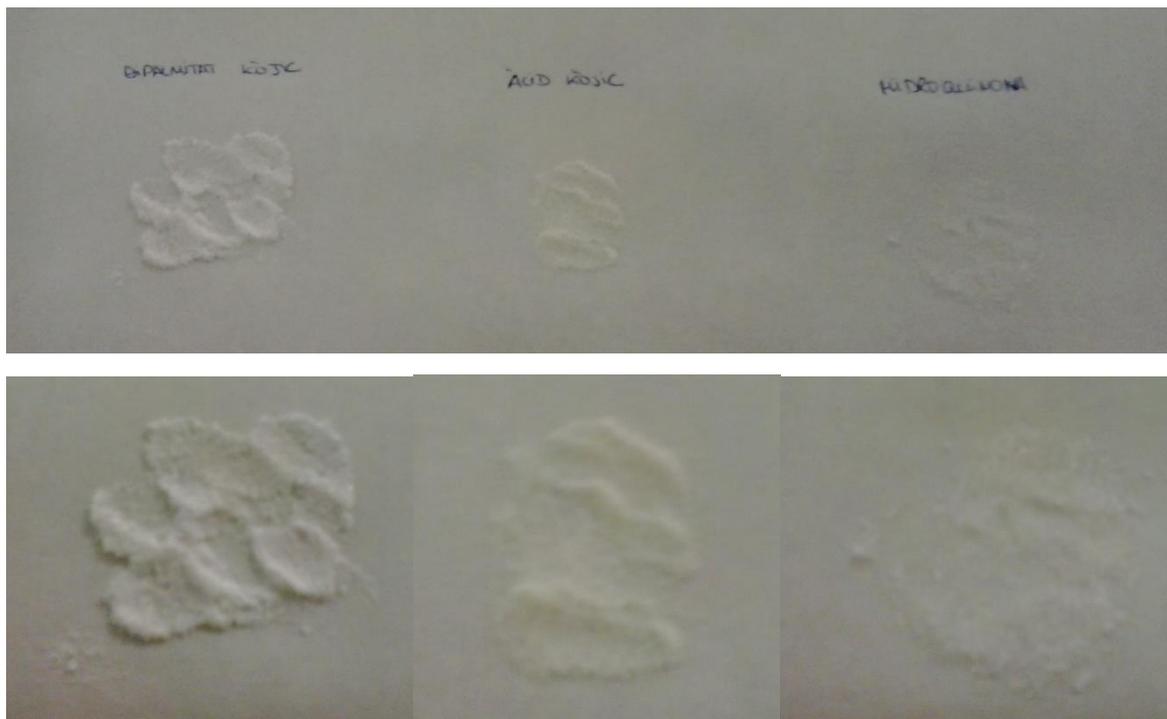


Figura 5.1 Fotografía de los tres APIs

5.1.4.2. Identificación IR: espectrofotometría infrarrojo

Los espectros obtenidos deben presentar las bandas de absorción en las mismas posiciones y con la misma intensidad relativa que las obtenidas con el espectro realizado, en las mismas condiciones, con los patrones de referencia.

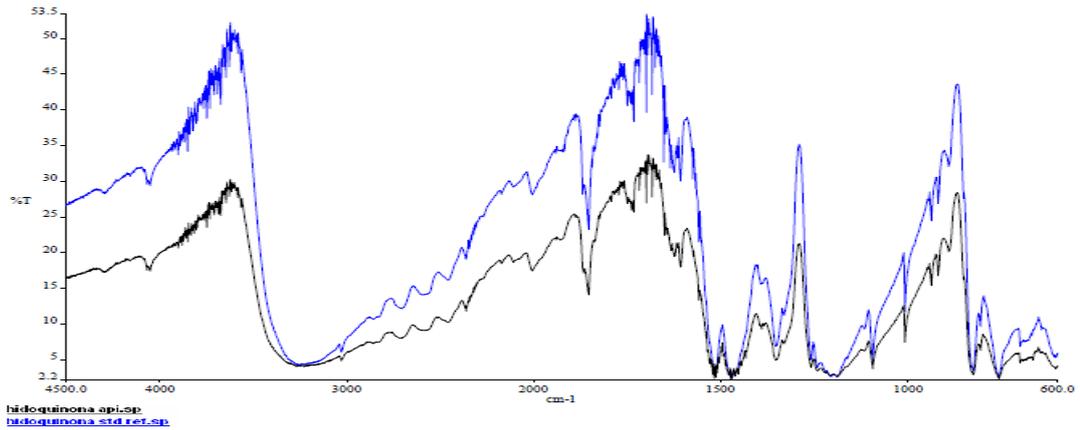


Figura 5.2 Superposición de espectros IR correspondientes a HQ API e HQ patrón de referencia

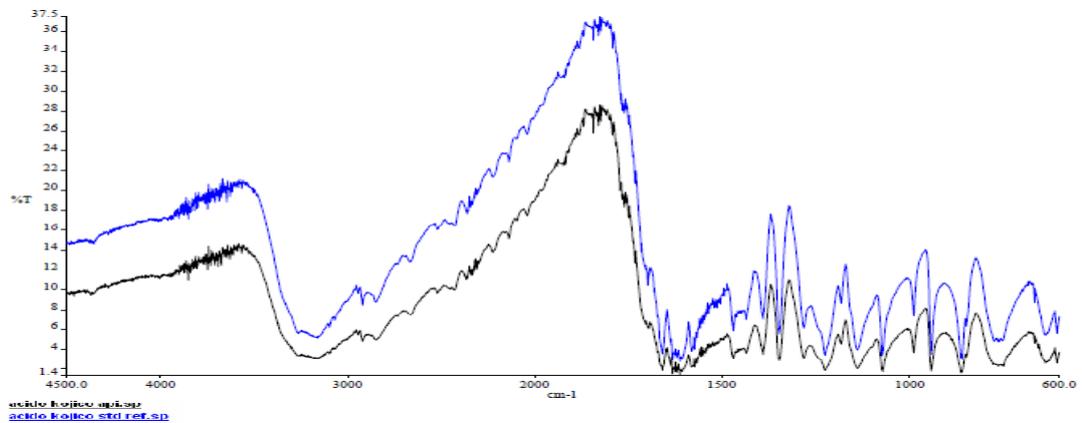


Figura 5.3 Superposición de espectros IR correspondientes a KA API y KA patrón de referencia

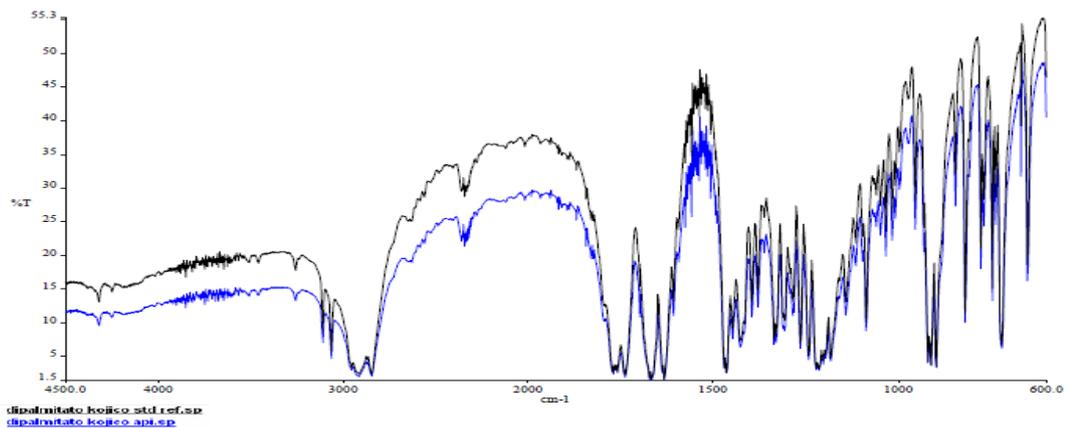


Figura 5.4 Superposición de espectros IR correspondientes a DPK API y DPK patrón de referencia

5.1.4.3. Identificación UV-Vis: espectrometría UV-Vis

Debido a la distinta naturaleza del DPK respecto a la HQ y KA, se preparan dos soluciones de cada uno de los APIs: una en metanol (MeOH) y otra en diclorometano

(DCM). En las Figuras 5.5 y 5.6 se presentan los espectros de UV-Visible correspondientes a las soluciones de HQ y KA en MeOH. Debido a que el DPK es una sustancia totalmente apolar, es prácticamente insoluble en MeOH – disolvente polar prótico –. Como consecuencia, en el espectro de la solución de concentración 10 µg/ml de DPK en MeOH no se observa ningún máximo. Se decide preparar una solución sobresaturada de concentración 100 µg/ml de DPK (10 mg en 100 ml), se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos y se realiza el espectro UV-Visible de la solución resultante (Figura 5.7).

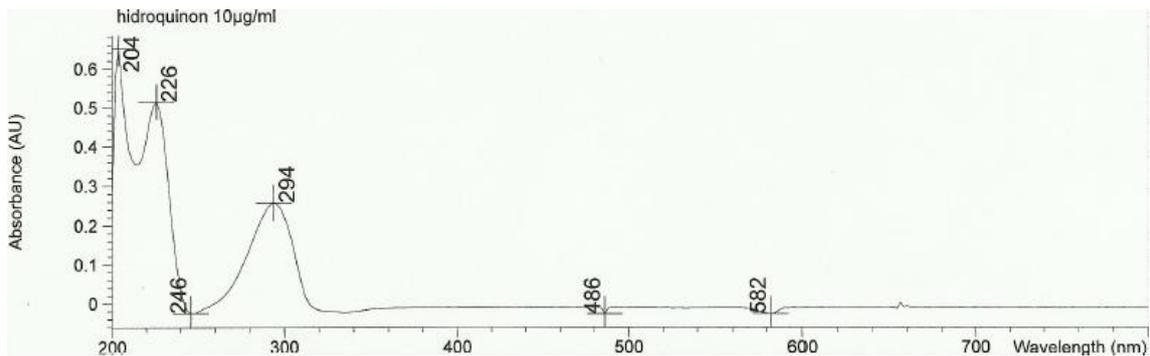


Figura 5.5 Espectro UV-Vis correspondiente a la solución de HQ en MeOH

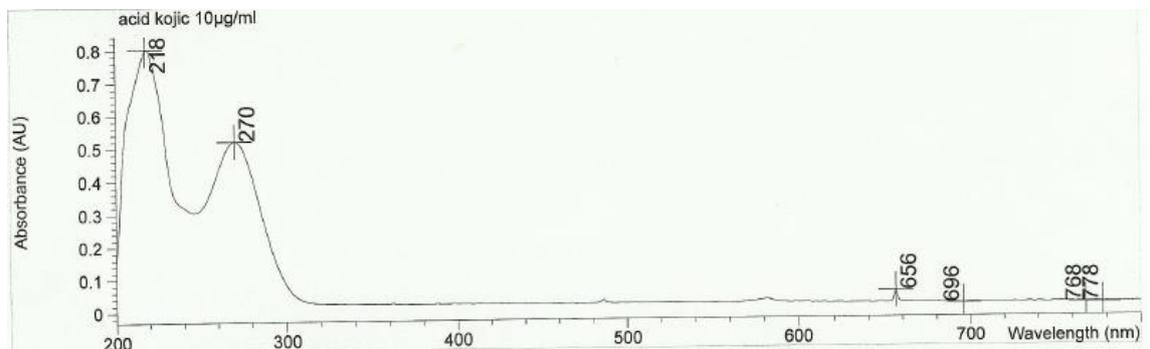


Figura 5.6 Espectro UV-Vis correspondiente a la solución de KA en MeOH

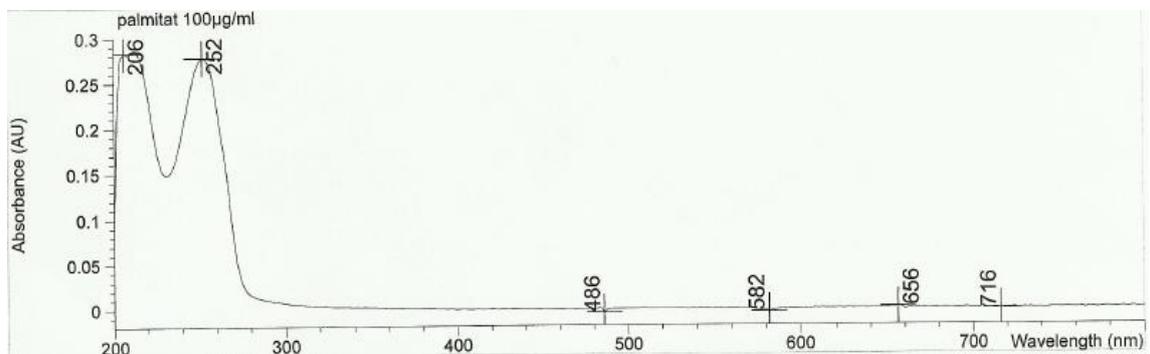


Figura 5.7 Espectro UV-Vis correspondiente a la solución de DPK en MeOH

Además, se preparan soluciones de cada uno de los APIs en DCM – disolvente apolar – de concentración 10 µg/ml. Siendo tanto la HQ como el KA sólo parcialmente solubles

CAPÍTULO 5: PREFORMULACIÓN

mientras que el DPK es totalmente soluble en DCM. Los espectros UV-Visible en DCM se observan, a continuación, en las Figuras 5.8, 5.9 y 5.10.

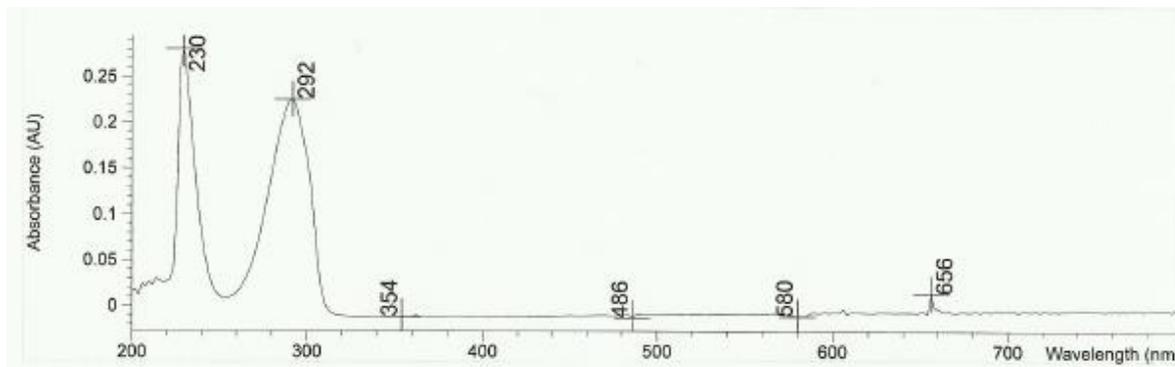


Figura 5.8 Espectro UV-Vis correspondiente a la solución de HQ en DCM

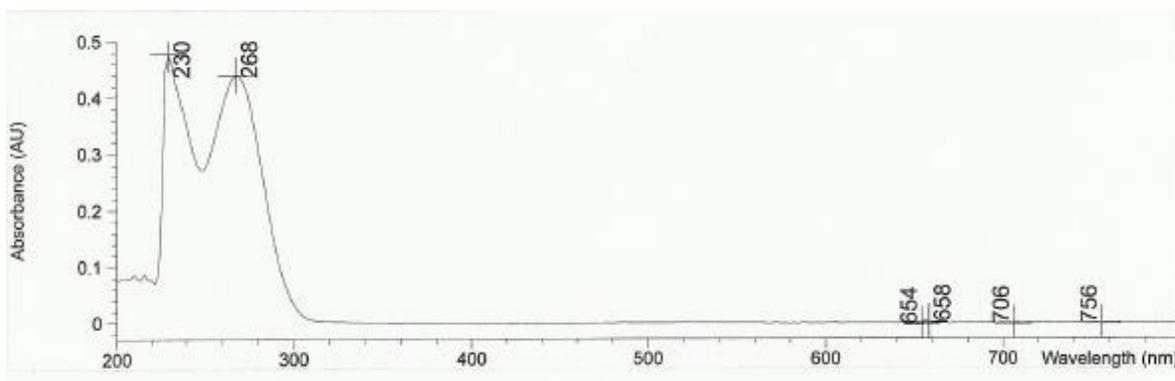


Figura 5.9 Espectro UV-Vis correspondiente a la solución de KA en DCM

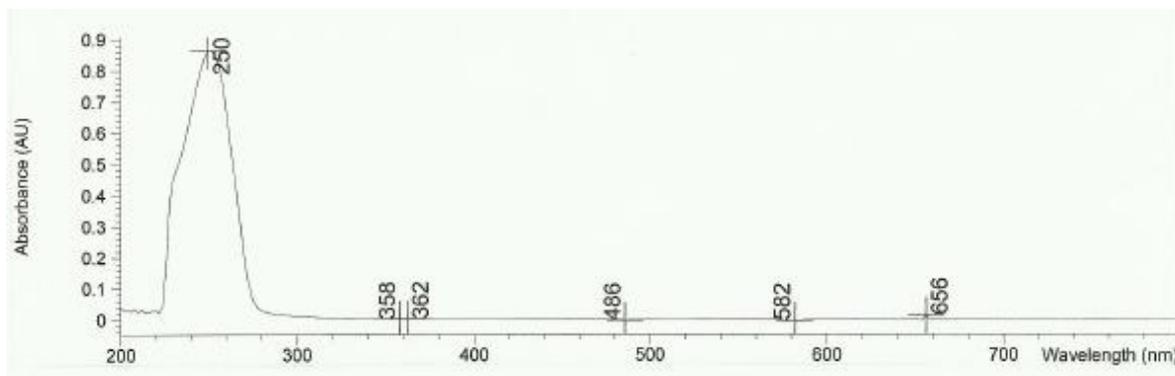


Figura 5.10 Espectro UV-Vis correspondiente a la solución de DPK en DCM

En la Tabla 5.5 se recopilan todos los máximos de absorbancia de los tres APIs en los dos disolventes. Se puede comprobar que la HQ cumple con la especificación propuesta en su monografía.

Tabla 5.5 Resumen de máximos de absorbancia de los APIs en los distintos disolventes

API	MeOH	DCM
HQ	226 / 294 nm	230 / 292 nm
KA	218 / 270 nm	230 / 268 nm
DPK	206 / 252 nm	250 nm

5.1.4.4. Punto de fusión

Los puntos de fusión obtenidos para cada uno de los tres APIs se muestran en la Tabla 5.6, valores que se encuentran dentro del intervalo de las especificaciones de cada uno de los APIs.

Tabla 5.6 Punto de fusión de los APIs

API	T _{FUSIÓN} (°C)	Especificación
HQ	173,2 °C	172-174 °C
KA	153,6 °C	151-155 °C
DPK	92,6 °C	92-96 °C

5.1.4.5. Humedad

El contenido en humedad de los APIs es uno de los parámetros más críticos ya que puede estar relacionado con la formación de los productos de degradación de los APIs tanto en su aparición como en la velocidad de su formación. Por otro lado, la humedad también influye en algunas de las propiedades reológicas del propio API y de sus mezclas.

La humedad ha sido valorada en dos de los APIs según especificaciones empleando métodos distintos. Los valores se recogen en la Tabla 5.7, cumpliendo las especificaciones de cada uno de ellos.

Tabla 5.7 Contenido en agua de los APIs

API	Humedad (%)	Especificación	Método
HQ	0,27%	≤ 0,5%	Karl Fischer
KA	-	-	-
DPK	0,31%	≤ 0,5%	Pérdida por desecación

CAPÍTULO 5: PREFORMULACIÓN

5.1.4.6. *Residuo de incineración*

La determinación del residuo de incineración evalúa la cantidad de sustancia residual no volatilizada de una muestra cuando es incinerada en presencia de ácido sulfúrico. Es decir, se determina el contenido de impurezas inorgánicas en el API.

Esta determinación ha sido efectuada sobre muestras de HQ y KA según especificaciones. Los resultados obtenidos, cumplen especificaciones, se recopilan en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8 Residuo de incineración de los APIs

API	Residuo incineración (%)	Especificación
HQ	0,08% \approx 0,1%	\leq 0,5%
KA	-	-
DPK	0,04% \approx 0,0%	\leq 0,1%

5.1.4.7. *Metales pesados*

Los metales pesados son impurezas inorgánicas que pueden proceder de catalizadores, equipos de producción tales como reactores, filtros o conductos así como de algunas materias primas. Se decide no realizar la determinación de metales pesados y coger el dato del certificado del proveedor.

Metales pesados (como Pb) inferior a 20 ppm en KA e inferior a 10 ppm en DPK, cumpliendo respectivamente sus especificaciones.

5.1.4.8. *Arsenio*

Igual que en el caso de los metales pesados, se coge como valor el dato del certificado del proveedor: Arsenio inferior a 2 ppm, cumpliendo la especificación.

5.1.4.9. *Valoración*

I. Valoración de HQ

En la volumetría redox realizada sobre una muestra de 250,35 mg de HQ se gastaron 4,5 ml de sulfato de cerio 0,1 N que calculando el resultado según apartado 5.1.3.9.I da un valor de 99,2%, cumpliendo las especificaciones marcadas por la monografía [45].

Se realiza, además, una valoración por HPLC según método descrito en anexo I generando un resultado de 99,5%. En la Figura 5.11 se presentan los cromatogramas patrón y problema API.

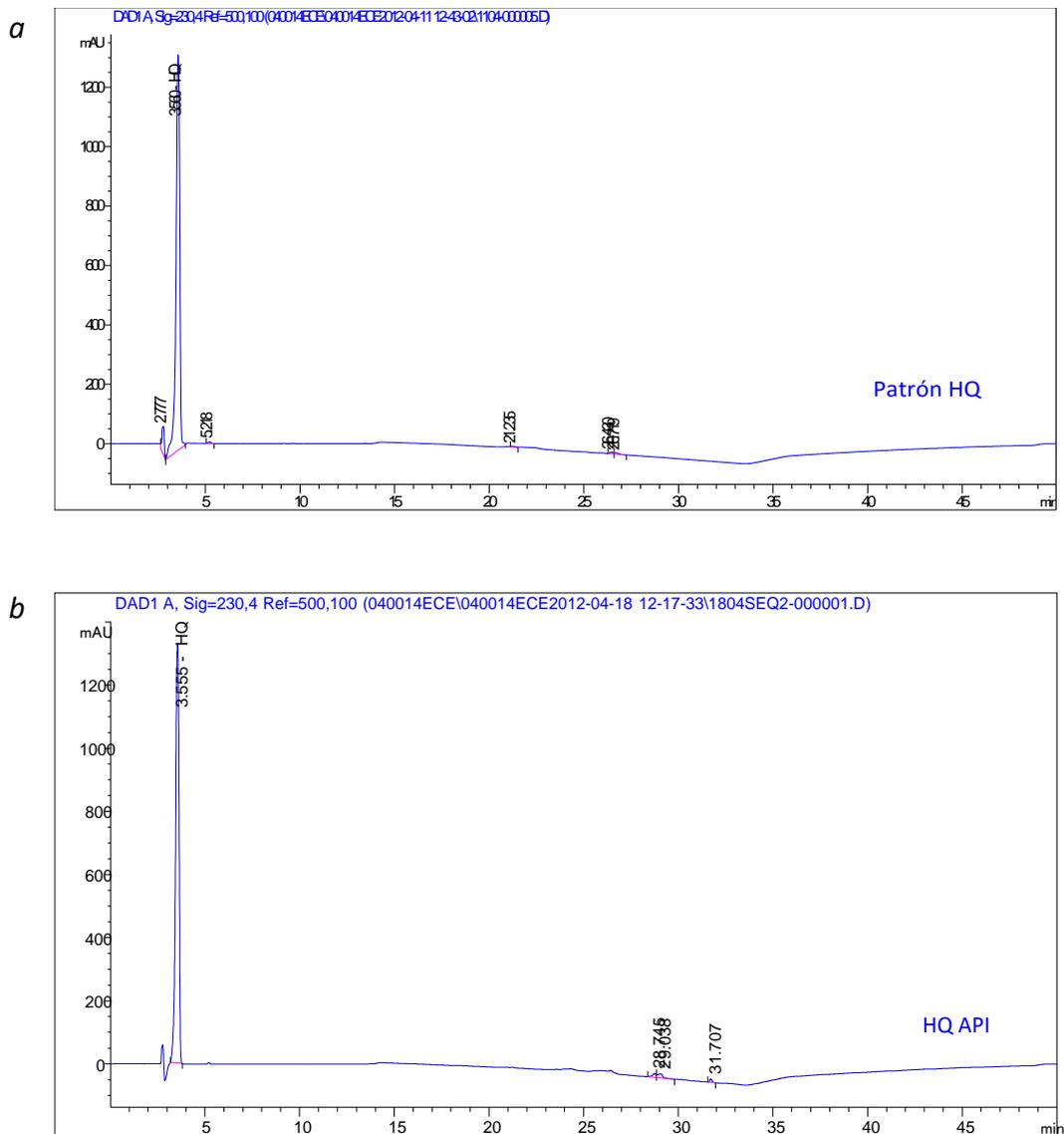


Figura 5.11 Cromatogramas correspondientes a la valoración de HQ

a: Cromatograma de la solución patrón de trabajo de HQ ; b: Cromatograma de la solución problema de HQ API

II. Valoración de KA y DPK

Utilizando la metódica analítica por HPLC descrita en el anexo III se obtiene un resultado de 99,8% en KA. En la Figura 5.12 se observa un cromatograma en el que eluye a un tiempo de 1,63 minutos el pico correspondiente a KA. En la Figura 5.13 se presenta una superposición de los cromatogramas patrón y problema.

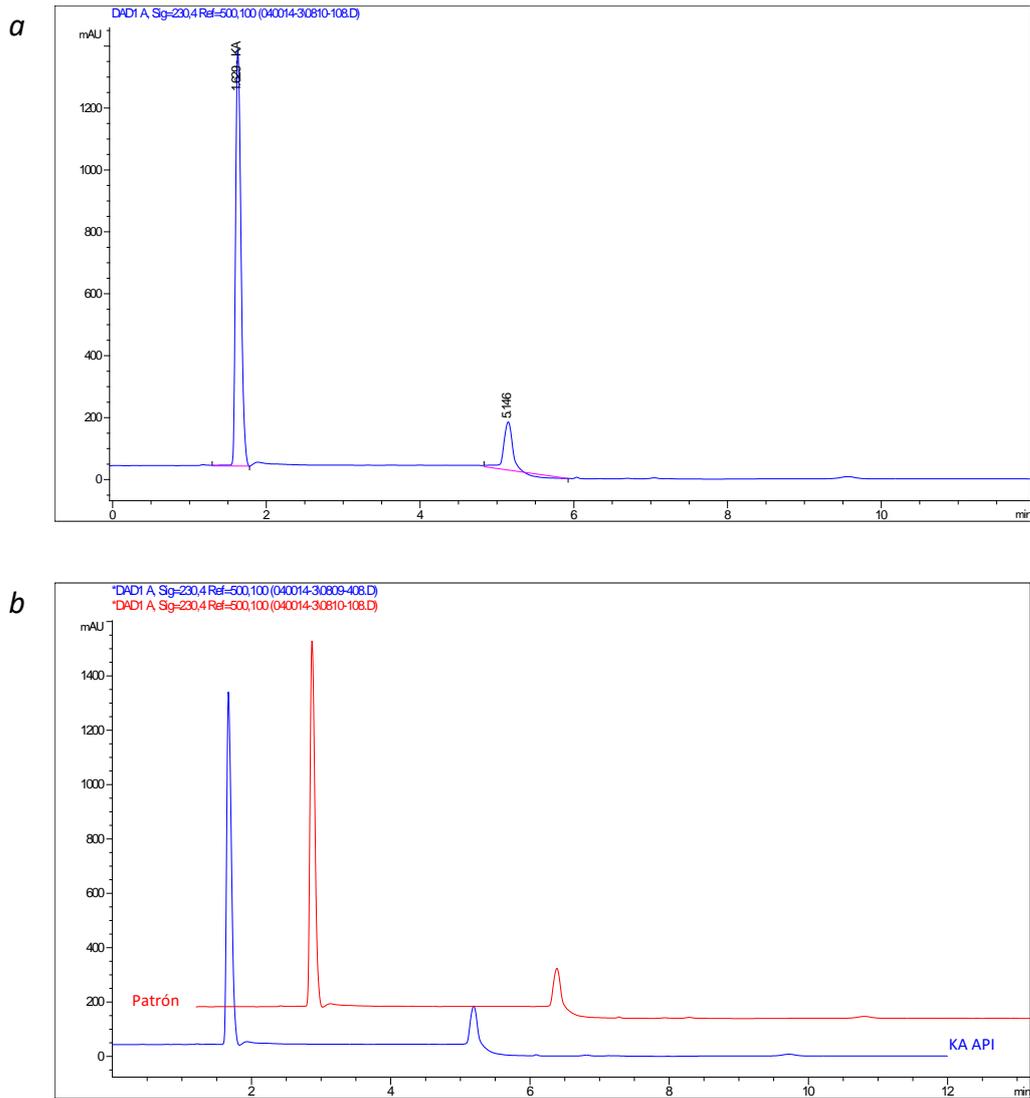


Figura 5.12 Cromatogramas correspondientes a la valoración de KA

a: Cromatograma de la solución problema de KA API; b: Superposición de los cromatogramas correspondientes a patrón y problema de KA

Utilizando la metodología analítica por GPC descrita en el anexo II se obtiene un resultado de 100,1% en DPK. En la Figura 5.14 se observa el cromatograma de DPK problema que eluye a 2,17 minutos libre de interferencias.

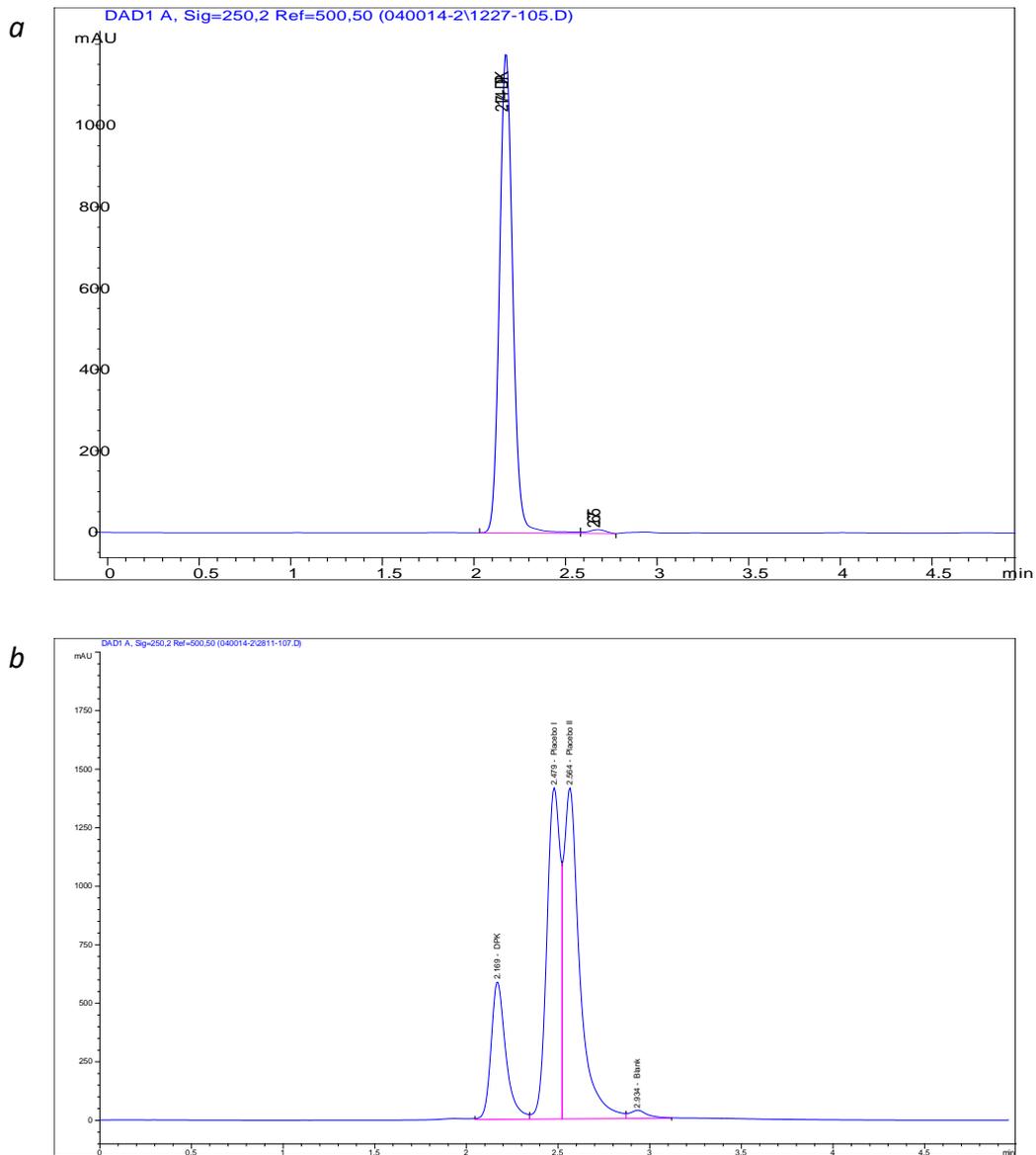


Figura 5.13 Cromatogramas correspondientes a la valoración de DPK

a: Cromatograma de la solución problema de DPK API; *b:* Superposición de los cromatogramas correspondientes a patrón y problema de DPK

5.1.4.10. Tamaño de partícula

La determinación de la distribución de tamaño de partícula representa gráficamente el grado de homogeneidad del API polvo. Esto ayuda a evaluar si el polvo es suficientemente adecuado para no tener problemas al dispersar el API en una de las fases de la crema.

Esta determinación ha sido efectuada sobre muestras de los tres APIs: HQ, KA y DPK. Los resultados obtenidos se recopilan en la Tabla 5.9 y la distribución gráfica de tamaño de partícula se muestran en las Figuras 5.14 a 5.16.

Tabla 5.9 Resultados de tamaño de partícula de los tres APIs

API	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)	D[4.3]
HQ	31,0	174,1	330,4	190,0
KA	19,3	102,4	358,1	150,8
DPK	5,1	24,7	56,3	31,0

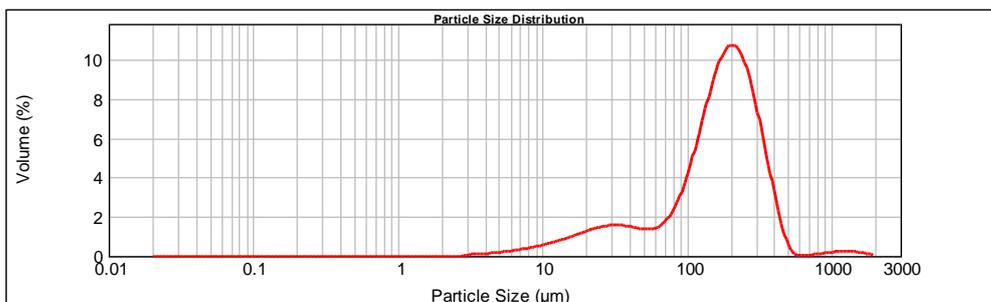


Figura 5.14 *Distribución de tamaños de partícula HQ*

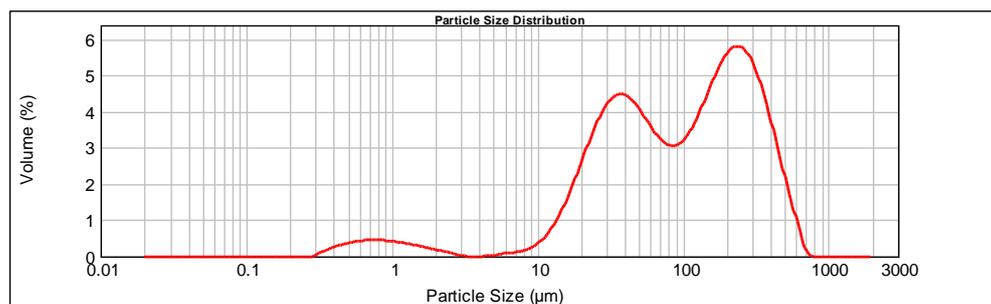


Figura 5.15 *Distribución de tamaños de partícula KA*

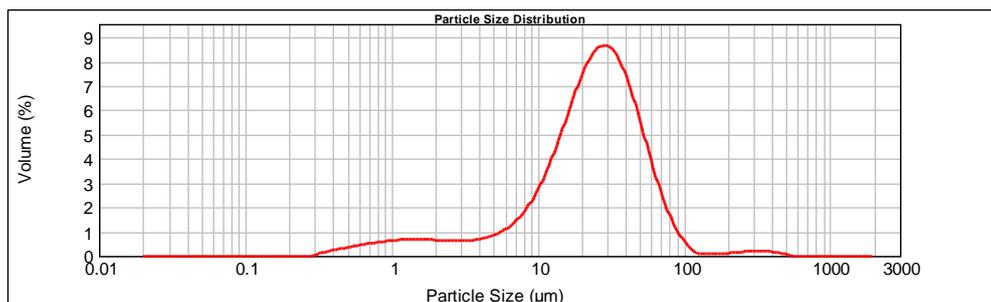


Figura 5.16 *Distribución de tamaños de partícula DPK*

Examinando la distribución gráfica de tamaño de partícula de HQ (Figura 5.14) se puede concluir que se trata de un polvo bastante homogéneo donde el tamaño de partícula medio es 190,0 µm, sólo un 10% del polvo tiene un tamaño inferior a 31,0 µm, un 50% un tamaño inferior a 174,1 µm y el 90% un tamaño inferior a 330,4 µm.

En el caso del KA (Figura 5.15) se observan dos grupos diferenciados de tamaños de partícula: el primer grupo con un tamaño de partícula alrededor de 50 µm y el segundo

grupo con un tamaño de partícula cerca de 300 μm . El tamaño medio del lote es 150,8 μm . Aunque se piensa que la distribución de tamaños de partícula del presente lote (K13360701) no dará problemas al elaborar la crema, se pedirá al proveedor una mejor homogeneización de los futuros lotes.

En el caso del DPK, se observa una correcta distribución de tamaños de partícula que demuestra la homogeneidad del lote. El tamaño de partícula medio es 31,0 μm tratándose de un sólido micronizado.

5.1.5. CONCLUSIONES

- Los tres APIs han sido analizados según métodos generales de USP-NF y/o Ph.Eur. cumpliendo las especificaciones del proveedor (en el caso de KA y DPK) y las especificaciones de la monografía de USP-NF en el caso de HQ.
- Se ha determinado la distribución de tamaño de partícula, parámetro crítico, en la elaboración de semi-sólidos comprobando que las distribuciones de tamaño de partícula de los lotes de HQ y DPK son correctas. Mientras que la distribución de tamaños del lote de KA, aun no siendo incorrecta, es muy amplia, lo que obliga a solicitar al proveedor una mejor homogeneización de la muestra para futuros lotes.
- Según los resultados de todos los ensayos realizados, se consideran los tres lotes de API adecuados para su incorporación en la formulación de un semi-sólido, en este caso, una crema.

5.2. ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD CON EXCIPIENTES

5.2.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente estudio es doble. Debido a que inicialmente no se encuentra ningún tipo de información en referencia a la compatibilidad de HQ con KA y DPK, el estudio de compatibilidad con excipientes se plantea únicamente con la HQ como API y se estudia la compatibilidad entre HQ:KA, HQ:DPK y la HQ con una serie de excipientes. Una vez demostrada su compatibilidad, se realiza un estudio que tiene como objetivo comprobar la compatibilidad de todos los componentes de la formulación, los tres APIs junto con los excipientes seleccionados a la proporción aproximada en que estarán en la fórmula.

Se realiza una búsqueda bibliográfica de los excipientes que, a priori, podrían ser más interesantes para la formulación de una crema. Considerando la posibilidad de que los tres API sean compatibles entre sí, se seleccionan los excipientes pensando en elaborar una crema; el gel queda descartado por la insolubilidad del DPK en agua. Después de un exhaustivo cribado, los excipientes seleccionados para llevar a cabo el estudio de compatibilidad son los contenidos en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10 Lista de excipientes para estudiar compatibilidad

Componente	Abreviación	Funcionalidad
Hidroquinona	QH	Principio activo
Ácido kójico	KA	Principio activo/Conservante
Dipalmitato kójico	DPK	Principio activo/Conservante
Metabisulfito sódico	SMB	Conservante
Avobenzona (Eusolex 9020)	AVB	Filtro solar
Octinoxate (Eusolex 2292)	OCT	Filtro solar
Butilhidroxianisol	BHA	Antioxidante
Butilhidroxitolueno	BHT	Antioxidante
Edetato disódico	EDTA	Agente quelante
Monoestearato de propilenglicol (Myrj 52s)	PGM	Emulgente
Mezcla de alcohol cetílico/Ceteth-20/Steareth-20 (Emulcire 61 WL 2659)	EM	Emulgente
Polisorbato 20	T20	Emulgente
Polisorbato 80	T80	Emulgente
Monoestearato de glicerilo	GMS	Emulgente
Baselina blanca	WP	Emoliente
Baselina líquida	LP	Emoliente

5.2.2. MATERIALES

5.2.2.1. Principios activos y patrones

HQ, *european pharma* Grade. Eastman/Fagron (Barcelona, España). Lote TS40736000

KA. CMS (Oxfordshire, Reino Unido). Lote K13360701

DPK. CMS (Oxfordshire, Reino Unido). Lote K16330603

HQ (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

KA (analytical standard $\geq 99.0\%$). Fluka (Buchs, Switzerland)

CAPÍTULO 5: PREFORMULACIÓN

DPK ($\geq 98.0\%$). Sino Lion (Massó, Barcelona)

5.2.2.2. *Reactivos y soluciones*

Reactivos:

Acetonitrilo (HPLC-gradiente) PAI-ACS. Panreac (Barcelona, España)

Agua (HPLC). Obtenida a partir de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

Ácido Acético glacial (RFE, USP, BP, Ph. Eur.) PRS-CODEXC

Tetrahidrofurano (para UV, IR, HPLC, GPC). Panreac (Barcelona, España)

5.2.2.3. *Aparatos y utillaje*

Aparatos:

Balanza analítica BP211D Sartorius

Calorímetro diferencial de barrido DSC 822^e, Mettler Toledo

Estufa T5028 Heraeus

Agitador orbital Reax-2 Heidolph

Baño de ultrasonidos Ultrasons Selecta

HPLC 1200 Agilent constituido por termostato de columna, bomba cuaternaria, inyector automático refrigerado y detector DAD. El sistema es controlado por el Chemstation version A.07

Utillaje:

Crisol de aluminio estándar 40 μ l

Espátula acero inoxidable

Pesasustancias

Matraces aforados de 50 y 100 ml

Imán

Pipetas de doble aforo de 1 ml, 10 ml

Vaso de precipitados de 1 l

Viales HPLC 2 ml

Pipetas *Pasteur* de vidrio

Tubos de ensayo 10 ml

Columna cromatográfica Phenogel™ 5 µm 50 Å, 4,6 x 300 mm

Pre-columna cromatográfica Phenogel™ 4,6 x 30 mm

Columna cromatográfica Zorbax SB-Phenyl 5 µm, 80 Å, 4,6 x 250 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

5.2.3. METODOLOGÍA

5.2.3.1. *Muestras involucradas en el estudio*

El estudio se lleva a cabo con las muestras siguientes:

- Componentes individuales:

Se pesa una cantidad suficiente de cada uno de los excipientes individuales y de cada uno de los tres APIs para la realización de los ensayos. Se preparan dos viales de cada sustancia: uno se utiliza para realizar el análisis inicial y el otro se introduce en la estufa a 50 °C.

- Mezclas binarias:

Las mezclas estudiadas son las descritas en la Tabla 5.11.

Se preparan dos replicados de cada mezcla de la siguiente forma:

- 1) Pesar exactamente alrededor de 400 mg de HQ y 40 mg de excipiente directamente en un vial de vidrio topacio.
- 2) Agitar el vial para homogeneizar el contenido.
- 3) Observar que no haya aglomerados.

Uno de los replicados rotulado como PM se utiliza para realizar el análisis inicial y el otro, rotulado como SM es introducido en la estufa a 50 °C.

CAPÍTULO 5: PREFORMULACIÓN

- Mezcla final:

La mezcla final de todos los componentes en una proporción aproximada a la que se utilizará en la formulación se prepara según Tabla 5.12.

Se preparara la mezcla de la siguiente forma:

- 1) Pesar exactamente cada uno de los componentes según Tabla 5.12 en un bote topacio.
- 2) Agitar el bote para homogeneizar el contenido en el agitador orbital durante 20 minutos

Una parte de la mezcla se utiliza para realizar el análisis inicial y el resto del bote se introduce en la estufa a 50 °C.

Tabla 5.11 Descripción de las mezclas de HQ con API y con excipientes

Número	Mezcla	Proporción
Mezcla 1	HQ:KA	1:1 / 1:2
Mezcla 2	HQ:DPK	1:1
Mezcla 3	HQ:EM	1:1
Mezcla 4	HQ:GMS	1:1
Mezcla 5	HQ:WP	1:1
Mezcla 6	HQ:LP	1:1
Mezcla 7	HQ:BHA	1:1 / 1:2
Mezcla 8	HQ:BHT	1:1 / 1:2
Mezcla 9	HQ:OCT	1:1
Mezcla 10	HQ:AVB	1:1
Mezcla 11	HQ:EDTA	1:1
Mezcla 12	HQ:PGM	1:1
Mezcla 13	HQ:T80	1:1
Mezcla 14	HQ:SMB	1:1
Mezcla 15	HQ:T20	1:1

Tabla 5.12 Cantidades pesadas para la preparación de la mezcla final

Componente	Fórmula (%)	Cantidad (g)
HQ	4,00	1,20
KA	2,00	0,60
DPK	2,00	0,60
BHA	0,10	0,03
BHT	0,10	0,03
EDTA	0,10	0,03
SMB	0,10	0,03
T80	10,00	3,00
T20	10,00	3,00
EM	10,00	3,00
GMS	10,00	3,00
PGM	5,00	1,50
WP	5,00	1,50
LP	5,00	1,50

5.2.3.2. Condiciones de almacenamiento y frecuencia de análisis

Para evaluar las potenciales incompatibilidades entre los APIs y los diferentes excipientes se analizaron tanto los componentes individuales como la mezcla según la Tabla 5.13.

Tabla 5.13 Almacenamiento y frecuencia de análisis

Condiciones	Tiempo	
	0	1 mes
Temperatura ambiente	✓	
50 °C		✓

5.2.3.3. Ensayos a realizar

Los ensayos realizados se muestran en la Tabla 5.14.

Tabla 5.14 Ensayos a realizar durante el estudio

Ensayos	Inicial	1 mes
Aspecto	✓	✓
DSC	✓	
Riqueza y PD*	✓	✓

*PD: productos de degradación

5.2.3.4. Métodos analíticos

I. Aspecto

En un lugar bien iluminado, sobre papel blanco, describir el aspecto, color y posibles defectos de los polvos.

II. DSC

El aparato empleado para esta ensayo es un DSC (calorimetría diferencial de barrido) Mettler Toledo modelo DSC 822e. Las condiciones del ensayo son las siguientes:

Muestra:	pesar aproximadamente 3 mg
Crisol:	crisol estándar de Al con tapa de 40 μ l
Rango temperatura:	30 – 300 °C
Velocidad de calentamiento:	10 °C/min
Gas de purga:	50 ml/min N ₂

III. Riqueza y productos de degradación

La valoración de la riqueza y los productos de degradación se realiza siguiendo el método cromatográfico desarrollado por HPLC descrito en el anexo I.

La valoración de la riqueza de DPK en las diferentes muestras involucrado se realiza siguiendo el método cromatográfico desarrollado por GPC descrito en el anexo II.

5.2.4. RESULTADOS Y DISCUSION

Los tres APIs (HQ, KA y DPK) son estables almacenados a las condiciones que se ha llevado a cabo el estudio – 1 mes a 50 °C –. No se observa ningún cambio en el aspecto y químicamente permanecen constantes ya que la degradación sufrida tanto por la HQ como por el KA es inferior al 1,0% (0,89% y 0,56%, respectivamente) siendo este valor el resultado de la suma de picos muy pequeños. El caso del DPK se evalúa por el método de GPC (anexo II) ya que no eluye en el método utilizado para evaluar el estudio de compatibilidad con excipientes (anexo I) debido a su naturaleza química (totalmente apolar). Su estabilidad frente a la temperatura es buena ya que la valoración de DPK al cabo de 1 mes a 50 °C es 97,9%.

Los cambios químicos producidos en las mezclas se clasifican en tres grupos según el criterio de degradación propuesto en la Tabla 5.15. Los cambios químicos de todas las mezclas se presentan en la Tabla 5.16.

Tabla 5.15 Criterio de clasificación de muestras según degradación producida a 1 mes a 50 °C

Evolución de la degradación	Nivel de interacción	
Δ PdD < 1,0%	Baja	
Δ PdD: 1,0 – 2,0%	Media	
Δ PdD > 2,0%	Alta	

El termograma obtenido en el DSC de HQ, Figura 5.17a, sólo muestra un pico endotérmico agudo que corresponde a la fusión de la HQ a 172,4 °C. A continuación se observa un evento endotérmico amplio, a partir de 210 °C, debido a la descomposición de la HQ. Este perfil de termograma es característico de una sustancia anhidra cristalina que también es mostrado tanto por el KA como por el DPK siendo las temperaturas de fusión 153,0 y 92,6 °C, respectivamente, Figuras 5.17b y 5.17c.

En la mayoría de mezclas binarias (PM), el pico de fusión de la HQ se conserva correctamente a pesar de los cambios hacia valores de temperatura ligeramente más altos o más bajos. Esto se debe a que lo que se analiza son mezclas de dos componentes, pero no necesariamente indica una posible interacción. En algunos casos, se observan también variaciones en los valores de entalpía de las PM que se atribuyen a cierta heterogeneidad en la pequeña muestra utilizada para las mediciones de DSC. Los datos térmicos tanto de la HQ como de los excipientes en las mezclas se presentan en las Tablas 5.17 y 5.18, respectivamente.

CAPÍTULO 5: PREFORMULACIÓN

Tabla 5.16 Resultados cromatográficos del estudio de compatibilidad con excipientes

Mezclas	Inicial				1 mes a 50 °C				ΔPD
	R	E	DP	MB	R	E	DP	MB	
HQ	99,9	-	0,02	99,9	98,2	-	0,89	99,1	0,87
KA	99,5	-	0,12	99,6	98,7	-	0,56	99,3	0,44
DPK	99,9	-	N.D.	99,9	97,9	-	N.D.	92,5	-
HQ:EM	98,5	N.D.	1,03	99,5	94,8	N.D.	2,52	97,3	1,49
HQ:GMS	98,5	N.D.	1,00	99,5	96,2	N.D.	0,74	97,0	0,26
HQ:WP	98,3	N.D.	1,18	99,4	97,1	N.D.	1,07	98,2	0,11
HQ:LP	98,2	N.D.	1,21	99,4	97,4	N.D.	0,99	98,4	0,22
HQ:BHA	95,4	98,8	2,49	99,6	95,2	99,8	1,50	99,0	0,99
HQ:BHT	98,6	96,8	1,03	98,7	96,8	97,5	0,69	98,0	0,14
HQ:KDP	97,3	N.D.	1,87	99,2	98,0	N.D.	1,16	99,2	0,71
HQ:OCT	96,8	100,4	0,57	99,2	97,8	98,6	1,20	99,4	0,63
HQ:AVB	97,3	101,6	1,21	100,7	93,2	92,2	6,23	98,9	5,02
HQ:EDTA	98,1	N.D.	1,35	99,5	91,1	N.D.	6,94	98,0	5,59
HQ:PGM	98,2	N.D.	1,18	99,4	92,6	N.D.	6,17	98,7	4,99
HQ:T80	96,6	N.D.	2,33	99,0	92,6	N.D.	5,68	98,3	3,35
HQ:MBS	95,2	N.D.	4,07	99,3	94,5	N.D.	5,30	99,8	1,73
HQ:KA	100,8	N.D.	0,00	100,8	97,8	94,6	1,38	97,6	1,38
HQ:T20	98,2	N.D.	1,37	99,5	94,4	N.D.	4,96	99,4	3,59

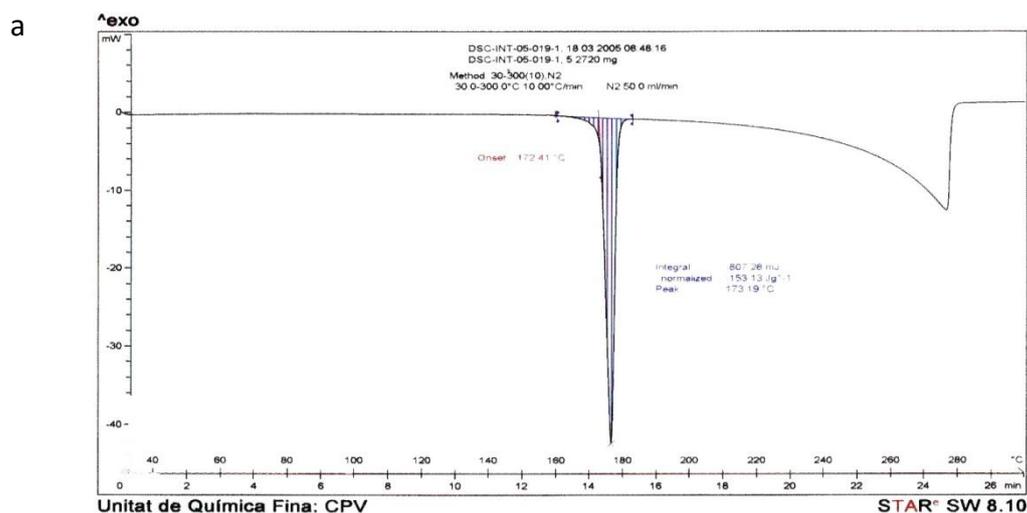
R:Riqueza (%)

E: Excipiente (%)

DP: Productos de degradación (%)

MB: Balance de materia (%)

ΔPD: Variación en lo productos de degradación (%)



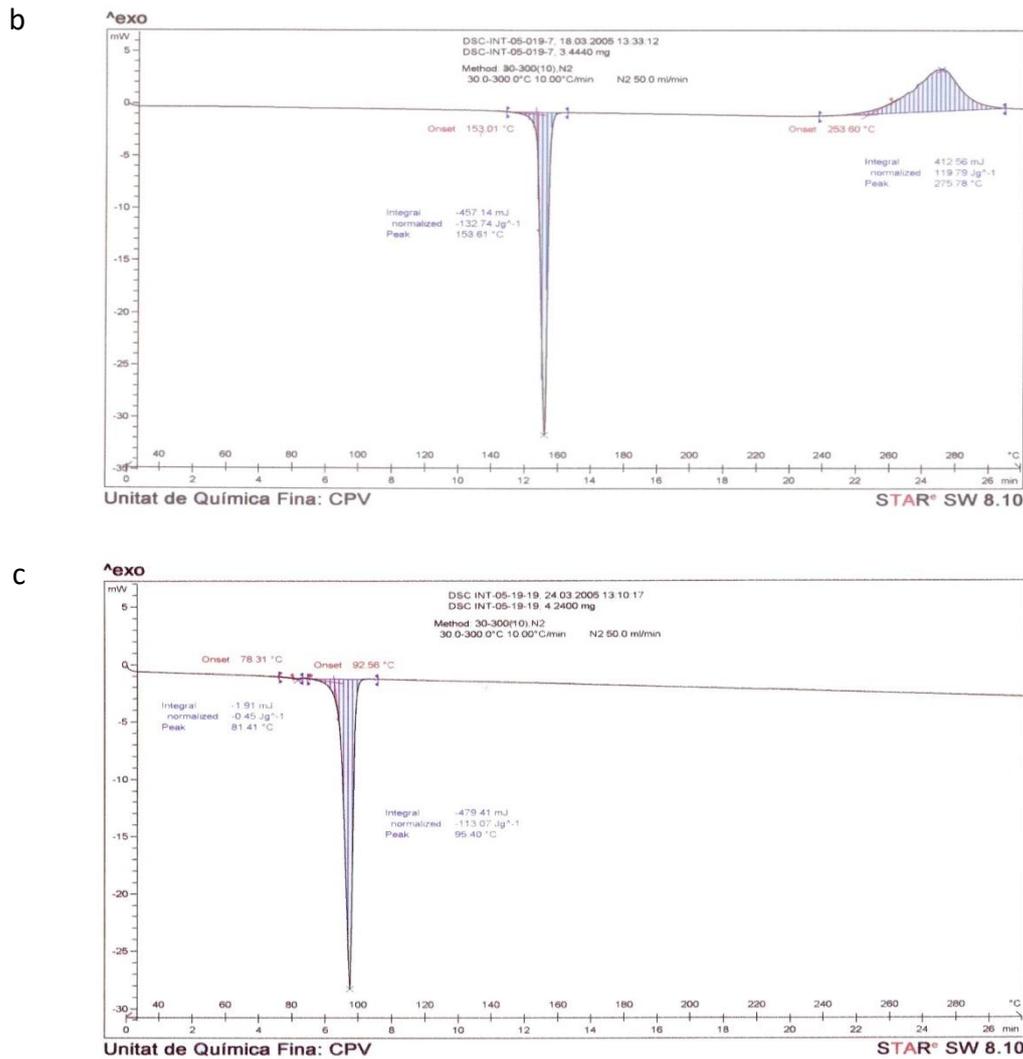


Figura 5.17 Termogramas obtenidos en el DSC

a: HQ; b: KA; c: DPK

- Mezclas HQ:WP, HQ:LP, HQ:BHA, HQ:BHT y HQ:DPK

Los termogramas obtenidos con las muestra PM pueden considerarse una superposición de los termogramas de los dos componentes individuales tal como muestran las Figuras 5.18a-5.18g. Por tanto, se puede concluir que en estas mezclas binarias no se da ningún tipo de interacción física entre componentes. Del análisis cromatográfico de estas mezclas, tanto las muestras PM como las SM, no se observa ningún cambio significativo: los valores de HQ permanecen constantes y no se observa ningún aumento significativo de los productos de degradación. Así, la HQ es compatible con WP, LP, BHA, BHT y DPK.

Tabla 5.17 Datos térmicos relativos a la HQ obtenidos en los DSC de las PM

Mezclas	Proporción HQ:Excipiente	T _{PEAK} (°C)	T _{ONSET} (°C)	ΔH _F (j/g)
HQ	-	172,4	173,2	-153,1
HQ:KA	1:1	129,0	145,4	26,0
	1:2	-	-	-
HQ:KDP	1:1	166,9	172,5	-85,6
HQ:EM	1:1	165,7	173,2	-119,5
HQ:GMS	1:1	156,2	170,6	-70,9
HQ:WP	1:1	172,2	173,2	-131,2
HQ:LP	1:1	171,9	173,3	-163,6
HQ:BHA	1:1	169,9	172,4	-149,4
	1:2	164,5	172,6	-164,5
HQ:BHT	1:1	171,9	172,8	-151,0
	1:2	170,2	172,0	-84,5
HQ:OCT	1:1	155,3	169,4	-133,3
HQ:AVB	1:1	145,9	165,3	-38,5
HQ:EDTA	1:1	172,4	172,8	-150,7
HQ:PGM	1:1	116,9	170,3	-30,6
HQ:T80	1:1	140,8	169,1	87,4
HQ:SMB	1:1	172,3	173,0	-152,1
HQ:T20	1:1	129,6	172,4	-64,10

▪ Mezcla HQ:GMS

En el termograma de esta mezcla, el pico endotérmico de HQ se ha ensanchado y bajado hacia una temperatura significativamente más baja, 156 °C (Figura 5.19a). Los cambios en el termograma son debidos a la solubilidad de la HQ en el excipiente fundido. Además también se observa una forma muy extraña en el pico endotérmico de fusión posiblemente debido a una vibración del crisol durante el transcurso de la medición. El análisis cromatográfico de la muestra SM muestra un valor riqueza del 96% y un valor en productos de degradación alrededor del 1%. Estos resultados sugieren que la HQ es compatible con el GMS.

Tabla 5.18 Datos térmicos relativos a los excipientes obtenidos en los DSC tanto de las muestras individuales como de las PM

Mezcla	P*	Excipientes individuales			PM		
		T _{PEAK} (°C)	T _{ONSET} (°C)	ΔH _F (j/g)	T _{PEAK} (°C)	T _{ONSET} (°C)	ΔH _F (j/g)
HQ:EM	1:1	48,1	48,8	-30,1	46,2	49,7	-58,6
HQ:GMS	1:1	59,8	60,2	-41,2	56,1	63,3	-90,9
HQ:WP	1:1	44,1	47,4	-37,2	45,4	54,8	-5,9
HQ:LP	1:1	-	-	-	-	-	-
HQ:BHA	1:1	40,9	61,1	-51,5	56,8	61,6	-0,92
	1:2	40,9	61,1	-51,5	57,4	60,9	-2,11
HQ:BHT	1:1	69,5	71,0	-46,9	69,3	71,7	-0,85
	1:2	69,5	71,0	-46,9	69,7	71,2	-19,6
HQ:KDP	1:1	92,6	95,4	-113,1	87,9	92,0	-36,9
HQ:OCT	1:1	-	-	-	-	-	-
HQ:AVB	1:1	77,8	78,5	-50,2	81,8	86,3	-35,3
HQ:EDTA	1:1	116,5	176,4	-205,5	-	-	-
HQ:PGM	1:1	244,4	250,8	-95,5	-	-	-
HQ:T80	1:1	-	-	-	-	-	-
HQ:SMB	1:1	164,5	203,5	-234,6	-	-	-
HQ:KA	1:1	153,0	153,6	-132,7	114,7	118,6	-58,4
	1:2	253,6	275,8	119,8	114,5	118,0	-102,4
HQ:T20	1:1	-	-	-	-	-	-

*P: proporción HQ:Excipiente

▪ Mezcla HQ:EM

En el caso de la mezcla HQ:EM, existen dos picos de fusión endotérmicos: uno debido a EM (a 46,2 °C) y otro debido a HQ (a 165,9 °C), indicando que no se da ningún tipo de interacción en estado sólido. El pico de fusión de HQ tiene un artefacto posiblemente a causa de la naturaleza que le otorgó una textura grasa a la mezcla y ésta no fue presionada correctamente contra la base del crisol, Figura 5.19b. Una disminución alrededor del 4% es observada en el valor de riqueza en la muestra SM respecto a la muestra PM. Esta disminución está relacionada tanto con el incremento de productos de degradación que ha sido duplicado después de 1 mes de exposición a 50 °C como a un posible problema en el proceso de extracción de la HQ.

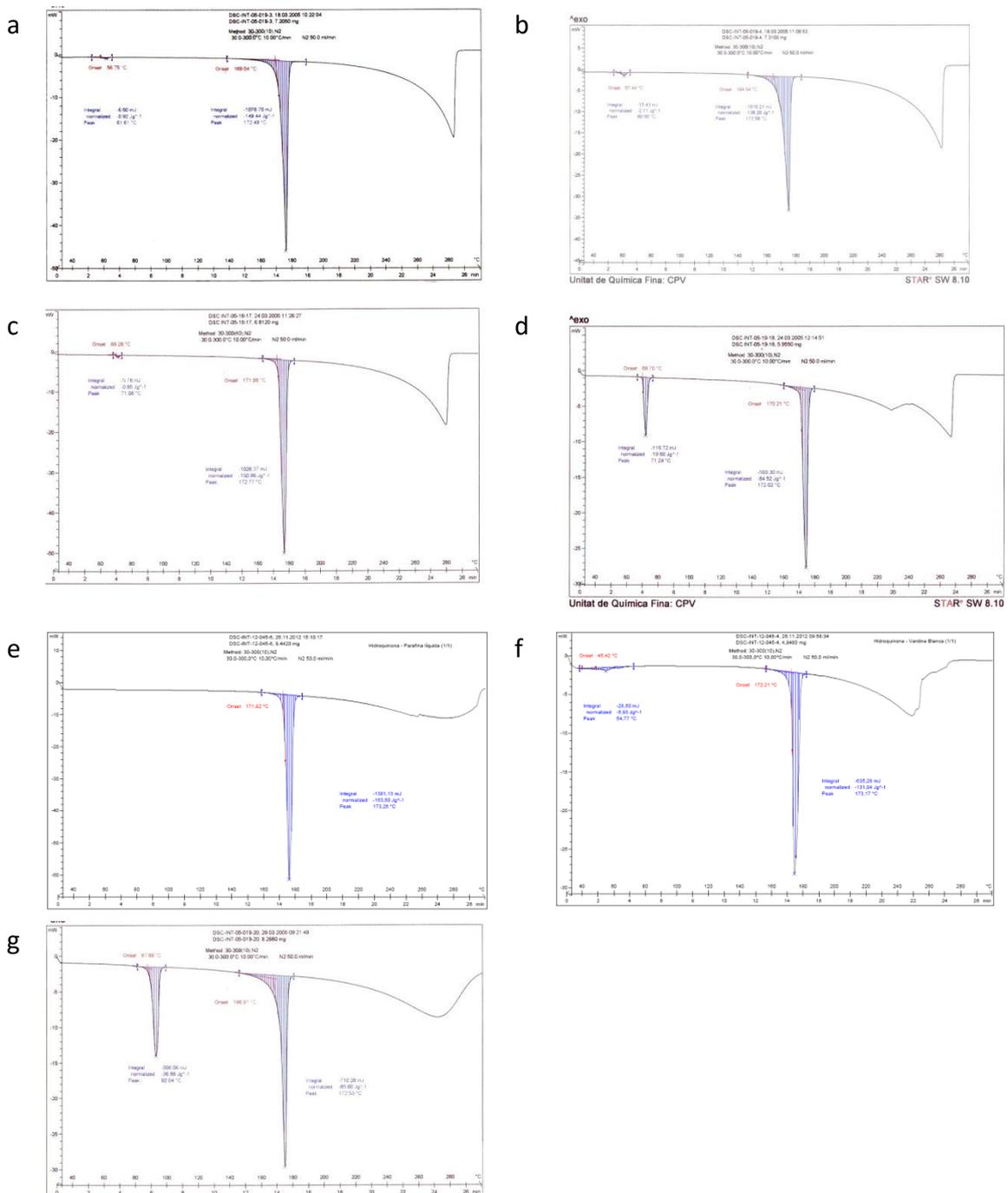


Figura 5.18 Termogramas obtenidos en el DSC de las mezclas

a: HQ:BHA (1:1) PM; b: HQ:BHA (1:2) PM; c: HQ:BHT (1:1) PM; d: HQ:BHT (1:2) PM; e: HQ:LP (1:1) PM; f: HQ:WP (1:1) PM; g: HQ:DPK (1:1) PM

- Mezclas HQ:PGM, HQ:T80 y HQ:T20

Los termogramas obtenidos en los DSC de estas mezclas mostraron un muy pico endotérmico muy amplio a temperaturas entre 116 y 140 °C (Figuras 5.19c-5.19e) que, teniendo en cuenta las diferencias de solubilidad en excipiente fundido, puede ser atribuido al punto de fusión de la HQ. En los casos de las muestras HQ:T20 y HQ:T80 PM, el pico endotérmico de fusión HQ

tenía, además, una forma muy extraña, posiblemente debido a una vibración del crisol durante el transcurso de la medición. Una disminución entre el 4-6% en los valores de riqueza, y relacionada con un incremento en los DP, se ha detectado en las muestras SM de estas mezclas. El aumento más importante es observado en la mezcla HQ:PGM que aumenta desde un 1,18% a 6,17% después de 1 mes de exposición a 50 °C. Evaluando los datos obtenidos se concluye que no existe ninguna evidencia de una posible interacción física mientras que los datos cromatográficos si sugieren una interacción química.

- Mezcla HQ:EDTA y HQ:AVB

El termograma obtenido en el DSC de EDTA muestra un amplio pico endotérmico a 116,5 °C debido a la pérdida del agua de deshidratación seguido de un pico endotérmico agudo a 244 °C indicando la fusión de EDTA. La mezcla HQ:EDTA presenta un pico endotérmico bien definido a 172,8 °C que sugiere que no existe ningún tipo de interacción entre el EDTA y la HQ. Por otro lado, dos picos endotérmicos a 81,8 °C debido a AVB y a 145,9 °C debido a HQ son detectados en la mezcla HQ:AVB PM. Este desplazamiento hacia temperaturas de fusión más bajas teniendo en cuenta la naturaleza cristalina del AVB, sugiere una posible interacción física entre los dos compuestos. Tal y como se observa en los resultados cromatográficos de estas mezclas, la HQ es degradada alrededor de un 6% que puede ser más o menos crítico en función de la proporción final en la formulación.

- HQ:KA mixture

El termograma obtenido con el DSC de KA muestra un pico endotérmico agudo a 153,0 °C que corresponde a su punto de fusión, seguido por un amplio exotérmico a 253,6 °C debido a KA descomposición. La curva adquirida en el DSC de la mezcla HQ:KA (1:1) muestra dos picos endotérmicos, no bien separados, previsiblemente el primero correspondiente al KA y el segundo correspondiente a la HQ. Sin embargo, se observa un desplazamiento muy marcado hacia temperaturas más bajas, en más de 20 °C que además va acompañado de una reducción del tamaño de pico y la entalpía por unidad de masa de HQ (Figura 5.20a). Esta interacción fue confirmada por el termograma de la mezcla HQ:KA (1:2) que muestra la desaparición del segundo pico correspondiente a la fusión de la HQ (Figura 5.20b). Tanto en las muestras PM como las muestras SM de esta mezcla no se detecta ningún tipo de degradación

CAPÍTULO 5: PREFORMULACIÓN

química. Así se puede concluir que basado en los datos térmicos existe una interacción en estado sólido de la HQ con el KA, pero no necesariamente una incompatibilidad desde el punto de vista de los datos cromatográficos.

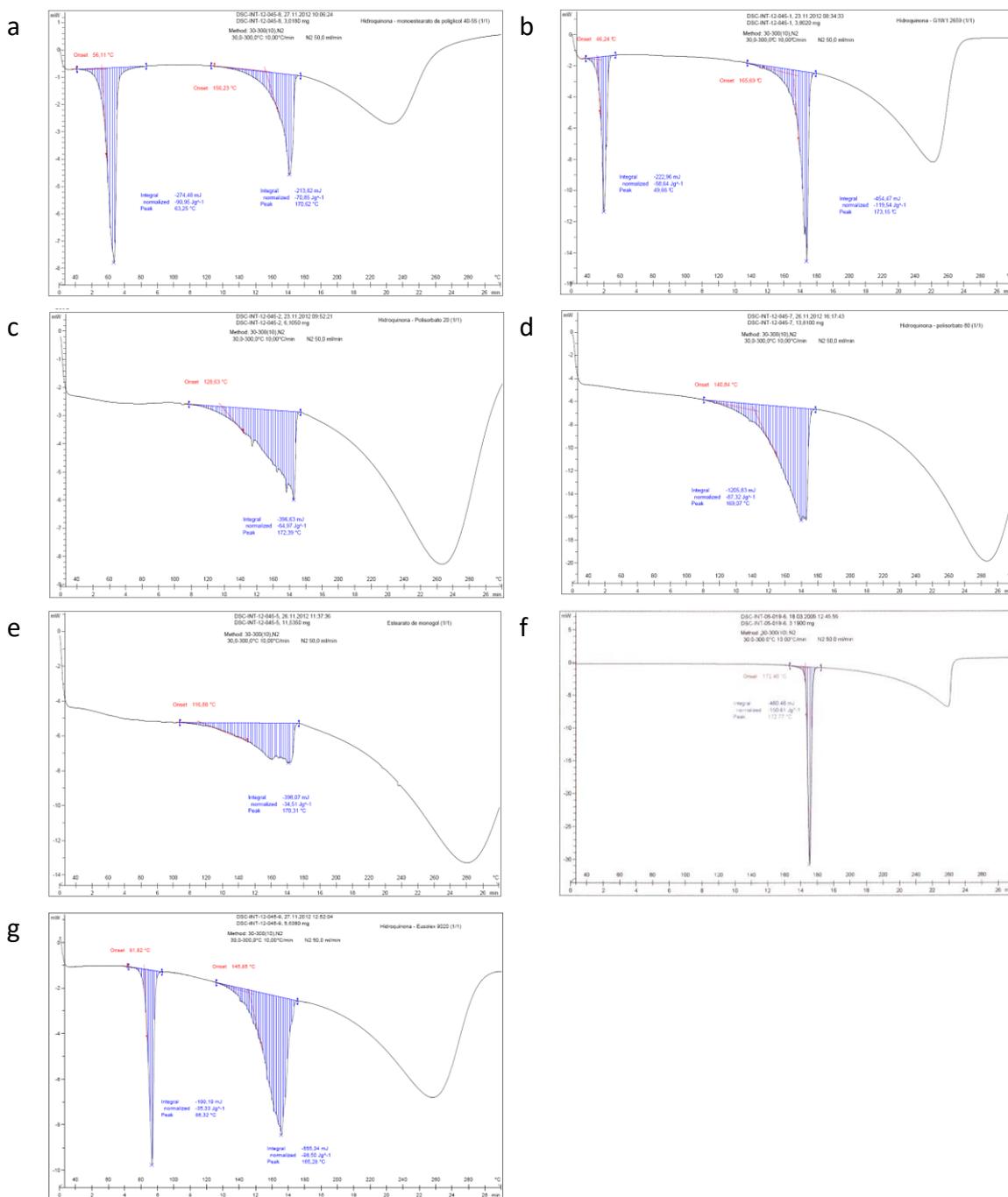


Figura 5.19 Termogramas obtenidos en el DSC de las mezclas

a: HQ:GMS PM; b: HQ:EM PM; c: HQ:T20 PM; d: HQ:T80 PM; e: HQ:PGM PM; f: HQ:EDTA PM; g: HQ:AVB PM

▪ Mezcla HQ:OCT

En la Figura 5.20c se observa un nuevo pico endotérmico a 125,9 °C además del pico endotérmico de fusión a 155,3 °C correspondiente a la fusión de la HQ. El pico aparecido a 125,9 °C no puede ser debido al OCT al tratarse de un excipiente líquido. En el análisis cromatográfico ninguna degradación significativa es detectada. Por lo tanto, la aparición del nuevo pico en el DSC parece indicar alguna interacción física con el excipiente.

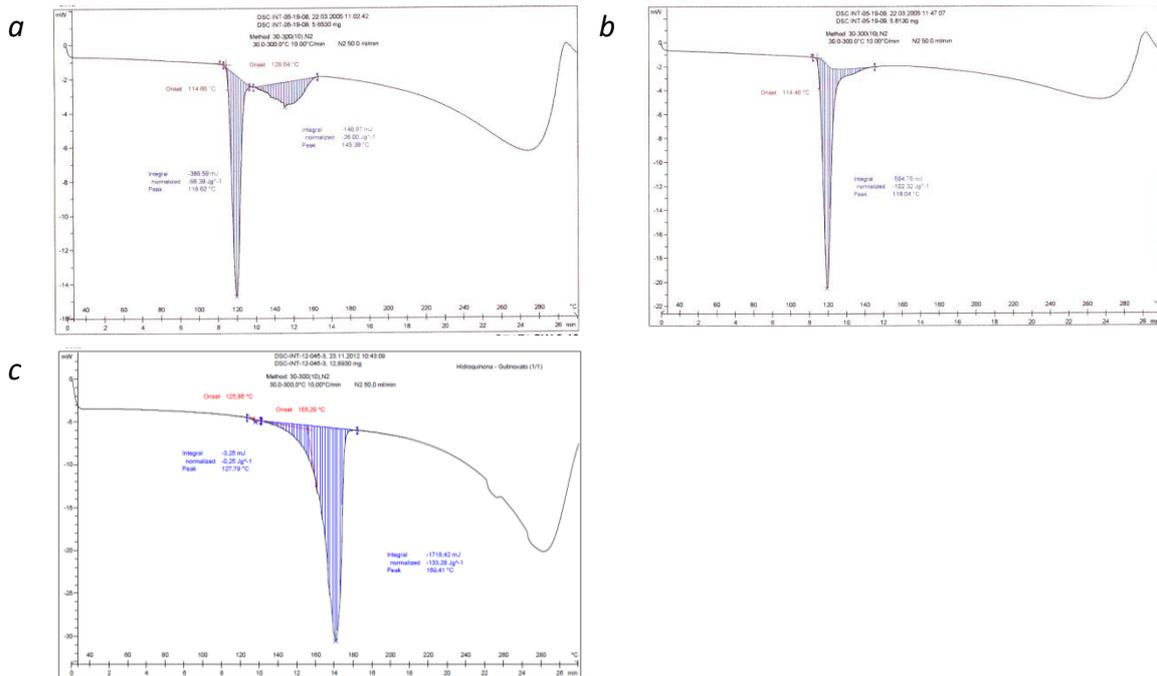


Figura 5.20 Termogramas obtenidos en el DSC de las mezclas
 a: HQ:KA (1:1) PM; b: HQ:EM KA (1:2) PM; c: HQ:OCT PM

▪ HQ:SMB mixture

El termograma de la mezcla HQ:SMB no fue realizado ya que el SMB funde con descomposición a 150 °C y por tanto, el pico de fusión de la HQ no se habría podido ver. En el análisis cromatográfico, inicialmente en la muestra PM ya se observa la aparición de algunos productos de degradación. Esta degradación aumenta alrededor de un 2% en la muestra SM.

Se estudia la estabilidad de la mezcla final constituida por todos los componentes de la formulación: los tres APIs y el conjunto de excipientes en una proporción similar a la que tendrá cada uno de ellos en la formulación final.

Se observa que los tres API se mantienen correctamente durante un mes a 50 °C tal y como se muestra en la Tabla 5.19. Se observa la formación de unos productos de

CAPÍTULO 5: PREFORMULACIÓN

degradación siendo la variación de éstos respecto al valor inicial de 0,11% que demuestra un nivel de interacción medio según la Tabla 5.15.

Tabla 5.19 Resultados del estudio de la mezcla final 1 mes a 50 °C

Parámetros	Inicial*	1 mes a 50 °C*
Valoración (HPLC)		
HQ	99,6	98,7
KA	100,1	99,3
DPK	100,5	99,9
BHA	98,8	98,1
BHT	99,3	98,7
OCT	99,1	98,9
AVB	100,6	98,9
Productos de degradación (HPLC)		
Individual	< LD	0,06
Totales	< LD	0,11

*: resultado de la valoración de los compuestos respecto a su valor nominal (%)

5.2.5. CONCLUSIONES

- Del estudio de compatibilidad de la HQ con los otros APIs y con los excipientes se puede concluir que:
 - La HQ es compatible tanto con KA como con DPK, ya que no se muestra ningún tipo de interacción química entre ellos.
 - No se observa ningún tipo de interacción HQ:excipiente en las mezclas 2, 5, 6, 7 y 8 (DPK, WP, LP, BHA, BHT) a lo largo del tiempo y en la condición estudiada.
 - En algunas mezclas tales como 4, 12, 13 y 15 (GMS, PGM, T80, T20) se observan disminuciones significativas en la temperatura de fusión de la HQ que son debidas a la diferencia de solubilidad del API con el excipiente fundido (distintas propiedades físico-químicas).
 - En las mezclas 1, 9 y 10 (KA, OCT y AVB) hay indicios de posibles interacciones físicas en estado sólido que solamente en el caso de la mezcla 10 – HQ:AVB – va acompañada de una degradación química

alta (aproximadamente 5,0%). Se estudian alternativas a este filtro solar pero son discriminadas por su falta de idoneidad en otros aspectos. De todas formas, la degradación en la formulación dependerá de las cantidades relativas entre ellos y de su interacción con el resto de componentes.

- Del estudio de compatibilidad de la mezcla final (mezcla de todos los componentes) se puede concluir que el nivel de interacción entre los componentes es medio, generando solamente un 0,11% de productos de degradación.

6. DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

6.1. INTRODUCCIÓN

Se pretende desarrollar una forma farmacéutica semisólida que contenga 4% de HQ, 2% de KA y 2% de DPK como principios activos para el tratamiento por vía tópica del melasma.

La forma farmacéutica a desarrollar sólo puede ser una crema debido a la diferencia de solubilidades de los tres principios activos: HQ y KA solubles en agua y DPK soluble en aceite.

Para ello se utilizan una serie de excipientes que se ensayan en diferentes formulaciones cuyas propiedades serán evaluadas mediante una serie de controles físico-químicos. Los resultados de estos controles dirigirán el desarrollo de estas formulaciones hasta la obtención de una formulación estable, segura y eficaz de los principios activos en la concentración mencionada.

6.2. MATERIALES

Para facilitar su localización se ha agrupado el material en: materias primas, reactivos y soluciones, aparatos y utillaje.

6.2.1. MATERIAS PRIMAS

Hidroquinona, european pharma Grade. Eastman/Fagron (Barcelona, España)	(HQ)
Ácido kójico. CMS (Oxfordshire, Reino Unido)	(KA)
Dipalmitato kójico. CMS (Oxfordshire, Reino Unido)	(DPK)
Lutrol F127 – Poloxamer 407–. Basf (Mannheim, Alemania)	(PLX)
Alcohol cetoestearílico. Fagron (Barcelona, España)	(CA)
Metabisulfito sódico. Fagron (Barcelona, España)	(SMB)
Propilenglicol. Fagron (Barcelona, España)	(PEG)

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Alcohol isopropílico. Fagron (Barcelona, España)	(IA)
Etanol 96 °. Fagron (Barcelona, España)	(EtOH)
Eusolex 9020 –Avobenzona–. Merck (Darmstadt, Alemania)	(AVB)
Eusolex 2292 – (Octinoxato–. Merck (Darmstadt, Alemania)	(OCT)
Butilhidroxianisol. Fagron (Barcelona, España)	(BHA)
Butilhidroxitolueno. Fagron (Barcelona, España)	(BHT)
EDTA sódico. Fagron (Barcelona, España)	(EDTA)
Lauril sulfato sódico. Fagron (Barcelona, España)	(SLS)
Estol 3603 –Triglicérido Caprílico/Cáprico–. Uniqema (Gouda, Países Bajos)	(CCT)
Brij 35 –Polioxietileno 23 lauril éter–. Uniqema (Gouda, Países Bajos)	(PLE)
Myrj 52 –Monoestearato de polietilenglicol–. Massó (Barcelona, España)	(PGM)
Span 20 –Monolaurato de sorbitano–. Uniqema (Gouda, Países Bajos)	(S20)
Emulcire 61 WL 2659 –Alcohol cetílico/Ceteth-20/Steareth-20–. Fagron (Barcelona, España)	(EM)
Estol 1474 –Estearato de glicerilo–. Uniqema (Gouda, Países Bajos)	(GMS)
Tween 20 –Polisorbato 20–. Massó (Barcelona, España)	(T20)
Tween 80 –Polisorbato 80–. Massó (Barcelona, España)	(T80)
Vaselina filante. Fagron (Barcelona, España)	(WP)
Vaselina líquida. Fagron (Barcelona, España)	(LP)
Glicerina. Fagron (Barcelona, España)	(GLY)

6.2.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

Acetonitrilo (para UV, IR, HPLC, ACS). Panreac (Barcelona, España)

Ácido acético glacial (para HPLC). Panreac (Barcelona, España)

Tetrahidrofurano (para UV, IR, HPLC, GPC). Panreac (Barcelona, España)

Agua calidad HPLC se obtiene a través de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

6.2.3. APARATOS Y UTILLAJE

Aparatos:

Balanza precisa 600C

Balanza AB104 Mettler Toledo

Baño termostático SS5 Selecta

Baño termostático SI11 SBS

Cámara de secado ED53 Binder – 55°C – (Tuttlingen, Alemania)

Nevera Liebherr LAB 2913

Cámara climática A (25 °C/60% HR) Dycometal CMO/300

Cámara climática B (30 °C/65% HR) Dycometal CMO/300

Cámara climática C (40 °C/75% HR) Dycometal CMO/300

Agitador de hélice RZR-1 Heidolph

Agitador magnético Agimatic ED Selecta

Mezclador planetario PRS Erweka

Mezclador-Emulsionador Stephan

Reactor BI-AGI-5 Lleal

Agitador ultraturrax L4R Silverson

Viscosímetro Brookfield CAP-2000+

Viscosímetro Visco Tester 500 Haake Thermo Scientific

Centrifuga Meditronic P Selecta

pHmetre 507 Crison

Extensómetro diseñado por el Dr. Alfonso del Pozo Ojeda y el Dr. JM^a Suñé Arbussà

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Estereoscopio binocular Shimadzu

Microscopio Leica DM 1000 LED

HPLC 1200 Agilent que consiste en un horno de columna, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de red de diodos (DAD), controlado por el software Chemstation versión B04.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Utillaje:

Varillas de vidrio para agitación

Vasos de precipitados de distintos volúmenes

Mortero y mano de mortero

Vidrios de reloj

Portaobjetos

Cubreobjetos

Vidrio liso para extensibilidad

Espátulas de acero inoxidable de diferentes dimensiones

Termómetro para controlar la temperatura del baño

Tubos centrífuga

Tubos de plástico flexible de polietileno de alta densidad (HDPE)

Pesasustancias

Matraces aforados de 10, 25, 50 y 100 ml Clase A

Tubos centrífuga de 10 ml

Pipeta doble aforo 1, 2, 5 y 10 ml Clase A

Botella 1 l Pyrex con tapón

Jeringas plástico 10 ml

Filtros de jeringa 33 0,45 μm Millex PVDF Millipore

Filtros de membrana 0,45 µm Durapore PVDF Millipore

Viales 2 ml HPLC

Pipetas Pasteur

Cronómetro Oregon Scientific

Columna cromatográfica Phenogel™ 5 µm 50 Å, 4,6 x 300 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

Pre-columna cromatográfica Phenogel™ 4.6 x 30 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

Columna cromatográfica Zorbax SB-Phenyl 5 µm, 80 Å, 4,6 x 250 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

6.3. MÉTODOS

6.3.1. MÉTODO ELABORACIÓN CREMA

- 1) Pesar los componentes de la fase oleosa, incluidos los emulgentes, y reunirlos en un mismo recipiente o reactor en función del tamaño del lote a preparar. Calentar en el baño termostático y homogeneizar a la velocidad adecuada. Calentar como mínimo a la temperatura de fusión del componente con punto de fusión más elevado, bajo agitación moderada para asegurar su homogeneidad. La temperatura y tipo de agitación se indican en cada prototipo.
- 2) Pesar los componentes de la fase acuosa y reunirlos en otro recipiente. Calentar a la misma temperatura que la fase oleosa, bajo agitación moderada para garantizar su homogeneidad. La temperatura y tipo de agitación se indican en cada prototipo.
- 3) Emulsionar por adición de la fase acuosa sobre la oleosa. La velocidad de adición, duración, velocidad de agitación y tipo de agitación empleada se indican en cada prototipo.
- 4) Estabilizar el sistema mediante la agitación, que se indica en cada prototipo, durante toda la fase de enfriamiento. La temperatura final también se indica en cada prototipo.

- 5) Incorporación de los API de la siguiente manera:
 - HQ y KA (APIs termolábiles): disolverlos o dispersarlos en el mínimo volumen posible de un solvente con la polaridad adecuada que se indica en cada prototipo, incorporándolos bajo agitación adecuada (indicada en cada prototipo) cuando la temperatura de la emulsión haya descendido a la temperatura indicada en cada prototipo.
 - DPK (API liposoluble no termolábil): se puede incorporar junto con HQ y KA o se puede incorporar mediante disolución en la fase oleosa, indicado en cada prototipo.
- 6) Dejar reposar la fórmula durante el tiempo necesario para enfriarla hasta temperatura ambiente.
- 7) Acondicionamiento de la crema, según las necesidades particulares de cada prototipo. El tipo de envase utilizado debe ser adecuado y compatible con la crema que contiene.

6.3.2. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

La determinación u observación de las características organolépticas proporciona una primera impresión de la calidad del producto. Los diferentes viales se sitúan frente a una fuente de luz blanca. Observar las características organolépticas de la crema: homogeneidad, color, olor y textura posterior a la aplicación por vía tópica. Realizar el examen al cabo de 1 hora de finalizar la elaboración y acondicionamiento de la crema. Las diferentes muestras se ponen a diferentes condiciones de temperatura y humedad: 30 °C/65% HR, 40 °C /75% HR o 55 °C, y nevera 4 °C con el objetivo de realizar el examen organoléptico periódicamente para observar algún signo de inestabilidad.

6.1.1.1. *Observación en el estereoscopio*

La observación del aspecto se realiza con el estereoscopio binocular Shimadzu.

Procedimiento:

Depositar una pequeña cantidad de crema en un portaobjetos y aplicar encima el cubreobjetos de forma que no quede aire en la preparación y ésta sea translúcida. Observar al estereoscopio. Observar el aspecto de la muestra: homogeneidad.

6.1.1.2. Observación en el microscopio

La observación del aspecto se realiza con el microscopio Leica DM 1000 LED.

Procedimiento:

Depositar una pequeña cantidad de crema en un portaobjetos y aplicar encima el cubreobjetos de forma que no quede aire en la preparación y ésta sea translúcida. Observar al microscopio con un objetivo 20X/0.40. Observar el aspecto de la muestra: homogeneidad, existencia de partículas, etc.

6.3.3. DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD DE LA CREMA

Para caracterizar una de las propiedades reológicas de las cremas desarrolladas se realiza el ensayo de viscosidad dinámica mediante un viscosímetro rotacional.

6.1.1.3. Viscosímetro rotacional Brookfield

La determinación de la viscosidad durante el desarrollo de la formulación se realiza con el viscosímetro rotacional Brookfield CAP 2000+, el spindle utilizado es el nº 7 y la velocidad de 50 rpm.

Procedimiento:

Transferir el contenido de 10 tubos de crema en un vaso de precipitados de 75 ml. Se comprueba que la temperatura de la crema sea de 20 ± 1 °C. Se sumerge el spindle del viscosímetro dentro de la muestra y se pone en marcha el aparato a las revoluciones indicadas durante un minuto. Transcurrido el minuto se lee el valor de la escala en el viscosímetro. Las tablas de conversión del equipo dan un factor que multiplicado por el valor que marca el aparato da como resultado el valor de la viscosidad en cP tal y como indica la siguiente ecuación:

$$\text{Viscosidad (cP)} = \text{valor viscosímetro} \cdot \text{factor}$$

6.1.1.4. Viscosímetro rotacional Haake Thermo Scientific

La determinación de la viscosidad, en el prototipo definitivo y el estudio de estabilidad preliminar, se realiza con viscosímetro rotatorio Haake Visco Tester 500 Thermo Scientific con camisa termostática.

El sistema de medición es un dispositivo de cilindros coaxiales (SVI/CV), sistema SEARLE, controlando la temperatura de la muestra a 25 °C con el baño termostático Haake B3 controlado por el termostato Haake DC30.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

El programa de cizalla:

- Fase 0: Tiempo de espera tras el llenado del sistema de medida: 20 s.
- Fase 1: Tiempo de latencia: 20 s.
- Fase 2: Incremento progresivo de velocidad de cizalla de 0 s^{-1} a 200 s^{-1} en 3 minutos.
- Fase 3: Velocidad de cizalla constante a 200 s^{-1} durante 1 min.
- Fase 4: Disminución progresiva de velocidad de cizalla de 200 s^{-1} a 0 s^{-1} en tres minutos.

Procedimiento:

Introducir la cantidad de muestra suficiente en el interior de la copa para cubrir totalmente el sensor sin ser excesiva para que no se derrame con el giro del rotor. Iniciar el análisis, por el ordenador, ejecutado por el software RheoWin.

6.3.4. DETERMINACIÓN DEL pH DE LA CREMA

La determinación del pH se realiza con el pH-metro Crison 507.

Procedimiento:

Pesar 1,0 g de crema en un vaso de precipitados de 25 ml. Añadir 10 ml de agua desionizada, calentar a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y agitar mediante un agitador magnético hasta dispersión. Dejar enfriar y determinar el pH en pH-metro con el electrodo de líquidos.

El pH debe estar comprendido dentro de un rango adecuado para su aplicación tópica: entre 4 y 7 [1]. Pero debido a que la HQ se oxida muy rápidamente en presencia de álcalis, el pH no debería ser mayor a 6 [104].

6.3.5. DETERMINACIÓN DE LA EXTENSIBILIDAD

La determinación de la extensibilidad se realiza con el extensómetro diseñado por el Dr. Del Pozo Ojeda - Dr. Suñé Arbussà y construido en el departamento de *Tecnología Farmacéutica* de la Facultad de Farmacia de la UB.

Procedimiento:

Encajar la parte superior del aparato con la parte inferior haciéndola girar de forma que quede una cavidad entre el eje y la parte superior. Rellenar la cavidad con

aproximadamente 1 g de la muestra a analizar enrasándola con la superficie de la parte superior del aparato. Encajar la tapa de plástico sobre la parte superior. Colocar la pesa de 100 g centrada encima de la tapa de plástico. Hacer girar la parte superior hasta que quede nivelada con la superior. Al cabo de 1 minuto, retirar el peso y medir con el pie de rey el diámetro del círculo formado por la extensión de la muestra entre la parte superior y la tapa de plástico.

El cálculo de la extensibilidad se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Extensibilidad (mm}^2\text{)} = \pi \cdot (d/2)^2$$

6.3.6. ENSAYO DE SEPARACIÓN DE FASES POR CENTRIFUGACIÓN

El ensayo de la separación de fases por el método de centrifugación se realiza con la centrífuga Meditronic P Selecta.

Procedimiento:

Se introducen 10,0 g de crema en un tubo de centrifuga de fondo cónico. Se centrifuga a 4500 rpm entre 5 y 15 minutos, en función del tipo de emulsión obtenida en cada prototipo. Posteriormente se observa si la muestra presenta 2 fases.

6.3.7. ENSAYO DE VALORACIÓN DE HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA y BHT

El ensayo de la valoración del DPK se realiza siguiendo el método cromatográfico por GPC desarrollado para dar soporte analítico a la fase de preformulación y desarrollo analítico descrito en el anexo II.

Para la valoración del resto de componentes (HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT) se sigue el método desarrollado y optimizado para dar soporte analítico a la fase de desarrollo de la formulación descrito en el anexo III.

6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo es desarrollar una crema despigmentante que contenga una triple combinación de principios activos: HQ (4%), KA (2%) y DPK (2%).

El estudio de la formulación se inicia a partir de los excipientes considerados más idóneos y que figuran descritos en farmacopea, los cuales ya se han relacionado en el apartado 7.2.1.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Se inician los estudios de formulación planteando el estudio de una base estable según la práctica galénica habitual y considerando inicialmente tan solo los APIs no termolábiles (KA y DPK). En función de la forma farmacéutica planteada – crema – se deben diseñar un mínimo de dos fases – una acuosa y otra oleosa – pero que pueden subdividirse en las fases o etapas necesarias para la correcta incorporación de cada uno de los APIs en el proceso de elaboración.

Una vez estudiados los excipientes escogidos y las características de los APIs que deben vehicular, se opta por un diseño de cuatro fases de elaboración.

6.4.1. PROTOTIPO Nº 1

Tabla 6.1 Fórmula del prototipo nº 1

Fases	Componentes	%	Función
A	PLX	20	Emulsionante/ Viscosizante
	PEG	10	Cosolvente
B	CA	7	Espesante
	WP	6	Emoliente
	LP	6	Emoliente
C	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
D	PEG	7	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	DPK	2	API/Conservante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A, B y C a 80 °C en el baño termostático.
- Una vez adquirida la temperatura de 80 °C, se añade C sobre B y se agita con una varilla, hasta su completa homogeneización.
- A continuación se añade A sobre la mezcla (B+C) y se agita con el agitador de palas hasta su homogeneización, manteniendo la temperatura a 80 °C.
- Se deja enfriar hasta temperatura ambiente con agitación constante.

- En un mortero, se mezclan el PEG, KA y DPK hasta obtener una emulsión homogénea, protegiéndola de la luz.
- Se vierte el contenido de la emulsión resultante de la mezcla (B+C+A) en un mortero y, lentamente, se añade la fase D. Se mezcla hasta su total homogeneización.
- Se envasa en recipientes de plástico HDPE, protegidos de la luz, y se guardan a distintas condiciones para realizar el estudio del aspecto.

Tabla 6.2 Evolución del aspecto del prototipo nº 1 conservado durante 1 mes a diferentes condiciones

Condiciones	24 horas	1 mes a Tamb[*]
Ambiente	Crema blanca y homogénea.	Crema ligeramente amarilla y homogénea
30 °C/65%HR	Crema blanca y homogénea.	Crema beige y homogénea
55 °C	Crema ligeramente amarilla y homogénea.	Crema beige (más oscura que ha 30 °C) y homogénea
Nevera	Crema blanca y homogénea.	Crema blanca y homogénea

*Tamb: temperatura ambiente

Al cabo de un mes se observa que la crema adquiere un color que va desde el ligeramente amarillo al beige claro que puede ser debido a la oxidación de algún componente de la fase oleosa, por lo que en el siguiente prototipo se incorporan antioxidantes adecuados.

6.4.2. PROTOTIPO Nº 2

Se añaden antioxidantes solubles en la fase oleosa: BHA y BHT. De esta forma, la emulsión queda totalmente protegida de la oxidación: la parte acuosa por el antioxidante soluble en agua (SMB) y en la parte oleosa por la mezcla de BHA y BHT.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Tabla 6.3 Fórmula del prototipo nº 2

Fases	Componentes	%	Función
A	PLX	20	Emulsionante/ Viscosizante
	PEG	10	Cosolvente
B	CA	7	Espesante
	WP	6	Emoliente
	LP	6	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
C	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
D	PEG	7	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	DPK	2	API/Conservante
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A, B y C a 80 °C en el baño termostático.
- Una vez adquirida la temperatura de 80 °C, se añade C sobre B y se agita con una varilla, hasta su completa homogeneización.
- A continuación se añade A sobre la mezcla (B+C) y se agita con el agitador de palas hasta su homogeneización, manteniendo la temperatura a 80 °C.
- Se deja enfriar hasta temperatura ambiente con agitación constante.
- En un mortero, se mezclan el PEG, BHA, KA y DPK hasta obtener una emulsión homogénea, protegiéndola de la luz.
- Se vierte el contenido de la emulsión resultante de la mezcla (B+C+A) en un mortero y, lentamente, se añade la fase D. Se mezcla hasta su total homogeneización.
- Se envasa en recipientes de plástico HDPE y se guardan a distintas condiciones para realizar el estudio del aspecto.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Tabla 6.4 Evolución del aspecto del prototipo nº 2 conservado durante 1 mes a diferentes condiciones

Condiciones	24 horas	1 mes a Tamb*
Ambiente		Crema blanca y homogénea
30 °C/65% HR		Crema beige y homogénea
55 °C	Crema blanca y homogénea.	Crema con dos capas: superior amarilla e inferior marrón
Nevera		Crema blanca y homogénea

*Tamb: temperatura ambiente

En principio, se considera una base inicialmente aceptable por su forma y presenta una estabilidad suficientemente adecuada ya que almacenada durante un mes a la condición de 30°C/65%HR mantiene las características iniciales de forma correcta.

Una vez conseguida una base inicialmente estable, en el siguiente prototipo se añade la HQ en forma de disolución en la fase externa.

6.4.3. PROTOTIPO Nº 3

Tabla 6.5 Fórmula del prototipo nº 3

Fases	Componentes	%	Función
A	PLX	20	Emulsionante/ Viscosizante
	PEG	10	Cosolvente
B	CA	7	Espesante
	WP	6	Emoliente
	LP	6	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
C	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
D	PEG	7	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	DPK	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A, B y C a 80 °C en el baño termostático.
- Una vez adquirida la temperatura de 80 °C, se añade C sobre B y se agita con una varilla, hasta su completa homogeneización.
- A continuación se añade A sobre la mezcla (B+C) y se agita con el agitador de palas hasta su homogeneización, manteniendo la temperatura a 80 °C.
- Se deja enfriar hasta temperatura ambiente con agitación constante.
- En un mortero, se mezclan el PEG, BHA, KA, DPK y HQ hasta obtener una emulsión homogénea, protegiéndola de la luz.
- Se añade lentamente el contenido de la emulsión (B+C+A) al mortero que contiene la disolución de la mezcla D, agitando constantemente a temperatura ambiente hasta su completa homogeneización.
- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegidos de la luz, y se guardan a distintas condiciones para realizar el estudio del aspecto.

Tabla 6.6 Resultados del prototipo nº 3 conservado durante 1 mes a diferentes condiciones

Condiciones	Parámetros	
	pH	Aspecto
Ambiente	5,17	Crema blanca y homogénea
30 °C/65% HR	-	Crema blanca, más amarilla alrededor del tapón y homogénea
55 °C	-	Crema blanca, más amarilla alrededor del tapón y homogénea. Se observa también separación de fases
Nevera	-	Crema blanca y homogénea

A 55 °C se observa una ligera separación de fases. Para evitar la separación de fases, en el siguiente prototipo se propone sustituir el cosolvente de la fase D, propilenglicol (PEG), por alcohol isopropílico (IA).

6.4.4. PROTOTIPO N° 4

Tabla 6.7 Fórmula del prototipo n° 4

Fases	Componentes	%	Función
A	PLX	20	Emulsionante/ Viscosizante
	PEG	10	Cosolvente
B	CA	7	Espesante
	WP	6	Emoliente
	LP	6	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
C	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
D	IA	7	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	DPK	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A, B y C a 80 °C en el baño termostático.
- Una vez adquirida la temperatura de 80 °C, se añade C sobre B y se agita con una varilla, hasta su completa homogeneización.
- A continuación se añade A sobre la mezcla (B+C) y se agita con el agitador de palas hasta su homogeneización, manteniendo la temperatura a 80 °C.
- Se deja enfriar hasta temperatura ambiente con agitación constante.
- En un mortero, se mezclan el IA, BHA, KA, DPK y HQ hasta obtener una emulsión homogénea, protegiéndola de la luz.
- Se añade lentamente el contenido de la emulsión (B+C+A) al mortero que contiene la disolución de la mezcla D, agitando constantemente a temperatura ambiente hasta su completa homogeneización.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegidos de la luz, y se guardan a distintas condiciones para realizar el estudio del aspecto.

Tabla 6.8 Resultados del prototipo nº 4 conservado durante 1 mes a diferentes condiciones

Condiciones	Parámetros	
	pH	Aspecto
Ambiente	5,40	Crema blanca y homogénea
30 °C/65% HR	-	Crema blanca, más amarilla alrededor del tapón y homogénea
55 °C	-	Crema blanca, más amarilla alrededor del tapón y homogénea. Ligera separación de fases
Nevera	-	Crema blanca y homogénea

Se observa una ligera coloración amarilla alrededor del tapón tanto en la muestra conservada a 30 °C/65% HR como en la conservada a 55 °C, así como una ligera separación de fases a 55 °C. El hecho de que la coloración se forme alrededor del tapón hace pensar en que el factor desencadenante sea la presencia de oxígeno. Esto juntamente con las altas temperaturas tanto en la elaboración de la emulsión como de la conservación de las muestras, podrían dar lugar a la termo-oxidación del PLX [105,106]. Otra explicación para la coloración amarillada alrededor del tapón podría ser la incompatibilidad del PEG con algunos plásticos que puede ablandarlos o disolverlos. Considerando todo lo anterior y para evitar la separación de fases, se decide cambiar el emulsionante: mezcla triglicérido caprílico/cáprico. Además, se sustituye el alcohol isopropílico por etanol 96° para mejorar la disolución de los componentes así como eliminar el olor característico del alcohol isopropílico.

6.4.5. PROTOTIPO Nº 5

Inicialmente se prepara la Fase A de forma similar a la fase A del prototipo anterior (prototipo nº 4): CCT (20%) y PEG (10%). Al intentar mezclar con la varilla la mezcla no queda homogénea, se observa la separación de las fases formándose gotículas en la superficie. Consecuentemente, se elimina el PEG. Y además, se incrementa la concentración de alcohol cetosteárico para aumentar la estabilidad de la crema.

Tabla 6.9 Fórmula del prototipo nº 5

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	15	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	14	Espesante
	WP	10	Emoliente
	LP	10	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	EtOH	7	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	DPK	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A y B a 80 °C en el baño termostático.
- Una vez adquirida la temperatura de 80 °C, se añade B sobre A agitando con el agitador de palas a baja velocidad, hasta su completa homogeneización. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente.
- En un mortero, se prepara la fase C utilizando como medio dispersante/solubilizante etanol 96°.
- A continuación, se añade lentamente la fase C sobre la mezcla (A+B), a temperatura ambiente agitando lentamente con el agitador de palas hasta su completa homogeneización.
- Se envasa diferentes recipientes protegidos de la luz y se guardan a distintas condiciones para realizar el estudio del aspecto.
- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegidos de la luz, y se guardan a distintas condiciones para realizar el estudio del aspecto.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Tabla 6.10 Resultados del prototipo nº 5 conservado durante 1 mes a diferentes condiciones

Condiciones	Parámetros	
	pH	Aspecto
Ambiente	5,53	Crema blanca y homogénea. Olor neutro y agradable
30 °C/65% HR	-	Crema blanca y homogénea. Olor neutro
55 °C	-	Crema blanca con menos viscosidad (más líquida)
Nevera	-	Crema blanca y homogénea.

Parece que la formulación es estable ya que a 55 °C no se observa separación de fases. La sustitución del IA por EtOH no mejora los resultados en cuanto a facilidad solubilizante. Consecuentemente se repite el prototipo nº 5 sustituyendo el EtOH por IA.

6.4.6. PROTOTIPO Nº 6

Tabla 6.11 Fórmula del prototipo nº 6

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	15	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	14	Espesante
	WP	10	Emoliente
	LP	10	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	IA	7	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	DPK	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A y B a 80 °C en el baño termostático.

- Una vez adquirida la temperatura de 80 °C, se añade B sobre A agitando con el agitador de palas a baja velocidad, hasta su completa homogeneización. Se deja enfriar.
- En un mortero, se prepara la fase C utilizando como medio dispersante/solubilizante alcohol isopropílico.
- A continuación, se añade lentamente la fase C sobre la mezcla (A+B), a temperatura ambiente agitando lentamente con el agitador de palas hasta su completa homogeneización.
- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegidos de la luz, y se guardan en la cámara climática 30 °C/65%HR.

Tabla 6.12 Resultados del prototipo nº 6 conservado durante 1 mes a 30 °C/65% HR

Parámetros	Inicial	1 mes	
		Tamb *	30 °C / 65% HR
Aspecto	Crema ligeramente amarillenta y homogénea. Ligero olor a alcohol	Crema ligeramente amarillenta y homogénea. Ligero olor a alcohol	Crema ligeramente amarillenta y homogénea. Ligero olor a alcohol
pH	5,15	-	-
Viscosidad (cP)	18000	-	-

*Tamb: temperatura ambiente

Se comprueba la presencia de aire ocluido en el interior de la emulsión resultado de la espuma formada durante la incorporación de SLS mediante agitación. Para disminuir la cantidad de espuma formada en el proceso de elaboración, en el próximo prototipo se reduce a la mitad la cantidad de SLS.

6.4.7. PROTOTIPO N° 7

Tabla 6.13 Fórmula del prototipo n° 7

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	15	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	14	Espesante
	WP	10	Emoliente
	LP	10	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	1	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	IA	7	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	DPK	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A y B a 80 °C en el baño termostático.
- Una vez adquirida la temperatura de 80 °C, se añade B sobre A agitando con el agitador de palas a baja velocidad, hasta su completa homogeneización. Se deja enfriar.
- En un mortero, se prepara la fase C utilizando como medio dispersante alcohol isopropílico.
- A continuación, se añade lentamente la fase C sobre la mezcla (A+B), a temperatura ambiente agitando lentamente con el agitador de palas hasta su completa homogeneización.
- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegidos de la luz, y se guardan en la cámara climática 30 °C/65%HR.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Tabla 6.14 Resultados del prototipo nº 7 conservado durante 1 mes a 30 °C/65% HR

Parámetros	Inicial	1 mes a 30 °C / 65% HR
Aspecto	Crema ligeramente amarillenta y homogénea. Ligero olor a alcohol	Crema ligeramente amarillenta y homogénea. Ligero olor a alcohol
pH	5,23	-
Viscosidad (cP)	11200	-

La crema es menos viscosa (más líquida) y se continúa observando burbujas de aire. Por tanto, el siguiente prototipo se ensaya con la cantidad habitual de SLS (2%) disminuyendo la velocidad de agitación al incorporarlo para intentar disminuir la formación de burbujas. Además, se decide incorporar el DPK en la fase oleosa (fase A) debido a su alta solubilidad en medios oleosos por ser un compuesto apolar con un valor de log P:14,0, con el fin de dar mayor robustez a la emulsión que se obtiene.

6.4.8. PROTOTIPO Nº 8

Tabla 6.15 Fórmula del prototipo nº 8

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	15	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	14	Espesante
	WP	10	Emoliente
	LP	10	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	IA	7	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A y B a 80 °C en el baño termostático. Se homogeneizan por separado mediante agitación con varilla.
- Una vez adquirida la temperatura de 80 °C, se añade B sobre A agitando con el agitador de palas a baja velocidad, hasta su completa homogeneización. Se deja enfriar.
- En un mortero, se prepara la fase C: se mezcla el BHA, KA, HQ y finalmente, como medio dispersante el alcohol isopropílico.
- A continuación, se mezcla lentamente (A+B) con la fase C a temperatura ambiente: inicialmente en el mortero y después se agita lentamente con el agitador de palas.
- Se afina en el vidrio mediante una espátula de acero inoxidable y se envasa en tubos de plástico HDPE, protegidos de la luz y el aire.

Tabla 6.16 Resultados del prototipo nº 8

Parámetros	Resultados
Aspecto	Crema de color blanco, homogénea y con ligero olor a alcohol
pH	5,51
Viscosidad (cP)	18133
Extensibilidad (mm ²)	1013,5

La crema elaborada es aceptable y parece estable ya que se mantiene homogénea y sin coloraciones durante varios días. Consecuentemente, en el próximo prototipo se añadirán los filtros solares en la fase oleosa ya que son compuestos ligeramente apolares con log P: 5,66 y log P: 4,91, respectivamente [107,108].

6.4.9. PROTOTIPO N° 9

Tabla 6.17 Fórmula del prototipo n° 9

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	15	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	14	Espesante
	WP	10	Emoliente
	LP	10	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
	OCT	7,5	Filtro solar UVB
	AVB	2	Filtro solar UVA
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	IA	7	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A y B a 80 °C en el baño termostático. Se homogeneizan por separado mediante agitación con varilla.
- Se añade B sobre A agitando con el agitador de palas a baja velocidad, hasta su completa homogeneización. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente sin dejar de agitar.
- En un mortero, se prepara la fase C: se mezcla el BHA, KA, HQ y finalmente, como medio dispersante el alcohol isopropílico.
- A continuación, se mezcla lentamente (A+B) con la fase C a temperatura ambiente: inicialmente en el mortero y después se agita lentamente con el agitador de palas.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

- Se afina en el vidrio mediante una espátula de acero inoxidable y se envasa en un envase de plástico HDPE, protegido de la luz y del aire.

A simple vista, el aspecto de la crema es correcto: crema blanca y opaca. Pero al preparar la muestra para observarla en el estereoscopio, extendida sobre un cubreobjetos de vidrio, se observa un aspecto granuloso. Al tacto, sin embargo, no se detecta ningún gránulo. Se envasa parte de la crema en un vial topacio y se estudia el aspecto a lo largo de una semana. El aspecto empeora con el tiempo: cada vez es más granuloso.

También se observa que es poco viscosa posiblemente debido a la insuficiente cantidad de CA. Por tanto, en el siguiente prototipo se aumentará la cantidad de CA bajando la cantidad de CCT, LP y WP para, de esta forma, aumentar el ratio entre el CA y el resto.

6.4.10. PROTOTIPO N° 10

Tabla 6.18 Fórmula del prototipo n° 10

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	12,5	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	15	Espesante
	WP	7,5	Emoliente
	LP	5	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
	OCT	7,5	Filtro solar UVB
	AVB	2	Filtro solar UVA
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	IA	7	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A y B a 80 °C en el baño termostático. Se homogeneizan por separado mediante agitación con agitadores de las palas.
- Se añade B sobre A agitando con el agitador de palas a baja velocidad, hasta su completa homogeneización. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente sin dejar de agitar.
- En un mortero, se prepara la fase C: se mezcla el BHA, KA, HQ y finalmente, como medio dispersante el alcohol isopropílico.
- A continuación, se mezcla lentamente (A+B) con la fase C a temperatura ambiente: inicialmente en el mortero y después se agita lentamente con el agitador de palas.
- Se afina en el vidrio mediante una espátula de acero inoxidable y se envasa en un envase de plástico HDPE, protegido de la luz y del aire.

Tabla 6.19 Resultados del prototipo nº 10

Parámetros	Resultados
Aspecto	Crema de color blanco, homogénea, ausencia de partículas. Olor agradable.
pH	5,08
Viscosidad (cP)	25333
Extensibilidad (mm ²)	977,2

Al mezclar la fase C con (A+B) se observa que se forman pequeños gránulos. La cantidad de gránulos presentes en la crema aumenta a lo largo del tiempo.

Se decide disminuir la cantidad de IA en el siguiente prototipo ya que de todos los componentes de la fórmula, el IA es el que puede tener un comportamiento más extremo con el resto de componentes sospechándose que puede ser el responsable de la separación en forma de gránulos.

Además, se realiza también un estudio de la técnica de mezclado de la fase C con (A+B): la fase C se empieza mezclando con un determinado % del conjunto de (A+B) y posteriormente se incorpora el resto. Los % de (A+B) estudiados serán: 4, 7, 10 y 15%.

6.4.11. PROTOTIPO N° 11

Tabla 6.20 Fórmula del prototipo n° 11

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	12,5	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	15	Espesante
	WP	7,5	Emoliente
	LP	5	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
	OCT	7,5	Filtro solar UVB
	AVB	2	Filtro solar UVA
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	IA	4	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A y B a 80 °C en el baño termostático. Se homogeneizan por separado mediante agitación con agitadores de las palas.
- Se añade B sobre A agitando con el agitador de palas a baja velocidad, hasta su completa homogeneización. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente sin dejar de agitar.
- En un mortero, se prepara la fase C: se mezcla el BHA, KA, HQ y finalmente, como medio dispersante el alcohol isopropílico.
- A continuación, en el mortero se mezcla inicialmente el % de (B+A) estudiado (5,7, 10 y 15) con la fase C mediante agitación (palas) a velocidad lenta.
- Posteriormente, se incorpora el resto de (B+A) sin dejar de agitar.

- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegido de la luz y del aire.

Se obtienen unas cremas de aspecto blanco, ligeramente más brillantes que la crema prototipo nº 10 debido a la disminución de IA, pero en todas se observan gránulos de precipitados. A los pocos días, se observa una ligera separación de fases en todas ellas.

Para evitar la separación de fases, se decide aumentar la cantidad de CA y de SLS para aumentar la viscosidad y disminuir la tensión superficial, respectivamente. Se vuelve a introducir la misma cantidad de IA anteriormente utilizada al descartarse que sea el responsable de la aparición de gránulos; de esta forma se consigue una solubilización más fácil y rápida de KA, HQ y BHA.

6.4.12. PROTOTIPO Nº 12

Tabla 6.21 Fórmula del prototipo nº 12

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	12,5	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	18	Espesante
	WP	7,5	Emoliente
	LP	5	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
	OCT	7,5	Filtro solar UVB
	AVB	2	Filtro solar UVA
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	3	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	IA	7	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A y B a 75 °C en el baño termostático. Se homogeneizan por separado mediante agitación con agitadores de las palas.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

- Se añade B sobre A agitando con el agitador de palas a baja velocidad, hasta su completa homogeneización. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente sin dejar de agitar.
- En un mortero, se prepara la fase C: se mezcla el BHA, KA, HQ y finalmente, como medio dispersante el alcohol isopropílico.
- A continuación, en el mortero se mezcla inicialmente un 10% de (B+A) con la fase C mediante agitación (palas) a velocidad lenta.
- Posteriormente, se incorpora el resto de (B+A) sin dejar de agitar.
- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegido de la luz y del aire.

Crema homogénea y sin gránulos de aspecto correcto, parece bien incorporado. Observada en el estereoscopio: mucho aire incorporado.

Se lleva a cabo el ensayo de separación de fases mediante el método de centrifugación.

Tabla 6.22 Resultado del ensayo de separación de fase por centrifugación del prototipo nº 12

Tiempo (min)	Aspecto
5	No se observa separación de fases
15	Se observa separación de fases

Para disminuir el aire incorporado en la crema se disminuirá la cantidad SLS a 2.5% para que no se forme tanta espuma y también se disminuirá la cantidad de CA a 15% para que la crema no sea tan viscosa, el aire no quede tan incorporado y le sea más fácil salir.

6.4.13. PROTOTIPO N° 13

Tabla 6.23 Fórmula del prototipo n° 13

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	12,5	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	15	Espesante
	WP	7,5	Emoliente
	LP	5	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
	OCT	7,5	Filtro solar UVB
	AVB	2	Filtro solar UVA
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2.5	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	IA	7	Cosolvente
	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A y B a 75 °C en el baño termostático. Se homogeneizan y enfrían hasta 60 °C por separado mediante agitación con agitadores de las palas.
- A 60 °C, se añade B sobre A agitando 10 minutos con el agitador de palas a baja velocidad. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente sin dejar de agitar.
- En un mortero, se prepara la fase C: se mezcla el BHA, KA, HQ y finalmente, como medio dispersante el alcohol isopropílico.
- A continuación, en el mortero se mezcla inicialmente un 10% de (B+A) con la fase C mediante agitación (palas) a velocidad lenta.
- Posteriormente, se incorpora el resto de (B+A) sin dejar de agitar.
- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegido de la luz y del aire.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

No se forma emulsión. Esto denota la importancia de la temperatura y tiempo de agitación en el proceso de emulsificación y la velocidad de enfriamiento de la emulsión.

Se decide repetir la fórmula del prototipo nº 10 cambiando la temperatura de mezcla de A y B a 70-75 °C y posteriormente, enfriar lentamente. Se elimina el alcohol isopropílico de la fase C para evitar la posterior separación de fases así como evitar el olor residual a este alcohol.

6.4.14. PROTOTIPO Nº 14

Tabla 6.24 Fórmula del prototipo nº 14

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	12,5	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	15	Espesante
	WP	7,5	Emoliente
	LP	5	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
	OCT	7,5	Filtro solar UVB
	AVB	2	Filtro solar UVA
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A y B a 75 °C en el baño termostático. Se homogeneizan por separado mediante agitación con agitadores de las palas.
- A 75 °C, se añade B sobre A agitando 5 minutos con el agitador de palas a baja velocidad. Enfriar hasta 70 °C y continuar la agitación durante 10 minutos.

Enfriar hasta 65 °C y continuar la agitación durante 15 minutos. Finalmente, enfriar hasta 40 °C y continuar la agitación durante 15 minutos.

- En un mortero, se prepara la fase C: se mezcla y tritura el BHA, KA, HQ. Esta mezcla pulverulenta se añade a un 10% de (B+A). Se homogeneiza mediante agitación (palas) a velocidad lenta.
- Posteriormente, se incorpora el resto de (B+A) sin dejar de agitar.
- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegido de la luz y del aire.

Tabla 6.25 Resultados del prototipo nº 14

Parámetros	Resultados
Aspecto	Crema blanca amarillenta, muy consistente
E. separación de fases por centrifugación	15 minutos a 4500 rpm: No separación de fases

Con esta prueba queda demostrada la importancia de la temperatura a la que se realizan las distintas fases de la elaboración, la agitación y el tiempo de enfriamiento. Con la supresión del IA se ha dado más robustez a la crema, que no presenta separación de las fases tras el ensayo de centrifugación.

La crema que se obtiene es demasiado viscosa ya que se pretende obtener una crema más fluida. En el siguiente prototipo de formulación se reduce la cantidad de CA y se aumenta la cantidad de las vaselinas (LP y WP).

6.4.15. PROTOTIPO N° 15

Tabla 6.26 Fórmula del prototipo n° 15

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	12,5	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	10	Espesante
	WP	10,5	Emoliente
	LP	7	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
	OCT	7,5	Filtro solar UVB
	AVB	2	Filtro solar UVA
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- En vasos de precipitados distintos se funden y/o disuelven las fases A y B a 75 °C en el baño termostático. Se homogeneizan por separado mediante agitación con agitadores de las palas.
- A 75 °C, se añade B sobre A agitando 5 minutos con el agitador de palas a baja velocidad. Enfriar hasta 70 °C y continuar la agitación durante 10 minutos. Enfriar hasta 65 °C y continuar la agitación durante 15 minutos. Finalmente, enfriar hasta 40 °C y continuar la agitación durante 15 minutos.
- En un mortero, se prepara la fase C: se mezcla y tritura el BHA, KA, HQ. Esta mezcla pulverulenta se añade a un 10% de (B+A). Se homogeneiza mediante agitación (palas) a velocidad lenta.
- Posteriormente, se incorpora el resto de (B+A) sin dejar de agitar.
- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegido de la luz y del aire.

Tabla 6.27 Resultados del prototipo nº 15

Parámetros	Resultados
Aspecto	Crema de color blanco, brillante, bien emulsionada
Aspecto estereoscopio	Gran cantidad de aire incorporado
Aspecto microscopio	Se observa algún cristal mayor a 100 μm
Viscosidad (cP)	14267
pH	5,12

Después de 15 minutos en la centrífuga, a 4500 rpm, se observa una ligera separación de fases que puede ser debida a que la prueba se hizo cuando la crema estaba recién fabricada y por lo tanto aún no había adquirido la consistencia definitiva. Se repitió la prueba de la centrífuga pasadas 20 h de la preparación y no se observó separación de fases.

La crema obtenida es muy fluida con demasiado aire incorporado y en el microscopio se observa algún cristal mayor a 100 μm ; lo que indica que es necesario triturar mejor la fase C. Para corregirlo, en el próximo prototipo, se aumenta la cantidad de CA a 12% y se modifica la técnica de incorporación de la fase C.

6.4.16. PROTOTIPO N° 16

Tabla 6.28 Fórmula del prototipo n° 16

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	12,5	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	12	Espesante
	WP	10,5	Emoliente
	LP	7	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
	OCT	7,5	Filtro solar UVB
	AVB	2	Filtro solar UVA
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	SLS	2	Tensioactivo aniónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- Fase A: se pesan todos los componentes y fundir en baño termostático a 75 °C.
- Fase B: se pesa el agua, a 75 °C se añade el EDTA y el SMB. Se agita con agitador magnético hasta su total disolución. Se añade el SLS, poco a poco en agitación, hasta su total dispersión.
- Cuando la fase A y la fase B están a 70-72 °C, se agita la fase A con el agitador de palas a velocidad lenta (posición 10).
- Se añade B sobre A lentamente sin dejar de agitar. Se apaga el termostato de la calefacción del baño.
- Al cabo de 3 minutos, se vacía el baño y se mantiene la agitación (posición 8). Se deja en estas condiciones hasta obtener una consistencia de crema.
- Fase C: se introduce el BHA en un mortero y se tritura. Se añaden el KA y HQ. Se Trituran finamente hasta completa homogeneización.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

- Cuando (B+A) está a 40 °C, se vierte en el mortero donde está la fase C, mezclando con una espátula de goma hasta alcanzar temperatura ambiente y la crema sea homogénea, procurando que no se incorpore aire.
- La crema se envasa en un vaso de precipitados de vidrio de 250 ml y se deja reposar, tapado con papel de aluminio protegiéndolo de la luz y el aire, durante 24 horas para que adquiera consistencia.

Tabla 6.29 Resultados del prototipo nº 16

Parámetros	Resultados
Aspecto	Crema de color blanco, brillante, bien emulsionada
Viscosidad (cP)	26533
pH	5,18
Extensibilidad	867,3
Prueba centrífuga	Inicialmente: No se observa separación de fases A los 2 días: No se observa separación de fases A los 6 días: Se observa ligera separación de fases

Al cabo de 6 días, se observa una ligera separación de fases. Se modificará la concentración de espesante y de las vaselinas. Además, se requiere más poder emulsificador para evitar la separación de fases sin que se incorpore demasiado aire. Consecuentemente, se sustituye el SLS por el PLE – Brij 35: éter laurílico polioxietileno 23 – al 10%.

6.4.17. PROTOTIPO N° 17

Tabla 6.30 Fórmula del prototipo n° 17

Fases	Componentes	%	Función
A	CCT	12,5	Emulsionante/ Viscosizante
	CA	15	Espesante
	WP	7,5	Emoliente
	LP	5	Emoliente
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
	OCT	7,5	Filtro solar UVB
	AVB	2	Filtro solar UVA
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	PLE	10	Tensioactivo no iónico
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
C	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	BHA	0,1	Antioxidante

Elaboración:

- Fase A: se pesan todos los componentes y fundir en baño termostático a 70-75 °C.
- Fase B: se pesa el agua y se calienta a 40 °C en el baño termostático (PLE no soluble en frío) añade el EDTA y el SMB. Se agita con agitador magnético hasta su total disolución. Se añade el PLE, poco a poco y en agitación, hasta su total disolución. Posteriormente, calentar a 70-75 °C.
- A 70-75 °C, se añade B sobre A lentamente sin dejar de agitar lentamente (agitador de palas, posición 8).
- A partir de los 60 °C, se agita a mano ya que con agitación de palas la emulsión adquiere una elevada consistencia y se adhiere a las paredes del recipiente.
- Fase C: se introducen en el mortero BHA, KA, HQ. Se trituran finamente hasta completa homogeneización.

- Cuando (B+A) alcanza los 35 °C, se coloca una parte (10%) en un mortero y se añade la fase C. Cuando está completamente incorporada, se añade el resto de (B+A) y se homogeneiza con espátula de goma.
- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegido de la luz y del aire.

La crema obtenida es blanca, muy brillante y muy viscosa. Se observa un poco de aire incorporado.

Se lleva a cabo un estudio en el que se investiga la concentración de PLE que da una viscosidad adecuada a la crema y la adición de un emulgente en la fase oleosa para aumentar la acción emulgente – span 20: monolaurato de sorbitano (S20) –. La formulación que se toma de referencia es la formulación del prototipo nº 17 con los siguientes cambios:

Tabla 6.31 Estudio de las variaciones de la fórmula del prototipo nº17

Componentes	Serie Prototipo nº17						
	17-0	17-1	17-2	17-3	17-4	17-5	17-6
PLE	10	5	8	5	5	5	5
S20	-	-	2	2	2	2	2
HQ	4	4	4	4	4	-	4
KA	2	2	2	2	-	2	-
DPK	2	2	2	2	4	2	-

Se preparan 4 viales topacio para cada una de las variaciones estudiadas para realizar un estudio de estabilidad así como de las bases – mezcla (B+A) –. Los viales se almacenan en las condiciones de 30°C/65%HR y 40°C/75%RH y se estudia el aspecto a lo largo de tiempo.

Las conclusiones que se extraen del estudio, Tabla 6.32, son:

- Cuanto más alta es la viscosidad de la emulsión, mejor estabilidad.
- La rotura de la emulsión se da cuando se incorpora la fase C ya sea por los propios APIs o por la incorporación de aire.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Tabla 6.32 Resultados del estudio de estabilidad de las variaciones de la fórmula del prototipo nº 17

Prototipo	Inicio	15 días		2 meses		
	Tamb*	30°C/65%HR	40°C/75%HR	30°C/65%HR	40°C/75%HR	
Crema						
17-0	bien	bien	ligera sf	bien	sf	
17-1	bien	bien	sf	sf	sf	
17-2	bien	suda	sf	sf	sf	
17-3	bien	sf	sf	sf	sf	
17-4	bien	suda	sf	bien	sf	
17-5	bien	-	-	bien	sf	
17-6	bien	-	-	sf	c. violeta	
Base (B+A)						
17-0	bien	bien	-	bien	-	
17-1	bien	bien	-	bien	-	
17-2	bien	bien	-	bien	-	
17-3	bien	bien	-	bien	-	
17-4	bien	bien	-	bien	-	
17-5	bien	bien	-	bien	-	
17-6	bien	bien	-	bien	-	

*Tamb: temperatura ambiente

sf: separación de fases

Se realiza un estudio bibliográfico sobre posibles incompatibilidades de los componentes de la fase C: PLE, EDTA, SMB, HQ y KA. Incompatibilidad de PLE con fenoles [109-111].

Los tensioactivos son moléculas anfifílicas que consisten en una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. Una de sus principales características en solución, es la formación de clústeres organizados de tamaño coloidal conocidos como micelas y que se forman por encima de una concentración denominada la concentración micelar crítica (CMC) siendo el resultado de un delicado equilibrio de fuerzas intermoleculares.

Un caso especial son los tensioactivos no iónicos, los cuales no contienen grupos funcionales ionizables, formados por grupos alcohol o éter (cabeza hidrofílica) y cadenas alifáticas (cola hidrofóbica). Su característica más importante en solución es que cuando se calienta exhibe un fenómeno de enturbiamiento perdiendo su solubilidad a determinada temperatura. Esta temperatura se conoce como punto de turbidez (CP) y las soluciones micelares se separan en dos fases: una fase rica y una

fase pobre en tensioactivo. La separación es probablemente debido al fuerte aumento en el número total de micelas y la disminución de las repulsiones intermicelares. Esta disminución es consecuencia de la disminución de la solubilidad del tensioactivo. Así, el equilibrio entre las interacciones hidrófilas e hidrófobas es un factor importante que determina el punto de turbidez que depende de su estructura molecular así como de los aditivos, sustancias con las que están mezclados. Los aditivos modifican las interacciones entre tensioactivo y disolvente, en consecuencia modifican también la CMC, el tamaño de las micelas y el comportamiento de las fases de las soluciones.

En este caso el tensioactivo es el PLE – Brij 35: polioxietileno lauril éter (Figura 6.1) –. La solubilidad acuosa de la cadena de polióxido de etileno se debe a la formación de enlaces puente de hidrógeno entre el solvente y el átomo de oxígeno del éter. Estos enlaces son sensibles a la temperatura haciendo que exista una temperatura a la que el grado de hidratación de la parte hidrofílica sea insuficiente para solubilizar la cadena alifática restante.

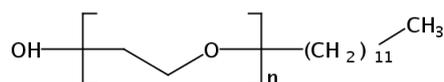


Figura 6.1 Estructura molecular PLE [110]

El punto de turbidez del PLE (118 °C [110]) es reducido por algunos de los componentes presentes en la fórmula, los compuestos fenólicos: HQ y KA, dos de los APIs. Esta reducción de la temperatura del punto de turbidez es debida a los enlaces de puente de hidrógeno entre los átomos de O del grupo éter y grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos. En este caso, este mecanismo se pone de manifiesto inestabilizando la crema, probablemente debido a la cantidad de PLE empleada y a la presencia de aire en la crema, ya que se encuentra suficientemente descrito que la presencia de aire en una emulsión es un factor que ayuda a su inestabilización y a la separación de fases, incluso en ausencia de otros factores de inestabilidad.

En consecuencia, para evitar la separación de fases se procede a cambiar de sistema emulgente, ya que parece ser uno de los factores que influyen en la inestabilización de la crema. En la fase oleosa se sustituye el CCT y el CA por un alcohol graso polioxietileno (Emulcire 61 WL 2659, EM) y monoestearato de glicerol (Estol 1474, GMS), respectivamente. En la fase acuosa, se sustituye el PLE por polisorbato 80 (Tween 80, T80) y monoestearato de polietilenglicol (Myrj 52, PGM). En consecuencia, se debe reducir la cantidad de WP y de LP. Y finalmente, el BHA se incorpora a la fase oleosa para aumentar el poder antioxidante.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

El sistema emulgente propuesto es una mezcla de sustancias químicas que pueden favorecer la estabilidad de la emulsión, a pesar de contener también componentes polioxietilenados. Ahora bien, dado que estos componentes se encuentran en menor proporción en valores absolutos, se considera que no deberían afectar de forma significativa al comportamiento de la crema en cuanto a su estabilidad a largo plazo (como así quedó demostrado posteriormente en el estudio de estabilidad a largo plazo efectuado).

6.4.18. PROTOTIPO Nº 18

Tabla 6.33 Fórmula del prototipo nº 18

Fases	Componentes	%	Función
A	EM	8	Emulsionante
	GMS	3	Espesante
	WP	6	Emoliente
	LP	4	Emoliente
	BHA	0,1	Antioxidante
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
	OCT	7,5	Filtro solar UVB
	AVB	2	Filtro solar UVA
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
	PGM	5	Tensioactivo no-iónico
	T80	2	Tensioactivo no-iónico
C	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API

Elaboración:

- Fase A: se pesan todos los componentes y fundir en baño termostático a 70-75 °C.
- Fase B: se pesa el agua y se calienta a 70-75 °C en el baño termostático. Añadir el EDTA y el SMB. Se agita con agitador magnético hasta su total disolución. Se añade el T80, poco a poco y en agitación, hasta su total disolución. Y finalmente, el PGM.

- A 70 °C, se añade B sobre A lentamente sin dejar de agitar lentamente (agitador de palas, posición 8). Seguir agitando durante todo el proceso de enfriamiento hasta llegar a los 35 °C.
- Fase C: se introducen en el mortero KA, HQ. Se trituran finamente hasta completa homogeneización.
- Cuando (B+A) alcanza los 35 °C, se añade la fase C manteniendo la agitación hasta alcanzar la temperatura de 25 °C.
- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegido de la luz y del aire. Una parte de los tubos se almacenan a la cámara climática de 40 °C/75%HR.

La base (A+B) a 35 °C tiene un aspecto muy blanco y fluido. Al adicionar la fase C y bajar la temperatura a 30 °C, aumenta su viscosidad. Pero, finalmente, la consistencia de la crema es demasiado fluida.

Tabla 6.34 Resultados del prototipo nº 18

Parámetros	Resultados
Aspecto	Crema de color blanco y muy fluida
Aspecto estereoscopio	Crema homogénea. No se observa aire incorporado.
Aspecto microscopio	Se observa algún cristal mayor a 100 µm
E. separación de fases por centrifugación	Inicialmente: No se observa separación de fases A los 15 días: No se observa separación de fases

A los 15 días a 40 °C/75%HR no se observa separación de fases – condición a la que las emulsiones no compatibles mostraban separación de fases –. Por tanto, se decide continuar con la optimización de la fórmula de este prototipo.

Se debe aumentar la consistencia de la crema ya que la crema es demasiado fluida. Por tanto, se incrementa la concentración de EM bajando ligeramente la concentración de vaselina líquida.

6.4.19. PROTOTIPO N° 19

Tabla 6.35 Fórmula del prototipo n° 19

Fases	Componentes	%	Función
A	EM	12	Emulsionante
	GMS	3	Espesante
	WP	6	Emoliente
	LP	2	Emoliente
	BHA	0,1	Antioxidante
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
	OCT	7,5	Filtro solar UVB
	AVB	2	Filtro solar UVA
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
	PGM	5	Tensioactivo no-iónico
	T80	2	Tensioactivo no-iónico
C	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API

Elaboración:

- Fase A: se pesan todos los componentes y fundir en baño termostático a 70-75 °C.
- Fase B: se pesa el agua y se calienta a 70-75 °C en el baño termostático. Añadir el EDTA y el SMB. Se agita con agitador magnético hasta su total disolución. Se añade el T80, poco a poco y en agitación, hasta su total disolución. Y finalmente, el PGM.
- A 70-75 °C, se añade B sobre A lentamente sin dejar de agitar lentamente (agitador de palas, posición 8). Seguir agitando durante todo el proceso de enfriamiento hasta llegar a los 35 °C.
- Fase C: se introducen en el mortero KA, HQ. Se trituran finamente hasta completa homogeneización.

- Cuando (B+A) alcanza los 35 °C, se añade la fase C manteniendo la agitación hasta alcanzar la temperatura de 25 °C.
- Se envasa en tubos de plástico HDPE, protegido de la luz y del aire Una parte de los tubos se almacenan a la cámara climática de 40 °C/75%HR.

Se obtiene una crema de aspecto blanco y homogéneo, más consistente que la anterior.

Se realiza un estudio para mejorar la robustez de la fórmula. Para ello se diseña una serie de fórmulas que tienen como base los prototipos 18 y 19, los que contienen T80 como emulgente formador en la fase acuosa. Se estudia la incorporación de polisorbato 20 (T20) – monolaurato de sorbitán polioxietilenado – como emulgente estabilizador. Los emulgentes formadores disminuyen la tensión superficial mientras que los emulgentes estabilizadores aumentan la viscosidad ya que ayudan a formar una capa compacta.

Tabla 6.36 Estudio de mejora de la robustez de la formulación del prototipo nº 19

Componentes	Cantidad componentes			
	19-I	19-II	19-III	19-IV
Prototipo nº 18	50 g	50 g		
T20	5 g	8 g		
Prototipo nº 19			50 g	50 g
T20			5 g	8 g

La cantidad de prototipo y la cantidad de T20 se mezclan en frío en el mortero. Se obtienen emulsiones con un aspecto correcto. Se prepara un vial de cada una de las formulaciones preparadas así como de los prototipos base (18 y 19) y se pone en estabilidad a la condición de 40 °C/75% HR para evaluar su desarrollo a lo largo del tiempo. Al cabo de 1 mes, se observan los diferentes viales.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Tabla 6.37 Resultados de estabilidad a 1 mes a 40 °C/75% HR de las formulaciones del estudio de mejora de robustez del prototipo nº19

Prototipo	Parámetros evaluados	
	Aspecto	E. separación fases por centrifugación
18	Crema blanca y homogénea.	Separación de fases
19-I	Crema blanca y homogénea	Ligera separación de fases
19-II	Crema blanca y homogénea	Ligera separación de fases
19	Crema blanca y homogénea	Ligera separación de fases
19-III	Crema blanca y homogénea	No separación de fases
19-IV	Crema blanca y homogénea	No separación de fases

En vista de los resultados obtenidos en el estudio anterior, se decide incorporar el T20 que ha proporcionado una mayor robustez a todas las formulaciones debido al aumento de poder emulgente en la fase acuosa.

6.4.20. PROTOTIPO Nº 20

Dado que se tiene una formulación que ya cumple con los objetivos previstos, se plantea seguir con el desarrollo de la crema utilizando los equipos semi-industriales disponibles en planta piloto, con el fin de ajustar la tecnología de elaboración a la posterior transposición d escala que deberá realizarse a nivel industrial. Así, se utiliza el reactor BI-AGI-5 Lleall para la elaboración de un lote de 4 kg de crema.

Con esta crema se lleva a cabo un estudio de estabilidad preliminar para evaluar la estabilidad de la crema a lo largo del tiempo (6 meses) a las tres condiciones: 25 °C/60% HR, 30 °C/65% HR y 40 °C/75% HR. En este estudio se realizan los siguientes ensayos:

- Aspecto
- Separación de fases por centrifugación
- pH
- Extensibilidad
- Viscosidad
- Valoración API
- Valoración antioxidantes y filtros solares

Tabla 6.38 Fórmula del prototipo nº 20

Fases	Componentes	%	Función
A	EM	12	Emulsionante
	GMS	3	Espesante
	WP	6	Emoliente
	LP	2	Emoliente
	BHA	0,1	Antioxidante
	BHT	0,1	Antioxidante
	DPK	2	API/Conservante
	OCT	7,5	Filtro solar UVB
	AVB	2	Filtro solar UVA
B	H ₂ O (d)	c.s.p. 100	Diluyente (fase acuosa)
	EDTA	0,05	Agente quelante
	SMB	0,10	Antioxidante
	PGM	5	Tensioactivo no-iónico
	T80	2	Tensioactivo no-iónico
C	KA	2	API/Conservante
	HQ	4	API
	T20	8	Tensioactivo no-iónico

Elaboración:

- Fase A: Se pesan todos los componentes y se introducen en el reactor nº 2 de la emulsionadora Stephan para su fusión.
 - Rotor: velocidad lenta (50 rpm) hasta fundir y 20 rpm hasta alcanzar una temperatura de 70-75 °C.
 - Se realiza el vacío que se mantiene por encima de 600 mm Hg.
- Fase B: Se prepara en un vaso de acero inoxidable de 2 L calentando en el baño termostático a 80 °C, agitando con el agitador de palas Heidolph.

Se disuelve en agua el EDTA y el SMB, después se añade lentamente el PGM. Cuando se ha disuelto completamente se añade el T80 y se homogeneiza. Seguidamente se detiene la agitación y se elimina el aire que pueda estar incorporado aplicando vacío. Finalmente, se coloca la fase B en el depósito del reactor nº 1 de la emulsionadora Stephan.

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

- A 70-75 °C se realiza la mezcla (B+A) manteniendo la agitación (lenta de palas a 58 rpm y rápida tipo túrrax a 214 rpm). Cuando finaliza la elaboración de la mezcla, dejar el túrrax 10 minutos más y apagar dejando la agitación lenta durante 10 minutos. Posteriormente, se cambia la calefacción por refrigeración lenta.
- Fase C: Cuando se alcanzan los 40 °C se rompe el vacío y con agitación, se añade la HQ y el KA y se deja agitando con los dos agitadores en funcionamiento hasta 35 °C. Se añade el T20. Se agita con los dos agitadores durante 5 minutos, realizando el vacío. Se deja hasta alcanzar la temperatura ambiente (25 °C). Duración de la preparación de la fase C: 1 hora.
- Se envasa en tubos flexibles de polietileno de alta densidad (HDPE), protegido de la luz y del aire. Por otra parte, también se envasan en viales de 10 ml de vidrio topacio y tapón de goma. Se almacenan a diferentes condiciones en las distintas cámaras climáticas: 25 °C/60%HR, 30 °C/65%HR y 40 °C/75%HR para estudiar su estabilidad durante 6 meses.

La crema obtenida es blanca, homogénea y de aspecto muy viscoso. Por este motivo, el ensayo de viscosidad se realiza con un spindle más delgado (nº 7) y una velocidad más baja (0,5 rpm). Se realizan 3 determinaciones. El resultado es $12,6 \cdot 10^3$ cP con un RSD: 52,1%. Se obtienen resultados muy irregulares debido a la gran viscosidad. Además, para realizar cada determinación se utiliza una gran cantidad de muestra.

Por tanto, se busca otro sistema para determinar la viscosidad: viscosímetro Haake VT 500. Después de desarrollar el ensayo según las características de la muestra, se realizan 3 determinaciones de la viscosidad a 200 s^{-1} y 25 °C obteniendo como resultado el valor de $2,089 \pm 0,0276 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (RSD:1,32%), que equivale a 2089 cP.

Tabla 6.39 Resultados del estudio de estabilidad del prototipo nº 20 a 25 °C/60% HR

Parámetros	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
Aspecto				
Tubo HDPE	Blanca y brillante	Blanca y brillante	Blanca y brillante	Blanca y brillante
Vial	Blanca y brillante	Blanca y brillante	Blanca y brillante	Blanca y brillante
S.F. Centrifuga	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
pH	5,80	5,67	5,42	5,10
Extensibilidad	617,6	698,3	772,2	894,2
Viscosidad	2,09	2,10	2,07	2,04
Valoración (HPLC)				
HQ	100,4	100,1	100,2	99,1
KA	102,9	102,5	101,6	100,6
DPK	103,5	103,3	103,0	102,7
BHA	103,1	102,8	101,1	95,3
BHT	103,6	102,9	101,1	96,9
OCT	100,5	100,6	100,2	99,8
AVB	100,8	100,5	100,0	99,2

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Tabla 6.40 Resultados del estudio de estabilidad del prototipo nº 20 a 30 °C/65% HR

Parámetros	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
Aspecto				
Tubo HDPE	Blanca y brillante	Blanca y brillante	Blanca-Grisácea	Blanca-Grisácea
Vial	Blanca y brillante	Blanca y brillante	Blanca y brillante	Blanca y brillante
S.F. Centrifuga	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
pH	5,80	5,48	4,86	4,35
Extensibilidad	617,6	725,5	842,6	986,1
Viscosidad	2,09	2,09	2,07	2,04
Valoración (HPLC)				
HQ	100,4	99,7	99,9	97,4
KA	102,9	102,6	100,8	99,8
DPK	103,5	102,8	101,7	100,2
BHA	103,1	97,1	92,1	87,6
BHT	103,6	101,7	99,3	97,4
OCT	100,5	100,3	100,0	99,6
AVB	100,8	100,3	100,5	100,1

CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Tabla 6.41 Resultados del estudio de estabilidad del prototipo nº 20 a 40 °C/75% HR

Parámetros	Tiempo (meses)			
	0	1	3	6
Aspecto				
Tubo HDPE	Blanca y brillante	Blanca-beige	Blanca-beige	Grisácea- Amarillenta
Vial	Blanca y brillante	Blanca y brillante	Blanca y brillante	Blanca. Ligeramente separación
S.F. Centrifuga	Correcto	Correcto	Correcto	Ligeramente separadas
pH	5,80	5,09	4,55	4,01
Extensibilidad	617,6	668,5	732,2	841,6
Viscosidad	2,09	2,01	1,94	1,71
Valoración (HPLC)				
HQ	100,4	99,8	99,4	96,1
KA	102,9	102,3	99,7	98,2
DPK	103,5	102,3	99,7	98,2
BHA	103,1	96,7	92,0	83,9
BHT	103,6	100,4	97,1	89,3
OCT	100,5	99,9	99,4	98,7
AVB	100,8	100,1	99,6	98,9

6.4.20.1. Aspecto y color

El aspecto de todas las muestra estudiadas, tanto la crema envasada en tubo de HDPE como la envasada en viales de vidrio topacio, a lo largo del estudio a la condición de almacenamiento 25 °C/60% HR es correcto – crema blanca, brillante y homogénea –. En cuanto a la condición de almacenamiento de 30 °C/65% HR, en la crema envasada en tubo de HDPE se observa que el aspecto cambia ligeramente a partir de los 3 meses desarrollándose un color ligeramente grisáceo. Finalmente, a la condición de almacenamiento de 40 °C/75% HR se observa que el color de la crema, envasada en tubo de HDPE, cambia ligeramente a partir de un mes. La crema va adquiriendo un color blanco-beige y posteriormente amarillento a lo largo del estudio.

En cuanto a las muestras de crema envasadas en viales de vidrio topacio, el aspecto no varía a lo largo del estudio excepto a los 6 meses a 40 °C/75% HR en la que se observa una ligera separación de fases.

El cambio de coloración observada en la crema envasada en tubos de HDPE es posible que sea debido a que los tubos no están totalmente llenos y a la temperatura en la zona del termosellado del tubo El cierre tampoco es hermético. Por tanto, el oxígeno está presente dentro de los tubos conduciendo a la oxidación de algunos componentes de la crema que generan este cambio de coloración.

6.4.20.2. Ensayo de separación de fases por centrifugación

Sólo se da la separación de fases en la crema almacenada durante 6 meses a 40 °C/75% HR. En el resto de muestras analizadas durante todo el estudio de estabilidad a las diferentes condiciones, el ensayo es correcto sin darse la separación de fases.

6.4.20.3. pH

Para el prototipo estudiado, las condiciones de almacenamiento 25°C/60%HR, 30°C/65% HR y 40 °C/75% HR y a todos los tiempos de toma de muestras, se obtienen unos valores de pH correctos, entre 4 y 7, para la aplicación tópica de la crema. Pero se observa una tendencia a la disminución de su valor.

Este proceso de acidificación de la crema que no afecta de forma significativa a las características organolépticas y de calidad de producto así como tampoco afecta a la estabilidad de los principios activos [104].

6.4.20.4. Extensibilidad y viscosidad

La viscosidad de la crema varía ligeramente a lo largo del tiempo a las diferentes condiciones. Esta variación es mayor cuanto más extremas son las condiciones de almacenamiento. La extensibilidad, por su parte, es mayor cuanto menor es la viscosidad. Por tanto, se observa un ligero aumento de los valores de extensibilidad. Estas variaciones observadas tanto de viscosidad como de extensibilidad a lo largo del estudio no son significativas y la crema conserva sus propiedades reológicas.

Considerando todos los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad preliminar, se puede concluir que la crema mantiene tanto las características organolépticas como de calidad de la crema.

6.4.20.5. Valoración de HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA y BHT

A lo largo de todo el estudio de estabilidad en las tres condiciones climáticas evaluadas, la valoración del contenido en los tres APIs en el prototipo en estudio cumple con las especificaciones establecidas para el producto acabado: 95,0 – 105,0%.

Se observa una disminución de la cantidad de BHA y BHT a lo largo del tiempo en todas las condiciones estudiadas, lo que indica que el antioxidante está realizando su función.

Se observa que el contenido de ambos filtros solares a lo largo del tiempo en las condiciones climáticas de 25 °C/60% HR y 30 °C/65% HR se mantiene constante. Mientras que se observa una ligera tendencia a la disminución en la condición de 40 °C/75% HR, cumpliendo en todos los casos la especificación preestablecida: 90,0 – 110,0%.

6.5. CONCLUSIONES

Una vez realizado el desarrollo de la formulación de la crema para el tratamiento del melasma por vía tópica conteniendo los tres APIs evaluados en la etapa de preformulación – HQ, KA y DPK – se concluye que:

- La fórmula óptima es la correspondiente a la del prototipo nº 20.
- Este prototipo de formulación presenta una caracterización reológica y una estabilidad preliminar adecuada para una crema despigmentante de aplicación tópica.

- La estabilidad preliminar estudiada sobre el prototipo nº 20 muestra una correcta conservación de la crema mostrando una evolución de las características reológicas y de la valoración de los componentes a controlar mucho más acentuada en las muestras conservadas a 40 °C/75% HR.

7. INDUSTRIALIZACIÓN

Una vez desarrollada la formulación óptima y establecida la técnica de elaboración a escala de planta piloto, debe efectuarse el estudio de escalado a escala industrial. El objetivo es confirmar que los datos e información obtenidos en el desarrollo farmacéutico y en los lotes galénicos (calidad de diseño) son reproducibles a escala industrial y así establecer las condiciones adecuadas a la maquinaria de fabricación a gran escala. Los lotes industriales deben dar lugar a unidades de dosificación que cumplan con las especificaciones establecidas en el diseño y desarrollo de la formulación (calidad de conformidad).

Los lotes de escalado se realizan inicialmente como ensayos de *viabilidad*, escala de fabricación completa o no, que pueden llevarse a cabo como un solo lote para confirmar que el proceso de escalado va como se ha previsto y no hay sorpresas inesperadas. Sin embargo, por lo general, es prudente planificar para tener suficientes materias primas así como suficiente tiempo asignado en la planta de fabricación para realizar ensayos de viabilidad o lotes adicionales, si hay parámetros que necesitan ser modificados. Debido al coste de los APIs y de los excipientes así como del coste asociado al tiempo necesario en planta, sólo se realizarán aquellos ensayos de viabilidad necesarios.

Una vez logrado este objetivo, debe asegurarse la calidad del medicamento para uso previsto comprobando los siguientes principios:

- La calidad, la seguridad y la eficacia deben ser diseñadas e incorporadas en el medicamento.
- La calidad no puede ser inspeccionada y probada sólo en el producto final.
- Cada paso del proceso de fabricación debe ser controlado para maximizar la probabilidad de que el producto final cumpla todas las especificaciones de calidad y de diseño.

Así, la validación de proceso es un elemento clave para garantizar que se cumplan estos objetivos de aseguramiento de la calidad y demostrar la capacidad de proporcionar, de forma continuada y reproducible, lotes homogéneos de acuerdo a unas especificaciones de calidad. Por esta razón, la validación del proceso se llevará a cabo con tres lotes fabricados consecutivamente en las instalaciones de fábrica donde

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

se producirá el medicamento en tamaño industrial. Durante la validación se debe prestar especial atención a una serie de factores tales como la selección de equipos de fabricación y materiales, materias primas (tanto API como excipientes), diseño del proceso y del producto acabado, y los ensayos a realizar durante el control en proceso y del producto acabado [112-113].

El documento clave de la validación es el protocolo de validación escrito y aprobado antes de comenzar cualquier lote de validación de fabricación. En este se especifica los procedimientos de fabricación, los intervalos de muestreo e identifica los parámetros a controlar en cada caso.

Estos lotes se deben acondicionar en el envase primario que posteriormente vaya a ser utilizado para la fabricación industrial y venta de producto en el mercado. Con estos tres primeros lotes fabricados también se llevarán a cabo los estudios de estabilidad del producto acabado según la normativa ICH.

7.1. ESTUDIO DE LA TECNOLOGIA DE FABRICACIÓN: ESCALADO

7.1.1. INTRODUCCIÓN

El laboratorio fabricante pretender fabricar lotes a nivel industrial de 120 kg de crema que generan 4.000 unidades de venta (tubos de crema). El tamaño de los lotes de escalado se realiza a tamaño industrial.

7.1.2. MATERIALES

7.1.2.1. *Materias primas*

Hidroquinona <i>European Pharma Grade</i> . Eastman (Capelleaan den IJssel, Países Bajos)	(HQ)
Ácido kójico. CMS (Oxfordshire, Reino Unido)	(KA)
Dipalmitato kójico. CMS (Oxfordshire, Reino Unido)	(DPK)
Metabisulfito sódico. Fagron (Barcelona, España)	(SMB)
Eusolex 9020 –Avobenzona–. Merck (Darmstadt, Alemania)	(AVB)
Eusolex 2292 – Octinoxato–. Merck (Darmstadt, Alemania)	(OCT)

Butilhidroxianisol. Fagron (Barcelona, España)	(BHA)
Butilhidroxitolueno. Fagron (Barcelona, España)	(BHT)
EDTA sódico. Fagron (Barcelona, España)	(EDTA)
Myrj 52 –Monoestearato de polietilenglicol–. Massó (Barcelona, España)	(PGM)
Span 20 –Monolaurato de sorbitano–. Uniqema (Gouda, Países Bajos)	(S20)
Emulcire 61 WL 2659 –Alcohol cetílico/Ceteth-20/Steareth-20–. Gattefossé (Saint-Priest, Francia)	(EM)
Estol 1474 –Estearato de glicerilo–. Uniqema (Gouda, Países Bajos)	(GMS)
Tween 20 –Polisorbato 20–. Massó (Barcelona, España)	(T20)
Tween 80 –Polisorbato 80–. Massó (Barcelona, España)	(T80)
Vaselina filante blanca. Fagron (Barcelona, España)	(WP)
Vaselina líquida. Fagron (Barcelona, España)	(LW)

A continuación se presentan los certificados de análisis de cada una de las materias primas utilizadas en la fase de industrialización, tanto en el proceso de escalado como en la validación de proceso.

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

HQ: Hidroquinona

Lote TS40736000

NC F-27

17/08 2007 10:54 FAX 934143290 IMCD ESPANA SA 003

EASTMAN
Register at WWW.EASTMAN.COM

Eastman Espana Sociedad Limitada
Carretera Nacional VI KM 23
28230 Las Rozas
Spain

CERTIFICATE OF ANALYSIS

08 AUG 2007

Ship To:
IMCD ESPANA ESPECIALIDADES
QUIMICAS SA
C/O DOMAN
P.I CAN VOLART
C/TORRE DEL CELLER S/N, MAVE B
E-08150 PARETS DEL VALLES

Sold To:
IMCD ESPANA ESPECIALIDADES
QUIMICAS SA
CALLE ORNSE 14/9
E-28020 MADRID

Material Description: Eastman(TM) Hydroquinone European Grade
Customer Order : 1012351 OP /
Outbound Delivery : 322A1214000010
Shipper Sales Order : 1011999
Ship Date : 08 AUG 2007
Batch / Lot : TR061201
Cust. Material No : 141976FER
Total # of Packages : 9.000
Net Weight, LB : 352.740
Net Weight, KG : 160.000

Characteristic	Value	Lower Limit	Upper Limit
Production Date	13.12.2006		
Free-flowing White Crystals	Passes		
Residue on Ignition, %	0.05		0.50
Water (Karl Fisher), %	0.28		0.50
TLC Identity	Passes		
Absorptivity @ 455 nm, ml/g*cm	0.045		0.190
UV Wavelength Maximum	294	291	295
Infrared Identity	Passes		
Melting Point (Initial), °C	172.3	172.0	
Melting Point (Final), °C	173.7		174.0
Expiration date, shelf life	12.12.2010		
Assay (Anhydrous Basis), %	100.18	99.00	100.50

If you have received this material from a distributor, please contact the distributor for further information.
For concerns related with Eastman shipments please call 800-EASTMAN (800-327-8626) for assistance.

Michael A. Callahan
Michael A. Callahan, Group Leader, Quality Assurance

Page 1 / 1

 Responsible Care®
A public Commitment

KA: Ácido kójico

Lote K13360701

F-18

15. ENE. 2007 17:00
A : ADUANAS

BRENTAG 34 932385655

Nº 473 P. 1

Your reference: 4600152469

**CERTIFICATE OF ANALYSIS
KOJIC ACID**

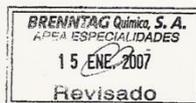
Batch No: K13360701
Net weight: 40.0 kg

Manufacture date: Dec 08
Retest Date: Dec 07

Chemical name: 2-hydroxy-5-hydroxymethyl-4-pyrone
Chemical formula: $C_6H_6O_4$
Mol. Wt.: 142.1

ANALYSIS

Assay: 99.8 %
Melting point: 152.8 - 154.7 °C
Residue on ignition: 0.04 %
Loss on drying: 0.37 %
Heavy Metals (as Pb): < 20 ppm
Arsenic: < 2 ppm



Date of issue: 5 January 2007

Page 1 of 1



Chemicals Ltd

9 Milton Park - Abingdon - Oxfordshire - OX14 4RR - UK

Tel. +44 (0) 1235 831160 Fax. +44 (0) 1235 831161

email: cms.marketing@cms-chemicals.com www.cms-chemicals.com

** COPIA VALIDADA **

Albarán: 0160584779/000010 Producto: ACIDO KOJICO BD005K
Código: 000000026981019300 Lote Brenntag: 0010334069 Lote Fabricante: K13360701
Extendido para: BODY ESTHETIC LABORATORIES, S.L.
S/Ref. Pedido: TELF S/Ref. Artículo:

Los datos contenidos en esta hoja se facilitan a título informativo únicamente y no eximen al receptor de la necesidad del preceptivo examen/comprobación para su aceptación a la entrega.

C M S C h e m i c a l s L t d

DPK: Dipalmitato kójico

Lote K16330701

F-19

Your Ref. 4500160910

CERTIFICATE OF ANALYSIS
KOJIC ACID DIPALMITATE

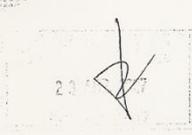
Batch No: K16330701
Net weight: 9 kg net

Manufacture date: Jan 07
Retest Date: Jan 08

Chemical name: 5-palmitoxyloxy-2-palmitoxyloxymethyl-4-pyrone
Chemical formula: $C_{38}H_{66}O_6$
Mol. Wt.: 618.9

ANALYSIS

Purity (HPLC)	99.3 %
Melting point	94.3 – 95.5 °C
Heavy Metals (as Pb)	< 10 ppm
Loss on drying:	0.14 %



Bodyestetic, s.l.

Date of issue: 16 April 2007 Page 1 of 1


Chemicals Ltd

9 Milton Park - Abingdon - Oxfordshire - OX14 4RR - UK
Tel. +44 (0) 1235 831160 Fax. +44 (0) 1235 831161
email: cms.marketing@cms-chemicals.com www.cms-chemicals.com

** COPIA VALIDADA **

Albarán: 0160604826/000010 Producto: ACIDO KOJICO DIPALMITATO BT 9 KG
Código: 000000027077019300 Lote Brenntag: 0010356697 Lote Fabricante: K16330701
Extendido para: BODY ESTHETIC LABORATORIES, S.L.
S/Ref.Pedido: e-mail S/Ref.Artículo:

Los datos contenidos en esta hoja se facilitan a título informativo únicamente y no eximen al receptor de la necesidad del preceptivo examen/comprobación para su aceptación a la entrega.

Lote K16330701

Your Ref: 4500163929

F-25

CERTIFICATE OF ANALYSIS
KOJIC ACID DIPALMITATE

Batch No: K16330701
Net weight: 40 kg net
Manufacture date: Jan 07
Retest Date: June 08

Chemical name: 5-palmitoxyloxy-2-palmitoxyloxymethyl-4-pyrone
Chemical formula: $C_{38}H_{66}O_6$
Mol. Wt.: 618.9

ANALYSIS

Purity (HPLC) 99.3 %
Melting point 94,3 – 95,5 °C
Heavy Metals (as Pb) < 10 ppm
Loss on drying: 0.14 %

BRENNTAG Química, S. A.
AREA ESPECIALIDADES
20 JUL. 2007
Revisado

Date of issue: 13 July 2007

Page 1 of 1



Chemicals Ltd

9 Milton Park - Abingdon - Oxfordshire - OX14 4RR - UK
Tel. +44 (0) 1235 831160 Fax. +44 (0) 1235 831161
email: cms.marketing@cms-chemicals.com www.cms-chemicals.com

** COPIA VALIDADA **

Albarán: 0160628885/000010 Producto: ACIDO KOJICO DIPALMITATO BT 10 KG
Código: 000000027077019300 Lote Brenntag: 0010378782 Lote Fabricante: K16330701
Extendido para: BODY ESTHETIC LABORATORIES, S.L.
S/Ref. Pedido: E-MAIL S/Ref. Artículo:

Los datos contenidos en esta hoja se facilitan a título informativo únicamente y no eximen al receptor de la necesidad del preceptivo examen/comprobación para su aceptación a la entrega.

EM: Emulcire 61 WL 2659

Lote 105396

F-17

80011282



GATTEFOSSÉ

CERTIFICAT D'ANALYSE

=====

PRODUIT : EMULCIRE 61 WL 2659 (Cetyl Alcohol and
 CODE PRODUIT : 5240/00 Ceteth-20 and Steareth-20)
 NUMERO DE LOT : 105398 ?
 DATE DE FABRICATION . . . : Avril 2006
 DATE DE REEVALUATION . . : Avril 2009

DEFINITION CHIMIQUE :

Alcool gras associé à un alcool gras polyoxyéthyléné.

TEST	SPECIFICATION	RESULTAT
ASPECT	Solide cireux	Conforme
ODEUR	Faible	Conforme
COULEUR (Echelle Gardner)	< 3	0,1
POINT DE GOUTTE (METTLER)	46,5 à 50,5 °C	48,5
pH (à 10% dans l'eau)	4,0 à 7,0	5,9
INDICE D'ACIDE	< 1,00 mgKOH/g	0,08
INDICE DE SAPONIFICATION	< 5,0 mgKOH/g	0,7
INDICE D'IODE	< 3 gI2/100g	0,3
TENEUR EN EAU	< 1,00 %	Conforme
TENEUR EN CENDRES SULFURIQUES	< 0,1 %	Conforme
METAUX LOURDS	< 10 ppm Pb	Conforme

Nous certifions que le lot est conforme aux spécifications en vigueur.
 Ce document est édité informatiquement et ne nécessite pas de signature.

23/08/06

M. Dronnier Responsable Qualité

GATTEFOSSÉ SAS : 36 chemin de Genas - BP 603 - F-69804 SAINT-PRIEST Cedex - France - Tél. +33 4 72 22 98 00 - Télécopie : +33 4 78 90 45 67

Lote 105396

F-20.

80020880



CERTIFICAT D'ANALYSE

=====
 PRODUIT : EMULCIRE 61 WL 2659
 CODE PRODUIT : 5240/00
 NUMERO DE LOT : 111340
 DATE DE FABRICATION ... : Mars 2007
 DATE DE REEVALUATION . : Mars 2010
 =====

DEFINITION CHIMIQUE :

Alcool gras associé à un alcool gras polyoxyéthyléné.

TEST	SPECIFICATION	RESULTAT
ASPECT	Solide cireux	Conforme
ODEUR	Faible	Conforme
COULEUR (Echelle Gardner)	< 3,0	0,1
POINT DE GOUTTE (METTLER)	46,5 à 50,5 °C	48,4
pH (à 10% dans l'eau)	4,0 à 7,0	6,89
INDICE D'ACIDE	< 1,00 mgKOH/g	0,06
INDICE DE SAPONIFICATION	< 5,0 mgKOH/g	0,1
INDICE D'IODE	< 3 gI2/100g	0,3
TENEUR EN EAU	< 1,00 %	Conforme
TENEUR EN CENDRES SULFURIQUES	< 0,1 %	Conforme
METAUX LOURDS	< 10 ppm Pb	Conforme

Nous certifions que le lot est conforme aux spécifications en vigueur.

Ce document est édité informatiquement et ne nécessite pas de signature.

9/05/07

M. Dronnier Responsable Qualité

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

GMS: Estol 1474

Lote 692460

22-02-2006 08:35

P.01/01

uniqema

F-16

MOIROUD
CENTRE DE FRET SOGARIS
94564 RUNGIS
B.R.D.

Uniqema
P.O. Box 2, 2800 AA Gouda
Buurtje 1, 2802 SE Gouda
The Netherlands
Telephone 31 (0)182 542911
Fax 31 (0)182 542250
www.uniqema.com

Produit ESTOL 1474 (GRANULATED POWDER) GLYC. MON
OSTEARATE SF (VEGETABLE)
Quantité 10000 KG
Commande no. 80243043 10
Charge no. 692460
Date du cert. 14-FEV-2006
Livraison no.
Transporteur
Date du départ
REF PC/237
MANUF.DATE: 10.01.2006
RETEST DATE: 10.01.2007

Certificate d'analyse

Analyse	Unité	Minimum	Maximum	Resultat
Indice d'acide	mgKOH/g	-	3.0	1.3
Couleur Lovibond cuvette de 1"	Y/R	-	4.0-1.2	1.5-0.6
Alpha-Monoglycérides	%	40	-	42
Glycérol libre	%	-	2.0	0.2

Chef de laboratoire Ir. R.T. van Drooge

Le certificat est imprimé automatiquement et ne nécessite pas de signature.

Page 1-1 (Page total)



Certified according to ISO 9001:2000
Certificate No. FM 10780

Unichema Chemie BV, trading as Uniqema

Buurtje 1, 2802 SE, Gouda, The Netherlands. Registered office Gouda, HR 290094

Uniqema is part of ICI Performance Specialties,
a business of Uniqema Nederland B.V.
registered in The Netherlands
Gouda, HR 24324849. A subsidiary of ICI.

Uniqema is a trademark of
the ICI Group of Companies.

TOTAL P.01

WP: Vaselina filante blanca

Lote 0508519

F-5
02/08/2005
Pág.: 1
Albarán: 35384



FAGRON

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
CERTIFICATE OF ANALYSIS

VASELINA FILANTE BLANCA Ph.Eur. 5 Lt
Paraffinum molle album

Fórmula: PM: Nº CAS:	Nº Lote / Batch Nº: 0508519 Nº Análisis / Analysis Nº: 0515624 Próximo Control Analítico/ Retest: 06/2010
---	--

INCI: Paraffin

Características: Masa incolora o blanca. Practicamente insoluble en agua y en alcohol, bastante soluble en eter y en cloruro de metileno. La sustancia fundida está libre de fluorescencias a la luz del día.

Description: Colourless or white mass. Practically insoluble in water and in alcohol, freely soluble in ether and in methylene chloride. The melted substance is free from fluorescence in daylight.

ENSAYOS / TESTS	ESPECIFICACIONES / SPECIFICATIONS	RESULTADOS / RESULTS	METODO / METHOD
Intervalo de fusión <i>Melting range</i>	66.0 - 68.0 °C	66.0 - 68.0 °C	A1131628
Acidez o alcalinidad <i>Acidity or alkalinity</i>	< 0.5	< 0.5	A4531628
Hidrocarburos <i>Hydrocarbons</i>	(H. aromáticos policíclicos) Test Ph.Eur. <i>(Polycyclic aromatic h.) Ph.Eur. Test</i>	Conforme <i>Conforms</i>	ANA31628
Sustancias carbonizables <i>Carbonisable substances</i>	Test Ph.Eur. <i>Ph.Eur. Test</i>	Conforme <i>Conforms</i>	A7131628
Sulfatos <i>Sulfate</i>	< 150 ppm	< 150 ppm	A1831628
Residuo de ignición <i>Residue on ignition</i>	< 0.05%	< 0.05 %	AHJ31628

OBSERVACIONES: Cumple Ph.Eur.
REMARKS: Complies with Ph.Eur.

CONSERVACIÓN: En envase bien cerrado, protegido de la luz
STORAGE: Store in a well-closed container, protected from light



Anna Codina / Directora Técnica

ROIG FARMA, S.A.U. - GRUPO FAGRON Tel. +34 93 731 07 22 - Fax +34 93 731 16 44 - pedidos@roigfarma.com
ROIG FARMA, S.A.U. - GRUPO FAGRON Tel. +34 93 731 07 22 - Fax +34 93 731 16 44 - pedidos@roigfarma.com

Lote 0705202



FAGRON

Certificado de Análisis
CERTIFICATE OF ANALYSIS

14/05/2007
Pág.: 1
Albarán: 85646

VASELINA FILANTE BLANCA Ph.Eur.
Vaselinum album

NC: F-21

<p>Fórmula</p> <p>PM</p> <p>Nº CAS:</p>	<p>NºLote/Batch Nº: 0705202</p> <p>NºAnálisis/Analysis Nº: 0721576</p> <p>Próximo Control Analítico/Retest: 05/2012</p>
--	--

INCI Paraffin

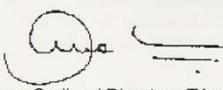
Características Masa untuosa blanda, translúcida blanca o casi blanca. Practicamente insoluble en agua y en etanol 96, soluble en cloruro de metileno. La substancia fundida está libre de fluorescencias a la luz del día.

Description: Colourless or white mass. Practically insoluble in water and in alcohol, freely soluble in ether and in methylene chloride. The melted substance is free from fluorescence in daylight.

ENSAYOS / TESTS	ESPECIFICACIONES / SPECIFICATIONS	RESULTADOS / RESULTS	METODO / METHOD
Identificación <i>Identification</i>	A, B, C, D	Conforme <i>Positive</i>	A0131628
Cenizas sulfúricas <i>Sulphated ash</i>	< 0.05 %	< 0.05 %	A1331628
Consistencia	60 - 300	170	ASY31628
Aspecto <i>Appearance</i>	Test Ph.Eur.	Conforme <i>Conforms</i>	BAN31628
Acidez o alcalinidad <i>Acidity or alkalinity</i>	Test Ph.Eur.	Conforme <i>Conforms</i>	A4531628
Hidrocarburos <i>Hydrocarbons</i>	(H. aromáticos policíclicos) Test Ph.Eur. <i>(Polycyclic aromatic h.) Ph.Eur. Test</i>	Conforme <i>Conforms</i>	ANA31628
Sustancias carbonizables <i>Carbonisable substances</i>	Test Ph.Eur. <i>Ph.Eur. Test</i>	Conforme <i>Conforms</i>	A7131628
Sulfatos <i>Sulfate</i>	< 150 ppm	< 150 ppm	A1831628

OBSERVACIONES Cumple Ph.Eur.
REMARKS: Complies with Ph.Eur.

CONSERVACIÓN En envase bien cerrado, protegido de la luz
STORAGE: Store in a well-closed container, protected from light



Anna Codina / Directora Técnica

ROIG FARMA, S.A.U. - GRUPO FAGRON Tel. +34 93 731 07 22 - Fax +34 93 731 16 44 - pedidos@roigfarma.com

LP: Vaselina líquida

Lote 05E1302

	CERTIFICADO DE ANÁLISIS		F-10
	<i>CERTIFICATE OF ANALYSIS</i>		14/06/2005 Pág.: 1 Albarán: 35384
PARAFINA LIQUIDA Ph.Eur. <i>Paraffinum liquidum</i>			
Fórmula: PM: Nº CAS: 8042-47-5		Nº Lote / Batch Nº: 05E1302 Nº Análisis / Analysis Nº: 0515076 Próximo Control Analítico/ Retest: 05/2008	
INCI: Paraffinum liquidum			
Características: Líquido oleoso, incoloro, límpido, prácticamente insípido, prácticamente insoluble en agua, poco soluble en alcohol y miscible con hidrocarburos. No presenta fluorescencia a la luz del día.			
Description: Colourless, transparent, oily liquid, free from fluorescence in daylight. It is almost tasteless. Practically insoluble in water, slightly soluble in alcohol and miscible with hydrocarbons.			
ENSAYOS / TESTS	ESPECIFICACIONES / SPECIFICATIONS	RESULTADOS / RESULTS	METODO / METHOD
Identificación <i>identification</i>	Test A, B, C	Conforme <i>Positive</i>	A0131629
Acidez o alcalinidad <i>Acidity or alkalinity</i>	Test Ph.Eur. <i>Ph.Eur. Test</i>	Conforme <i>Conforms</i>	A4531629
Densidad relativa <i>Specific gravity</i>	0.827 - 0.890 g/ml	0.882 g/ml	A0431629
Viscosidad cinemática <i>Kinematic viscosity</i>	110 - 230 mPa.s	198 mPa.s	ABM31629
Sustancias relacionadas <i>Related substances</i>	(Hidrocarburos aromáticos policíclicos) Test <i>(Polycyclic aromatic hydrocarbons) Ph.Eur. Test</i>	Conforme <i>Conforms</i>	A0731629
Sustancias carbonizables <i>Carbonisable substances</i>	Test Ph.Eur. <i>Ph.Eur. Test</i>	Conforme <i>Conforms</i>	A7131629
Parafinas sólidas <i>Solid paraffins</i>	Test Ph.Eur. <i>Ph.Eur. Test</i>	Conforme <i>Conforms</i>	AQO31629
OBSERVACIONES: Cumple Ph.Eur.			
REMARKS: Complies with Ph.Eur.			
CONSERVACIÓN: En envase bien cerrado, protegido de la luz			
STORAGE: In a well-closed container, protected from light			
 Anna Codina / Directora Técnica			
ROIG FARMA, S.A.U. - GRUPO FAGRON Tel. +34 93 731 07 22 - Fax +34 93 731 16 44 - pedidos@roigfarma.com ROIG FARMA, S.A.U. - GRUPO FAGRON Tel. +34 93 731 07 22 - Fax +34 93 731 16 44 - pedidos@roigfarma.com			

BHA: Butilhidroxianisol

Lote 0509809

F-5
 03/10/2005
 Pág.: 1
 Albarán: 35384



FAGRON

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
 CERTIFICATE OF ANALYSIS

BUTILHIDROXIANISOL Ph.Eur.
Butylhydroxyanisolum

Fórmula: C ₁₁ H ₁₆ O ₂ PM: 180.3 Nº CAS: 25013-16-5	Nº Lote / Batch Nº: 0509809 Nº Análisis / Analysis Nº: 0516036 Próximo Control Analítico/ Retest: 04/2008
---	--

INCI: BHA

Características: Polvo cristalino blanco-amarillento o débilmente rosado. Prácticamente insoluble en agua, muy soluble en cloruro de metileno, fácilmente soluble en alcohol y en aceites vegetales. Soluble en disoluciones alcalinas débiles.

Description: White, yellowish or slightly pinkish, crystalline powder. Practically insoluble in water, very soluble in methylene chloride, freely soluble in alcohol and in fatty oils. It dissolves in dilute solutions of alkali hydroxides.

ENSAYOS / TESTS	ESPECIFICACIONES / SPECIFICATIONS	RESULTADOS / RESULTS	METODO / METHOD
Identificación <i>Identification</i>	A, B, C	Conforme <i>Positive</i>	A0130347
Aspecto de la disolución <i>Appearance of solution</i>	Límpida y no más coloreada que grado 5 en <i>Clear and not more coloured than intensity 5 of</i>	Conforme <i>Conforms</i>	A0230347
Intervalo de fusión <i>Melting range</i>	48 - 63 °C	58 - 63 °C	A1130347
Sustancias relacionadas <i>Related substances</i>	Test Ph.Eur. <i>Ph.Eur. Test</i>	Conforme <i>Conforms</i>	A0730347
Plomo <i>Lead</i>	< 10 ppm	< 10 ppm	A8630347
Cobre <i>Copper</i>	< 5 ppm	Conforme <i>Conforms</i>	A5630347
Zinc <i>Zinc</i>	< 5 ppm	< 5 ppm	A2430347
Arsénico <i>Arsenic</i>	< 2 ppm	< 2 ppm	A1630347
Metales pesados <i>Heavy metals</i>	< 10 ppm	< 10 ppm	A1230347
Cenizas sulfúricas <i>Sulphated ash</i>	< 0.1 %	0.01 %	A1330347
Riqueza <i>Assay</i>	> 90 %	99.5 %	A1030347

OBSERVACIONES: Cumple Ph.Eur.
REMARKS: Complies with Ph.Eur.

CONSERVACIÓN: Guardar protegido de la luz
STORAGE: Store protected from light


 Anna Codina / Directora Técnica

ROIG FARMA, S.A.U. - GRUPO FAGRON Tel. +34 93 731 07 22 - Fax +34 93 731 16 44 - pedidos@roigfarma.com
 ROIG FARMA, S.A.U. - GRUPO FAGRON Tel. +34 93 731 07 22 - Fax +34 93 731 16 44 - pedidos@roigfarma.com

BHT: Butilhidroxitolueno

Lote 05E3105

F-4
 30/06/2005
 Pág.: 1
 Albarán: 35384



FAGRON

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
CERTIFICATE OF ANALYSIS

BUTILHIDROXITOLUENO Ph.Eur.
Butylhydroxytoluenum

Fórmula: C ₁₅ H ₂₄ O PM: 220.4 Nº CAS: 128-37-0	Nº Lote / Batch Nº: 05E3105 Nº Análisis / Analysis Nº: 0515205 Próximo Control Analítico/ Retest: 05/2010
---	---

INCI: BHT

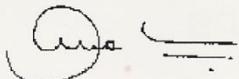
Características: Polvo cristalino blanco o blanco-amarillento. Prácticamente insoluble en agua, muy soluble en acetona, fácilmente soluble en alcohol y en aceites vegetales.

Description: White or yellowish-white crystalline powder. Practically insoluble in water, very soluble in acetone, freely soluble in alcohol and in vegetable oils.

ENSAYOS / TESTS	ESPECIFICACIONES / SPECIFICATIONS	RESULTADOS / RESULTS	METODO / METHOD
Identificación <i>Identification</i>	A, B, C, D	Conforme <i>Positive</i>	A0130348
Aspecto de la disolución <i>Appearance of solution</i>	Límpida y no más coloreada que disol. ref. A5 o <i>Clear and not more coloured than ref.sol. Y5 or</i>	Conforme <i>Conforms</i>	A0230348
Punto de solidificación <i>Congeeing temperature</i>	69 - 70 °C	69 °C	A4930348
Sustancias relacionadas <i>Related substances</i>	< 0.5 %	< 0.5 %	A0730348
Cenizas sulfúricas <i>Sulphated ash</i>	< 0.1 %	< 0.1 %	A1330348

OBSERVACIONES: Cumple Ph.Eur.
REMARKS: Complies with Ph.Eur.

CONSERVACIÓN: Conservar en envase bien cerrado
STORAGE: Store in a well-closed container



Anna Codina / Directora Técnica

ROIG FARMA, S.A.U. - GRUPO FAGRON Tel. +34 93 731 07 22 - Fax +34 93 731 16 44 - pedidos@roigfarma.com

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

AVB: Eusolex® 9020

Lote 5844A026

F-12

08/02 '07 JUE 15:37 FAX 0034 93 544 02 85 M.F.Q.DIV.PROD.QUIMICOS +--+ ALMACEN QUIM. 002



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product **Eusolex® 9020**
Code **105844**
Batch **5844A026** Customer:
Manufacturing Date: **22-01-2007**
Release Date: **24-01-2007**
Retest Date: **01-2010**

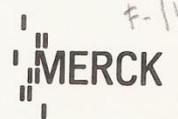
Test Items	Requirements	Units	Result
Characters	off-white to yellowish crystalline powder with weak odor	-	Complies
Identification (IR)	IR-Spectrum Conforms	-	Complies
Identification (UV)	UV-Spectrum Conforms	-	Complies
Assay	95.0 - 105.0	%	95.9
Melting range	81 - 86	°C	83.9
Specific absorbance	1110 - 1170	-	1140
Loss on drying	Not more than 0.5	%	0.09
Chromatographic purity (ind.)	Not more than 3.0	%	1.10
Chromatographic purity (total)	Not more than 4.5	%	2.11
Organic Volatile Impurities (OVI)	Conforms to USP <467>	-	Complies

Conforms to USP (Avobenzone)

Dr. Valenti Bou
Laboratorio Fabricación
Quality Control

This document has been produced electronically and is valid without a signature
Merck Farma y Química, S.A. Polígono Merck. 08100 Mollet del Vallès (Barcelona). Tel. (34) 93 565 55 00
Printing Date: 05-02-2007 09:07

Pag: 1 of 1

OCT: Eusolex® 2292**Lote K92080282**

Certificate of Analysis

Merck Farma y Química S.A.
 Admón. Marketing y Ventas Química
 P.O.Box 47
 Polígono Merck
 08100 MOLLET DEL VALLES
 España

Your contact person:

Fr. SANCHEZ

Telephone: 0034 93 565,55,83

Telefax: 0034 93 544,02,85

Customer no.: 172329

Delivery note no.: 11052762

Date of print: 08.02.2007

1.05382.9026 Eusolex® 2292

Batch K92080282

	Spec. Values	Batch Values
Colour	colourless to light yellow (< 100 Hazen)	colourless to light yellow (< 100 Hazen)
Appearance	clear liquid	clear liquid
Odour	practical odourless	practical odourless
Assay (GC)	≥ 98 %	99.9 %
Identity		
IR-spectrum	IR spectrum conforms	IR spectrum conforms
UV-spectrum	UV spectrum conforms	UV spectrum conforms
chromatography purity	conforms	passes test
Refractive index (n 20/D)	1.542 - 1.548	1.546
Density (d 25/25)	1.005 - 1.013	1.010
Spec. absorbance (at 308 nm; 1 %; 1 cm; methanol)	≥ 830	869
Acid value	≤ 0.9	0.1
Water	≤ 0.5 %	0.01 %

conforms USP

Test date (DD.MM.YYYY): 12.10.2006

Dr. Jens Schewitz

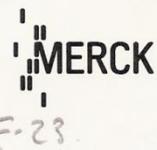
responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

Merck KGaA 64271 Darmstadt Tel. (06151)72-0
 SA-7 Anfo: 13566131 1478992 - 1053820000.000000 V. 981

Page 1 of 1

Lote K92080582



Certificate of Analysis

BODY-ESTHETIC LABORATORIES S.L.
BERTRAN I GÜELL, 72-74
08850 GAVA-BARCELONA-
ESPAÑA

Your contact person:
 Torsten Huegel, CS EU PIGM
 Telephone: 06151 / 722716

Customer order no.: 0009099066
 Customer order date: 10.07.2007

Customer no.: 172329
 Order no.: 104374879
 Delivery note no.: 93098943

consignee's p.o.: mail SR. DANIEL

Date of print: 12.07.2007

1.05382.9026 Eusolex® 2292
 Batch K92080582

	Spec. Values	Batch Values
Colour	colourless to light yellow (< 100 Hazen)	colourless to light yellow (< 100 Hazen)
Appearance	clear liquid	clear liquid
Odour	practical odourless	practical odourless
Assay (GC)	≥ 98 %	99.9 %
Identity		
IR-spectrum	IR spectrum conforms	IR spectrum conforms
UV-spectrum	UV spectrum conforms	UV spectrum conforms
chromatography purity	conforms	passes test
Refractive index (n 20/D)	1.542 - 1.548	1.544
Density (d 25/25)	1.005 - 1.013	1.010
Spec. absorbance (at 308 nm; 1 %; 1 cm; methanol)	≥ 830	875
Acid value	≤ 0.9	0.1
Water	≤ 0.5 %	0.01 %

conforms USP

Test date (DD.MM.YYYY): 11.04.2007

Dr. Jens Schewitz

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

EDTA: Edetato disódico

Lote 05F1605

F-6
27/09/2005
Pág.: 1
Albarán: 35384



FAGRON

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
CERTIFICATE OF ANALYSIS

EDETATO DISODICO Ph.Eur.
Dinatrii edetas

Fórmula: C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O PM: 372.2 Nº CAS: 139-33-3	Nº Lote / Batch Nº: 05F1605 Nº Análisis / Analysis Nº: 0516046 Próximo Control Analítico/ Retest: 06/2010
--	--

INCI: Disodium EDTA

Características: Polvo cristalino blanco. Soluble en agua, bastante soluble en alcohol,

Description: White crystalline powder. Soluble in water, sparingly soluble in alcohol.

ENSAYOS / TESTS	ESPECIFICACIONES / SPECIFICATIONS	RESULTADOS / RESULTS	METODO / METHOD
Identificación <i>Identification</i>	A ,B ,C ,D	Conforme <i>Positive</i>	A0130547
Aspecto de la disolución <i>Appearance of solution</i>	Límpida e incolora <i>Clear and colourless</i>	Conforme <i>Conforms</i>	A0230547
pH <i>pH</i>	4.0 - 5.5 (5 %)	4.4	A1530547
Impurezas <i>Impurities</i>	< 0.1 % (A)	< 0.1 %	AFV30547
Hierro <i>Iron</i>	< 80 ppm	< 80 ppm	A1730547
Metales pesados <i>Heavy metals</i>	< 20 ppm	< 20 ppm	A1230547
Riqueza <i>Assay</i>	98.5 - 101.0 %	99.3 %	A1030547

OBSERVACIONES: Cumple Ph.Eur.
REMARKS: Complies with Ph.Eur.

CONSERVACIÓN: En envase bien cerrado, protegido de la luz
STORAGE: In a well-closed container, protected from light



Anna Codina / Directora Técnica

ROIG FARMA, S.A.U. - GRUPO FAGRON Tel. +34 93 731 07 22 - Fax +34 93 731 16 44 - pedidos@roigfarma.com
ROIG FARMA, S.A.U. - GRUPO FAGRON Tel. +34 93 731 07 22 - Fax +34 93 731 16 44 - pedidos@roigfarma.com

SMB: Metabisulfito sódico

Lote 0516280

F-7
 25/10/2005
 Pág.: 1
 Albarán: 35384



FAGRON

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
 CERTIFICATE OF ANALYSIS

SODIO METABISULFITO Ph.Eur.
Natrii metabisulfis

Fórmula: Na ₂ S ₂ O ₅ PM: 190.1 Nº CAS: 7681-57-4	Nº Lote / Batch Nº: 0510825 Nº Análisis / Analysis Nº: 0516280 Próximo Control Analítico/ Retest: 10/2007
---	--

INCI: Sodium metabisulfite

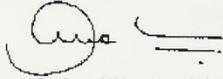
Características: Polvo cristalino blanco o cristales incoloros, fácilmente soluble en agua, poco soluble en alcohol.

Description: White crystalline powder or colourless crystals, freely soluble in water, slightly soluble in alcohol.

ENSAYOS / TESTS	ESPECIFICACIONES / SPECIFICATIONS	RESULTADOS / RESULTS	METODO / METHOD
Identificación <i>Identification</i>	A, B, C	Conforme <i>Positive</i>	A0132098
Aspecto de la disolución <i>Appearance of solution</i>	Límpida e incolora <i>Transparent and colourless</i>	Conforme <i>Conforms</i>	A0232098
pH <i>pH</i>	3.5 - 5.0 (5 %)	4.1	A1532098
Tiosulfatos <i>Thiosulfate</i>	Test Ph.Eur. <i>Ph.Eur. Test</i>	Conforme <i>Conforms</i>	ADY32098
Hierro <i>Iron</i>	<20 ppm	< 5 ppm	A1732098
Arsénico <i>Arsenic</i>	<5 ppm	< 1 ppm	A1632098
Metales pesados <i>Heavy metals</i>	<20 ppm	< 10 ppm	A1232098
Dióxido de azufre <i>Sulfur dioxide</i>	> 66.0 %	67.05 %	ACZ32098
Riqueza <i>Assay</i>	95.0 - 100.5 %	99.1 %	A1032098

OBSERVACIONES: Cumple Ph.Eur.
REMARKS: Complies with Ph.Eur.

CONSERVACIÓN: En envase bien cerrado, protegido de la luz.
STORAGE: Store in a well-closed container, protected from light.



Anna Codina / Directora Técnica

ROIG FARMA, S.A.U. - GRUPO FAGRON Tel. +34 93 731 07 22 - Fax +34 93 731 16 44 - pedidos@roigfarma.com
 ROIG FARMA, S.A.U. - GRUPO FAGRON Tel. +34 93 731 07 22 - Fax +34 93 731 16 44 - pedidos@roigfarma.com

PGM: Myrj 52 S Pharma

Lote 1157248

26. Jan. 2007 10:44 transport moiroud

Nº 1757 P. 13 F-13
uniema
 Mevise Site

CIAL QUIMICA MASSO SA
 SAP 209225

Ctra. Hostalric a Tossa, km 1,8
 08495 Fogars de la Selva (Barcelona)
 España
 Teléfono: (93) 766 98 00
 Fax: (93) 766 98 02

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product: MYRJ 52 S PHARMA
 Product Description: Polyoxyethylene (4s) stearate
 Batch No: 1157248
 Quantity: 1.800 KG
 Date of Certificate: 19/04/2006
 Manufacturing Date: 18/04/2006
 Recommended re-analysis Date: 18/04/2008
 Customer Purchase Order Number: PC24278

We certify that this material has been analysed and conforms to the agreed specification

	Units	Specification	Result	Test Method
✓ Acid value	mgKOH/g	Max 1.0	0.6	UIL 1001
✓ Saponification value	mgKOH/g	25 - 35	28	UIL 1007
✓ Iodine value	g/100g	Max 2.0	0.3	UIL 1004
✓ Hydroxyl value	mgKOH/g	25 - 40	32	UIL 1002
✓ Melting Point	°C	38 - 52	47	QC 2016
✓ Congealing Point	°C	37 - 47	41	QC 2019
✓ Colour	Gardner	Max 2	1	UIL 1006
✓ Water	% m/m	Max 1.0	0.6	UIL 1003
✓ Alkalinity test		Pass	Pass	QC 2059
✓ Heavy metals	mg/kg	Max 10	<10	QC 2009
✓ Reducing substances test		Pass	Pass	QC 1317
✓ Sulphated ash	% m/m	Max 0.2	<0.2	QC 2005
✓ Organic volatile impurities test		Pass	Pass	USP 481
✓ Peroxide value	meq/kg	Max 5	1	UIL 1002
✓ Free ethylene oxide	mg/kg	Max 1	<1	UIL 5130
✓ Free polyethylene glycol	% m/m	17 - 27	19	
✓ 1,4-dioxane	mg/kg	Max 10	<10	UIL 5130
✓ Ethylene glycol	mg/kg	Max 620	<620	QC 1293
✓ Appearance at 80°C		Clear liquid	Pass	UIL 6002
Stearic	% m/m	40.0 - 60.0	50.2	UIL 1005
Palmilic + stearic	% m/m	Min 90.0	94.1	UIL 1005

Certificate is system generated and does not require a signature

Quality Control Manager: Rafael Beneyto



A member of the ICI Group
 The Unidol and Unisema are
 Trademarks of the ICI Group of
 Companies

Unichema Chemie BV, trading as Unisema
 Buijse 1, 2602 BE, Gouda, The Netherlands. Registered office Gouda, HR 29009403

Lote 1188583

4. Juin 2007 10:42 transport moiroud N°0004 P. 5

F-24

CIAL, QCA, MASSO
SAP 251612

uni ema
Mevisa Site

Ctra. Hostaiaic a Tossa, km 1,8
08495 Fogars de la Selva (Barcelona)
España
Teléfono: (93) 766 98 00
Fax: (93) 766 98 02

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product: MYRJ 52 S PHARMA
 Product Description: Polyoxyethylene (4c) stearate
 Batch No: 1188583
 Quantity: 1200 KG
 Date of Certificate: 28/02/2007
 Manufacturing Date: 27/02/2007
 Recommended re-analysis Date: 28/02/2009
 Customer Purchase Order Number: PC/30217

We certify that this material has been analysed and conforms to the agreed specification

	Units	Specification	Result	Test Method
Acid value	mgKOH/g	Max 1.0	0.4	UIL 1001
Saponification value	mgKOH/g	25 - 35	31	UIL 1007
Iodine value	g/100g	Max 2.0	0.3	UIL 1004
Hydroxyl value	mgKOH/g	25 - 40	33	UIL 1002
Melting Point	°C	36 - 52	48	QC 2015
Congeeing Point	°C	37 - 47	47	QC 2019
Colour	Gardner	Max 2	2	UIL 1006
Water	% m/m	Max 1.0	0.6	UIL 1003
Alkalinity test		Pass	PASS	QC 2009
Heavy metals	mg/kg	Max 10	<10	QC 2009
Reducing substances test		Pass	PASS	QC 1317
Sulphated ash	% m/m	Max 0.2	<0.2	QC 2005
Organic volatile impurities test		Pass	PASS	USP 461
Peroxide value	meq/kg	Max 5	2	UIL 1002
Free ethylene oxide	mg/kg	Max 1	<1	UIL 5130
Free polyethylene glycol	% m/m	17 - 27	21	UIL 5130
1,4-dioxane	mg/kg	Max 10	<10	QC 1293
Ethylene glycol	mg/kg	Max 620	<620	QC 1293
Appearance at 80°C		Clear liquid	PASS	UIL 6002
Stearic	% m/m	40.0 - 60.0	54.4	UIL 1005
Palmitic + stearic	% m/m	Min 90.0	97.4	UIL 1005

Certificate is system generated and does not require a signature

Quality Control Manager: Rafael Beneyto




Unichema Chemie BV, 1185PG 88 Ulsjema
Boutje 1, 2802 BE, Oude, The Netherlands. Register office Gouda, HR 28006483

T80: Polisorbato 80

Lote 609D0241

F-14

unigema

Unigema QC Laboratory
 ET1 Road, Wilton
 Redcar TS10 4RG
 Telephone: (01642) 435049
 Fax: (01642) 435048
 E-Mail: keith.harland@unigema.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product: TWEEN™ 80V PHARMA
Product Description: Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monooleate vegetable sourced
Batch No: 609D0241
Date of Certificate: 6 September 2006
Manufacturing Date: September 2006
Recommended re-analysis Date: September 2008
In compliance with: EP- Polysorbate 80, USP/NF- Polysorbate 80, ICH - Residual solvents

	Units	Specification	Result	Test Method (C&P/SC)
Acid value	mgKOH/g	Max 2.0	1.5	7
Saponification value	mgKOH/g	45 - 55	51.8	18
Hydroxyl value	mgKOH/g	65 - 80	74.8	17
Water	% m/m	2.5 - 3.0	3.0	40
Colour	Gardner	Max 5	5	6
Sulphated ash	% m/m	Max 0.25	0.08	32
Kin. viscosity at 25°C	mm ² /s	300 - 500	394	22
Free ethylene oxide	mg/kg	Max 1	<1	44
1,4-dioxane	mg/kg	Max 10	2	44
Peroxide value	meq/kg	Max 5	<1	15
Appearance at 25°C		Clear liquid	Clear	1
Organic volatile Impurities		Conforms	Conforms	
Rel.density at 25°C		1.06 - 1.09	Conforms	
Heavy metals	mg/kg	Max 10	Conforms	
Ethylene glycol	mg/kg	Max 620	Conforms	
Fatty acid composition:				
Oleic acid fraction	% m/m	58.0 - 85.0	Conforms	UIL 1005
Myristic	% m/m	Max 5.0	Conforms	
Palmitic	% m/m	Max 16.0	Conforms	
Palmitoleic	% m/m	Max 8.0	Conforms	
Stearic	% m/m	Max 6.0	Conforms	
Linoleic	% m/m	Max 18.0	Conforms	
Linolenic	% m/m	Max 4.0	Conforms	

Certificate is system generated and does not require signature.

Quality Control Manager: Keith Harland



BS EN ISO 9001:2000
 Page 1 of 1

Unichama Chemie BV, trading as Unigema
 Buitje 1, 2802 BE, Gouda, The Netherlands. Registered office Gouda, HR 29009483

T20: Polisorbato 20

Lote 607D0181

F-15

uniqema

Uniqema QC Laboratory
 ET1 Road
 Wilton
 Redcar
 TS10 4RG
 Telephone: (01642) 435049
 Fax: (01642) 435048
 E-Mail: keith.harland@uniqema.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product: TWEEN™ 20
Product Description: Polyoxyethylene 20 sorbitan monolaurate
Batch No: 607D0181
Date of Certificate: 18 July 2006
Manufacturing Date: July 2006
Recommended re-analysis Date: July 2008

	<u>Units</u>	<u>Specification</u>	<u>Result</u>	<u>Test Method (C&P/SC)</u>
Appearance at 25°C		Clear liquid	Clear	1
Acid value	mgKOH/g	Max 2.0	1.26	7
Saponification value	mgKOH/g	40 - 50	45.5	18
Hydroxyl value	mgKOH/g	96 - 108	107	17
Water	% m/m	2.5 - 3.0	2.67	40
Colour at 25°C	Gardner	Max 5	4	6
Free ethylene oxide	mg/kg	Max 1	<1	44
1,4-dioxane	mg/kg	Max 10	1	44
Sulphated ash	% m/m	Max 0.2	0.17	32
Peroxide value	meq/kg	Max 10	<1	15

Certificate is system generated and does not require signature
 Quality Control Manager: Keith Harland



A member of the ICI Group
 The roundel and Uniqema are
 Trademarks of the ICI Group of
 companies



BS EN ISO 9001:2000

Page 1 of 1

Lote 200013



COMERCIAL QUÍMICA MASSÓ, S.A.
 C/ Viladomat, 321 5º
 08029 - Barcelona (Spain)
 Telf. 0034 - 93 495 25 00 Fax. 0034 - 93 495 25 02
www.comasso.com/for

F-22

CERTIFICATE OF ANALYSIS

MASSOCARE T20

(INCI : Polysorbate 20)

Batch nr.: 200013
 Date of certificate : July 2007
 Manufacturing date : July 2007
 Recommended re-test date : July 2009

CoA according specification

	Units	Specification	Results
Acid value	mgKOH/g	< 2.00	0.92
Saponification value	mgKOH/g	< 50.00	43.2
Hydroxyl value	mgKOH/g	96.00 - 108.00	104
Colour at 25°C	Gardner	< 5	4
Water	% m/m	2.50 - 3.00	2.77
Sulphated ash	% m/m	< 0.20	0.13
Peroxide value	meq/kg	< 10.00	< 1.0
Free ethylene oxide	mg/kg	< 1.00	< 1.0
1,4-dioxane	mg/kg	< 10.00	1.0
Appearance at 25°C		Clear liquid	clear

Certificate of analysis generated electronically (not signed)



R.08.02.04.1.5 Rev.0

Page 1 of 1

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

7.1.2.2. *Patrones*

HQ (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

KA (analytical standard $\geq 99.0\%$). Fluka (Buchs, Switzerland)

DPK ($\geq 98.0\%$). Sino Lion (Massó, Barcelona)

7.1.2.3. *Equipos de producción y aparatos*

Equipos de la planta de producción:

Balanza compacta ICS226 Mettler Toledo

Balanza analítica XS Mettler Toledo

Reactor RUC 200

Reactor PFP 100

Bomba Lobular Hyclean SLR 2-50

Molino Coloidal MZ 100 Fryma Koruma

Agitador magnético con calefacción Agimatic-E Selecta

Máquina llenadora-selladora tubos E-250 TGM

Sistema Producción Agua Purificada

Sistema Tratamiento de Aire

Aparatos del laboratorio:

Balanza compacta ICS226 Mettler Toledo

Balanza analítica XS Mettler Toledo

Viscosímetro Visco Tester 500 Haake Thermo Scientific

Centrifuga Meditronic P Selecta

Baño de ultrasonidos Ultrasons 9 L Selecta (Barcelona, España)

Agitador magnético Agimatic ED Selecta (Barcelona, España)

HPLC 1100 Agilent que consiste en un horno de columna, una bomba binaria, un

inyector automático y un detector de red de diodos (DAD), controlado por el software Chemstation versión B04.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

UPLC Acquity™ Waters equipado con una bomba binaria, un carro de muestras de 96 viales termostatzado y un detector de red de diodos (DAD), controlado por software Empower (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.).

7.1.2.4. Utillaje y EPIs

Utillaje y EPIs para la planta de fabricación:

Vaso de precipitados de vidrio de distintos volúmenes

Libradores de acero inoxidable

Gafas de protección ocular

Guantes vinilo

Mascarilla autofiltrante FFP3

Utillaje del laboratorio:

Espátulas de acero inoxidable de diferentes dimensiones

Vasos de precipitados de distintos volúmenes (25 ml, 100 ml, 1 l)

Probetas de distintos volúmenes (10 ml, 100 ml, 1 l) Clase A graduada

Desecador de vidrio Simax con grifo en la tapa esmerilada

Pesasustancias

Matraces aforados de 10, 25, 50 y 100 ml Clase A

Tubos centrífuga de 10 ml

Pipeta doble aforo 1 ml Clase A

Botella 1 l Pyrex con tapón

Jeringas plástico 10 ml

Filtros de jeringa 33 0,45 µm Millex PVDF Millipore

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

Filtros de jeringa 33 0,22 μm Millex PVDF Millipore

Filtros de membrana 0,22 μm Durapore PVDF Millipore

Papel de filtro plano para análisis cualitativo

Viales 2 ml HPLC

Pipetas Pasteur

Cronómetro Oregon Scientific

Columna cromatográfica Phenogel™ 5 μm 50 Å, 4,6 x 300 mm

Pre-columna cromatográfica Phenogel™ 4,6 x 30 mm

Columna cromatográfica Zorbax RRHT SB-Phenyl 1.8 μm 80 Å, 2,1x 100 mm

7.1.3. METODOS

7.1.3.1. *Fórmula*

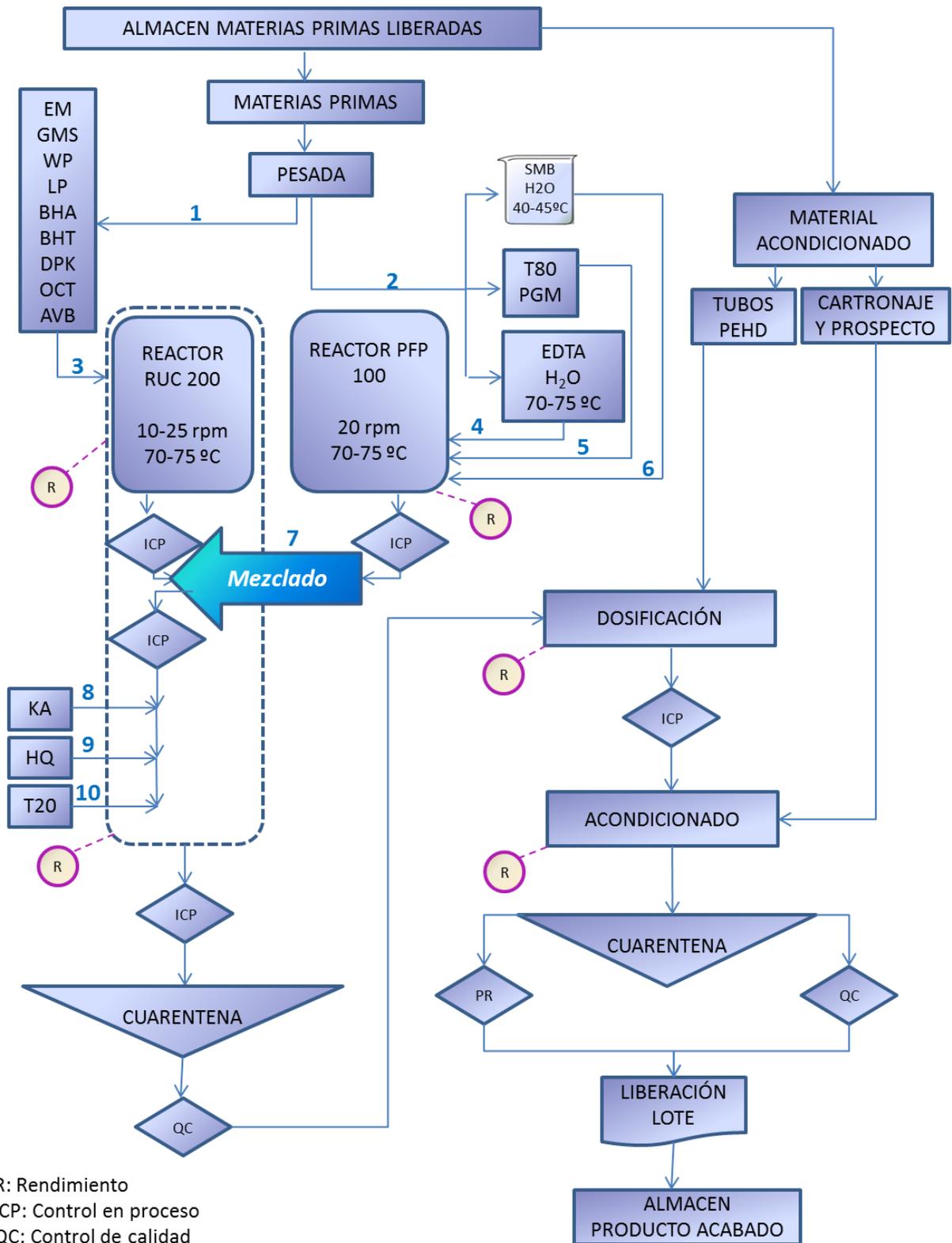
La fórmula de fabricación expresada en % así como las cantidades de cada uno de los componentes tanto a nivel unitario, escala piloto como escala industrial son las indicadas en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1 Fórmula de fabricación de la crema

	Componentes	%	Unitaria (30 g)	Escala Galénica (400 g)	Escala Industrial (120 kg)
EM	Emulcire 61 WL 2659	12,00	3,60	48,00	14,40
GMS	Estol 1474	3,00	0,90	12,00	3,60
WP	Vaselina Filante Blanca	6,00	1,80	24,00	7,20
LP	Vaselina Líquida	2,00	0,60	8,00	2,40
BHA	Butilhidroxianisol	0,10	0,03	0,40	0,12
BHT	Butilhidroxitolueno	0,10	0,03	0,40	0,12
DPK	Dipalmitato Kójico	2,00	0,60	8,00	2,40
OCT	Eusolex 2292	7,50	2,25	30,00	9,00
AVB	Eusolex 9020	2,00	0,60	8,00	2,40
H ₂ O	Agua desionizada	44,15	13,25	176,60	52,98
EDTA	Edetato de Disodio	0,05	0,015	0,20	0,06
SMB	Metabisulfito de Sodio	0,10	0,03	0,40	0,12
PGM	Myrj 52 S Pharma	5,00	1,50	20,00	6,00
T80	Polisorbato 80	2,00	0,60	8,00	2,40
HQ	Hidroquinona	4,00	1,20	16,00	4,80
KA	Ácido kójico	2,00	0,60	8,00	2,40
T20	Polisorbato 20	8,00	2,40	32,00	9,60
Peso total		100%	30 g	400 g	120 kg

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

7.1.3.2. Diagrama de proceso



7.1.3.3. Proceso de fabricación: lotes de escalado

Comprobaciones previas

- 1) Comprobar la limpieza y rotulación de las salas y utillaje.

Pesadas

- 2) Pesar las materias primas descritas en la fórmula y depositarlas en recipientes de tal manera que queden protegidas de la humedad y herméticamente cerradas. Además estos recipientes deben estar, en todo momento correctamente etiquetados e identificados.

Preparación de la fase oleosa: fusión

- 3) Comprobar la limpieza y rotulación de la sala de mezclado.
- 4) En el Reactor RUC 200, incorporar las siguientes materias primas manualmente por la boca de carga en el orden descrito a continuación, registrando el número de control de cada materia prima:

1)	LP	2400,0 g
2)	WP	7200,0 g
3)	EM	14400,0 g
4)	BHA	120,0 g
5)	BHT	120,0 g
6)	GMS	3600,0 g
7)	AVB	2400,0 g
8)	OCT	9000,0 g
9)	DPK	2400,0 g

- 5) Poner en marcha el reactor RUC 200 en las siguientes condiciones hasta obtener la fase oleosa fundida y homogénea:

Temperatura:	70-75 °C
Velocidad de agitación ancora:	10-25 rpm

- 6) Mantener esta fase en un rango de temperatura entre 70 - 75 °C durante la mezcla con la fase acuosa a una velocidad del agitador de ancla entre 5 – 10 rpm.

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

Preparación de la fase acuosa: disolución

- 7) En el Reactor PFP 100 incorporar las siguientes materias primas manualmente por la boca de carga por el orden descrito a continuación. registrando el número de control de cada materia prima:

10)	H ₂ O	52980,0 g
11)	EDTA	60,0 g
12)	SMB	120,0 g

- 8) Poner en marcha el agitador de ancla en las siguientes condiciones hasta obtener una fase incolora y transparente:

Velocidad de agitación ancla: 20 rpm

- 9) Calentar la solución en un rango de temperatura de 70 - 75 °C. A continuación incorporar las siguientes materias primas, registrando el número de control:

12)	PGM	6000,0 g
13)	T80	2400,0 g

- 10) Continuar con la agitación con el agitador de ancla a 20 rpm hasta la total disolución de la fase acuosa, manteniendo la temperatura de la disolución en el rango de 70 – 75 °C.

La disolución obtenida es ligeramente amarilla y homogénea, sin partículas en suspensión.

Mezcla de la fase oleosa y la fase acuosa: Emulsión

- 11) Control en proceso: comprobar que las temperaturas tanto de la fase acuosa como de la oleosa sean de 70 – 75 °C.
- 12) Conectar la salida del reactor PFP 100 a la entrada del reactor RUC 200 utilizando la manguera de 25,4 mm x 34,5 mm de silicona.
- 13) Traspasar la fase acuosa al reactor RUC 200. mediante la manguera de 25,4 mm x 34,5 mm de silicona, con el vacío conectado a 550 – 600 mbar.

Agitar al mismo tiempo que se traspasa la fase acuosa al reactor RUC 200 con el agitador de ancla a 20 rpm.

Cuando el cabezal del túrrax esté cubierto por el producto conectarlo a 1500 ± 200 rpm (1300 rpm – 1700 rpm) para que empiece a emulsionar.

- 14) Una vez emulsionado, dejar enfriar hasta $45 - 50$ °C con la agitación del agitador de ancla a 20 rpm.
- 15) Conectar el vacío a 500 – 550 mbar y la agitación del agitador de ancla a 20 - 25 rpm.
- 16) Cuando alcance los $40 - 45$ °C, detener el vacío y la agitación, incorporar por la boca de carga:

16) KA 2400,0 g

Conectar el vacío a 500 – 550 mbar y la agitación del agitador de ancla a 20 - 25 rpm y el túrrax a 300 – 500 rpm.

Adición de la HQ

- 17) Manteniendo la temperatura del reactor a $40 - 42$ °C, detener el vacío y la agitación e incorporar por la boca de carga:

17) HQ 4800,0 g

Conectar el vacío a 500 – 550 mbar, la agitación del agitador de ancla a 20 – 25 rpm y el túrrax a 300 - 500 rpm.

- 18) Manteniendo la temperatura del reactor a $40 - 42$ °C, detener el vacío y la agitación e incorporar por la boca de carga:

18) T20 9600,0 g

Conectar el vacío a 500 – 550 mbar y la agitación del agitador de ancla a 20 - 25 rpm y el túrrax a 300 - 700 rpm.

- 19) Con el vacío conectado a 500 – 550 mbar, mantener la velocidad de agitación del agitador de ancla a 20 rpm y la del túrrax a 300 – 700 rpm hasta la formación de la emulsión.

Dejar enfriar hasta alcanzar la temperatura de 25 ± 5 °C ($20 - 30$ °C) con el agitador de agitador de ancla en marcha a 20 rpm y deteniendo el túrrax.

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

- 20) Calcular rendimiento mediante la comprobación del peso total de la emulsión con la célula de carga.

Tolerancia admitida 119 –121 kg

- 21) Control en proceso: aspecto.

Aspecto: Emulsión blanca, homogénea, ausencia de cuerpos extraños.

Cuarentena y toma de muestra para Control de Calidad

- 22) Si el aspecto es correcto, poner el lote en estado de *CUARENTENA*.
- 23) Tomar una muestra de 300 g aproximadamente en un vaso de precipitados convenientemente etiquetado o rotulado (nombre producto, código de producto, número de lote y la fecha de la toma de muestra) y entregarla a Control de Calidad para la determinación de la viscosidad según metódica analítica descrita en capítulo 8 y la valoración del contenidos en los tres APIs según metódica analítica descrita en Anexo IV.

Acondicionamiento

- 24) Comprobar la limpieza y etiquetado de equipos y utensilios.
- 25) Comprobar el formato de la máquina llenadora-selladora y colocar los tubos en el alimentador de la máquina.
- 26) Ajustar la dosificación a 30 g y el sellado de los tubos. La dosificación debe estar comprendida entre 28,50 g y 31,50 g de peso neto que corresponde a 37.04 g y 40.94 g de peso bruto (incluido el peso del tubo, lo que implica que el peso teórico bruto es de 38,99 g).
- 27) La máquina llenadora-selladora de tubos llena los tubos, los sella y troquela el número de lote.
- 28) Cada 10 minutos, tomar un tubo para controlar el peso y tomar 6 envases para que Control de Calidad realice: el análisis completo del lote para su liberación según metódica analítica descrita en capítulo 8.

Estuchado

- 29) Comprobar limpieza y rotulación de sala y máquina. Comprobar el material de acondicionamiento tanto estuche como prospecto: textos, fecha de caducidad y precio.
- 30) Colocar cada tubo en un estuche, junto con un prospecto.
- 31) Tomar muestras para Muestroteca y Control de Calidad.

7.1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realiza el primer lote de escalado del tamaño industrial definitivo para comprobar cómo funciona el proceso diseñado y desarrollado a escala laboratorio: lote SU01. Las cantidades de cada uno de los componentes de la fórmula del lote SU01 junto con los pesos reales se presentan en la Tabla 7.2. Se toman tres muestras a distintos niveles del reactor – inicio, mitad y final – (Figura 7.1), una vez se ha realizado la fase de emulsión, para determinar el aspecto y la homogeneidad. El aspecto de las tres muestras es una crema homogénea y sin partículas, pero de coloración ligeramente rosa. Por tanto, se decide investigar que ha podido provocar la coloración rosa no esperada y no analizar la uniformidad de contenido.

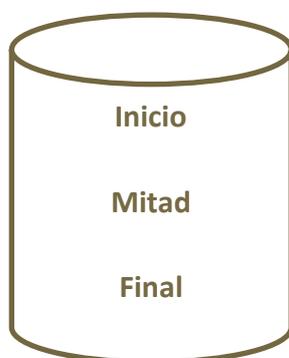


Figura 7.1 Niveles de muestreo en el reactor RUC 200

Se revisa todo el material de fabricación y se comprueba que el agitador de ancla del reactor RUC 200 es parcialmente de hierro. El hierro metálico tiene tendencia a oxidarse debido a su configuración electrónica ($1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^6$), la cual no tiene la capa de valencia llena. El potencial estándar de reducción del par Fe(II)/Fe es bajo, -0,44V; lo que indica que, en contacto con elementos que tengan un potencial estándar de reducción superior a éste, se oxidará. Por tanto, debe considerarse que en las palas del agitador hay cantidades considerables de Fe (II) y Fe (III).

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

Estas cantidades son demasiado grandes para ser acomplejadas por el EDTA, presente en la formulación con el objetivo de secuestrar posibles trazas metálicas, que se ve superado por tal concentración.

Tabla 7.2 Fórmula del lote SU01 en cantidades (g) teóricas y reales

Componentes		Peso teórico (g)	Peso real (g)	Comprobación
Fase Oleosa (A)				
EM	Emulcire 61 WL 2659	14400,0	14400,0	OK
GMS	Estol 1474	3600,0	3600,1	OK
WP	Vaselina Filante Blanca	7200,0	7200,0	OK
LP	Vaselina Líquida	2400,0	2400,3	OK
BHA	Butilhidroxianisol	120,0	120,0	OK
BHT	Butilhidroxitolueno	120,0	120,0	OK
DPK	Dipalmitato Kójico	2400,0	2417,0*	OK
OCT	Eusolex 2292	9000,0	9000,0	OK
AVB	Eusolex 9020	2400,0	2400,0	OK
Fase acuosa (B)				
H ₂ O	Agua desionizada	52980	52980	OK
EDTA	Edetato de Disodio	60,0	60,0	OK
SMB	Metabisulfito de Sodio	120,0	120,0	OK
PGM	Myrj 52 S Pharma	6000,0	6000,0	OK
T80	Polisorbato 80	2400,0	2400,2	OK
Incorporación en polvo				
HQ	Hidroquinona	4800,0	4804,8*	OK
KA	Ácido kójico	2400,0	2404,8*	OK
T20	Polisorbato 20	9600,0	9600,0	OK

*La cantidad de los APIs están corregidos por la riqueza dada por Control de Calidad.

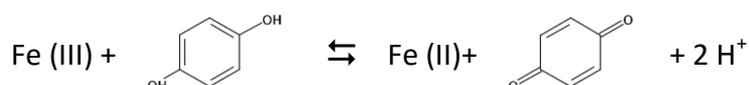
Por otro lado, el ácido kójico (5-Hidroxi-2-(hidroximetil)-4H-piran-4-ona) contiene una estructura específica de sideróforo la cual es capaz de secuestrar cationes de Fe(III) mediante la coordinación a través de los átomos de oxígeno del grupo carbonilo y del grupo fenol, formando el complejo Fe(III)- ácido kójico (Figura 7.2) [114-117].



Figura 7.2 Complejo Fe (III) ácido kójico [117]

La formación de dicho complejo está favorecida debido a que su formación es pH-dependiente estando favorecida a $\text{pH} \sim 5$ (pH de la crema 5.5). Cuanto menor es el pH , menor es el grado de desprotonación del ácido kójico y por tanto, el proceso de complejación se da en menor grado [118]. Estos complejos son de color rojo, la variación del matiz del color depende tanto del pH como de la relación entre el ácido kójico y Fe (III) [119].

Además, debe tenerse en cuenta que otro de los componentes principales de la crema es la HQ, agente reductor, por el cual se reduce el Fe (III) a Fe (II) mediante la siguiente reacción:



Puesto que los iones Fe (III) se unen a estos ligandos de forma más fuerte que los aniones Fe (II). La reducción de estos aniones por parte de la HQ da como resultado una relativa pérdida de color e intensidad, motivo por el cual la crema fabricada es de color ligeramente rosa.

Para evitar toda la reactividad ocasionada por la presencia de Fe (III) y Fe (II), se procede a cambiar las palas del reactor por unas palas nuevas de acero inoxidable de calidad farmacéutica. Además, también se cambia la forma de incorporar el SMB para evitar al máximo su calentamiento y favorecer al máximo la estabilidad de la crema. Se incorporará en solución con un 5% del agua total a unos 40°C justo antes de la incorporación de los sólidos (KA, HQ y T20) una vez realizada la emulsión y enfriada a 40°C .

De esta forma, se procede a fabricar el segundo lote de escalado industrial: lote SU02. Las cantidades de cada uno de los componentes de la fórmula del lote SU02 junto con

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

los pesos reales se presentan en la Tabla 7.3. El muestreo de este lote se realiza de la misma forma que en el lote anterior, según Figura 7.1. Todas las muestra de la crema elaborada son de color blanco, homogéneas y sin partículas. Los resultados de la uniformidad de contenido muestran un alto grado de homogeneidad tal como se muestra en la Tabla 7.4.

Tabla 7.3 Fórmula del lote SU02 en cantidades (g) teóricas y reales

Componentes		Peso teórico (g)	Peso real (g)	Comprobación
Fase Oleosa (A)				
EM	Emulcire 61 WL 2659	14400,0	14400,1	OK
GMS	Estol 1474	3600,0	3600,0	OK
WP	Vaselina Filante Blanca	7200,0	7200,2	OK
LP	Vaselina Líquida	2400,0	2400,1	OK
BHA	Butilhidroxianisol	120,0	120,0	OK
BHT	Butilhidroxitolueno	120,0	120,0	OK
DPK	Dipalmitato Kójico	2400,0	2417,0*	OK
OCT	Eusolex 2292	9000,0	9000,1	OK
AVB	Eusolex 9020	2400,0	2400,3	OK
Fase acuosa (B)				
H ₂ O	Agua desionizada	53300	50330	OK
EDTA	Edetato de Disodio	60,0	60,0	OK
PGM	Myrj 52 S Pharma	120,0	6000,2	OK
T80	Polisorbato 80	6000,0	2400,1	OK
Incorporación de SMB				
H ₂ O	Agua desionizada	2650,0	2650,0	OK
SMB	Metabisulfito de Sodio	120,0	120,0	OK
Incorporación de sólidos				
HQ	Hidroquinona	4800,0	4804,8*	OK
KA	Ácido kójico	2400,0	2404,8*	OK
T20	Polisorbato 20	9600,0	9600,1	OK

*La cantidad de los APIs están corregidos por la riqueza dada por Control de Calidad.

Tabla 7.4 Resultados de la homogeneidad del lote SU02

Muestra	HQ (%)	KA (%)	DPK (%)
SU02-1.1	98,6	99,3	100,1
SU02-1.2	99,3	98,4	99,7
SU02-1.3	100	99,6	99,0
Media	99,3	99,1	99,6
SD	0,70	0,62	0,56
RSD	0,70	0,63	0,56

7.1.5. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado la transposición a escala industrial del proceso de fabricación establecido en el desarrollo galénico para la formulación propuesta, estableciéndose un proceso industrial satisfactorio que cumple con los objetivos establecidos.
- La formulación obtenida en la producción industrial de la crema ha demostrado cumplir con los atributos de calidad establecidos a partir de la investigación galénica llevada a cabo.
- Todos los elementos metálicos utilizados durante el proceso de fabricación deben ser de acero inoxidable de calidad farmacéutica para evitar la formación de complejos metálicos con el KA.
- La incorporación del SMB es aconsejable realizarla una vez elaborada la emulsión y antes de la incorporación de los sólidos (KA, HQ y T20) a una temperatura de unos 40-45 °C.

7.2. VALIDACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN

La validación del proceso de fabricación es una exigencia legal por la cual mediante una serie de pruebas documentadas y un informe se asegura que el proceso de fabricación genera un producto de calidad.

La validación del proceso de fabricación garantiza además que el proceso de escalado ha sido bien conducido y que el producto industrial es equivalente al producto elaborado durante el desarrollo.

Por tanto, se valida el proceso para asegurar que todos los lotes que se fabriquen siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 8.1.3.3 sean reproducibles, con la misma calidad y cumplan con las especificaciones establecidas.

7.2.1. OBJETIVO

El objetivo primordial de la validación del proceso de fabricación es la obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que el método de fabricación es lo suficientemente fiable como para conseguir fabricar lotes de la crema medicamentosa para el tratamiento del melasma, que contiene un 4% de HQ, 2% de KA y 2% de DPK como APIs, con la mayor garantía y homogeneidad posible.

7.2.2. ALCANCE

Este procedimiento es de aplicación a los tres lotes de 120 kg que corresponde a un tamaño de lote industrial de la crema medicamentosa, fabricados consecutivamente, objeto de la validación.

7.2.3. MATERIALES

7.2.3.1. *Materias primas*

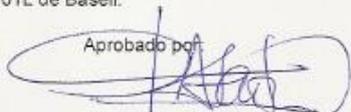
Las mismas que las descritas anteriormente en el apartado 7.1.1.1.

7.2.3.2. *Material de acondicionado*

El material de acondicionamiento será idéntico al utilizado para el envasado de los envases comerciales: tubo flexible de HDP de 30 ml blanco, con cierre con opérculo y tapón de rosca de polipropileno (PP) de color blanco.

Tubo PEAD coextrusionado con opérculo 30 ml

Lote 270386

Body, esthetic Laboratories +		CERTIFICADO DE ANÁLISIS		DFAR.040 Rev.00
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO PRODUCTOS FARMACÉUTICOS				
MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO: TUBO ANONIMO PEAD COEXTRUSIONADO CON OPÉRCULO 30 ML LOTE N°: 270386 N° CONTROL INTERNO: 1202 MÉTODO INTERNO: PNT-019 Periodo de validez: Indefinido		N° CÓDIGO: 5556 PROVEEDOR APROBADO: TAPSER, S.A FABRICANTE: BASELL & POLYONE & VALSPAR & BALLERSTAEDT & ATOFINA & INNOVENE CANTIDAD: 12600 tubos		
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES		RESULTADOS	
Composición	Tubo flexible de 30 ml blanco, con tapón blanco a rosca con cierre con opérculo.		Conforme	
Material	1) Material del Cuerpo:	PEAD ¹ /Adhesivo/EVOH ³ /Adhesivo/PEAD ¹	Conforme	
	Color del cuerpo:	Colorante Blanco F164 ⁶	Blanco	
	2) Material de la Cabeza:	PEAD ²	Conforme	
	Color de la Cabeza:	Colorante Blanco F164	Blanco	
	3) Barniz:	H-1592 Mate ⁷	Conforme	
	4) Complejo Operculado:	ALU/SURLYN 60:40 Blanco ⁴	Conforme	
	5) Tapón:	Polipropileno ⁵	Conforme	
	Color del Tapón:	Colorante Blanco F164	Blanco	
Dimensiones	Diámetro (mm)	29,4 - 30,6	29,5	
	Longitud (mm)	83,3 - 86,7	86,0	
	Espesor (mm)	0,49 - 0,51	0,50	
	Métrica Rosca Lineal(mm)	15,68 - 16,32	16,0	
	Perforación (mm)	1,47 - 1,53	1,50	
	Capacidad real (ml)	55,86 - 58,14	56,9	
	Capacidad nominal (ml)	29,1 - 30,6	30	
Peso Medio del Tubo con Tapón y Opérculo (g)	8,81 - 9,17		8,99	
Envase	Recepción:	Debe recepcionarse en perfecto estado de limpieza, sin ningún tipo de defecto y perfectamente acondicionado.	Conforme. Adjunto D-006.	
	Unidad de Recepción:	Caja de Cartón de 252 unidades.	Conforme	
	Identificación:	Deberá ir bien identificado indicando el nombre del producto, nombre del proveedor y lote.	Conforme	
Observaciones: PEAD ¹ : Polietileno de Alta Densidad, Hostalen GF 4750 de Basell. PEAD ² : Polietileno de Alta Densidad, Purell ACP 6541A de Basell. EVOH ³ : Copolímero Etileno-Alcohol Vinílico. ALU/SURLYN 60:40 Blanco ⁴ : complejo operculado de Ballerstaedt. Polipropileno ⁵ : Se utilizan indistintamente tres productos homólogos para fabricar el tapón: Atofina Polypropylene PPH 7060 de Atofina, 101-SA09 de Innovene y "Moplen" HP501L de Basell.				
		Aprobado por:  Responsable Control de Calidad Fecha 05/06/07		
Bodyesthetic Laboratories, S.L Bertran i Güell, 72. Pol. Ind. Massotes 08850 Gavà (Barcelona) Tel. 902 26 20 31 Fax. 902 23 55 16				

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

7.2.3.3. Patrones

Los mismos que los descritos anteriormente en el apartado 7.1.1.2.

7.2.3.4. Equipos y aparatos

Los mismos que los descritos anteriormente en el apartado 7.1.1.3.

7.2.3.5. Utillaje y EPIs

Los mismos que los descritos anteriormente en el apartado 7.1.1.4.

7.2.4. METODOS

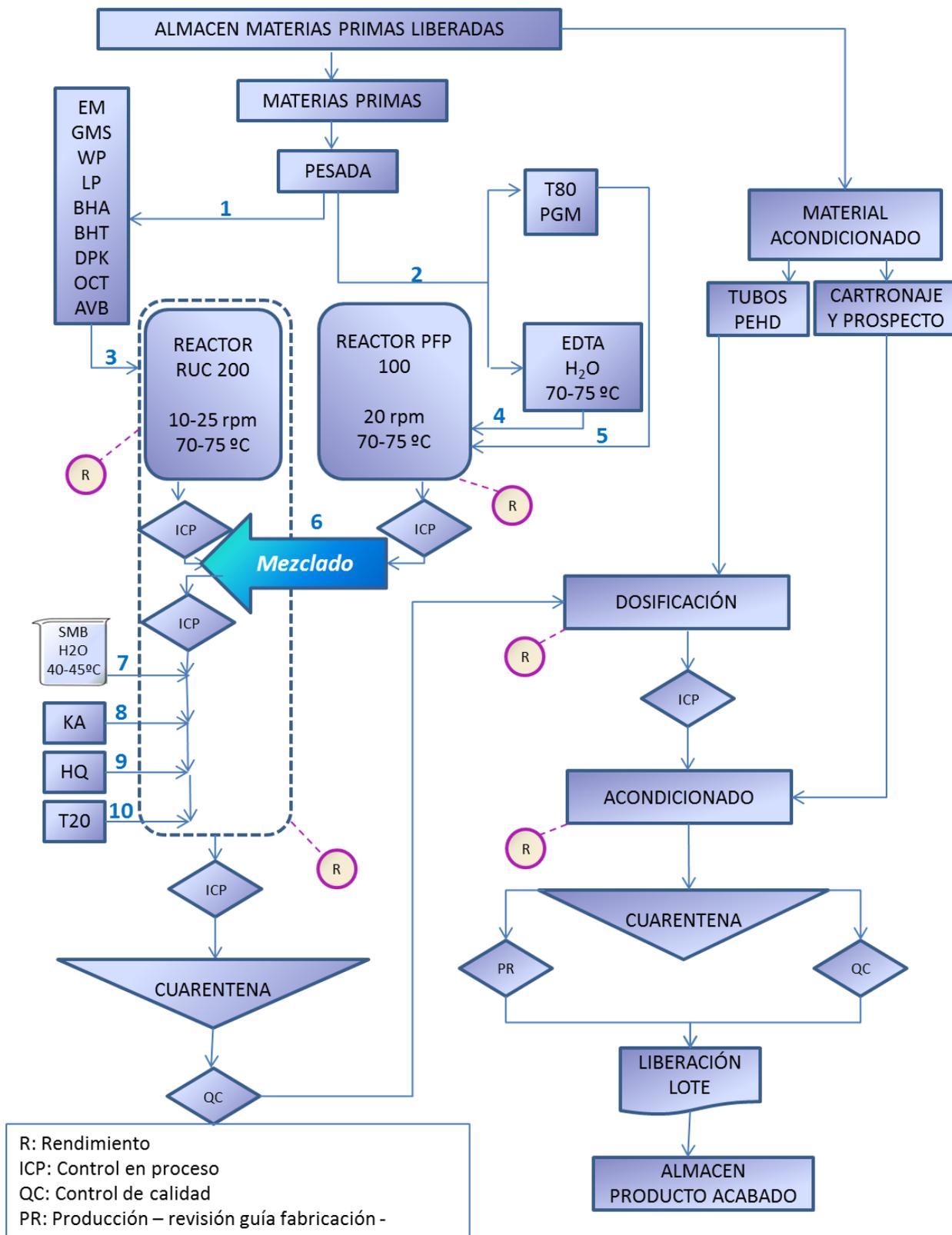
7.2.4.1. Fórmula

La fórmula de fabricación por fases, expresada en %, así como las cantidades necesarias para fabricar un lote a escala industrial de 120 kg, expresadas en kg, son las indicadas en la Tabla 7.5.

Tabla 7.5 Fórmula de fabricación por fases

Componentes		%	Escala Industrial (120 kg)
Fase Oleosa (A)			
EM	Emulcire 61 WL 2659	12,00	14,40
GMS	Estol 1474	3,00	3,60
WP	Vaselina Filante Blanca	6,00	7,20
LP	Vaselina Líquida	2,00	2,40
BHA	Butilhidroxianisol	0,10	0,12
BHT	Butilhidroxitolueno	0,10	0,12
DPK	Dipalmitato Kójico	2,00	2,40
OCT	Eusolex 2292	7,50	9,00
AVB	Eusolex 9020	2,00	2,40
Fase acuosa (B)			
H ₂ O	Agua desionizada	41,94	50,33
EDTA	Edetato de Disodio	0,05	0,06
PGM	Myrj 52 S Pharma	5,00	6,00
T80	Polisorbato 80	2,00	2,40
Incorporación de SMB			
H ₂ O	Agua desionizada	2,21	2,65
SMB	Metabisulfito de Sodio	0,10	0,12
Incorporación de sólidos			
HQ	Hidroquinona	4,00	4,80
KA	Ácido kójico	2,00	2,40
T20	Polisorbato 20	8,00	9,60

7.2.4.2. Diagrama de proceso



7.2.4.3. Proceso de fabricación: lotes de validación

Comprobaciones previas

- 1) Comprobar la limpieza y rotulación de las salas y utillaje

Pesadas

- 2) Pesar las materias primas descritas en la fórmula y depositarlas en recipientes de tal manera que queden protegidas de la humedad y herméticamente cerradas. Además estos recipientes deben estar, en todo momento correctamente etiquetados e identificados.

Preparación de la fase oleosa: fusión

- 3) Comprobar la limpieza y rotulación de la sala de mezclado.
- 4) En el Reactor RUC 200, incorporar las siguientes materias primas manualmente por la boca de carga en el orden descrito a continuación, registrando el número de control de cada materia prima:

1)	LP	2,40 kg
2)	WP	7,20 kg
3)	EM	14,40 kg
4)	BHA	120,0 g
5)	BHT	120,0 g
6)	GMS	3,60 kg
7)	AVB	2,40 kg
8)	OCT	9,00 kg
9)	DPK	2,40 kg

- 5) Poner en marcha el reactor RUC 200 en las siguientes condiciones hasta obtener la fase oleosa fundida y homogénea:

Temperatura:	70-75 °C
Velocidad de agitación ancora:	10-25 rpm

- 6) Mantener esta fase en un rango de temperatura entre 70 - 75 °C hasta la mezcla con la fase acuosa a una velocidad de agitador de ancla de 5 – 10 rpm.

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

Preparación de la fase acuosa: disolución

- 7) En el Reactor PFP 100 incorporar las siguientes materias primas manualmente por la boca de carga por el orden descrito a continuación. registrando el número de control de cada materia prima:

10) H₂O (14,00 kg x 3) + 8,98 kg

11) EDTA 60,00 g

- 8) Poner en marcha el agitador de ancla en las siguientes condiciones hasta obtener una fase incolora y transparente:

Velocidad de agitación ancla: 20 rpm

- 9) Calentar la solución en un rango de temperatura de 70 - 75 °C. A continuación incorporar las siguientes materias primas, registrando el número de control:

12) PGM 6,00 kg

13) T80 2,40 kg

- 10) Continuar con la agitación con el agitador de ancla a 20 rpm hasta la total disolución de la fase acuosa. manteniendo la temperatura de la disolución en el rango de 70 – 75 °C.

La disolución obtenida es ligeramente amarilla y homogénea, sin partículas en suspensión.

Mezcla de la fase oleosa y la fase acuosa: Emulsión

- 11) Control en proceso: comprobar que la temperatura tanto de la fase acuosa como de la oleosa sea de 70 – 75 °C.

- 12) Conectar la salida del reactor PFP 100 a la entrada del reactor RUC 200 utilizando la manguera de 25,4 mm x 34,5 mm de silicona.

- 13) Traspasar la fase acuosa al reactor RUC 200. mediante la manguera de 25,4 mm x 34,5 mm de silicona, con el vacío conectado a 550 – 600 mbar.

Agitar al mismo tiempo que se traspasa la fase acuosa al reactor RUC 200 con el agitador de ancla a 20 rpm.

Cuando el cabezal del túrrax esté cubierto por el producto conectarlo a 1500 ± 200 rpm (1300 rpm – 1700 rpm) para que empiece a emulsionar.

- 14) Una vez emulsionado, dejar enfriar hasta 45 – 50 °C con la agitación del agitador de ancla a 20 rpm.

Incorporación del SMB

- 15) En un recipiente de vidrio limpio y seco. incorporar las siguientes materias primas registrando el número de control:

14) H₂O 2.00 kg

15) SMB 120.00 g

- 16) Calentar y agitar en la placa calefactora a 40 – 45 °C y con agitación a 400 – 500 rpm hasta su incorporación a la fase oleosa.
- 17) Control en proceso: comprobar que tanto la temperatura de la emulsión como de la disolución de SMB sea de 40 – 45 °C.
- 18) Incorporar la disolución SMB por la boca de carga a la emulsión.
- 19) Conectar el vacío a 500 – 550 mbar y la agitación del agitador de ancla a 20 - 25 rpm.

Adición de sólidos

- 20) Cuando alcance los 40 – 45 °C, detener el vacío y la agitación e incorporar por la boca de carga:

16) KA 2,40 kg

Conectar el vacío a 500 – 550 mbar y la agitación del agitador de ancla a 20 - 25 rpm y el túrrax a 300 – 500 rpm.

- 21) Manteniendo la temperatura del reactor a 40 – 42 °C, detener el vacío y la agitación e incorporar por la boca de carga:

17) HQ 4,80 kg

Conectar el vacío a 500 – 550 mbar, la agitación del agitador de ancla a 20 – 25 rpm y el túrrax a 300 - 500 rpm.

- 22) Manteniendo la temperatura del reactor a 40 – 42 °C. a continuación. detener el vacío y la agitación, e incorporar por la boca de carga:

18) T20 9,60 kg

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

Conectar el vacío a 500 – 550 mbar y la agitación del agitador de ancla a 20 - 25 rpm y el túrrax a 300 - 500 rpm.

- 23) Con el vacío conectado a 500 – 550 mbar, mantener la velocidad de agitación del agitador de ancla a 20 rpm y el túrrax a 300 – 500 rpm hasta la formación de la emulsión.

Una vez formada la emulsión, detener el túrrax y dejar enfriar hasta alcanzar la temperatura de 25 ± 5 °C (20 – 30 °C) con el agitador de agitador de ancla en marcha a 20 rpm.

- 24) Calcular rendimiento mediante la comprobación del peso total de la emulsión con la célula de carga.

Tolerancia admitida	119 – 121 kg
---------------------	--------------

- 25) Control en proceso: aspecto.

Aspecto: Emulsión blanca, homogénea, ausencia de cuerpos extraños.

Cuarentena y toma de muestra para Control de Calidad

- 26) Si el aspecto es correcto, poner el lote en estado de *CUARENTENA*.
- 32) Tomar una muestra de 300 g aproximadamente en un vaso de precipitados convenientemente etiquetado o rotulado (nombre producto, código de producto, número de lote y la fecha de la toma de muestra) y entregarla a Control de Calidad para la determinación de la viscosidad según metódica analítica descrita en capítulo 8 y la valoración del contenidos en los tres APIs según metódica analítica descrita en Anexo IV.

Acondicionamiento

- 27) Comprobar la limpieza y etiquetado de equipos y utensilios.
- 28) Comprobar el formato de la máquina llenadora-selladora y colocar los tubos en el alimentador de la máquina.
- 29) Ajustar la dosificación a 30 g y el sellado de los tubos. La dosificación debe estar comprendida entre 28,50 g y 31,50 g de peso neto que corresponde a 37.04 g y 40.94 g de peso bruto (incluido el peso del tubo, lo que implica que el peso teórico bruto es de 38,99 g)

- 30) La máquina llenadora-selladora de tubos llena los tubos, los sella y troquea el número de lote.
- 31) Cada 10 minutos, tomar un tubo para controlar el peso y tomar 6 envases para que Control de Calidad realice el análisis completo del lote para su liberación según metodología analítica descrita en el capítulo 8.

Estuchado

- 32) Comprobar limpieza y rotulación de sala y máquina. Comprobar el material de acondicionamiento tanto estuche como prospecto: textos, fecha de caducidad y precio.
- 33) Colocar cada tubo en un estuche, junto con un prospecto.
- 34) Tomar muestras para Muestroteca y Control de Calidad.

7.2.4.4. Muestras

Se estudian tres lotes, tomando las muestras y envases tal y como se detalla a continuación. Se realiza el estudio de la homogeneidad entre:

- Muestras de la crema al final del proceso de emulsión (9 muestras del interior del reactor), sobre los tres lotes diferentes
- Muestras de 9 tubos diferentes (del inicio, de la mitad y del final del proceso de envasado) de un mismo lote, realizado sobre tres lotes diferentes.

Se identificarán las muestras etiquetándolas tal y como se resume en la Tabla 7.6.

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

Tabla 7.6 Etiquetado muestreo

Lote	Fase		Muestras
A-01	Final fase emulsionado	Inicio	A01R1.1/A01R1.2/A01R1.3
		Mitad	A01R2.1/A01R2.2/A01R2.3
		Final	A01R3.1/A01R3.2/A01R3.3
	Envasado	Inicio	A01E1.1/A01E1.2/A01E1.3
		Mitad	A01E2.1/A01E2.2/A01E2.3
		Final	A01E3.1/A01E3.2/A01E3.3
A-02	Final fase emulsionado	Inicio	A02R1.1/A02R1.2/A02R1.3
		Mitad	A02R2.1/A02R2.2/A02R2.3
		Final	A02R3.1/A02R3.2/A02R3.3
	Envasado	Inicio	A02E1.1/A02E1.2/A02E1.3
		Mitad	A02E2.1/A02E2.2/A02E2.3
		Final	A02E3.1/A02E3.2/A02E3.3
A-03	Final fase emulsionado	Inicio	A03R1.1/A03R1.2/A03R1.3
		Mitad	A03R2.1/A03R2.2/A03R2.3
		Final	A03R3.1/A03R3.2/A03R3.3
	Envasado	Inicio	A03E1.1/A03E1.2/A03E1.3
		Mitad	A03E2.1/A03E2.2/A03E2.3
		Final	A03E3.1/A03E3.2/A03E3.3

7.2.4.5. Análisis

La validación del proceso de fabricación se estudiará a partir de la determinación de los siguientes parámetros críticos de la crema obtenida al final de la fase de emulsión:

- Aspecto
- Viscosidad
- Valoración de HQ, KA y DPK

Además, se realizará de los 9 envases de cada uno de los tres lotes:

- Control de contenido (%)
- Control de la integridad del sellado del envase

Según metódica descrita en capítulo 8, excepto la valoración del contenido en los tres principios activos que se sigue la metódica analítica descrita en el Anexo V.

7.2.4.6. Especificaciones

Para cada uno de los ensayos a realizar se da una especificación, especificación que deberá cumplirse. En el siguiente cuadro se resumen los ensayos a realizar, junto con las especificaciones establecidas para llevar a cabo este estudio.

Tabla 7.7 Especificaciones de la crema

Ensayo	Especificación
Aspecto	Crema de color blanco, homogénea, opaca, ausencia de cuerpos extraños, brillante, olor suave
Viscosidad	0,750-1,500 Pa·s
Valoración	HQ 95,0-105,0%
	KA 95,0-105,0%
	DPK 95,0-105,0%
Contenido efectivo del envase	Media \geq 30 g Individual \geq 90%
Control de estanqueidad	Cumple

7.2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.2.5.1. Final fase emulsionado

Una vez realizada y homogeneizada la emulsión se estudian los parámetros descritos anteriormente en el apartado 7.2.4.5: aspecto, viscosidad y valoración de los APIs.

I. Aspecto

Todas las 9 muestras extraídas del reactor cumplen con la especificación en cuanto a aspecto “*crema de color blanco, homogénea, opaca, ausencia de cuerpos extraños, brillante, olor suave*”.

II. Viscosidad

Se determina la viscosidad de cada una de las muestras cumpliendo también la especificación establecida previamente, apartado 7.2.4.6. Los resultados se presentan en la Tabla 7.8.

Para la valoración de los APIs, se preparan muestras por duplicado de cada una de las muestras del reactor de los diferentes lotes y se da como resultado la media siempre que el RSD sea inferior a 2,0%.

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

Para cada uno de los parámetros estudiados se realiza el análisis estadístico y se presenta el gráfico de recorrido para evaluar si el proceso está bajo control estadístico. Es decir, que es un proceso estable y reproducible y que por tanto, generará una crema que cumplirá con las especificaciones.

Los gráficos de recorrido de las valoraciones de los tres APIs muestran un proceso bajo control ya que sólo alguno de los resultados es cercano al límite de aviso ($\pm 2\sigma$) y ninguno sobrepasa el límite de alerta ($\pm 3\sigma$). Consecuentemente, los datos muestran unas cremas altamente homogéneas que cumplen con las especificaciones.

Tabla 7.8 Resultados de la viscosidad de la crema

Viscosidad (Pa·s)			
Muestra	Lote A01	Lote A02	Lote A03
R1.1	1,106	1,256	1,059
R1.2	1,206	1,289	1,164
R1.3	1,141	1,354	1,111
R2.1	1,287	1,121	1,156
R2.2	1,151	1,353	1,139
R2.3	1,133	1,209	1,206
R3.1	1,250	1,301	1,203
R3.2	1,125	1,241	1,049
R3.3	1,223	1,195	1,155
Media	1,180	1,258	1,138
SD	0,06	0,08	0,06
RSD	5,35	6,06	4,92
Media global	1,192		
SD	0,08		
RSD	6,78		

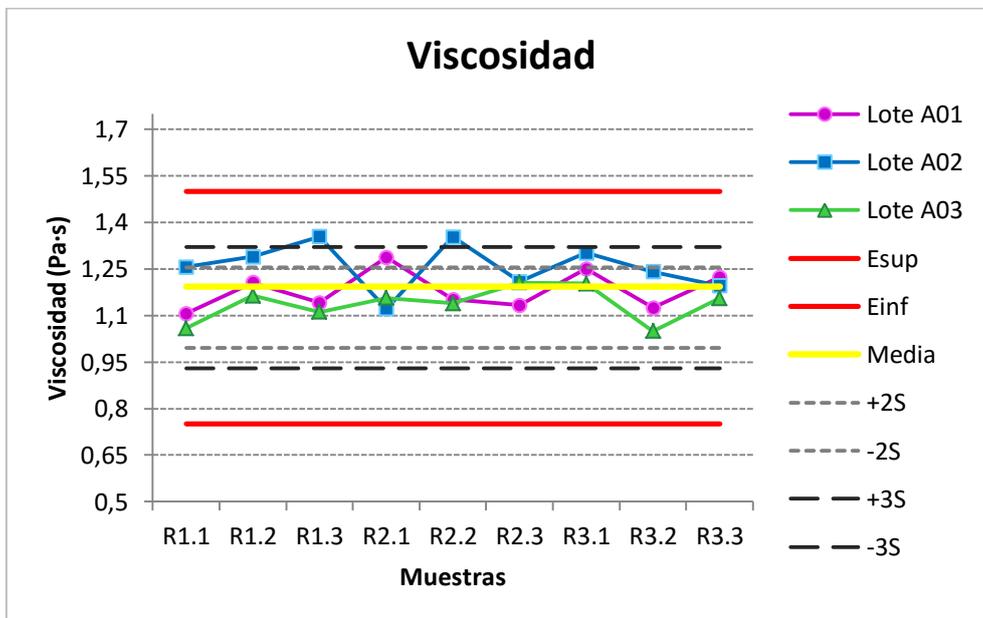


Figura 7.3 Gráfico de recorrido correspondiente al parámetro viscosidad

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

Tabla 7.9 Resultados uniformidad de contenido en HQ en crema

HQ			
Muestra	Lote A01	Lote A02	Lote A03
R1.1	100,48	99,59	100,07
R1.2	98,45	99,21	100,52
R1.3	99,42	98,89	99,65
R2.1	100,01	100,72	99,08
R2.2	98,04	98,22	100,36
R2.3	99,86	100,26	98,72
R3.1	100,32	98,63	98,47
R3.2	98,69	100,03	97,98
R3.3	100,21	100,80	98,31
Media	99,5	99,6	99,2
SD	0,90	0,92	0,94
RSD	0,90	0,93	0,95
Media global	99,4		
SD	0,90		
RSD	0,90		

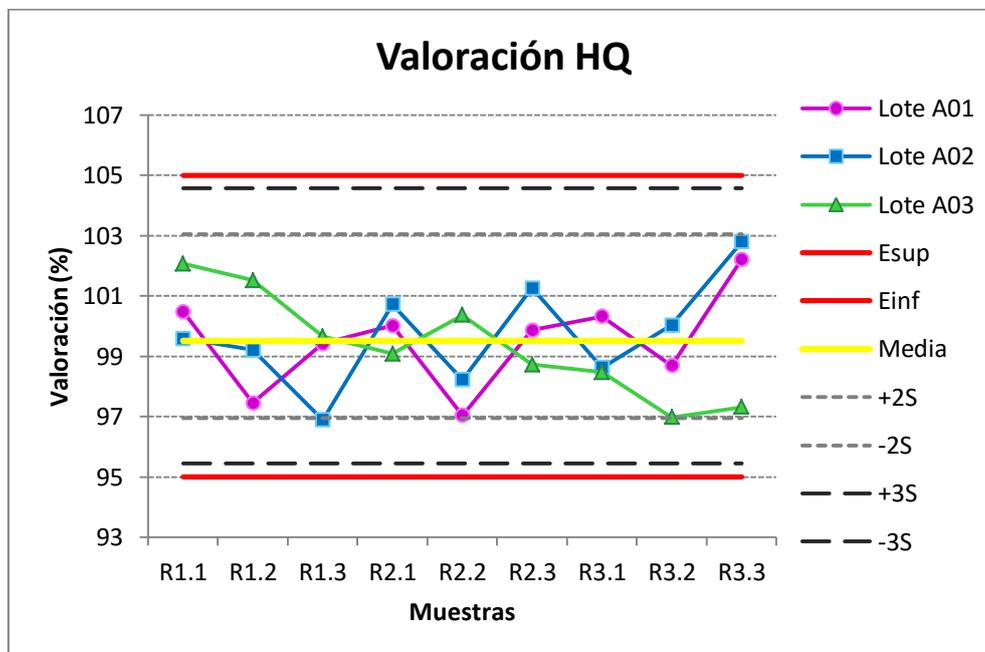


Figura 7.4 Gráfico de recorrido correspondiente a la valoración en HQ

Tabla 7.10 Resultados uniformidad de contenido en KA en crema

KA			
Muestra	Lote A01	Lote A02	Lote A03
R1.1	99,94	98,90	101,32
R1.2	101,02	98,39	99,71
R1.3	98,56	99,69	100,58
R2.1	99,77	101,52	99,85
R2.2	100,84	99,49	98,25
R2.3	98,56	98,34	100,05
R3.1	99,98	100,59	99,43
R3.2	100,87	99,97	101,45
R3.3	101,50	99,02	101,76
Media	100,1	99,5	100,3
SD	1,05	1,04	1,13
RSD	1,05	1,05	1,12
Media global	100,0		
SD	1,08		
RSD	1,08		

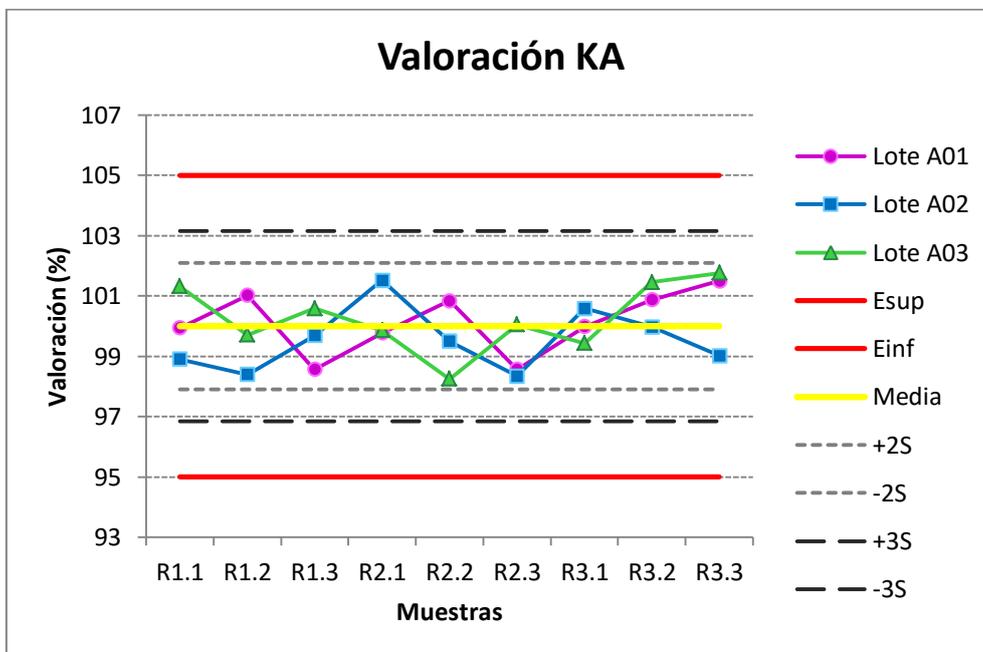


Figura 7.5 Gráfico de recorrido correspondiente a la valoración en KA

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

Tabla 7.11 Resultados uniformidad de contenido en DPK en crema

DPK			
Muestra	Lote A01	Lote A02	Lote A03
R1.1	98,06	100,78	101,21
R1.2	98,74	100,17	100,23
R1.3	99,94	102,60	100,32
R2.1	99,65	98,82	98,59
R2.2	99,14	99,07	99,95
R2.3	100,69	101,91	100,18
R3.1	100,72	99,94	99,19
R3.2	99,84	99,99	98,63
R3.3	100,48	101,45	98,33
Media	99,7	100,5	99,6
SD	0,91	1,27	0,98
RSD	0,91	1,27	0,98
Media global	99,9		
SD	1,11		
RSD	1,11		

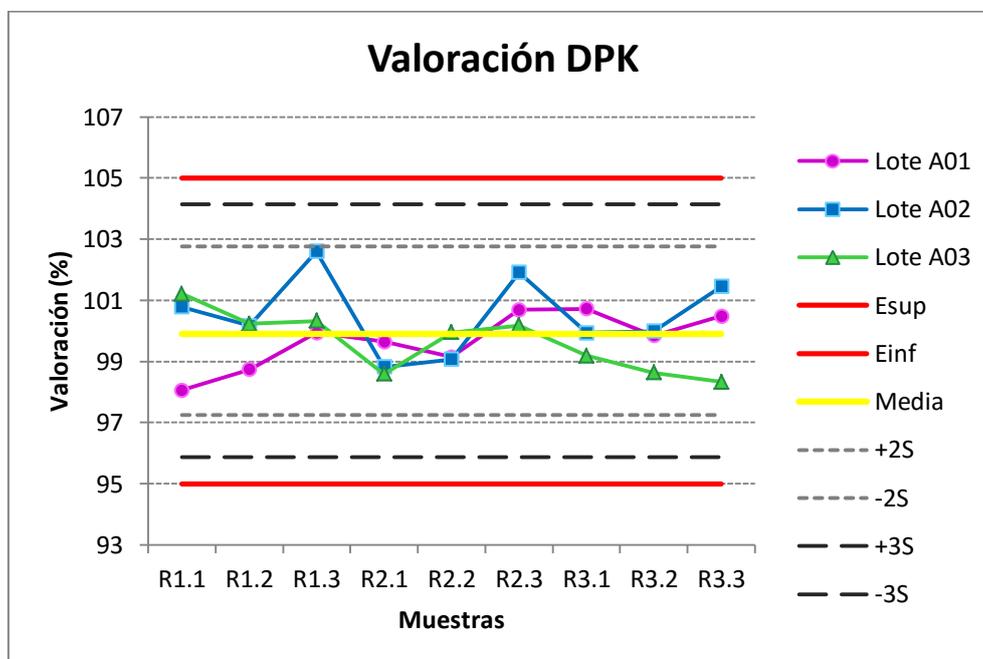


Figura 7.6 Gráfico de recorrido correspondiente a la valoración en DPK

En la Tabla 7.12 se presenta un resumen del estudio de capacidad del proceso que verifica la aptitud que tiene éste para producir lotes de crema dentro de especificaciones. Para realizar este tipo de estudio el proceso de estar bajo control estadístico, los datos deben seguir una distribución normal y la muestra debe ser representativa.

Anteriormente, se ha comprobado que el proceso está bajo control estadístico mediante los gráficos de control y se puede afirmar que la muestra es representativa. Finalmente, se comprueba que los datos siguen una distribución normal tal y como se observa en los gráficos siguientes (Figuras 7.7 a 7.10).

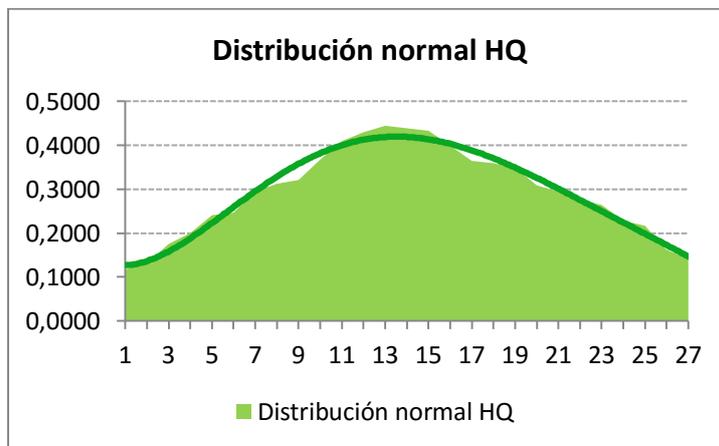


Figura 7.7 Gráfico de probabilidad normal de los datos de la valoración de la HQ

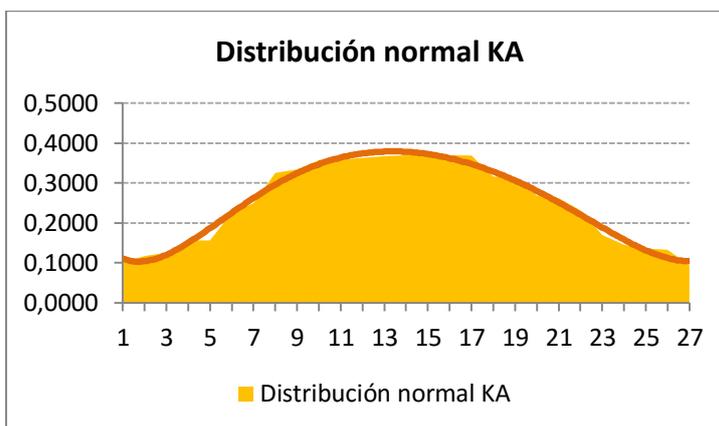


Figura 7.8 Gráfico de probabilidad normal de los datos de la valoración del KA

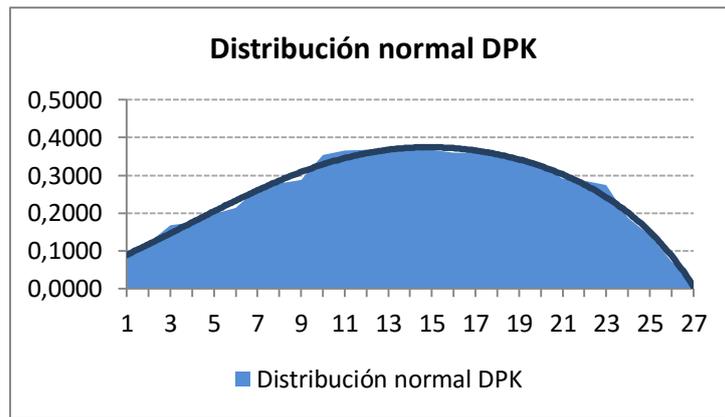


Figura 7.9 Gráfico de probabilidad normal de los datos de la valoración del DPK

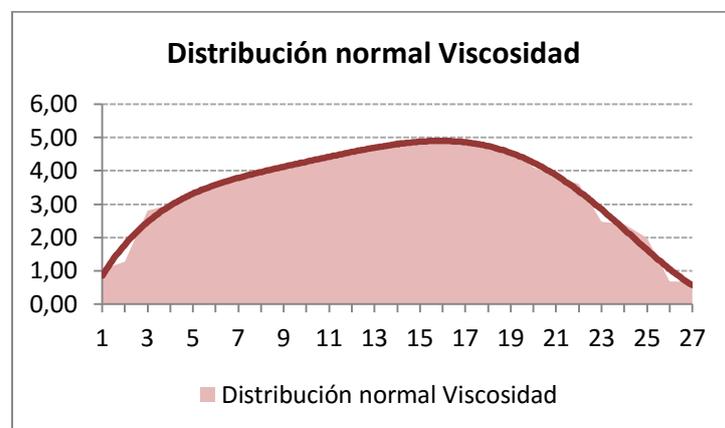


Figura 7.10 Gráfico de probabilidad normal de los datos de la viscosidad

En el estudio de capacidad se calcula el *índice de capacidad estándar*, C_p , que relaciona la diferencia entre los límites de la especificación y un múltiplo de la desviación estándar del parámetro estudiado asociado a la variabilidad del proceso. Si la media del parámetro estudiado no está centrado, C_p sobreestima la capacidad del proceso. Por este motivo también se calcula el *índice de capacidad unilateral*, C_{pk} , que se calcula cuando la media no está centrada y dará resultados negativos cuando la media se sitúe fuera de especificaciones. Los resultados se indican en la Tabla 7.12.

Los valores obtenidos para estos índices indican que el proceso de fabricación de la crema tiene una buena capacidad según el criterio general “ $C_{pk} < 1$ proceso pobre, $C_{pk} > 1.33$ proceso bueno y $C_{pk} > 2$ proceso excelente” [119-120].

Tabla 7.12 Resumen del estudio de capacidad del proceso de fabricación de la crema

Parámetros	Media	Esp. Inf	Esp. Sup	Cp	Cpk
Valoración HQ	99,4	95,0	105,0	1,811	1,610
Valoración KA	100,0	95,0	105,0	1,554	1,546
Valoración DPK	99,9	95,0	105,0	1,580	1,549
Viscosidad	1,192	0,750	1,500	1,920	1,577

Se analizan los resultados obtenidos en la validación por ANOVA de una vía ($p < 0,05$). Tal y como se observa en la Tablas 7.13, para la valoración de todos los APIs, todos los $F_{\text{CALCULADO}}$ son menores al valor crítico (F_{CRITICO}). Por tanto, se evidencia que no hay diferencias significativas entre lotes.

Mientras que, el análisis estadístico realizado para la viscosidad muestra que sí existe una diferencia significativa entre los lotes. Esto es debido a la gran varianza entre resultados, aún del mismo lote, inherente a la determinación de la viscosidad. Los tres lotes cumplen las especificaciones preestablecidas y se da por correcta la validación.

Tabla 7.13 Resumen del análisis estadístico de los resultados de la validación del proceso

Parámetro	Lote	Promedio	Varianza	F_{CALCULADO}	F_{CRITICO}
HQ	A01	99,50	0,803	0,3567	3,4028
	A02	99,59	0,852		
	A03	99,24	0,886		
KA	A01	100,12	1,105	1,1299	3,4028
	A02	99,55	1,084		
	A03	100,27	1,267		
DPK	A01	99,70	0,829	1,9881	3,4028
	A02	100,53	1,618		
	A03	99,63	0,963		
Viscosidad	A01	1,18	0,004	7,6903	3,4028
	A02	1,26	0,006		
	A03	1,14	0,003		

CAPÍTULO 7: INDUSTRIALIZACIÓN

7.2.5.2. Fase final envasado

Durante el proceso de envasado de la crema en tubos de HDPE de 30 g se muestrea 20 tubos (6 inicio, 8 mitad y 6 final) para estudiar los parámetros descritos anteriormente en el apartado 7.2.4.5: contenido efectivo del envase y control de la estanqueidad.

Tanto el contenido efectivo del envase como el control de la estanqueidad se realizan sobre 10 tubos para cada uno de los lotes y ensayo (3 inicio, 4 mitad y 3 final) según la metodología analítica descrita en el capítulo 8. Los resultados del control efectivo del envase, Tabla 7.14, cumplen con las especificaciones establecidas en el apartado 7.2.4.6.

Tabla 7.14 Resultados contenido efectivo de los tubos de crema

Tubo	Lote A-01	Lote A-02	Lote A-03
1	30,5	30,1	30,7
2	30,1	30,3	31,5
3	29,9	28,8	28,9
4	30,8	30,7	30,9
5	30,9	31,2	30,5
6	29,6	30,4	31,1
7	29,0	28,6	30,8
8	30,9	30,3	29,4
9	31,0	31,5	32,3
10	28,7	30,4	31,7
Media	30,1	30,2	30,8
SD	0,83	0,92	1,02
RSD	2,75	3,03	3,31

Se realiza un análisis estadístico de los resultados obtenidos para el contenido efectivo por ANOVA de una vía ($p < 0,05$). Tal y como se observa en la Tablas 7.14, el $F_{\text{CALCULADO}}$ es menor al valor crítico (F_{CRITICO}). Por tanto, se demuestra que no hay diferencias significativas entre los contenidos de los tubos de los diferentes lotes.

El contenido de ninguno de los 10 tubos sometidos al ensayo de control de la estanqueidad muestra un cambio de coloración. Por tanto, el envase es hermético, cumple con la especificación establecida.

Tabla 7.15 Resumen del análisis estadístico de los resultados del contenido efectivo

Parámetro	Lote	Promedio	Varianza	F _{CALCULADO}	F _{CRITICO}
Contenido efectivo	A01	30,14	0,6871	1,4054	3,3541
	A02	30,23	0,8401		
	A03	30,78	1,0351		

7.2.6. CONCLUSIONES

- El proceso de fabricación a escala industrial ha sido correctamente validado, proporcionando resultados homogéneos tanto inter como intra-lote para cada uno de los parámetros estudiados, considerados críticos en dicho proceso de fabricación y que por tanto, podrían afectar a la calidad del producto.
- Los datos obtenidos en la validación han sido sometidos a tratamiento estadístico demostrando que el proceso está bajo control estadístico y los índices de capacidad del proceso calculados definen el proceso como bueno (no necesita mejora).
- Considerando todos los resultados obtenidos con los análisis estadísticos, se puede concluir que no existen diferencias significativas de los lotes fabricados para la valoración del contenido en los tres APIs ni en el contenido efectivo. Considerando estos resultados de forma global, se puede concluir que el proceso de fabricación establecido proporcionará una crema con los atributos de calidad deseados de forma reproducible y repetitiva.

8. CONTROL DE PRODUCTO TERMINADO

8.1. INTRODUCCIÓN

El análisis farmacéutico juega un papel principal durante el ciclo de vida del medicamento, tanto durante el desarrollo como en la fabricación según GMP. Las preocupaciones acerca de la seguridad del principio activo, el coste del programa de desarrollo, la fabricación compleja, las demandas del mercado de datos basados en evidencias y el aumento de los requisitos regulatorios son temas que pueden ser abordados a través de una mejor comprensión del principio activo, del medicamento o del proceso de fabricación que, a su vez, puede sólo puede lograrse a través de la realización de estudios analíticos y la consiguiente obtención de datos analíticos robustos [121].

La implantación de controles en proceso en los puntos considerados críticos en el proceso de fabricación y la validación del proceso han reducido significativamente las variaciones inter e intra-lote. Para mantener estas variaciones al mínimo es necesario llevar a cabo una serie de acciones tales como:

- Análisis y control de todas las materias primas (principios activos, excipientes y material de acondicionado) involucradas en el proceso de fabricación
- Realización de verificaciones tanto de las instalaciones como de los equipos
- Evaluaciones del personal involucrados en las diferentes fases de la fabricación de la crema

En resumen, se trata de una evaluación continua que garantiza así la calidad, seguridad y eficacia del producto terminado.

Una vez fabricado un lote, éste permanece en cuarentena mientras una muestra representativa es analizada para determinar si cumple todas las especificaciones establecidas previamente y toda la documentación generada, tanto durante la fabricación como en el análisis, es revisada de forma exhaustiva. Si esta revisión individual del lote es positiva, se procede a aprobar el lote y su consiguiente liberación al mercado [112].

CAPÍTULO 8: CONTROL DE PRODUCTO TERMINADO

Las especificaciones describen de forma detallada los requisitos que debe cumplir el producto terminado. Son una lista de ensayos, referenciados a los procedimientos analíticos, asociados a unos criterios de aceptación adecuados, que pueden ser límites numéricos, intervalos u otros criterios. Establece el conjunto de criterios a los que el producto farmacéutico terminado debe ajustarse para ser considerado aceptable para su uso previsto. En algunos casos justificados, las especificaciones a la liberación del lote no tienen por qué coincidir necesariamente con las especificaciones a caducidad, pudiendo ser estar últimas menos restrictivas. Es decir, las especificaciones de alguno de los parámetros pueden variar dentro de unos márgenes a lo largo de su vida útil. [112,122].

El control de calidad de un medicamento debe constar como mínimo de los siguientes ensayos:

- Descripción cualitativa y características físico-químicas de la forma farmacéutica
- Identificación del principio activo de forma específica e inequívoca
- Valoración cuantitativa del principio activo y de los conservantes y antioxidantes si se encuentran incluidos en la forma farmacéutica
- Valoración tanto cualitativa como cuantitativa de los productos de degradación que se pudieran generar
- Otros ensayos según forma farmacéutica como pH, viscosidad, extensibilidad, contenido efectivo del envase, control microbiológico.

Muchos de los procedimientos analíticos mediante los cuales se evalúan algunas de las características del producto, están descritos en la farmacopea del país o región (Europa, Estados Unidos o Japón) y deberán ser utilizados.

El procedimiento analítico para la valoración del principio activo en producto terminado sólo se encuentra descrito en la USP para algunos medicamentos. Mientras que la valoración de los productos de degradación en producto terminado no tiene por qué encontrarse descrito. Otras características del producto terminado como la valoración de conservantes y antioxidantes pueden no tener asociado un procedimiento analítico descrito en farmacopea. En estos casos, se deben desarrollar y validar unos procedimientos analíticos propios.

El HPLC es una herramienta flexible que es utilizada para generar la mayoría de datos analíticos requeridos durante desarrollo y fabricación de un producto terminado. Los métodos de HPLC pueden ser modificados para cumplir todas las necesidades analíticas de cada una de las fases del desarrollo [121].

Durante las distintas fases del desarrollo farmacéutico de la crema despigmentante se han desarrollado, adaptado, optimizado y validado diferentes métodos analíticos. Se inició el desarrollo farmacéutico con la fase de preformulación la cual fue soportada analíticamente por un método de RP-HPLC preliminar *stability-indicating* (50 minutos). El método de RP-HPLC fue adaptado y optimizado para dar soporte a la fase de desarrollo galénico de la formulación (14 minutos). Para llevar a cabo la fase de industrialización, este método de RP-HPLC (14 minutos) fue transferido a UPLC optimizando el tiempo de análisis de 14 a 3 minutos. Pero en todas estas fases, el DPK siempre fue determinado individualmente con un método de GPC (5 minutos) debido a su naturaleza totalmente apolar. Para afrontar los estudios de estabilidad se decide desarrollar un método capaz de determinar conjuntamente el DPK, el resto de componentes a controlar (HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT) y las sustancias relacionadas o productos de degradación formados durante la estabilidad y así optimizar los costes asociados al análisis.

En este capítulo se presentan la metodología analítica y las especificaciones para la liberación del producto terminado al mercado. El procedimiento analítico para liberar los lotes al mercado es el último método desarrollado que determina simultáneamente todos los componentes a controlar (HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA, BHT y sustancias relacionadas). Los tres lotes fabricados durante la validación de proceso de fabricación han sido analizados conforme a la metodología analítica y los resultados obtenidos, dentro de especificaciones, generaron los certificados de análisis.

En la Tabla 8.1 se resumen los ensayos a realizar en la crema, los procedimientos analíticos asociados y las especificaciones establecidas para cada uno de los ensayos.

CAPÍTULO 8: CONTROL DE PRODUCTO TERMINADO

Tabla 8.1 Especificaciones de la crema

Ensayo	Método de análisis	Especificaciones a liberación
Aspecto	Método organoléptico	Crema de color blanco, opaca, brillante, olor suave
Identificación	Ph.Eur. ed. Vigente 2.2.29	t _R correspondientes a los patrones de HQ, KA y DPK
Viscosidad	Ph.Eur. ed. Vigente 2.2.10	0,750-1,500 Pa·s
pH	Ph.Eur. ed. Vigente 2.2.3	3,0 – 6,0
Extensibilidad	Método interno	800 – 1200 mm ²
Control de la estanqueidad	Método interno	Cumple
Contenido efectivo del envase	USP edición Vigente <755>	Medio ≥ contenido declarado Individual ≥ 90 %
Valoración API		
	HQ	95,0 – 105,0%
	KA	95,0 – 105,0%
	DPK	95,0 – 105,0%
Valoración antioxidantes		
	BHA Método interno	90,0 – 110,0%
	BHT según Ph.Eur. ed. Vigente 2.2.29	90,0 – 110,0%
Valoración filtros solares		
	OCT	90,0 – 110,0%
	AVB	90,0 – 110,0%
Productos de degradación		
	Individual	≤ 0,5%
	Totales	≤ 2,0%
Control microbiológico		
TAMC ¹ < 10 ² ufc/g		Cumple
TYMC ² < 10 ¹ ufc/g		Cumple
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : ausencia / g	Ph.Eur. ed. Vigente 5.1.4 categoría 3	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i> : ausencia / g		Ausencia

¹TAMC: recuento de microorganismos aerobios viables totales

²TYMC: recuento de levaduras/mohos totales

8.2. MATERIALES

8.2.1. PATRONES

HQ (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

KA (analytical standard $\geq 99.0\%$). Fluka (Buchs, Switzerland)

DPK ($\geq 98.0\%$). Sino Lion (Massó, Barcelona)

OCT (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

AVB (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

BHA (Pharmaceutical secondary standard – traceable to Ph.Eur. and USP). Fluka (Buchs, Switzerland)

BHT (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

8.2.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

Reactivos:

Acetonitrilo (para UV, IR, HPLC, ACS). Panreac (Barcelona, España) (ACN)

Dihidrógeno fosfato de potasio (RFE, USP, BP, Ph.Eur) PRS Codex. Panreac (Barcelona, España) (PO_4^{-3})

Ácido orto-fosfórico 85% (USP-NF, BP, Ph. Eur.) puro, grado farma. Panreac (Barcelona, España) (H_3PO_4)

Azul de metileno (para análisis). Panreac (Barcelona, España)

Agua calidad HPLC se obtuvo a través de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Soluciones:

- Azul de metileno 0,1% (p/v): Pesar 100 mg de azul de metileno y disolver en 100 ml de agua destilada. Filtrar el indicador a través de un papel filtro.

8.2.3. APARATOS Y UTILLAJE

Aparatos:

Microscopio Leica DM 1000 LED (Barcelona, España)

Viscosímetro Visco Tester 500 Haake Thermo Scientific (Massachusetts, EE.UU)

pHmetro 507 Crison (Alella, España)

Agitador magnético Agimatic ED Selecta (Barcelona, España)

Extensómetro diseñado por el Dr. Alfonso del Pozo Ojeda y el Dr. JM^a Suñé Arbussà

Balanza analítica BP211D Sartorius (Gotinga, Alemania)

Baño de ultrasonidos Ultrasons 9 L Selecta (Barcelona, España)

HPLC 1200 Agilent que consiste en un horno de columna, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de red de diodos (DAD), controlado por el software Chemstation versión B04.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Utillaje:

Espátulas de acero inoxidable de diferentes dimensiones

Portaobjetos

Vasos de precipitados de distintos volúmenes (25 ml, 100 ml, 1 l)

Probetas de distintos volúmenes (10 ml, 100 ml, 1 l) Clase A graduada

Desecador de vidrio Simax con grifo en la tapa esmerilada

Pesasustancias

Matraces aforados de 10, 25, 50 y 100 ml Clase A

Tubos centrífuga de 10 ml

Pipeta doble aforo 1 ml Clase A

Botella 1 l Pyrex con tapón

Jeringas plástico 10 ml

Filtros de jeringa 33 0,45 μm Millex PVDF Millipore

Filtros de membrana 0,45 μm Durapore PVDF Millipore

Papel de filtro plano para análisis cualitativo

Viales 2 ml HPLC

Pipetas Pasteur

Cronómetro Oregon Scientific

Columna cromatográfica Pursuit RXs Diphenyl 5 μm 80 Å, 4.6x 150 mm

8.3. MÉTODOS

8.3.1. ASPECTO

Determinar el aspecto de la crema en un lugar bien iluminado, sobre fondo negro o azul y describir el aspecto, color, olor y posibles defectos. El aspecto debe cumplir con la siguiente descripción: *Crema de color blanco, opaca, brillante, olor suave*. En caso de duda, realizar la observación del aspecto con el microscopio Leica DM 1000 LED.

Procedimiento:

Depositar una pequeña cantidad de crema en un portaobjetos y aplicar encima el cubreobjetos de forma que no quede aire en la preparación y ésta sea translúcida. Observar al microscopio con un objetivo 20X/0.40. Observar el aspecto de la muestra: homogeneidad, existencia de partículas, etc.

8.3.2. VISCOSIDAD

Determinar la viscosidad con el viscosímetro rotatorio Haake. Visco Tester 500 Thermo Scientific con camisa termostática según método general Ph.Eur. 2.2.10 [123]. La viscosidad debe estar comprendida entre 0,750 y 1,500 Pa·s.

Procedimiento:

Introducir la cantidad de muestra suficiente en el interior de la copa para cubrir totalmente el sensor sin ser excesiva para que no se derrame con el giro del rotor. Iniciar el análisis, por el ordenador, ejecutado por el software RheoWin en las siguientes condiciones:

CAPÍTULO 8: CONTROL DE PRODUCTO TERMINADO

- Sistema de medición: cilindros coaxiales SVI+SV
- Baño termostático modelo Haake B3 + Haake DC30 a una temperatura de trabajo de 25 ± 0.5 °C
- Programa de cizalla (Tabla 8.2):

Tabla 8.2 Programa de cizalla para la determinación de la viscosidad

Fase	Tiempo (s)	Velocidad giro (1/s)
0. Tiempo de espera tras el llenado	20	
1. Tiempo de latencia	20	
2. Incremento de velocidad de cizalla	180	0-200
3. Velocidad de cizalla constante	60	200
4. Disminución de velocidad de cizalla	180	200-0

8.3.3. pH

Determinar el pH con el pH-metro Crison 507 según método general Ph.Eur. 2.2.3 [123]. El pH debe estar comprendido entre 3,0 y 6,0.

Procedimiento

Pesar 1,0 g de crema en un vaso de precipitados de 25 ml. Añadir 10 ml de agua desionizada, calentar a 40 °C y agitar mediante un agitador magnético hasta dispersión. Dejar enfriar y determinar el pH en pH-metro con el electrodo de líquidos.

8.3.4. EXTENSIBILIDAD

Determinar la extensibilidad con el extensómetro diseñado por el Dr. Del Pozo Ojeda – Dr. Suñé Arbussà, construido en el departamento de *Tecnología Farmacéutica* de la Facultad de Farmacia de la UB según método interno. La extensibilidad debe estar comprendida entre 800 y 1200 mm².

Procedimiento

Encajar la parte superior del aparato con la parte inferior haciéndola girar de forma que quede una cavidad entre el eje i la parte superior. Rellenar la cavidad con aproximadamente 1 g de la muestra a analizar enrasándola con la superficie de la parte superior del aparato. Encajar la tapa de plástico sobre la parte superior. Colocar la pesa de 100 g entrada encima de la tapa de plástico. Hacer girar la parte superior

hasta que quede nivelada con la superior. Al cabo de 1 minuto, retirar el peso y medir con el pie de rey el diámetro del círculo formado por la extensión de la muestra entre la parte superior y la tapa de plástico.

El cálculo de la extensibilidad se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Extensibilidad (mm}^2\text{)} = \pi \cdot (d/2)^2$$

8.3.5. CONTENIDO EFECTIVO DEL ENVASE

Determinar el contenido efectivo sobre 10 tubos según método general USP<755> [124]. Ninguno de los contenidos individuales es inferior al 90,0% del contenido declarado y el contenido medio debe ser mayor o igual que el contenido declarado.

Procedimiento

- Pesar individualmente 10 tubos llenos.
- Extraer completamente el contenido de cada tubo, abrir el tubo mediante un corte y lavarlo con un disolvente adecuado; conservar el cierre y otras partes del tubo presentes durante el pesaje inicial.
- Secar y volver a pesar cada tubo vacío, junto con sus partes correspondientes.

Determinar el peso neto de los contenidos del recipiente por diferencia.

8.3.6. CONTROL DE LA ESTANQUEIDAD

Realizar el control de estanqueidad sobre 10 tubos según método interno. Ninguna muestra debe exhibir o presentar indicios de coloración azul o diferente al producto original.

Procedimiento

- Preparar el desecador con la solución de azul de metileno al 0,1% (p/v).
- Sumergir los 10 tubos, cerrar el desecador y aplicar vacío a una velocidad 1,3 kPa/min hasta llegar a 40 kPa.
- Dejar 1 minuto.
- Quitar el vacío y esperar 10 minutos.

- Sacar, limpiar y cortar los tubos para observar el aspecto de la crema.

8.3.7. VALORACIÓN del CONTENIDO en HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT

La valoración de dos de los APIs – HQ, KA y DPK –, los dos filtros solares – OCT y AVB – y los dos antioxidantes – BHA y BHT – y las sustancias relacionadas (impurezas y productos de degradación) se realiza por HPLC, según el método general Ph.Eur. 2.2.29 [123], habiendo investigado y desarrollado un procedimiento analítico capaz de detectar y cuantificar todos los compuestos que deben ser controlados (HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA, BHT y las sustancias relacionadas) simultáneamente en producto terminado en un tiempo de análisis de 35 minutos. Dicho método ha sido validado comprobándose su idoneidad. El contenido de cada uno de ellos debe cumplir los siguientes criterios:

- HQ, KA y DPK : entre 95,0 – 105,0%
- OCT, AVB, BHA y BHT: entre 90,0 – 110,0%
- Sustancias relacionadas: máxima individual $\leq 0,20\%$ y totales $\leq 2,00\%$

8.3.8. CONTROL MICROBIOLÓGICO

Determinar la calidad microbiológica sobre 10 tubos según método general Ph.Eur.

5.1.4. La crema debe cumplir con los siguientes criterios:

- Recuento de microorganismos aerobios viables totales (TAMC): $< 10^2$ ufc/g
- Recuento de levaduras/mohos totales (TYMC): $< 10^1$ ufc/g
- *Pseudomonas aeruginosa*: Ausencia/g
- *Staphylococcus aureus*: Ausencia/g

Los análisis microbiológicos son realizados en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia.

Toma de muestra y realización de diluciones.

En condiciones asépticas se toman 10 g de producto y se transfiere a un frasco de vidrio estéril de 250 ml de capacidad, al que se le añade 90 ml de solución diluyente (NaCl-peptona tamponada pH 7,0) y obtener la dilución madre 1/10 (10–1). Homogeneizar bien y realizar una segunda dilución, transfiriendo 1 ml de la dilución

madre a 9 ml de la solución diluyente de un tubo de vidrio estéril, para obtener para obtener la dilución 1/100 (10-2).

Método de siembra en masa

Sobre 1 placa de Petri aséptica y vacía, se añade 1 ml de la dilución 10-1 y se añade 18-20 ml de medio de cultivo triptona soja agar (TSA) atemperado a 45 °C, distribuir homogéneamente el inóculo en el medio haciendo movimientos circulares sobre una superficie horizontal y dejar solidificar. Repetir esta operación sobre otra placa de TSA y sembrar la dilución 10-2. Sembrar ambas diluciones por duplicado. Incubar las placas a 30-35 °C durante 3-5 días para determinar el recuento de los microorganismos aerobios viables totales (TAMC).

Sobre placas de Sabouraud Dextrosa agar (SD), repetir la siembra descrita para el TSA pero solo con la dilución 10-1. Incubar a 20-25 °C durante 5-7 días para determinar el recuento de levaduras/mohos totales (TYMC).

Determinación del recuento de los microorganismos aerobios viables totales (TAMC)

Tras los periodos de incubación prescritos, se realiza el recuento de las colonias crecidas en las placas de TSA, y se calcula la media aritmética de las 2 placas sembradas por duplicado procedentes de la misma dilución. Con los resultados obtenidos se calculan las ufc/g.

Determinación del recuento de levaduras/mohos totales (TYMC)

Al igual que el apartado anterior, realizar el recuento de las colonias crecidas en las placas de SD, y se calcula la media aritmética de las 2 placas sembradas, para con ello obtener las ufc/g.

Test para *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

Tomar 10 ml de la dilución madre obtenida en el apartado de toma de muestra y realización de diluciones, y añadirlos a una botella que contenga 90 ml de medio de cultivo líquido TSB. Esta dilución equivale a un gramo del producto a ensayar. Homogeneizar bien e incubar a 30-35 °C durante 18-24h.

1. *Pseudomonas aeruginosa*

Tras la incubación de la dilución en TSB, sembrar con un asa de kolle una placa de Agar Cetrimide. Incubar a 30-35 °C durante 18-72h.

CAPÍTULO 8: CONTROL DE PRODUCTO TERMINADO

Si se desarrollan colonias sospechosas (*P. aeruginosa* en Cetrimide adquiere un color verdoso), se examinarán al microscopio tras realizar una tinción de Gram y se efectuará el test de la oxidasa. Los bacilos Gram negativos que den positivo el test de la oxidasa se inocularán en una galería API 20NE (BioMérieux).

2. *Staphylococcus aureus*

De la dilución en TSB, sembrar con un asa de kolle una placa de Agar Manitol y poner a incubar durante 30-35 °C durante 18-72h.

Si se desarrolla alguna colonia sospechosa (*S. aureus*, de color blanco-amarillo habrá hecho virar el medio selectivo a amarillo), verificar la morfología y tinción de Gram. En caso de tratarse de cocos Gram positivos agrupados en racimos confirmar el test con la prueba de la coagulasa.

El producto cumple con el ensayo si no se desarrollan colonias sospechosas o si las pruebas de confirmación dan negativas.

8.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se adjuntan los resultados, correspondientes a los tres primeros lotes a escala industrial fabricados para la validación del proceso de fabricación, para cada uno de los ensayos descritos en la especificación de la crema

8.4.1. ASPECTO

Los tres lotes de crema, A-01, A-02 y A-03, cumple con la siguiente especificación:

“Crema de color blanco, opaca, brillante, olor suave”

8.4.2. VISCOSIDAD

Se da como resultado de la viscosidad de cada uno de los lotes la media de las 10 determinaciones realizadas para la validación del proceso de fabricación, ver capítulo 7 apartado 7.2.5.1 (Tabla 7.8), tal y como se muestra en la Tabla 8.3. Estos resultados cumplen con la especificación propuesta: 0,750 –1,500 Pa·s.

Tabla 8.3 Resultados de viscosidad para los tres lotes

Lote	Viscosidad(Pa·s)
A-01	1,180
A-02	1,258
A-03	1,138

8.4.3. pH

Los resultados de la determinación de pH, para los tres lotes, se muestran en la Tabla 8.4. Estos resultados cumplen con la especificación propuesta: 3,0 –6,0.

Tabla 8.4 Resultados de pH para los tres lotes

Lote	pH
A-01	5,79
A-02	5,80
A-03	5,64

8.4.4. EXTENSIBILIDAD

Los resultados de la determinación de extensibilidad, para los tres lotes, se muestran en la Tabla 8.5. Estos resultados cumplen con la especificación propuesta: 800 –1200 mm².

Tabla 8.5 Resultados de la extensibilidad para los tres lotes

Lote	Extensibilidad (mm)
A-01	855,9
A-02	818,4
A-03	996,5

8.4.5. CONTENIDO EFECTIVO DEL ENVASE

Se da como resultado del contenido efectivo de cada uno de los lotes la media de las 10 determinaciones individuales realizadas para la validación del proceso de fabricación, ver capítulo 7 apartado 7.2.5.2 (Tabla 7.14), tal y como se muestra en la Tabla 8.6. Estos resultados cumplen con la especificación propuesta: valor medio ≥ 30 g y cualquier valor individual ≥ 27 g (90% del contenido declarado).

CAPÍTULO 8: CONTROL DE PRODUCTO TERMINADO

Tabla 8.6 Resultados del contenido efectivo para los tres lotes

Lote	Contenido efectivo	
	Valor medio (g)	Individual \geq 90%
A-01	30,1	Cumple
A-02	30,2	Cumple
A-03	30,8	Cumple

8.4.6. CONTROL DE LA ETANQUEIDAD

Este ensayo también forma parte de la validación del proceso de fabricación, ver capítulo 7 apartado 7.2.5. El contenido de ninguno de los 10 tubos, de cada lote, sometidos al ensayo de control de la estanqueidad muestra un cambio de coloración. Por tanto, el envase es hermético, cumple con la especificación.

8.4.7. VALORACIÓN del CONTENIDO en HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA, BHT y sustancias relacionadas

Se lleva a cabo la valoración de los compuestos a controlar en la crema mediante el procedimiento analítico descrito en el Anexo V. La Tabla 8.7 muestra los resultados obtenidos, que cumplen las especificaciones propuestas.

Tabla 8.7 Resultados de la valoración de los tres lotes de crema

Compuesto	Lote A01	Lote A02	Lote A03
<i>Valoración</i>			
HQ	97,6	99,6	97,9
KA	100,3	99,3	100,8
DPK	99,8	103,1	100,8
OCT	98,6	100,3	101,3
AVB	97,5	99,6	101,1
BHA	97,9	95,2	98,5
BHT	98,2	103,2	102,3
<i>Sustancias relacionadas</i>			
Máx. Individual	< LD	< LD	< LD
Totales	< LD	< LD	< LD

8.4.8. CONTROL MICROBIOLÓGICO

Se lleva a cabo el análisis de la calidad microbiológica de los tres lotes en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia según en ensayo descrito en el apartado 8.3.9. Los resultados cumplen las especificaciones propuestas (Tabla 8.8).

Tabla 8.8 Resultados del control microbiológico de los tres lotes de crema

Parámetro	Lote A-01	Lote A-02	Lote A-03
Recuento de microorganismos aerobios viables totales (TAMC): $< 10^2$ ufc/g	C	C	C
Recuento de levaduras/mohos totales (TYMC): $< 10^1$ ufc/g	C	C	C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : ausencia / g	A	A	A
<i>Staphylococcus aureus</i> : ausencia / g	A	A	A

8.5. CONCLUSIONES

- Tras el estudio realizado en los tres lotes fabricados a escala industrial para la validación del proceso de producción, y que serán utilizados en el estudio de estabilidad, se puede concluir que se obtiene una crema que cumple con todas las especificaciones preestablecidas para demostrar la calidad de la crema.
- Los tres lotes demuestran que la formulación y la técnica de elaboración desarrolladas son correctas, reproducibles y robustas, confirmando la óptima investigación realizada durante el desarrollo del producto.

9. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

9.1. INTRODUCCIÓN

La estabilidad de un medicamento es la capacidad, en un sistema de envasado específico, de mantener por un tiempo determinado sus propiedades (físicas, químicas y microbiológicas) originales dentro de las especificaciones de calidad existentes. En otras palabras, es el grado en que un medicamento conserva, dentro de los límites especificados, durante todo el período de almacenamiento y uso, las mismas propiedades y características que poseía en el momento de su envasado [112,125, 126].

Para valorar la estabilidad de un medicamento, se llevan a cabo los estudios de estabilidad en los que se evalúa el efecto de los factores ambientales en la calidad de un medicamento. Esta información se utiliza para la predicción de su vida útil, determinar las condiciones de almacenamiento apropiadas y sugerir instrucciones de etiquetado. Por otra parte, los datos generados durante la prueba de estabilidad es un requisito importante para la aprobación por parte de las Autoridades Sanitarias de cualquier medicamento. Así, los estudios de estabilidad de medicamentos son un conjunto complejo de procedimientos que involucran un coste considerable, consumo de tiempo y conocimientos científicos con el fin de demostrar la calidad, eficacia y seguridad en un medicamento a lo largo del tiempo y en función de las condiciones ambientales de almacenamiento.

Los estudios de estabilidad son un proceso complejo debido a la participación de una variedad de factores que influyen en la estabilidad del medicamento. Estos factores incluyen la estabilidad del API, la interacción entre API y excipientes, el proceso de fabricación seguido, la forma farmacéutica, el envase y las condiciones de luz, calor y humedad encontradas durante el transporte, almacenamiento y manipulación del medicamento [127]. Además, reacciones de degradación vía oxidación, reducción, hidrólisis o racemización juegan un papel muy importante en la estabilidad de un medicamento y dependen de condiciones como el pH, radiación, catálisis, etc. así como de las materias primas utilizadas y el tiempo que transcurre entre la fabricación y el uso del medicamento.

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Un producto farmacéutico puede sufrir cambio en la apariencia, la consistencia, uniformidad de contenido, humedad, el tamaño de partícula, pH, la integridad del envasado, afectando así su estabilidad. Por una parte, cambios físicos que pueden ser causados por impactos o fluctuaciones de temperatura. Por otra parte, las reacciones químicas antes mencionadas que pueden conducir a la formación de productos de degradación, de pérdida de potencia del API, la pérdida de actividad de algunos excipientes como la acción antioxidante o conservante antimicrobiano, etc. [128].

Teniendo en cuenta todo lo expuesto hasta ahora, la razón principal de los estudios de estabilidad es la preocupación por el bienestar del paciente. Aparte de la degradación del medicamento en productos de degradación que pueden ser tóxicos, la pérdida de potencia del API puede conducir al fracaso de la terapia [127].

El diseño de los estudios formales de estabilidad para el medicamento debe basarse en el conocimiento del comportamiento y las propiedades del API así como de la experiencia obtenida en los estudios de estabilidad realizados durante la etapa de desarrollo de la formulación. Para ello, previo al inicio del estudio, se debe realizar el protocolo del estudio de estabilidad, documento que incluye la siguiente información:

- Lotes en estudio: para estudios de estabilidad destinados al registro de nuevos medicamentos se realizan sobre dos lotes pilotos y uno galénico o sobre tres lotes industriales según la forma farmacéutica de que se trate, según ICH [129].
- Acondicionado: se realiza en el producto envasado en el acondicionado primario propuesto para su comercialización.
- Periodicidad de muestreo: la frecuencia de los análisis debe ser la suficiente para establecer el perfil de estabilidad del nuevo medicamento. Según las ICH, la frecuencia de análisis en las condiciones de almacenamiento a largo plazo debe ser cada 3 meses durante el primer año, cada 6 meses durante el segundo año y posteriormente cada año hasta alcanzar la fecha de caducidad propuesta para el producto [129].

En condiciones aceleradas de almacenamiento, el estudio debe incluir un mínimo de tres puntos, incluyendo los puntos inicial y final. En general, se realizan análisis a 0, 3, y 6 meses.

En condiciones de almacenamiento intermedias, necesario como consecuencia de un cambio significativo en la condición de almacenamiento acelerado, se

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

recomienda un mínimo de cuatro puntos de análisis, incluyendo los puntos de tiempo inicial y final: 0, 6, 9 y 12 meses.

En general, un cambio significativo en un medicamento abarca los siguientes aspectos:

- Una disminución del 5% del ensayo de valoración o riqueza del API con respecto al valor obtenido al inicio del estudio
 - Algún producto de degradación excede el límite establecido al inicio del estudio
 - Fallo respecto a los criterios iniciales para el aspecto, en las características físicas y funciones galénicas (dureza, separación de fases, etc.)
 - Incumplimiento de las especificaciones de pH o del ensayo de disolución.
- Plan de muestreo: el plan de muestreo para el estudio de estabilidad implica tanto el cálculo del número de muestras (envases) que se deben almacenar de cada lote en las diferentes cámaras climáticas como el número de tomas de muestra de los lotes almacenados de manera que cubra todo el estudio (Tabla 9.1) [129,130].

Tabla 9.1 Calendario de muestreo típico para estudios de estabilidad de medicamentos [130]

Environment	Intervals	Intended climate zones
25 °C/60% RH	3, 6, 9, 12, 18, 24, 36	Long term for zones I and II
30 °C/35% RH	3, 6, 9, 12, 18, 24, 36	Long term for zone III
30 °C/65% RH ^a	3, 6, 9, 12, 18, 24, 36	Long term for zone IVa, or intermediate condition for zones I and II out to 12 months
30 °C/75% RH	3, 6, 9, 12, 18, 24, 36	Long term for zone IVa or intermediate condition for zones I and II out to 12 months
40 °C/75% RH	3, 6	Accelerated condition for all zones

^aTest 9 and 12 months only if failure to meet specification at 40 °C/75% RH or assay is different from initial by greater than 5% for zones I and II submission only.

- Condiciones de almacenamiento: en general, un medicamento debe ser evaluado en condiciones de almacenamiento que ponen a prueba su estabilidad térmica y, si procede, su sensibilidad a la humedad. Las condiciones de almacenamiento y la duración de los estudios deben ser suficientes para cubrir el periodo almacenamiento, envío y uso posterior (Tabla 9.2).

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Tabla 9.2 Condiciones de almacenamiento para estudios de estabilidad de medicamentos [127]

Intended storage condition	Stability Test Method	ICH Test temperature and humidity (Period in months)	WHO Test temperature and humidity (Period in months)
Room temperature	Long term	25±2°C/60±5% RH (12)	25±2°C/60±5% RH or 30±2°C/65±5% RH 30±2°C/75±5% RH (12)
	Intermediate	30±2°C/65±5% RH (6)	30±2°C/65±5% RH (6)
	Accelerated	40±2°C/75±5% RH (6)	40±2°C/75±5% RH (6)
Refrigerated	Long term	5°C/ambient (12)	5±3°C
	Accelerated	25±2°C/60±5% RH (6)	25 ±2°C/60±5% RH or 30 ±2°C/65±5% RH
Freezer	Long term	-20°C/ambient (12)	-20°C±5°C

- Parámetros a controlar: son aquellos ensayos de control de calidad del medicamento que son utilizados para evaluar la estabilidad de las muestras del estudio. Estos parámetros suelen ser aquellos que monitorizan aquellas propiedades que se podría esperar que cambien durante el transcurso del estudio: calidad, pureza, potencia e identidad.
- Métodos de análisis: siempre que sea posible, se recomienda seguir los procedimientos descritos en las farmacopeas (RFE, Ph.Eur., USP, etc.) ya que los resultados obtenidos mediante estos métodos, en general, son mejor aceptados.

Cuando no es posible, se utilizan métodos alternativos que deben estar debidamente validados. En el caso del método para valorar el contenido en API y productos de degradación, éste debe ser un método *stability-indicating*, en el que se ha llevado a cabo el estudio de degradación forzada, y estar debidamente validado con, como mínimo, la especificidad, exactitud, precisión y linealidad, en un rango lo suficientemente amplio como para cubrir cualquier posible valor que pueda obtenerse durante los estudios de estabilidad [131,132].

- Especificaciones: los criterios de aceptación propuestos para cada uno de los ensayos de control de calidad establecidos pudiendo tener diferentes criterios de aceptación para las especificaciones de liberación y de vida útil.

El estudio de estabilidad se lleva a cabo según el protocolo aprobado y manteniendo el medicamento en el envase propuesto para la comercialización, en número suficiente en cada una de las cámaras climáticas – fijadas a diferentes condiciones de almacenamiento – de acuerdo con el protocolo.

Las muestras son retiradas según calendario de muestreo del protocolo de estabilidad y analizadas por los métodos referenciados en el protocolo, tan pronto como sea posible ya que un retraso en el análisis puede afectar a los resultados. En los estudios de estabilidad realizados en este trabajo se establece un límite para realizar el análisis de ± 2 semanas con respecto a la fecha de la salida de la muestra de la cámara climática.

Por tanto, el objetivo es la realización del estudio de estabilidad para conocer la estabilidad de la formulación de la crema desarrollada en las condiciones para la zona climática II según directrices ICH [129].

9.2. MATERIALES

Para facilitar su localización se ha agrupado el material en: patrones, reactivos y soluciones, aparatos y utillaje.

9.2.1. PATRONES

HQ (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

KA (analytical standard $\geq 99.0\%$). Fluka (Buchs, Switzerland)

DPK (KAD-15, Min. 95%). Sino Lion (Massó, Barcelona, España)

OCT (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

AVB (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

BHA (Pharmaceutical secondary standard – traceable to Ph.Eur. and USP). Fluka (Buchs, Switzerland)

BHT (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

9.2.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

Acetonitrilo (para UV, IR, HPLC, ACS). Panreac (Barcelona, España) (ACN)

Ácido acético glacial (para HPLC). Panreac (Barcelona, España) (HAcO)

Tetrahidrofurano (para UV, IR, HPLC, GPC). Panreac (Barcelona, España) (THF)

Agua calidad HPLC se obtiene a través de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

9.2.3. APARATOS Y UTILLAJE

Aparatos:

Microscopio Leica DM 1000 LED (Barcelona, España)

Viscosímetro Visco Tester 500 Haake Thermo Scientific (Massachusetts, EE.UU)

pHmetro 507 Crison (Alella, España)

Agitador magnético Agimatic ED Selecta (Barcelona, España)

Extensómetro diseñado por el Dr. Alfonso del Pozo Ojeda y el Dr. JM^a Suñé Arbussà

Balanza analítica BP211D Sartorius (Gotinga, Alemania)

Baño de ultrasonidos Ultrasons 9 L Selecta (Barcelona, España)

HPLC 1200 Agilent que consiste en un horno de columna, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de red de diodos (DAD), controlado por el software Chemstation versión B04.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Cámara climática A (25 °C/60% HR) Dycometal CMO/300

Cámara climática B (30 °C/65% HR) Dycometal CMO/300

Cámara climática C (40 °C/75% HR) Dycometal CMO/300

Utillaje:

Espátulas de acero inoxidable

Portaobjetos

Vasos de precipitados de distintos volúmenes (25 ml, 100 ml, 1 l)

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Probetas de distintos volúmenes (10 ml, 100 ml, 1 l) Clase A graduada

Pesasustancias

Matraces aforados de 10, 25, 50 y 100 ml Clase A

Tubos centrífuga de 10 ml

Pipeta doble aforo 1 ml Clase A

Botella 1 l Pyrex con tapón

Jeringas plástico 10 ml

Viales 2 ml HPLC

Pipetas Pasteur

Cronómetro Oregon Scientific

Columna cromatográfica Pusuit RX Diphenyl 5 μm 80 Å, 4.6x 150 mm

9.3. METODOLOGÍA

Para la realización del estudio de estabilidad se sigue el siguiente procedimiento en donde se reflejan las condiciones de almacenamiento consideradas, el calendario de toma de muestra para la realización del mismo y los ensayos a llevar a cabo y evaluar.

9.3.1. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El estudio se realiza almacenando muestras de los tres lotes de la validación del proceso de fabricación de la crema – A02, A03 y A04 – acondicionados en tubos de PEAD, en las condiciones descritas en la Tabla 9.3.

Tabla 9.3 Resumen de las condiciones fijadas en cada una de las cámaras climáticas

Cámara climática	Condiciones climáticas
A	25 °C \pm 2 °C / 60% \pm 5% HR
B	30 °C \pm 2 °C / 65% \pm 5% HR
C	40 °C \pm 2 °C / 75% \pm 5% HR

Los parámetros de humedad y temperatura de las cámaras se controlan durante todo el periodo del estudio, obteniéndose un registro en papel de dichos parámetros.

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

En cada cámara climática se introducen 45 envases de cada lote, cantidad suficiente para analizar los parámetros, previstos en apartado 9.3.3, de la crema a cada uno de los tiempos a evaluar.

Cada uno de los envases se etiqueta indicando el número de lote y condición de almacenamiento.

9.3.2. PERIODICIDAD DE ANÁLISIS

La estabilidad acelerada tiene una duración de seis meses y las muestras se almacenan en la cámara correspondiente (C). La estabilidad a largo plazo tiene una duración prevista de 2 años (24 meses) y las muestras se almacenan en la cámara A. Los tiempos de muestreo se indican en la Tabla 9.4 para todas las condiciones estudiadas.

En caso de que el producto sea inestable a 40 °C/ 75% HR se introduce una nueva condición climática en el estudio, 30 °C/ 65% HR que se debe realizar hasta un año (0, 3, 6, 9 y 12 meses). Esta condición se planifica desde el inicio del estudio.

Tabla 9.4 Periodicidad de análisis en las distintas condiciones climáticas

Condiciones climáticas	Tiempos de análisis						
	0	3	6	9	12	18	24
25 ± 2 °C / 60 ± 5% HR	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
30 ± 2 °C / 65 ± 5% HR	✓	✓	✓	✓	✓		
40 ± 2 °C / 75 ± 5% HR	✓	✓	✓				

Para la realización de los análisis en cada punto se toman 3 envases por condición.

9.3.3. PARÁMETROS A CONTROLAR

El estudio de estabilidad de la crema se lleva a cabo mediante el control de los siguientes parámetros considerados críticos:

- Aspecto de la crema y del material de acondicionado
- Determinación del pH de la crema
- Determinación de la viscosidad
- Determinación de la extensibilidad
- Valoración del contenido de los APIs: HQ, KA y DPK
- Valoración del contenido en filtros solares: OCT y AVB

- Valoración de los antioxidantes: BHA y BHT
- Valoración del contenido en sustancias relacionadas
- Control microbiológico

9.3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Los métodos de análisis de cada uno de los ensayos se han descrito en el capítulo 8 correspondiente al control de producto terminado.

9.3.5. ESPECIFICACIONES

Para cada uno de los ensayos a realizar se da una especificación, especificación que se habrá de cumplir a lo largo de todo el estudio de estabilidad y por tanto será el marcador de la calidad o no calidad del producto durante todo el período en que dura dicho estudio. En la Tabla 9.5 se resumen los ensayos a realizar, junto con los métodos a utilizar y las especificaciones establecidas para llevar a cabo este estudio.

El control microbiológico se realiza al inicio del estudio de estabilidad, a los 6 meses, a 1 año y al final del estudio de estabilidad a largo plazo (2 años).

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Tabla 9.5 Métodos y especificaciones para los parámetros a controlar durante el estudio de estabilidad

Ensayo	Método de análisis	Especificaciones
Aspecto	Método organoléptico	Color blanco. Emulsión correcta, sin separación de fases
Identificación	Ph.Eur. ed. Vigente 2.2.29	t _R correspondientes a los patrones de HQ, KA y DPK
Viscosidad	Ph.Eur. ed. vigente 2.2.10	0.750-1.500 Pa·s
pH	Ph.Eur. ed. Vigente 2.2.3	3.0 – 6.0
Extensibilidad	Método interno	800 – 1200 mm ²
Valoración API	Método interno	
	HQ Ph.Eur. ed. Vigente	95.0 – 105.0%
	KA 2.2.29	95.0 – 105.0%
	DPK	95.0 – 105.0%
Valoración antioxidantes	Método interno	
	BHA Ph.Eur. ed. Vigente	90.0 – 110.0%
	BHT 2.2.29	90.0 – 110.0%
Valoración filtros solares	Método interno	
	OCT Ph.Eur. ed. Vigente	90.0 – 110.0%
	AVB 2.2.29	90.0 – 110.0%
Sustancia relacionadas	Método interno	
	Individual Ph.Eur. ed. Vigente	≤ 0.2%
	Totales 2.2.29	≤ 2.0%
Calidad microbiológica		
TAMC	Ph.Eur. ed. vigente	< 10 ² ufc/g
TYMC	5.1.4 categoría 3	< 10 ¹ ufc/g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>		Ausencia

¹TAMC: recuento de microorganismos aerobios viables totales

²TYMC: recuento de levaduras/mohos totales

9.3.6. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

9.3.6.1. *Variación del aspecto de la crema*

Los resultados obtenidos permitirán observar las posibles variaciones habidas en el transcurso del almacenamiento, reflejo de la existencia de posibles alteraciones físicas, químicas y/o galénicas del producto.

9.3.6.2. *Variación del pH de la crema*

Los resultados obtenidos de la determinación del pH de la crema permitirán observar las posibles variaciones habidas en el transcurso del almacenamiento, reflejo de la existencia de posibles alteraciones físicas, químicas y/o galénicas del producto.

9.3.6.3. *Control de la viscosidad de la crema*

Los resultados obtenidos en la determinación de la viscosidad de la crema permiten conocer las buenas características reológicas del mismo y que éstas no varíen durante el transcurso del almacenamiento en las condiciones específicas.

9.3.6.4. *Control de la extensibilidad de la crema*

Los resultados obtenidos en la determinación de la extensibilidad de la crema permiten conocer las buenas características reológicas del mismo y que éstas no varíen durante el transcurso del almacenamiento en las condiciones específicas.

9.3.6.5. *Valoración de los APIs, filtros solares, antioxidantes y sustancias relacionadas*

Los resultados obtenidos, junto con el resto de características analizadas, deberán permitir evaluar la idoneidad de los APIs en la formulación en las condiciones del ensayo, así como las posibles disminuciones de potencia a lo largo del tiempo de almacenamiento y la formación de las sustancias relacionadas o productos de degradación. También permitirán conocer las posibles pérdidas cualitativas del resto de sustancias funcionales y el impacto en la función que realizan.

9.3.6.6. *Control microbiológico*

Los resultados obtenidos demostrarán la calidad microbiológica del producto y del proceso de fabricación.

9.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los lotes estudiados (A02, A03 y A04), en los tiempos de análisis establecidos según protocolo y en las condiciones climáticas consideradas (25 °C/60% HR, 30 °C/65% HR y 40 °C/75% HR).

Los datos generados durante los estudios de estabilidad se resumen en las tablas que se adjuntan a continuación según condición climática y lote (Tablas 9.6 a 9.14).

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

9.4.1. RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD A LARGO PLAZO

Tabla 9.6 Resultados de la estabilidad del lote A01 a 25 °C/60% HR

Determinación	Especificación	Tiempo (meses)							
		0	3	6	9	12	18	24	
Aspecto	Color blanco. Emulsión correcta	C	C	C	C	C	C	C	
pH	3,0 – 6,0	5,8	5,5	4,6	4,9	4,3	4,3	3,9	
Viscosidad (Pa·s)	0,750 – 1,500	1,180	1,201	1,123	0,785	0,764	0,780	0,830	
Extensibilidad (mm ²)	800 – 1200	855,9	1086,6	989,7	1091,8	1037,8	1182,2	1155,0	
Valoración (HPLC)									
	HQ	95,0 – 105,0 %	97,6	97,8	98,6	97,8	97,1	98,4	97,1
	KA	95,0 – 105,0 %	100,3	97,8	98,8	98,7	97,7	96,9	96,2
	DPK	95,0 – 105,0 %	99,8	98,2	98,4	97,7	97,1	96,5	96,0
	BHA	90,0 – 110,0 %	97,9	95,7	80,2	82,3	81,0	85,5	83,3
	BHT	90,0 – 110,0 %	98,2	95,4	96,1	91,0	90,1	93,8	92,9
	OCT	90,0 – 110,0 %	98,6	98,3	97,6	97,8	96,9	96,7	96,3
	AVB	90,0 – 110,0 %	97,5	98,1	97,6	97,1	96,9	97,2	96,8
Sustancias relacionadas (HPLC)									
	Individual	≤ 0,20%	< LD	< LD	< LD	0,03	0,05	0,07	0,09
	Totales	≤ 2,00%	< LD	< LD	< LD	0,05	0,08	0,16	0,31
Calidad microbiológica									
	TAMC	≤ 10 ² ufc/g	C	-	C	C	C	-	C
	TYMC	≤ 10 ¹ ufc/g	C	-	C	C	C	-	C
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia/g	A	-	A	A	A	-	A
	<i>Staphilococcus aureus</i>	Ausencia/g	A	-	A	A	A	-	A

C: Correcto

A: Ausencia

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Tabla 9.7 Resultados de la estabilidad del lote A02 a 25 °C/60% HR

Determinación	Especificación	Tiempo (meses)						
		0	3	6	9	12	18	24
Aspecto	Color blanco. Emulsión correcta	C	C	C	C	C	C	C
pH	3,0 – 6,0	5,8	5,7	4,4	4,8	4,4	4,3	4,4
Viscosidad (Pa·s)	0,750 – 1,500	1,258	1,395	1,391	1,006	0,975	0,851	0,957
Extensibilidad (mm ²)	800 – 1200	818,4	994,8	1012,4	1087,2	975,0	1077,1	1131,6
Valoración (HPLC)								
	HQ 95,0 – 105,0 %	99,6	98,8	98,6	99,3	97,5	98,0	97,3
	KA 95,0 – 105,0 %	99,3	99,5	99,6	100,0	98,3	98,8	97,8
	DPK 95,0 – 105,0 %	103,1	101,4	100,3	99,9	98,1	98,4	97,5
	BHA 90,0 – 110,0 %	95,2	95,1	90,2	87,2	89,7	89,0	88,7
	BHT 90,0 – 110,0 %	103,2	95,5	91,7	93,3	92,21	93,5	93,7
	OCT 90,0 – 110,0 %	100,3	98,6	98,1	97,7	97,4	97,6	97,2
	AVB 90,0 – 110,0 %	99,6	98,4	98,4	98,2	97,4	97,0	97,3
Sustancias relacionadas (HPLC)								
	Individual ≤ 0,20%	< LD	< LD	0,02	0,05	0,08	0,11	0,16
	Totales ≤ 2,00%	< LD	< LD	0,02	0,10	0,16	0,27	0,42
Calidad microbiológica								
	TAMC ≤ 10 ² ufc/g	C	-	C	C	C	-	C
	TYMC ≤ 10 ¹ ufc/g	C	-	C	C	C	-	C
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ausencia/g	A	-	A	A	A	-	A
	<i>Staphilococcus aureus</i> Ausencia/g	A	-	A	A	A	-	A

C: Correcto

A: Ausencia

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Tabla 9.8 Resultados de la estabilidad del lote A03 a 25 °C/60% HR

Determinación	Especificación	Tiempo (meses)						
		0	3	6	9	12	18	24
Aspecto	Color blanco. Emulsión correcta	C	C	C	C	C	C	C
pH	3,0 – 6,0	5,6	5,5	4,8	4,4	4,4	4,3	4,2
Viscosidad (Pa·s)	0,750 – 1,500	1,138	1,118	1,160	0,834	1,053	0,774	0,801
Extensibilidad (mm ²)	800 – 1200	996,5	971,9	1122,3	1010,4	1071,5	1164,2	1114,8
Valoración (HPLC)								
	HQ 95,0 – 105,0 %	97,9	99	99,5	99,1	98,6	98,8	98,1
	KA 95,0 – 105,0 %	100,8	100,6	99,3	99,0	98,4	97,6	96,9
	DPK 95,0 – 105,0 %	100,8	100,1	99,1	99,3	98,2	97,6	97,1
	BHA 90,0 – 110,0 %	98,5	85,1	78,5	83,6	84,3	85,7	85,5
	BHT 90,0 – 110,0 %	102,,3	93,1	87,9	87,0	86,4	85,6	85,9
	OCT 90,0 – 110,0 %	101,3	100,7	100,1	99,8	99,5	99,1	98,8
	AVB 90,0 – 110,0 %	101,1	101,2	100,8	100,3	99,8	99,2	98,5
Sustancias relacionadas (HPLC)								
	Individual ≤ 0,20%	< LD	< LD	< LD	0,04	0,06	0,09	0,12
	Totales ≤ 2,00%	< LD	< LD	< LD	0,05	0,08	0,15	0,28
Calidad microbiológica								
	TAMC ≤ 10 ² ufc/g	C	-	C	C	C	-	C
	TYMC ≤ 10 ¹ ufc/g	C	-	C	C	C	-	C
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ausencia/g	A	-	A	A	A	-	A
	<i>Staphilococcus aureus</i> Ausencia/g	A	-	A	A	A	-	A

C: Correcto

A: Ausencia

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

9.4.2. RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD INTERMEDIA

Tabla 9.9 Resultados de la estabilidad del lote A01 a 30 °C/65% HR

Determinación	Especificación	Tiempo (meses)				
		0	3	6	9	12
Aspecto	Color blanco. Emulsión correcta	C	C	C	I	I
pH	3,0 – 6,0	5,8	5,6	4,3	4,6	4,2
Viscosidad (Pa·s)	0,750 – 1,500	1,180	1,149	1,177	-	-
Extensibilidad (mm ²)	800 – 1200	855,9	1086,0	1049,6	-	-
Valoración (HPLC)						
	HQ 95,0 – 105,0 %	97,6	96,9	95,6	96,8	97,2
	KA 95,0 – 105,0 %	100,3	100,1	99,2	98,6	97,5
	DPK 95,0 – 105,0 %	99,8	98,1	97,2	96,5	95,3
	BHA 90,0 – 110,0 %	97,9	87,3	79,4	78,1	82,6
	BHT 90,0 – 110,0 %	98,2	91,2	97,6	94,8	88,6
	OCT 90,0 – 110,0 %	98,6	98,6	98,4	95,8	96,3
	AVB 90,0 – 110,0 %	97,5	98,0	98,0	96,2	97,3
Sustancias relacionadas (HPLC)						
	Individual ≤ 0,20%	< LD	0,04	0,05	0,14	0,11
	Totales ≤ 2,00%	< LD	0,04	0,11	0,33	0,30
Control microbiológico						
	TAMC ≤ 10 ² ufc/g	C	-	C	-	C
	TYMC ≤ 10 ¹ ufc/g	C	-	C	-	C
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ausencia/g	A	-	A	-	A
	<i>Staphilococcus aureus</i> Ausencia/g	A	-	A	-	A

C: Correcto

I: Incorrecto ⇒ separación de fases. Color amarillento. Obturador manchado de negro. Inviabile efectuar viscosidad y extensibilidad.

A: Ausencia

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Tabla 9.10 Resultados de la estabilidad del lote A02 a 30 °C/65% HR

Determinación	Especificación	Tiempo (meses)				
		0	3	6	9	12
Aspecto	Color blanco. Emulsión correcta	C	C	C	I	I
pH	3,0 – 6,0	5,8	5,4	4,3	4,5	3,9
Viscosidad (Pa·s)	0,750 – 1,500	1,258	0,894	0,908	-	-
Extensibilidad (mm ²)	800 – 1200	818,3	1009,0	983,5	-	-
Valoración (HPLC)						
	HQ 95,0 – 105,0 %	99,6	98,7	97,7	98,3	98,0
	KA 95,0 – 105,0 %	99,3	98,4	96,9	97,6	96,8
	DPK 95,0 – 105,0 %	103,1	98,3	97,4	96,8	96,0
	BHA 90,0 – 110,0 %	95,2	94,2	82,5	74,1	79,1
	BHT 90,0 – 110,0 %	103,2	94,0	86,6	91,5	89,6
	OCT 90,0 – 110,0 %	100,3	97,8	96,9	97,7	98,6
	AVB 90,0 – 110,0 %	99,6	95,7	100,8	96,1	98,6
Sustancias relacionadas (HPLC)						
	Individual ≤ 0,20%	< LD	< LD	0,07	0,12	0,12
	Totales ≤ 2,00%	< LD	< LD	0,13	0,28	0,44
Control microbiológico						
	TAMC ≤ 10 ² ufc/g	C	-	C	-	C
	TYMC ≤ 10 ¹ ufc/g	C	-	C	-	C
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ausencia/g	A	-	A	-	A
	<i>Staphilococcus aureus</i> Ausencia/g	A	-	A	-	A

C: Correcto

I: Incorrecto ⇒ separación de fases. Color amarillento. Obturador manchado de negro. Inviabile efectuar viscosidad y extensibilidad.

A: Ausencia

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Tabla 9.11 Resultados de la estabilidad del lote A03 a 30 °C/65% HR

Determinación	Especificación	Tiempo (meses)				
		0	3	6	9	12
Aspecto	Color blanco. Emulsión correcta	C	C	C	I	I
pH	3,0 – 6,0	5,6	5,3	4,8	4,3	3,8
Viscosidad (Pa·s)	0,750 – 1,500	1,138	1,118	1,160	-	-
Extensibilidad (mm ²)	800 – 1200	996,5	1004,4	999,5	-	-
Valoración (HPLC)						
	HQ 95,0 – 105,0 %	97,9	97,8	97,5	98,1	97,3
	KA 95,0 – 105,0 %	100,8	98,4	99,8	98,1	97,0
	DPK 95,0 – 105,0 %	100,8	98,4	96,8	96,3	95,8
	BHA 90,0 – 110,0 %	98,5	94,8	91,8	85,6	83,4
	BHT 90,0 – 110,0 %	102,3	100,7	94,2	87,6	81,2
	OCT 90,0 – 110,0 %	101,3	98,8	97,8	97,2	97,5
	AVB 90,0 – 110,0 %	101,1	98,5	97,3	97,6	96,9
Sustancias relacionadas (HPLC)						
	Individual ≤ 0,20%	< LD	0,04	0,04	0,07	0,08
	Totales ≤ 2,00%	< LD	0,05	0,07	0,17	0,26
Control microbiológico						
	TAMC ≤ 10 ² ufc/g	C	-	C	-	C
	TYMC ≤ 10 ¹ ufc/g	C	-	C	-	C
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ausencia/g	A	-	A	-	A
	<i>Staphilococcus aureus</i> Ausencia/g	A	-	A	-	A

C: Correcto

I: Incorrecto ⇒ separación de fases. Color amarillento. Obturador manchado de negro. Inviabile efectuar viscosidad y extensibilidad.

A: Ausencia

9.4.3. RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD ACELERADA

Tabla 9.12 Resultados de la estabilidad del lote A01 a 40 °C/75% HR

Determinación	Especificación	Tiempo (meses)			
		0	3	6	
Aspecto	Color blanco. Emulsión correcta	C	C	I	
pH	3,0 – 6,0	5,8	4,6	3,7	
Viscosidad (Pa·s)	0,750 – 1,500	1,18	0,883	-	
Extensibilidad (mm ²)	800 – 1200	855,9	1086,6	-	
Valoración (HPLC)					
	HQ	95,0 – 105,0 %	97,6	99,8	96,6
	KA	95,0 – 105,0 %	100,3	100,4	98,6
	DPK	95,0 – 105,0 %	99,8	96,3	95,5
	BHA	90,0 – 110,0 %	97,9	91,9	78,7
	BHT	90,0 – 110,0 %	98,2	94,7	84,2
	OCT	90,0 – 110,0 %	98,6	97,7	98,5
	AVB	90,0 – 110,0 %	97,5	95,8	97,7
Sustancias relacionadas (HPLC)					
	Individual	≤ 0,20%	< LD	0,08	0,17
	Totales	≤ 2,00%	< LD	0,13	0,44
Calidad microbiológica					
	TAMC	≤ 10 ² ufc/g	C	-	C
	TYMC	≤ 10 ¹ ufc/g	C	-	C
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia/g	A	-	A
	<i>Staphilococcus aureus</i>	Ausencia/g	A	-	A

C: Correcto

I: Incorrecto ⇒ separación de fases. Color amarillo. Obturador manchado de negro. Inviabile efectuar viscosidad y extensibilidad.

A: Ausencia

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Tabla 9.13 Resultados de la estabilidad del lote A02 a 40 °C/75% HR

Determinación	Especificación	Tiempo (meses)			
		0	3	6	
Aspecto	Color blanco. Emulsión correcta	C	C	I	
pH	3,0 – 6,0	5,8	4,5	3,2	
Viscosidad (Pa·s)	0,750 – 1,500	1,258	0,981	-	
Extensibilidad (mm ²)	800 – 1200	818,34	991,0	-	
Valoración (HPLC)					
	HQ	95,0 – 105,0 %	99,6	98,2	97,6
	KA	95,0 – 105,0 %	99,3	97,8	98,2
	DPK	90,0 – 110,0 %	103,1	96,1	95,2
	BHA	90,0 – 110,0 %	95,2	94,5	79,3
	BHT	90,0 – 110,0 %	103,2	99,9	93,4
	OCT	90,0 – 110,0 %	100,3	99,3	101,3
	AVB	90,0 – 110,0 %	99,6	96,9	96,7
Sustancias relacionadas (HPLC)					
	Individual	≤ 0,20%	< LD	0,10	0,16
	Totales	≤ 2,00%	< LD	0,14	0,51
Calidad microbiológica					
	TAMC	≤ 10 ² ufc/g	C	-	C
	TYMC	≤ 10 ¹ ufc/g	C	-	C
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia/g	A	-	A
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia/g	A	-	A

C: Correcto

I: Incorrecto ⇒ separación de fases, mayor al principio del tubo. Color amarillo. Inviabile efectuar viscosidad y extensibilidad.

A: Ausencia

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Tabla 9.14 Resultados de la estabilidad del lote A03 a 40 °C/75% HR

Determinación	Especificación	Tiempo (meses)			
		0	3	6	
Aspecto	Color blanco. Emulsión correcta	C	C	I	
pH	3,0 – 6,0	5,6	4,4	3,5	
Viscosidad (Pa·s)	0,750 – 1,500	1,138	0,975	-	
Extensibilidad (mm ²)	800 – 1200	996,5	982,2	-	
Valoración (HPLC)					
	HQ	95,0 – 105,0 %	97,9	97,6	96,9
	KA	95,0 – 105,0 %	100,8	99,7	98,6
	DPK	95,0 – 105,0 %	100,8	98,9	95,3
	BHA	90,0 – 110,0 %	98,5	89,2	78,2
	BHT	90,0 – 110,0 %	102,,3	92,2	87,1
	OCT	90,0 – 110,0 %	101,3	98,7	97,3
	AVB	90,0 – 110,0 %	101,1	96,7	97,0
Sustancias relacionadas (HPLC)					
	Individual	≤ 0,20%	< LD	0,12	0,19
	Totales	≤ 2,00%	< LD	0,16	0,68
Control microbiológico					
	TAMC	≤ 10 ² ufc/g	C	-	C
	TYMC	≤ 10 ¹ ufc/g	C	-	C
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia/g	A	-	A
	<i>Staphilococcus aureus</i>	Ausencia/g	A	-	A

C: Correcto

I: Incorrecto ⇒ separación de fases, mayor al principio del tubo. Color amarillo. Inviabile efectuar viscosidad y extensibilidad.

A: Ausencia

9.4.4. DISCUSIÓN

9.4.4.1. Aspecto

Para todos los lotes estudiados, en las condiciones de almacenamiento 25 °C/60% HR, se obtiene un aspecto y color correctos, acorde con las especificaciones establecidas para el producto terminado hasta los 24 meses de estudio.

Tanto en el estudio de estabilidad intermedio (30 °C/65% HR) como en el estudio de estabilidad acelerada (40 °C/75% HR) se observa un cambio en el aspecto de la crema a lo largo de tiempo. A partir de los 9 y 6 meses, respectivamente, se observa la separación de fases, coloración amarillenta y obturador manchado de negro.

Por tanto, puede concluirse que la crema mantiene las características relativas al aspecto y color a lo largo del tiempo en su envase primario en las condiciones de 25 °C/60% HR pero no en las condiciones de 30 °C/65% HR y 40 °C/75% HR.

9.4.4.2. pH

A lo largo del estudio de estabilidad a largo plazo (25 °C/60% HR), todos los lotes en estudio obtienen unos valores de pH correctos, acorde con las especificaciones establecidas para el producto terminado, tal y como se refleja en las Figuras 9.1 a 9.3.

Si bien, aun estando los valores dentro de especificaciones, se observa una tendencia a la disminución de los valores de pH en todas las condiciones de almacenamiento estudiadas.

Este fenómeno corresponde a una acidificación de la crema que no afecta de ninguna forma ni a las características organolépticas ni a la calidad del producto. Esta acidificación es debida a la presencia de protones que han ido cediendo alguno de los excipientes al formular una emulsión; si bien esta acidificación no afecta de forma significativa a la estabilidad química de los principios activos ya que tanto la HQ como el KA tienen un carácter débilmente ácido y el DPK es un compuesto neutro y en consecuencia, los APIs son estables en medios ligeramente ácidos.

En conclusión, a pesar de la acidificación de la crema el pH está dentro de los límites establecidos en las especificaciones a lo largo del tiempo en todas las condiciones estudiadas.

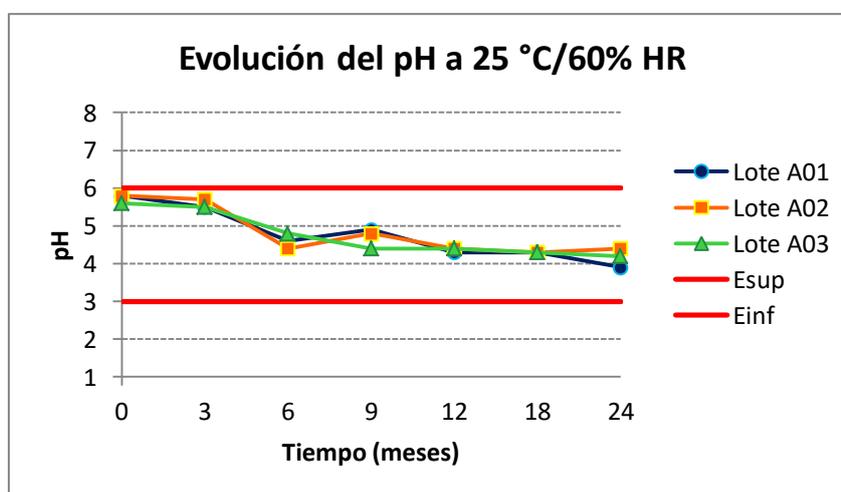


Figura 9.1 Gráfico de la evolución del pH a 25 °C/60% HR

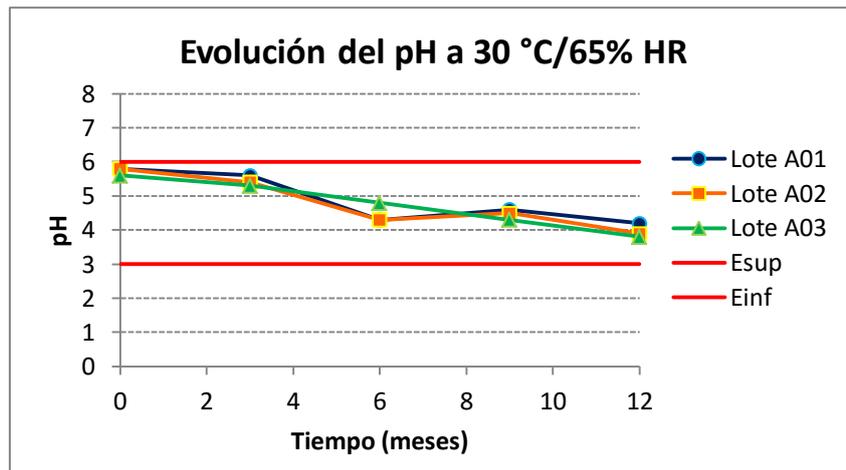


Figura 9.2 Gráfico de la evolución del pH a 30 °C/65% HR

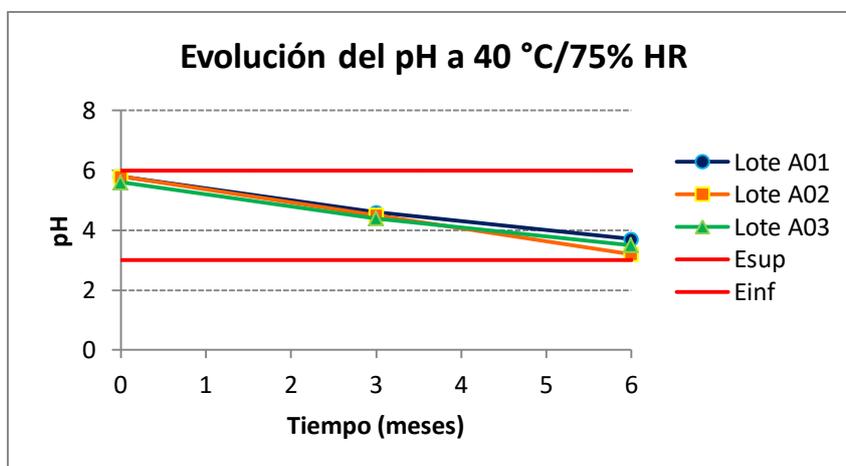


Figura 9.3 Gráfico de la evolución del pH a 40 °C/75% HR

9.4.4.3. Viscosidad

Los valores de viscosidad de los tres lotes a lo largo del estudio de estabilidad a las tres condiciones de almacenamiento se encuentran dentro de las especificaciones establecidas previamente: 0,750 – 1,500 Pa·s.

A pesar de ello, se aprecia una disminución de la viscosidad a lo largo del tiempo en todas las condiciones aunque cuanto más extrema es la condición más rápido se da la disminución, tal y como se observa en las Figuras 9.4 a 9.6. En cuanto a rapidez: 40 °C/75% HR > 30 °C/65% HR > 25 °C/60% HR.

En el estudio de estabilidad intermedio y en el estudio de estabilidad acelerada no se puede realizar el ensayo de viscosidad a lo largo de todo el estudio ya que se da una separación de fase a partir de los nueve y seis meses, respectivamente.

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

El análisis estadístico paramétrico realizado (ANOVA de una vía) entre los tres lotes almacenados a 25 °C/60% HR indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la evolución de la viscosidad de los tres lotes a lo largo del tiempo ya que se cumple que $F < F_{crit}$ (Figura 9.7).

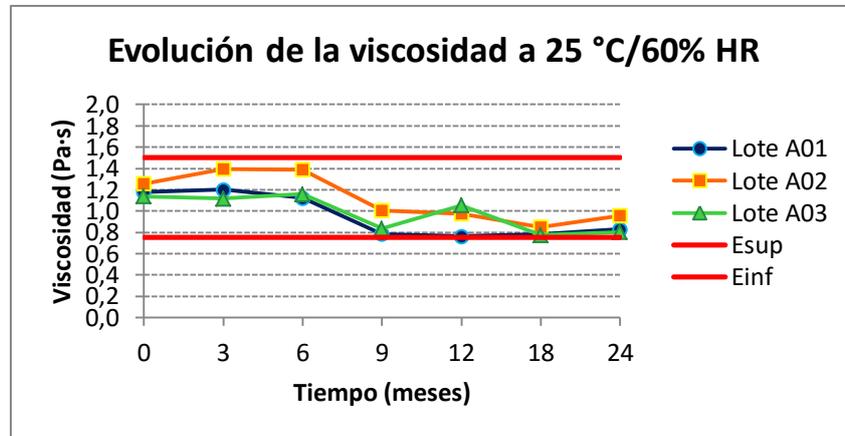


Figura 9.4 Gráfico de la evolución de la viscosidad a 25 °C/60% HR

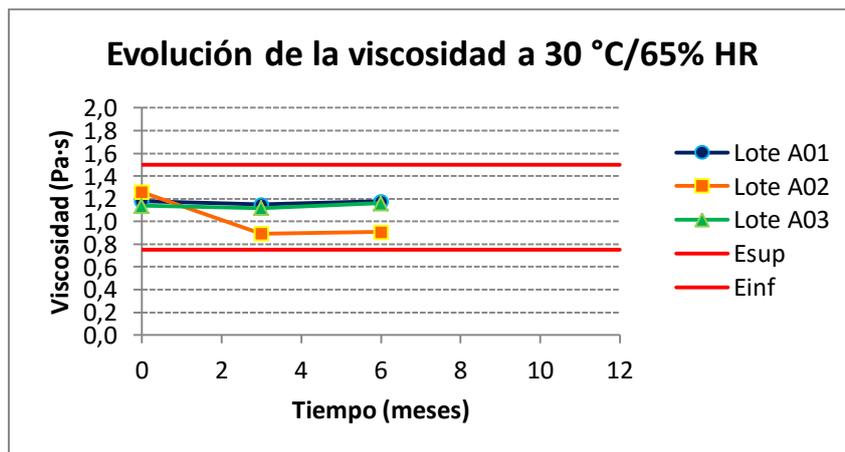


Figura 9.5 Gráfico de la evolución de la viscosidad a 30 °C/65% HR

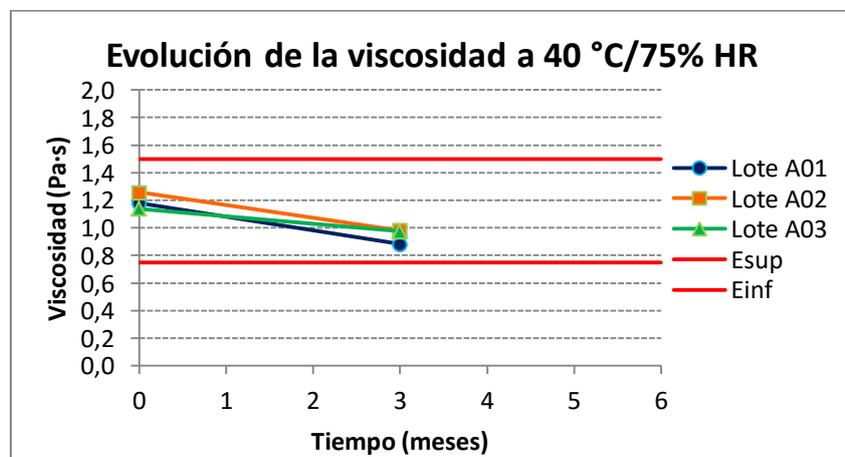


Figura 9.6 Gráfico de la evolución de la viscosidad a 40 °C/75% HR

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
A01	7	6,66320	0,95189	0,04181		
A02	7	7,83300	1,11900	0,05018		
A03	7	6,87800	0,98257	0,02958		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	SC	GL	PC	F	P	F _{CRIT}
Entre grupos	0,11079	2	0,055	1,367	0,280	3,555
Dentro de los grupos	0,72939	18	0,041			
Total	0,84018	20				
SC: suma de los cuadrados GL: grados de libertad PC: promedio de los cuadrados F: valor estadístico F calculado P: probabilidad F _{CRIT} : valor estadístico F tabulado						

Figura 9.7 Análisis estadístico de la viscosidad a 25 °C/60% HR

9.4.4.4. Extensibilidad

Como se puede observar en las Figuras 9.8 a 9.10, los valores de extensibilidad de los tres lotes almacenados en las diferentes condiciones climáticas, se encuentran dentro del rango de especificaciones establecidas durante la fase de desarrollo: 800 – 1200 mm².

A pesar de ello, se aprecia un aumento de la extensibilidad a lo largo del tiempo en todas las condiciones que parece que se relaciona con la disminución de viscosidad ya que a lo largo del tiempo aumenta la extensibilidad al disminuir la viscosidad. Al igual que en el ensayo de la viscosidad, no se puede realizar el ensayo de la extensibilidad en aquellas muestras en que se produce la separación de fases: a partir de los nueve meses a 30 ° C/65% HR y a los 6 meses a 40 °C/75% HR.

Se realiza también un análisis estadístico paramétrico (ANOVA de una vía), al igual que con los resultados de la viscosidad, entre los tres lotes almacenados a 25 °C/60% HR que demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la evolución de la extensibilidad de los tres lotes a lo largo del tiempo ya que se cumple que $F < F_{crit}$ (Figura 9.11).

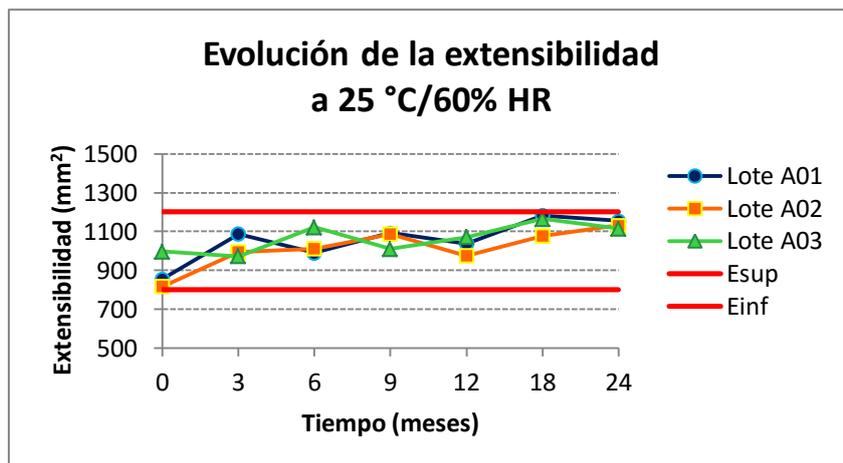


Figura 9.8 Gráfico de la evolución de la extensibilidad a 25 °C/60% HR

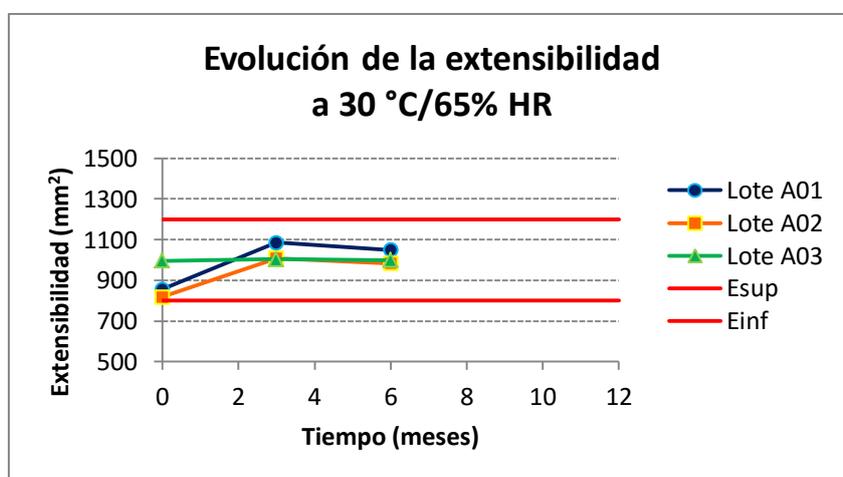


Figura 9.9 Gráfico de la evolución de la extensibilidad a 30 °C/65% HR

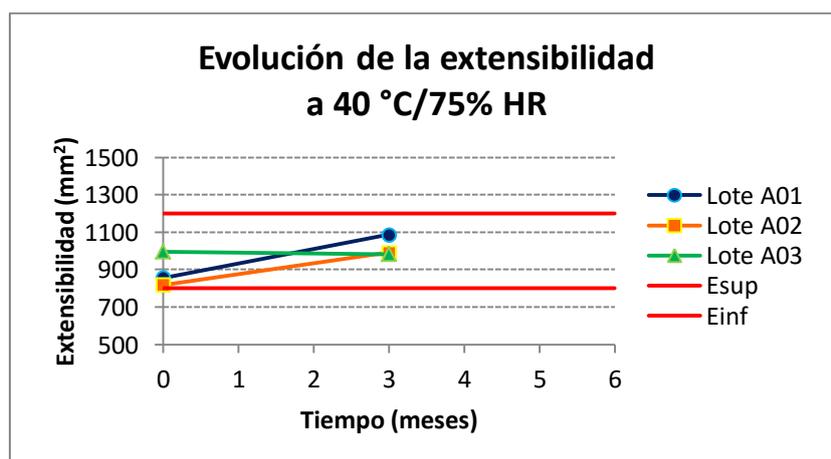


Figura 9.10 Gráfico de la evolución de la extensibilidad a 40 °C/75% HR

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
A01	7	7399,0	1057,00	12117,56		
A02	7	7096,5	1013,79	10553,48		
A03	7	7451,6	1064,514	5330,931		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	SC	GL	PC	F	P	F _{CRIT}
Entre grupos	10493,76286	2	5246,881	0,562	0,580	3,555
Dentro de los grupos	168011,81714	18	9333,990			
Total	178505,58	20				
SC: suma de los cuadrados GL: grados de libertad PC: promedio de los cuadrados F: valor estadístico F calculado P: probabilidad F _{CRIT} : valor estadístico F tabulado						

Figura 9.11 Análisis estadístico de la extensibilidad a 25 °C/60% HR

9.4.4.5. Valoración de los APIs

A lo largo de todo el estudio de estabilidad en las tres condiciones climáticas evaluadas, todos los lotes en estudio se obtienen unos valores del contenido en los tres APIs correctos, acorde con las especificaciones establecidas para el producto terminado, 95,0 – 10,0%, tal y como se refleja en las Figuras 9.12 a 9.14 para HQ, en las Figuras 9.15 a 9.17 para KA y en la Figuras 9.18 a 9.20 para DPK.

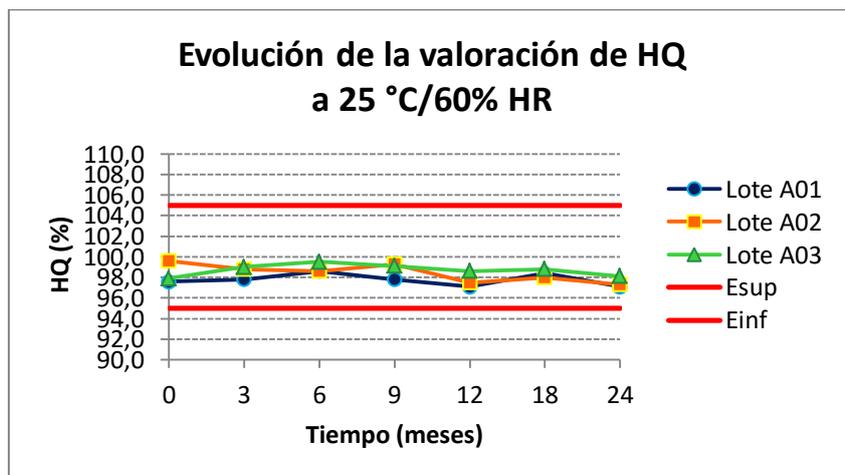


Figura 9.12 Gráfico de la evolución del contenido en HQ a 25 °C/60% HR

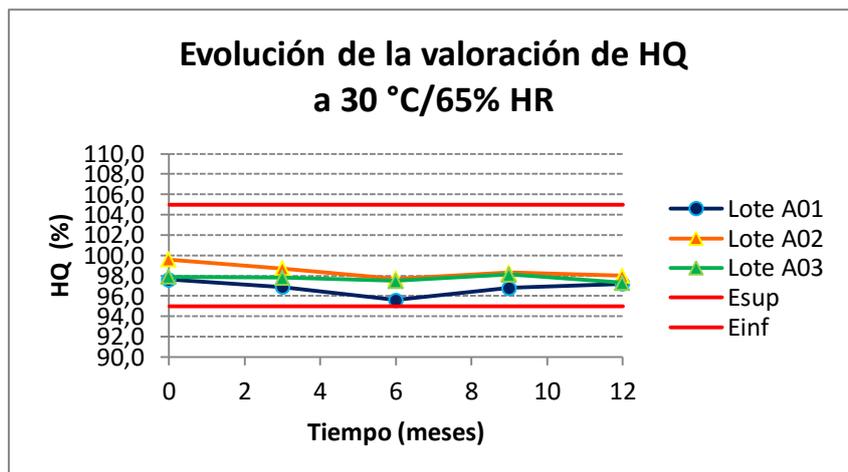


Figura 9.13 Gráfico de la evolución del contenido en HQ a 30 °C/65% HR

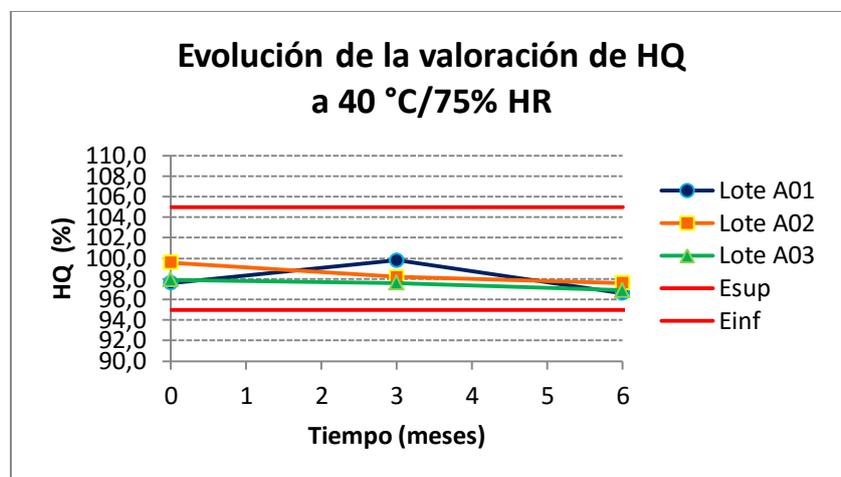


Figura 9.14 Gráfico de la evolución del contenido en HQ a 40 °C/75% HR

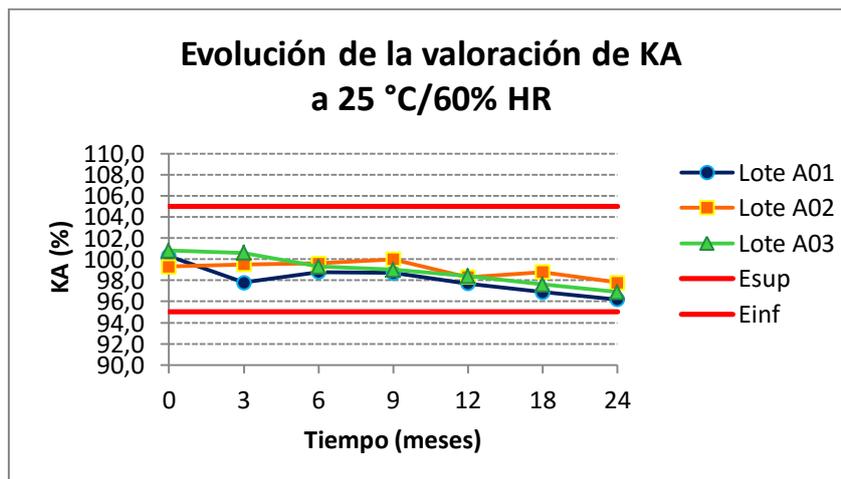


Figura 9.15 Gráfico de la evolución del contenido en KA a 25 °C/60% HR

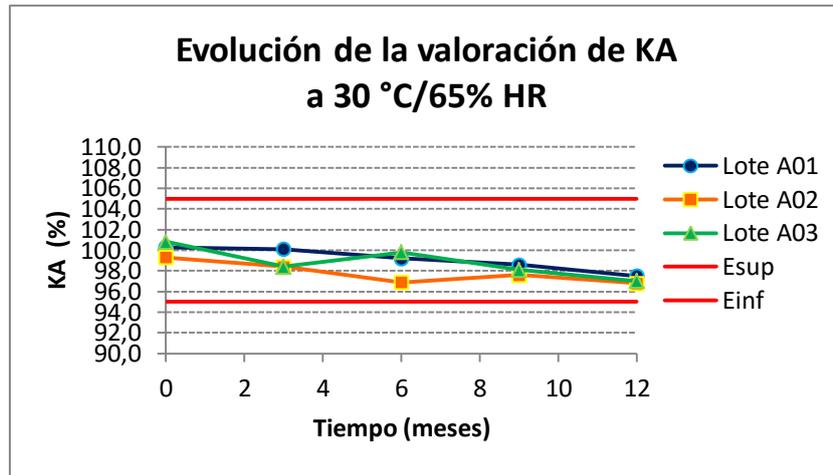


Figura 9.16 Gráfico de la evolución del contenido en KA a 30 °C/65% HR

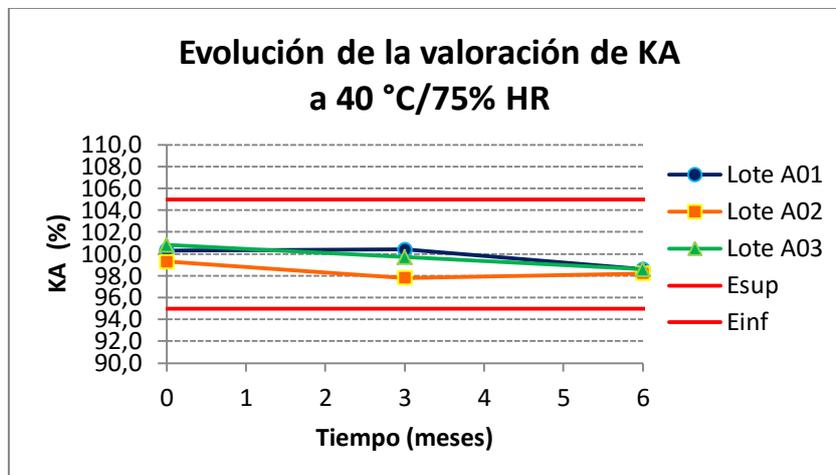


Figura 9.17 Gráfico de la evolución del contenido en KA a 40 °C/75% HR

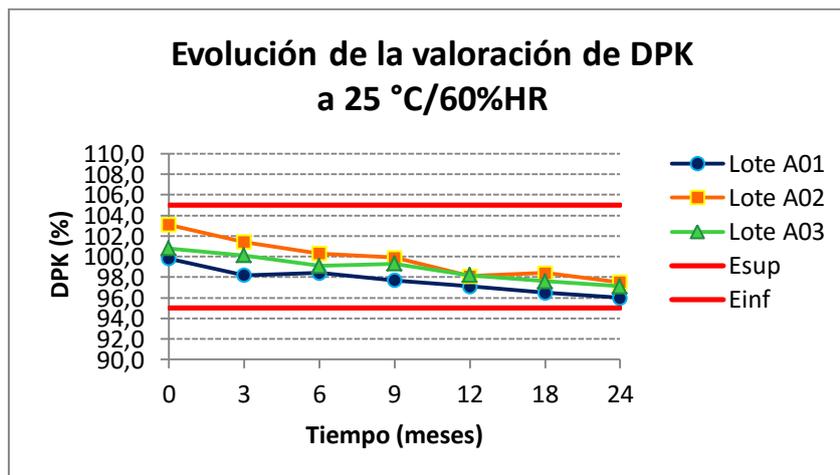


Figura 9.18 Gráfico de la evolución del contenido en DPK a 25 °C/60% HR

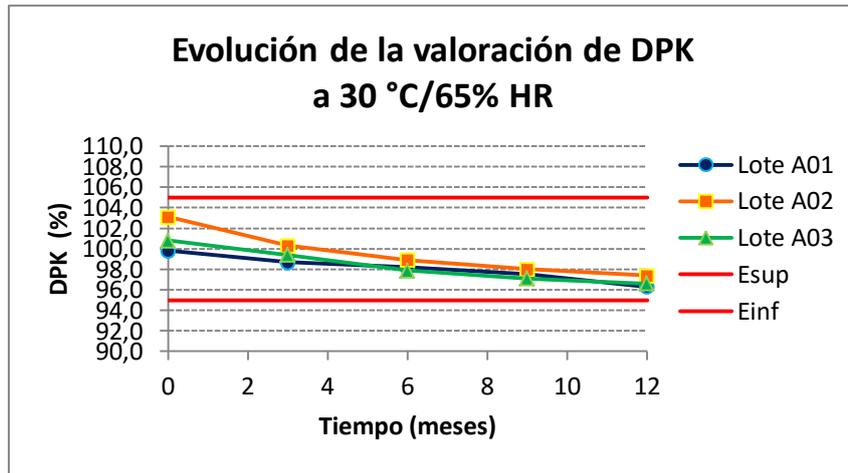


Figura 9.19 Gráfico de la evolución del contenido en DPK a 30 °C/65% HR

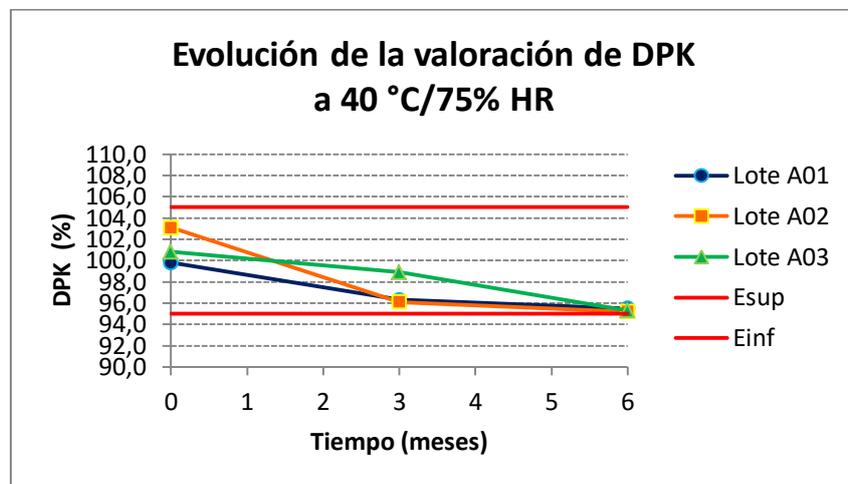


Figura 9.20 Gráfico de la evolución del contenido en DPK a 40 °C/75% HR

9.4.4.6. Valoración de los filtros solares

Como se puede apreciar en las Figuras 9.21 a 9.26, los contenidos en OCT y AVB de los tres lotes fabricados y almacenados en las distintas condiciones climáticas, se encuentran dentro de las especificaciones establecidas: 90,0 – 100,0%.

Sin embargo, se observa una suave tendencia a la baja de ambos filtros solares a lo largo del tiempo en las tres condiciones climáticas.

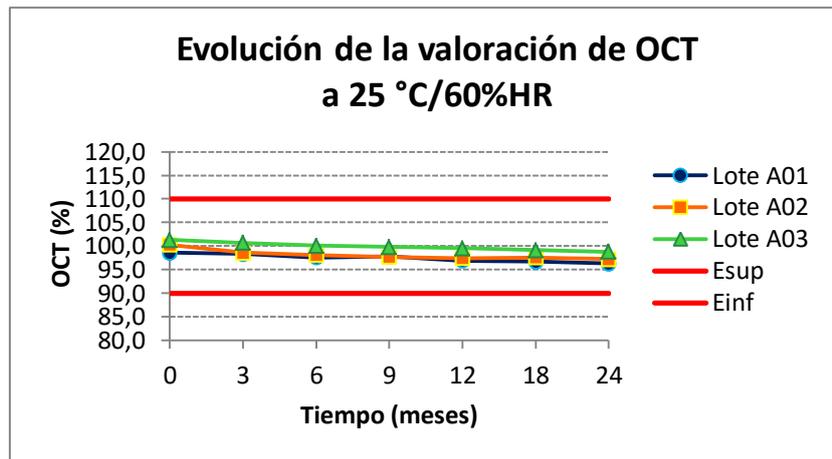


Figura 9.21 Gráfico de la evolución del contenido en OCT a 25 °C/60% HR

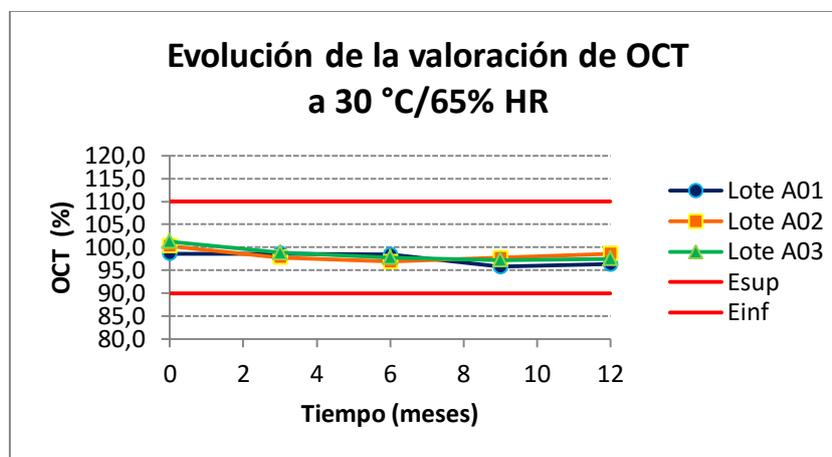


Figura 9.22 Gráfico de la evolución del contenido en OCT a 30 °C/65% HR

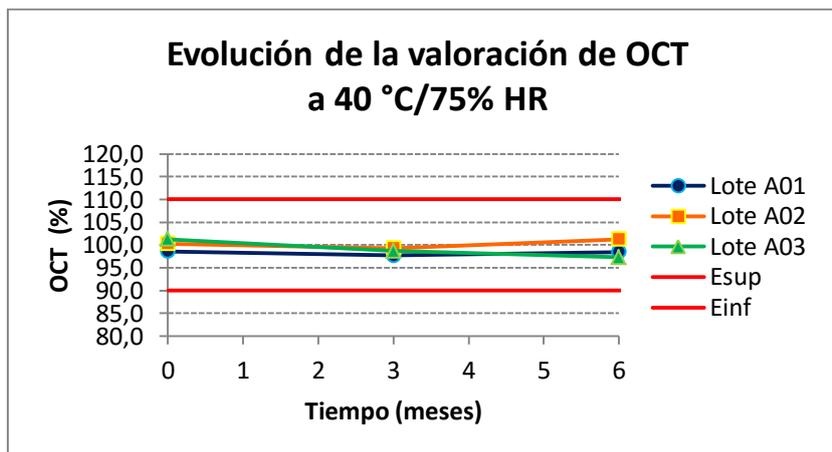


Figura 9.23 Gráfico de la evolución del contenido en OCT a 40 °C/75% HR

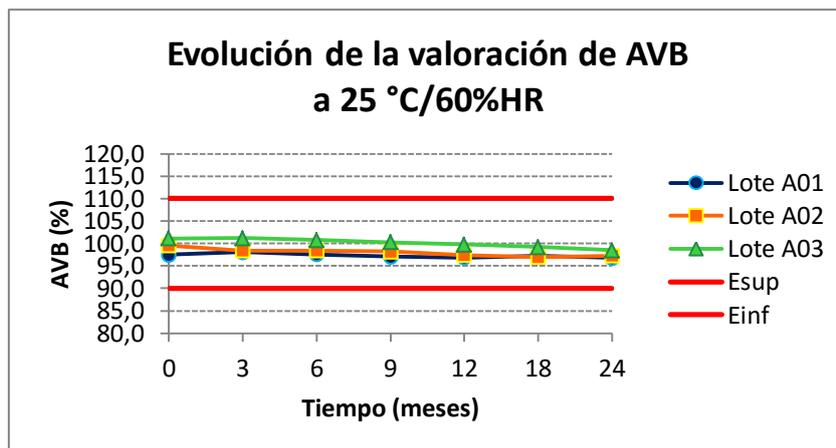


Figura 9.24 Gráfico de la evolución del contenido en AVB a 25 °C/60% HR

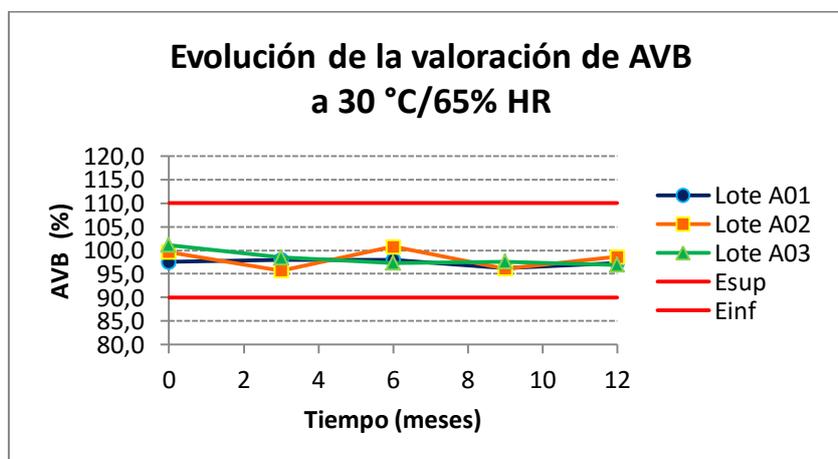


Figura 9.25 Gráfico de la evolución del contenido en AVB a 30 °C/65% HR

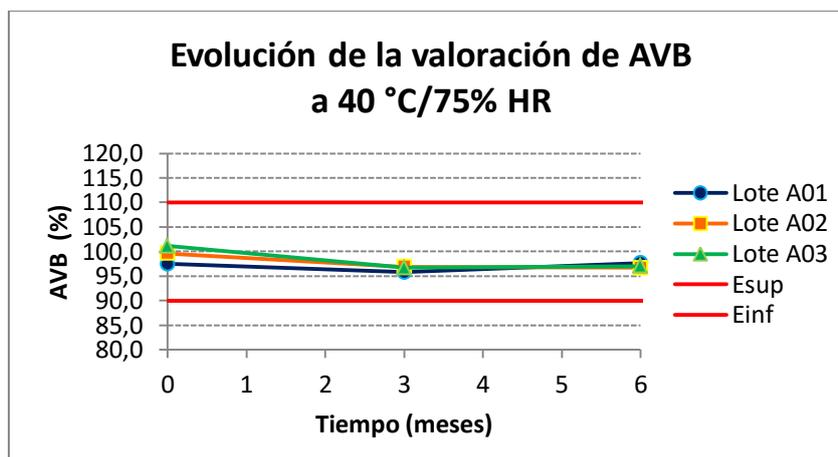


Figura 9.26 Gráfico de la evolución del contenido en AVB a 40 °C/75% HR

9.4.4.7. Valoración de los antioxidantes

Como puede observarse en la Figuras 9.27 a 9.32, los valores del contenido en antioxidantes (BHA y BHT) de los tres lotes a lo largo del estudio de estabilidad a las tres condiciones de almacenamiento presentan una disminución muy brusca obteniéndose valores fuera de especificaciones desde tiempos relativamente cortos.

El hecho de que la cantidad de antioxidante disminuya a lo largo del tiempo es aceptable puesto que indica que la acción que el antioxidante está realizando su función. En el estudio de estabilidad a largo plazo, por un lado, el aspecto de la crema se mantiene constante a lo largo del tiempo, sin presentar cambios en el color hacia tonos amarillentos que indicaría la oxidación de algunos componentes de la fase oleosa de la emulsión. Por otra parte, el contenido en HQ también se mantiene estable, dentro de especificaciones a lo largo del tiempo, siendo la HQ una sustancia reductora, es decir, con tendencia natural a la oxidación.

En consecuencia, a pesar de los valores de BHA y BHT por debajo de las especificaciones de producto terminado a lo largo del tiempo, se considera que la crema mantiene sus propiedades de estabilidad puesto que tanto el aspecto como el contenido en los principios activos es correcto tal y como demuestra el estudio de estabilidad a largo plazo (25 °C/60% HR).

En el caso de estos excipientes funcionales (antioxidantes, conservantes, etc.) se acepta que la especificación a la fecha de caducidad sea distinta que la establecida para la liberación del lote, puesto que si desarrolla correctamente su función de forma lógica debe disminuir su cantidad inicial a lo largo del tiempo.

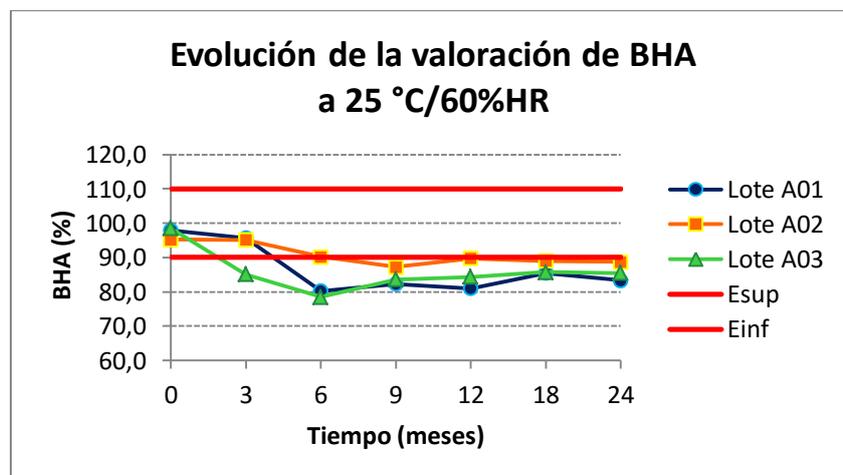


Figura 9.27 Gráfico de la evolución del contenido en BHA a 25 °C/60% HR

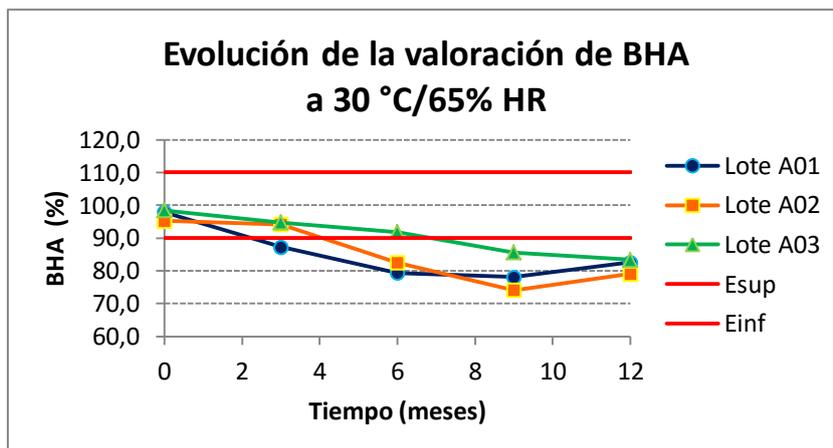


Figura 9.28 Gráfico de la evolución del contenido en BHA a 30 °C/65% HR

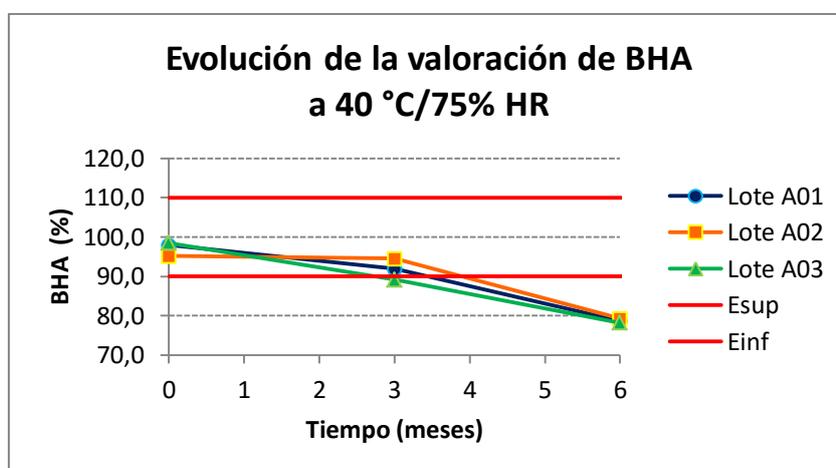


Figura 9.29 Gráfico de la evolución del contenido en BHA a 40 °C/75% HR

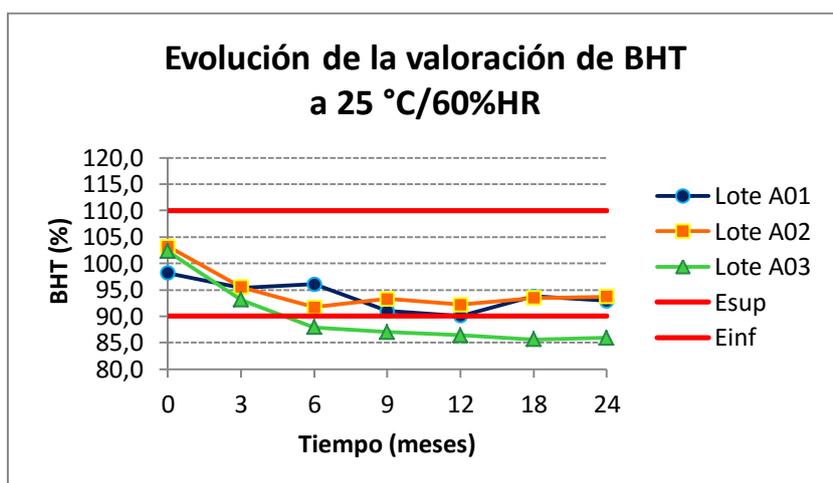


Figura 9.30 Gráfico de la evolución del contenido en BHT a 25 °C/60% HR

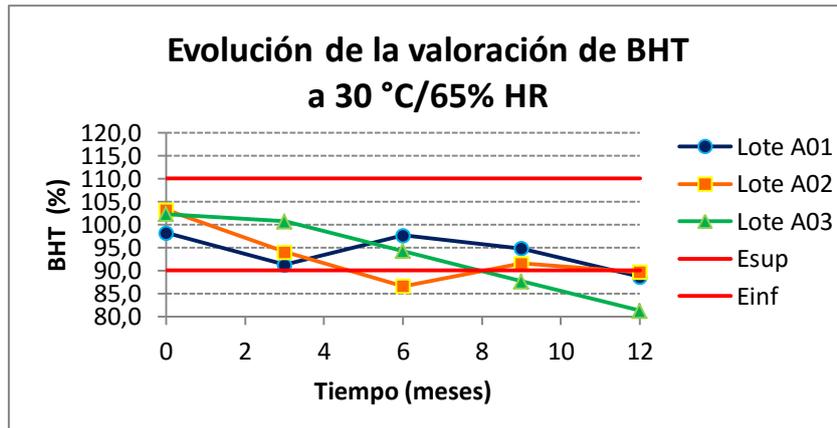


Figura 9.31 Gráfico de la evolución del contenido en BHT a 30 °C/65% HR

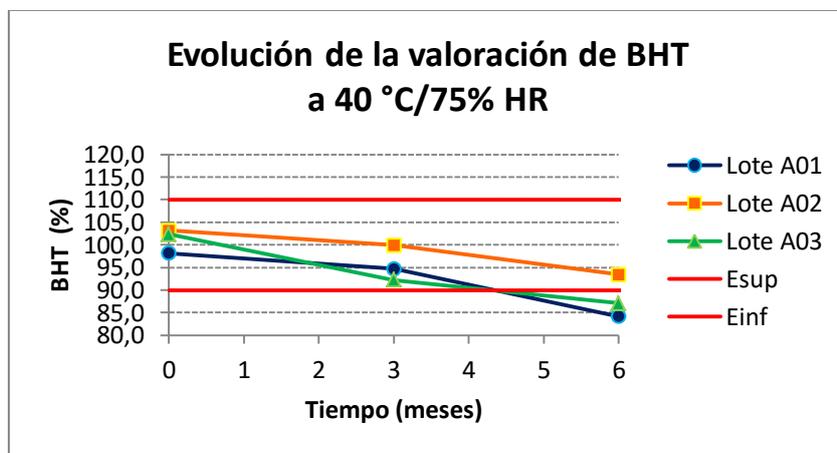


Figura 9.32 Gráfico de la evolución del contenido en BHT a 40 °C/75% HR

9.4.4.8. Valoración de las sustancias relacionadas

A lo largo de todo el estudio de estabilidad en las tres condiciones climáticas evaluadas, en todos los lotes se obtienen unos valores de sustancias relacionadas tanto individuales como totales correctos, acorde con las especificaciones establecidas para el producto terminado, $\leq 0,2\%$ para la sustancia relacionada individual y $\leq 2,0\%$ para las sustancias relacionadas totales, tal y como se refleja en las Figuras 9.33 a 9.35 para la sustancia relacionada individual y en las Figuras 9.36 a 9.38 para las sustancias relacionadas totales.

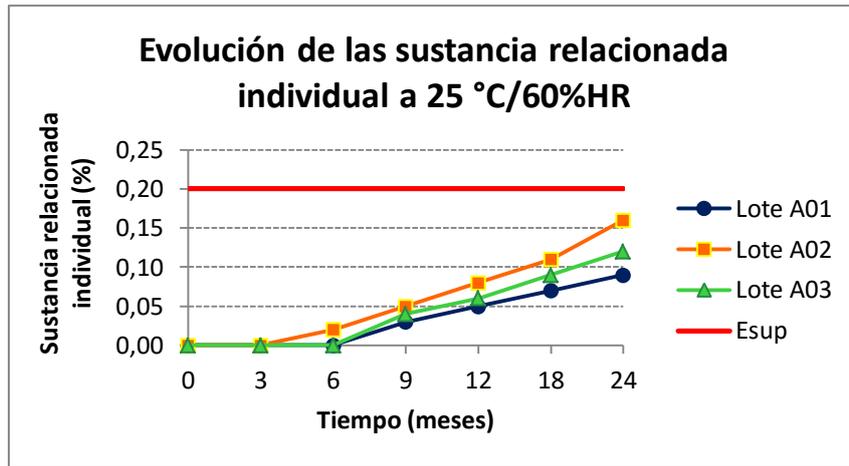


Figura 9.33 Gráfico de la evolución del contenido de la sustancia relacionada individual a 25 °C/60% HR

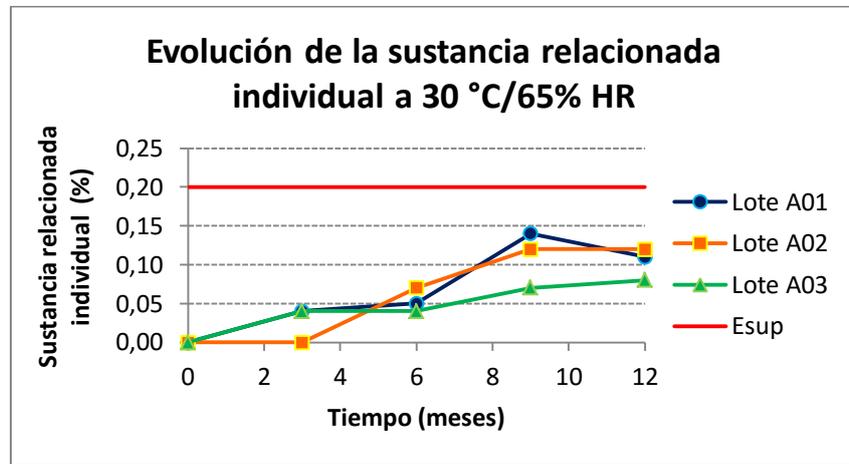


Figura 9.34 Gráfico de la evolución del contenido de la sustancia relacionada individual a 30 °C/65% HR

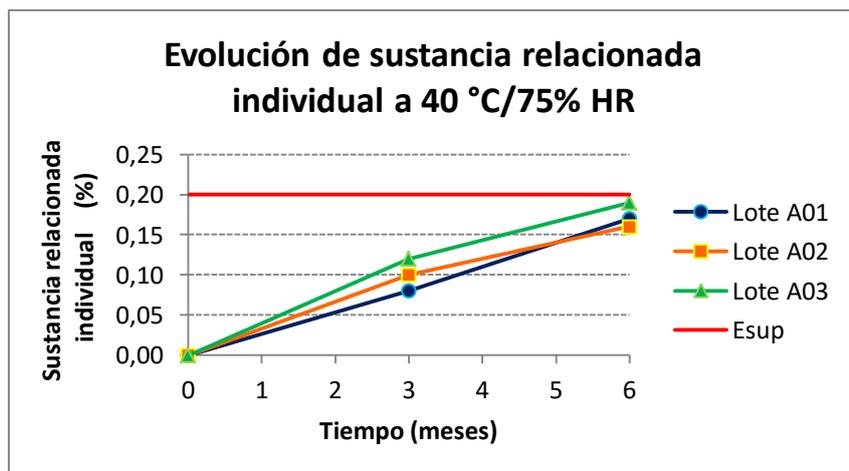


Figura 9.35 Gráfico de la evolución del contenido de la sustancia relacionada individual a 40 °C/75% HR

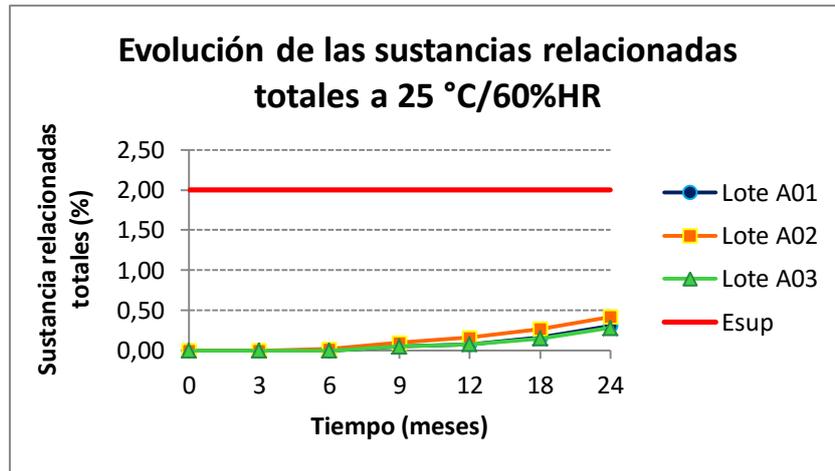


Figura 9.36 Gráfico de la evolución del contenido de las sustancias relacionadas totales a 25 °C/60% HR

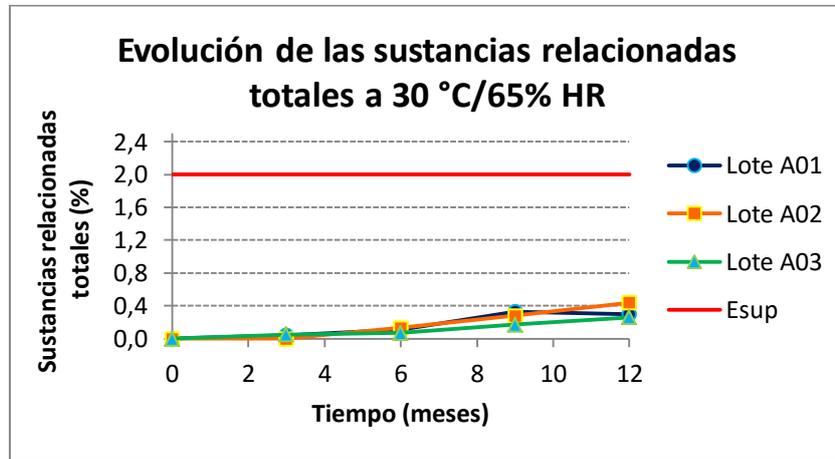


Figura 9.37 Gráfico de la evolución del contenido de las sustancias relacionadas totales a 30 °C/65% HR

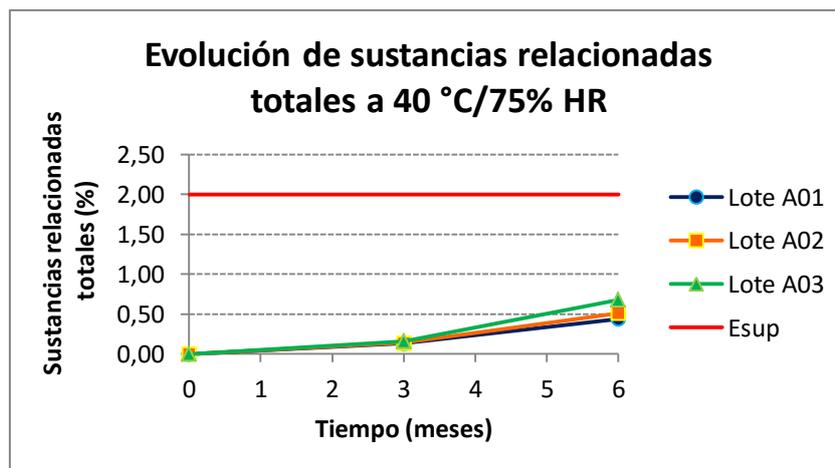


Figura 9.38 Gráfico de la evolución del contenido de las sustancias relacionadas totales a 40 °C/75% HR

CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

En la Figura 9.39 y 9.40 se muestran los cromatogramas obtenidos para el lote A02 a los 6 meses de conservación a 40 °C/75% HR y a los 24 meses de conservación a 25 °C/60% HR, respectivamente.

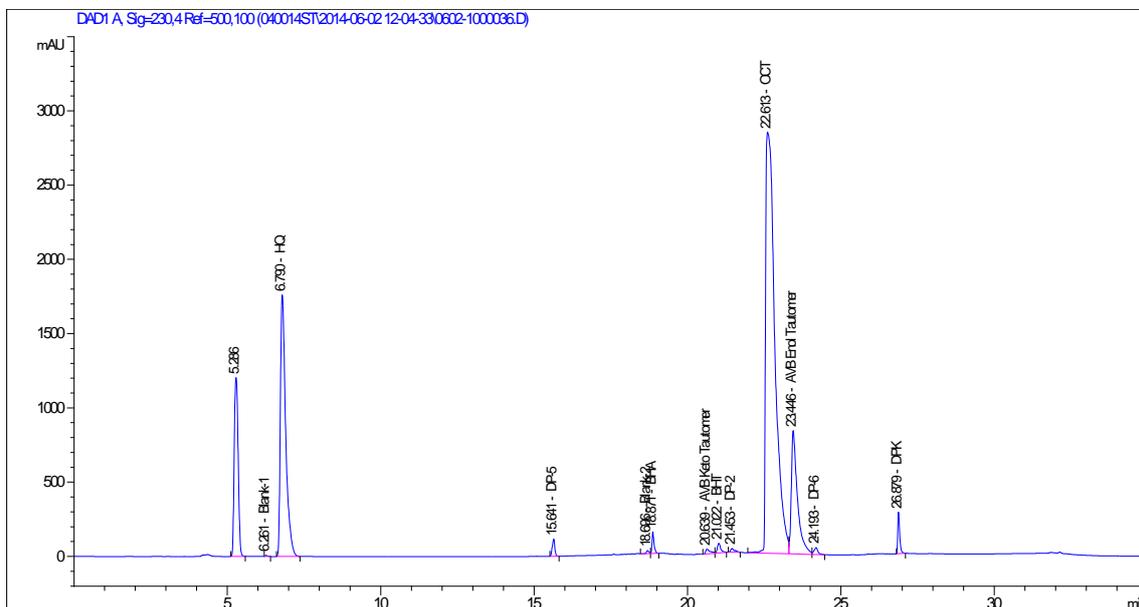


Figura 9.39 Cromatograma del lote A02 a los 6 meses de conservación a 40 °C/75% HR

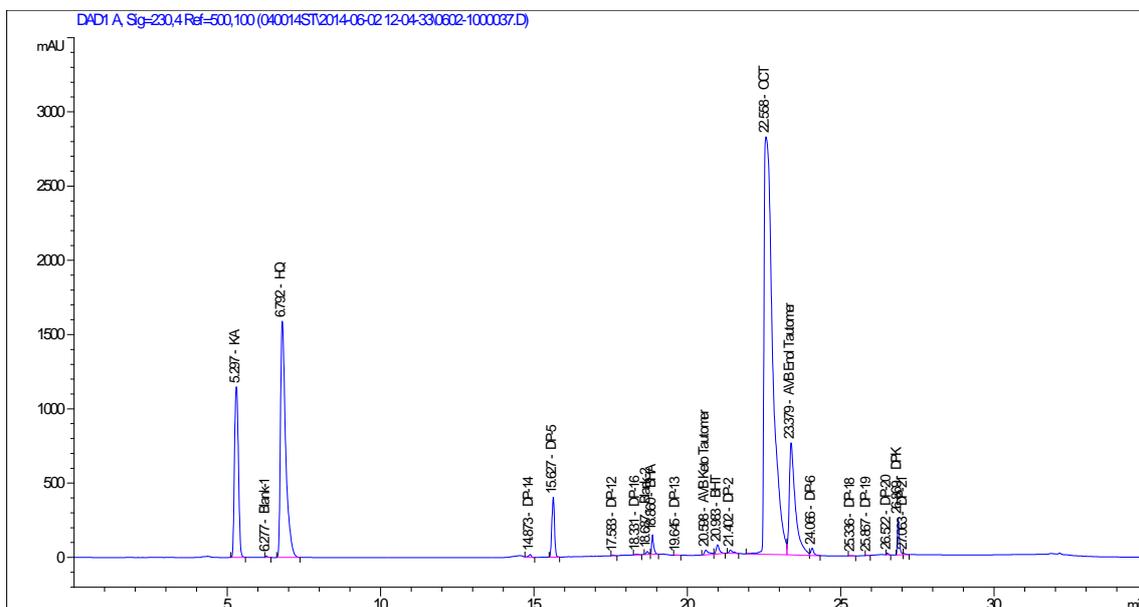


Figura 9.40 Cromatograma del lote A02 a los 24 meses de conservación a 25 °C/60% HR

9.4.4.9. Control microbiológico

Todos los análisis realizados de los tres lotes a lo largo del estudio almacenados en las diferentes condiciones climáticas cumplen con las especificaciones propuestas del producto. Por tanto, la crema mantiene la calidad microbiológica a lo largo del tiempo.

9.5. CONCLUSIONES

- Los tres lotes estudiados (A01, A02 y A03) cumplen con todas las especificaciones propuestas para la liberación del lote a lo largo de 24 meses en la condición climática de 25 °C/60% HR, con excepción del contenido en BHA y BHT en que, a partir de los 6 meses, disminuyen cuantitativamente, lo que obliga a establecer para ellos unas nuevas especificaciones al tiempo de caducidad.
- A 25 °C/60% HR se observa una disminución a lo largo de tiempo en la viscosidad que está relacionado con un aumento de la extensibilidad, mientras el aspecto de la crema se mantiene constante a lo largo de 24 meses.
- Se observa una ligera disminución en el contenido de HQ y KA a lo largo del tiempo cumpliendo las especificaciones propuestas a lo largo del estudio.
- Se observa una tendencia positiva en la sustancia relacionada individual y también en las sustancias relacionadas totales, aunque a los 24 meses se observan unos valores muy inferiores a los límites de las especificaciones propuestas.
- En el resto de condiciones estudiadas, 30 °C/65% HR y 40 °C/75% HR, a lo largo del estudio se observa un cambio significativo en el aspecto: se da la separación de fases adquiriendo un color amarillento. Esto hace imposible la realización de los ensayos de viscosidad y extensibilidad en algunos puntos del estudio. Sin embargo, el contenido en los APIs, filtros solares y sustancias relacionadas cumplen con las especificaciones propuestas.
- En vista de los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad se propone un periodo de validez de 2 años para la crema formulada y unas condiciones especiales de conservación a temperatura inferior a 25 °C.
- Se propone establecer una nueva especificación de BHA y BHT al tiempo de caducidad: $\geq 50,0\%$ para BHA y $\geq 60,0\%$ para BHT.

10. DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

El análisis farmacéutico moderno abarca mucho más que el análisis de APIs, excipientes o producto terminado. El objetivo principal del análisis farmacéutico es asegurar la calidad del producto terminado. En consecuencia, la calidad no puede ser sólo ensayada en el producto terminado pero una planificación correcta de los ensayos con una metodología e instrumentación adecuadas puede ayudar a construir la calidad en el producto terminado. La calidad debe ser incorporada en el producto terminado por medio de un conocimiento profundo del producto que se ha desarrollado y del proceso de fabricación, junto con un conocimiento de los riesgos involucrados en la fabricación del producto y la mejor forma para minimizar esos riesgos [121].

El proceso de desarrollo farmacéutico de la crema despigmentante ha conestado de diferentes fases. El objetivo de la primera fase, etapa de preformulación, fue obtener una mejor comprensión del API mediante la caracterización del éste y estudiar las posibles interacciones con otras sustancias, ya fuesen otros posibles principios activos para formar una combinación o una serie de excipientes adecuados para el desarrollo de una formulación de una forma farmacéutica semi-sólida. Así, para facilitar el desarrollo de una metodología de análisis y conocer las vías de degradación del API se realizó el estudio de degradaciones forzadas resultando en un método de fase reversa de cromatografía líquida de alta resolución (RP-HPLC) *stability-indicating* con un tiempo de análisis de 50 minutos. La información obtenida en esta primera etapa del desarrollo conduce a una futura mejor comprensión del desarrollo galénico de la formulación. Así, el objetivo per se no fue desarrollar un método de análisis rápido para el API sino un desarrollar un método analítico que pudiese detectar un perfil completo de degradación para la HQ dejando para futuras etapas la reducción del tiempo de análisis.

La segunda etapa en el proceso de desarrollo farmacéutico es la fase de investigación y desarrollo galénico de la formulación teniendo como objetivo desarrollar la mejor formulación, en forma farmacéutica crema para aplicación por vía tópica, que incluya la combinación de los tres principios activos seleccionados. Por tanto, era necesario disponer de una metodología analítica adecuada para dar soporte al desarrollo galénico de la formulación. Debido a la gran cantidad de prototipos y pruebas

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

realizadas en este estadio, el método de análisis debía ser relativamente corto, por lo que se adaptó y optimizó el método anterior obteniendo un método con un tiempo de análisis de 14 minutos.

Una vez desarrollado el prototipo de formulación más adecuado y realizados los estudios de estabilidad preliminar, el proceso de elaboración de la crema fue escalado a nivel industrial para fabricar los lotes comerciales de 120 kg. Pensando en la gran cantidad de muestras que se generan en la fase de industrialización, se optimizó el método de RP-HPLC transfiriéndolo a UPLC, consiguiendo una reducción del tiempo de análisis de 14 a 3 minutos.

Uno de los APIs seleccionados en la fase de preformulación fue el DPK, de naturaleza totalmente apolar. Esta característica fue determinante para su análisis ya que no fue posible su detección y cuantificación mediante el método RP-HPLC desarrollado. Por esta razón, durante todas estas fases (preformulación, desarrollo galénico e industrialización), el DPK siempre fue determinado individualmente con un método cromatográfico de permeación en gel (GPC) desarrollado con un tiempo de análisis de 5 minutos.

Posteriormente, cuando se planifican los estudios de estabilidad y la transferencia de los métodos analíticos a Control de Calidad, se constata que aun siendo el tiempo de análisis corto, la metodología analítica involucrada es demasiado costosa debido a la duplicidad de análisis, uno para determinar el contenido en DPK y el otro para valorar el resto de compuestos. Debido a que también se deben controlar los productos de degradación formados durante los estudios de estabilidad, inicialmente se piensa en utilizar el método de RP-HPLC desarrollado durante la fase de preformulación adaptándolo y optimizándolo para conseguir separar todos los compuestos. Para evitar los costes asociados a la duplicidad de análisis, se decide desarrollar y validar un método capaz de determinar simultáneamente los 7 compuestos en estudio (HQ, KA, DPK, OCT, AVB, CHA y BHT) y sus correspondientes sustancias relacionadas.

No existe ninguna guía oficial que indique la secuencia óptima de experimentos analíticos necesarios para el desarrollo de un método, ya que depende del mismo método. No obstante, el desarrollo lógico de un método transcurre en una serie de etapas [133]:

- Definición de las características requeridas en el método: precisión exigida, grado de selectividad, sensibilidad deseada, tiempo de análisis, coste, tamaño de la muestra, tipo de equipo, etc.

- Puesta a punto: la puesta a punto incluye desde los primeros estudios de tanteo con soluciones patrón hasta la preparación de la solución problema, siendo la comprobación de la idoneidad del sistema parte integral del método.
- Estudios de estabilidad de la solución problema: la estabilidad de la solución problema preparada para analizar se evalúa durante la fase de desarrollo del método junto con la robustez (optimización de los parámetros cromatográficos críticos).
- Verificación de las características de fiabilidad: se deben conocer las características de fiabilidad de un método para su aplicación en rutina que comprenden los cinco criterios fundamentales de validación – selectividad, linealidad y rango, precisión, exactitud y límite de cuantificación –.

La utilización de estos procedimientos analíticos a lo largo del desarrollo farmacéutico, implica la verificación de que éstos funcionan correctamente según lo previsto, es decir, los métodos deben ser validados.

Toda validación comienza a partir de un método ya probado y ajustado. La validación de un método analítico es el procedimiento por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son adecuados para el uso previsto. Más específicamente, la validación de un método analítico 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 atributos de calidad previamente establecidos [134].

Dicha demostración debe ser documentada mediante un protocolo de validación y el correspondiente informe. En el protocolo debe constar el objetivo, la definición del sistema a validar, la identificación de los parámetros, el diseño del plan experimental y los criterios de aceptación.

Se debe tener en cuenta que los aparatos o instrumentos que se utilizan para el desarrollo del procedimiento analítico y la posterior validación, deben estar cualificados – características del aparato deben estar verificadas –.

El personal técnico debe estar formado, es decir, poseer unos conocimientos y una preparación adecuados al tipo de estudios que vayan a realizarse así como experiencia en las técnicas a emplear.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Los métodos que deben validarse son los siguientes [135]. Los parámetros de validación requeridos en cada caso se muestran en la Tabla 10.1, según ICH Q2A (R1) [135].

- Ensayos de identificación: ensayos destinados a garantizar la identidad de un analito en una muestra por comparación de una propiedad de la muestra con la de un patrón de referencia.
- Ensayos para la determinación del analito de interés en un API o en un producto terminado: están destinadas a medir el analito presente en una muestra dada. El ensayo representa una medida cuantitativa del componente principal, API. Para producto terminado, parámetros similares de validación se aplican al ensayo para cuantificar el API u otros componentes. Los mismos parámetros de validación también pueden aplicarse a los ensayos asociados con otros procedimientos analíticos (por ejemplo, ensayo de disolución).
- Ensayos límite de impurezas o cuantificación de impurezas: sea el tipo de ensayo que sea, está diseñado para reflejar con precisión las características de pureza de la muestra. Se requieren diferentes parámetros de validación según se trate de un ensayo límite o un ensayo cuantitativo.

Tabla 10.1 Parámetros de validación requeridos para en sayos de identificación, impurezas y valoración [132]

Type of analytical procedure	Identification	Testing for impurities		Assay: Dissolution (measurement only) Content/potency
		Quantitation	Limit	
Accuracy	–	+	–	+
Precision				
Repeatability	–	+	–	+
Intermediate precision	–	+ ^a	–	+ ^a
Specificity ^b	+	+	+	+
Detection limit	–	– ^c	+	–
Quantitation limit	–	+	–	–
Linearity	–	+	–	+
Range	–	+	–	+
Solution stability	–	+	+	+

^aIn cases where reproducibility has been performed, intermediate precision is not needed.

^bLack of specificity of one analytical procedure could be compensated by other supporting analytical procedure(s).

^cMay be needed in some cases.

–, signifies that this characteristic is not normally validated; +, signifies that this characteristic is normally validated.

Los parámetros de validación se definen tal y como se explica a continuación [133].

I. Selectividad

Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar de forma simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestras.

II. Linealidad

Capacidad de un método analítico para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

III. Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La precisión se considera a tres niveles:

- a. **Repetibilidad:** expresa la precisión del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra bajo las mismas condiciones de operación durante un corto intervalo de tiempo.
- b. **Precisión intermedia:** expresa la precisión método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, dentro del mismo laboratorio, bajo condiciones operativa diferentes: diferentes días, diferentes analistas, los diferentes equipos, etc.
- c. **Reproducibilidad:** expresa la precisión método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra bajo condiciones operativas distintas y en distintos laboratorios.

IV. Exactitud

La exactitud de un método analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

V. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación de un método analítico es la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud.

VI. Límite de detección

El límite de detección de un método analítico es la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar.

VII. Robustez

La robustez de un método analítico es la capacidad de permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o “estabilidad” durante su empleo en rutina.

VIII. Idoneidad del sistema

La idoneidad del sistema es la comprobación efectuada en el sistema cromatográfico antes de empezar cualquier análisis para verificar que la resolución y la precisión instrumental del sistema es la adecuada para el análisis que se realizará a continuación.

10.1. DETERMINACIÓN DE HQ y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN POR HPLC

10.1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de la etapa de preformulación es obtener el conocimiento fundamental que sea de utilidad para:

- el desarrollo correcto de la formulación del producto farmacéutico seleccionando la forma del API (sal, polimorfo, etc.), los excipientes y la forma farmacéutica para que sea estable y biodisponible
- caracterizar el API y, si es necesario, su proceso de obtención para seleccionar el proveedor

En resumen, las actividades englobadas en la etapa de preformulación se dirigen hacia la plena comprensión de la química del API para desarrollar un producto farmacéutico adecuado a las necesidades planteadas [102]. Desde la perspectiva cromatográfica es un proceso iterativo ya que por un lado es necesario separar un conjunto de impurezas y productos de degradación del API y por otro lado, se debe avanzar en el desarrollo del producto farmacéutico [121].

Una de las cuestiones más importantes a considerar en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos es la estabilidad química de los principios activos, ya que afecta a la seguridad y eficacia del medicamento. Las directrices de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) sobre los estudios de estabilidad exigen el análisis de las muestras en estabilidad y la evaluación de los datos obtenidos de ellos para conocer y entender los cambios que pueden ocurrir con el transcurso del tiempo, tanto en principio activo como en producto farmacéutico debido a la influencia de varios factores ambientales como la temperatura y la humedad. En consecuencia, el conocimiento de las características de estabilidad inherentes al API ayuda a seleccionar la formulación y el tipo de envasado más adecuado, así como el establecimiento de las condiciones de almacenamiento más adecuadas y la vida útil, requeridos en la documentación regulatoria [136,137].

La directriz ICH Q1A también recomienda la realización de degradaciones forzadas en API para establecer sus características de estabilidad inherentes, lo que lleva a la separación e identificación de los productos de degradación, el establecimiento de las

vías de degradación y por tanto, el apoyo a la idoneidad de los procedimientos analíticos propuestos [135]. También se requiere que los procedimientos analíticos usados para el análisis de las muestras de estabilidad, es decir, el método de HPLC debe ser *stability-indicating* y deben estar plenamente validado [125,138]. Un método *stability-indicating* es un procedimiento de análisis cuantitativo validado que puede detectar los cambios que se pueden dar, en función del tiempo, en las propiedades tanto del API como del producto acabado, midiendo con precisión los APIs, sin la interferencia de productos de degradación, impurezas del proceso, excipientes, u otras impurezas potenciales [139].

En este contexto, el objetivo principal del desarrollo de métodos en la etapa de preformulación, es obtener el conocimiento químico fundamental del API para facilitar la formulación del producto farmacéutico [121].

Así, el elemento clave en el desarrollo del método de HPLC, adecuado para los presentes objetivos, incluye la generación de productos de degradación. Éstos se generan a través de la degradación forzada de acuerdo con el requisito de la directriz ICH bajo la cual se debe evaluar el comportamiento de degradación en las condiciones de ácido, base, oxidación, fotodegradación, humedad y temperatura llevando a cabo la identificación y caracterización de los productos de degradación con las técnicas analítica adecuadas [140].

Para llevar a cabo lo explicado hasta este punto, se desarrolla un método de HPLC *stability-indicating*, compatible con cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas (LC/MS). Se llevan a cabo los estudios de degradación forzada identificando cada uno de los productos de degradación formados por LC/MS. Posteriormente, se valida el método según la directriz ICH Q2B [135].

10.1.2. MATERIALES

10.1.2.1. *Patrones*

HQ (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

p-Benzoquinona (reagent grade $\geq 98\%$). Sigma-Aldrich (St.Luis, MI, USA)

10.1.2.2. *Reactivos y soluciones*

Reactivos:

Metanol (para UV, IR, HPLC, GPC). Panreac (Barcelona, España)

(MeOH)

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Acetonitrilo (para UV, IR, HPLC, ACS). Panreac (Barcelona, España) (ACN)

Ácido acético glacial (para HPLC). Panreac (Barcelona, España) (HAcO)

Ácido clorhídrico 37% (RFE, BP, Ph.Eur.) PRS-CODEX. Panreac (Barcelona, España)

Sodio Hidróxido 0,1 mol/l (0,1N) SV. Panreac (Barcelona, España)

Hidrógeno Peróxido 33% p/v (110 vol.) estabilizado (USP, BP, Ph. Eur.) puro, grado farma. Panreac (Barcelona, España)

Sodio Carbonato anhidro (USP-NF, BP, Ph.Eur.) puro, grado farma. Panreac (Barcelona, España)

di-Potasio Hidrógeno Fosfato anhidro (Ph.Eur., BP, USP) grado GMP – IPEC. Panreac (Barcelona, España)

Acetato amónico (Reag. Ph.Eur.) para análisis, ACS. Panreac (Barcelona, España)

Sulfato amónico (Reag. Ph.Eur.) para análisis, ACS, ISO. Panreac (Barcelona, España)

Quinine hydrochloride dihydrate (analytical standard). Sigma-Aldrich (St. Luis, MI, USA)

Agua calidad HPLC se obtuvo a través de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Soluciones preparadas en el laboratorio:

- Hidróxido sódico 0,01 N: Transferir 10 ml de la solución hidróxido sódico 0.1 N SV a un matraz aforado de 100 ml. Enrasar con agua purificada y homogeneizar.
- Ácido clorhídrico 1 N: En un matraz aforado de 1 l, que contenga unos 700 ml de agua purificada, transferir 83 ml de ácido clorhídrico 37% (RFE, BP, Ph.Eur.). Enrasar a 1 l con agua purificada.
- Ácido clorhídrico 0,1N: Transferir 10 ml de la solución de ácido clorhídrico 1 N a un matraz aforado de 100 ml. Enrasar con agua purificada y homogeneizar.
- Agua oxigenada al 10%: Transferir 150 ml de hidrógeno peróxido 33% (USP, BP, Ph.Eur.) a un matraz aforado de 500 ml. Enrasar con agua purificada y homogeneizar.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

- Carbonato sódico 0,2 M: Pesar 2,12 g de carbonato sódico anhidro (USP, BP, Ph.Eur.) y disolver en 1 l de agua purificada.
- Carbonato sódico 0,02 M: Transferir 10 ml de la solución de carbonato sódico 0,2 M a un matraz aforado de 100 ml. Enrasar con agua purificada y homogeneizar.
- Quinina al 2%: Pesar 2 g de quinina monohidrocloruro dihidrato en un matraz 100 ml. Disolver y enrasar en H₂O purificada.

10.1.2.3. Aparatos y utillaje

Aparatos:

Balanza analítica BP211D Sartorius (Gotinga, Alemania)

Baño de ultrasonidos Ultrasons 9 L Selecta (Barcelona, España)

Agitador magnético Agimatic ED Selecta (Barcelona, España)

Centrifuga Meditronic P Selecta (Barcelona, España)

HPLC 1200 Agilent que consiste en un horno de columna, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de red de diodos (DAD), controlado por el software Chemstation versión B04.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA); códigos internos CQ33, CQ51

Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) acoplado a un detector de espectrometría de masas (cuadrupolo híbrido) de tiempo de vuelo QSTAR Elite (ABSciex, Concord, Ontario, Canada) equipado con una fuente de ionización pro electrospray (ESI), controlado por el software Analyst QS 2.0 software (ABSciex, Concord, Ontario, Canada).

Estufa T5028 Heraeus

Cámara de fotoestabilidad SunTest CPS+ Atlas (Mount Prospect, IL, USA) equipada con una lámpara de Xenon de acuerdo con la opción 1 de la directriz ICH Q1B

Espectrofotómetro UV-Visible HP8452A DAD Hewlett Packard

Utillaje:

Espátulas de acero inoxidable de diferentes dimensiones

Vasos de precipitados de distintos volúmenes (25 ml, 100 ml, 1 l)

Probetas de distintos volúmenes (10 ml, 100 ml, 1 l) Clase A graduada

Pesasustancias

Desecador de vidrio Simax con grifo en la tapa esmerilada

Matraces aforados de 10, 25, 50 y 100 ml Clase A

Tubos centrífuga de 10 ml

Pipeta doble aforo 1, 2, 5 y 10 ml Clase A

Botella 1 l Pyrex con tapón

Jeringas plástico 10 ml

Filtros de jeringa 33 0,45 μm Millex PVDF Millipore

Filtros de membrana 0,45 μm Durapore PVDF Millipore

Viales 2 ml HPLC

Pipetas Pasteur

Cronómetro Oregon Scientific

Columna cromatográfica Zorbax SB-Phenyl 5 μm , 80 Å, 4,6 x 250 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Columna cromatográfica Luna C18 5 μm , 100 Å, 4,6 x 250 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

Columna cromatográfica Symmetry C8 5 μm , 100 Å, 4,6 x 250 mm (Waters, Milford, MA, USA)

10.1.3. METODOLOGIA

10.1.3.1. Degradaciones forzadas

Las degradaciones forzadas se realizan de acuerdo con la ICH Q1A (R2) [136] y la ICH Q1B [137] tanto en solución como en estado sólido. En solución se realiza la degradación por hidrólisis en medio ácido, medio básico y neutro, oxidación y fotólisis.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

En estado sólido se llevan a cabo los estudios de degradación por temperatura y por humedad.

I. Degradaciones en solución

a. Hidrólisis en medio ácido

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de HQ en un matraz aforado de 25 ml. Añadir y enrasar con HCl y dejar reaccionar con agitación constante durante un tiempo determinado a 40 °C (ver condiciones en Tabla 10.1.1). A continuación, se deja atemperar a temperatura ambiente. Homogeneizar y transferir una alícuota de 1 ml a un matraz aforado de 10 ml. Neutralizar con la cantidad necesaria de NaOH diluida hasta pH 6 aproximadamente. Enrasar con diluyente y homogeneizar.

Tabla 10.1.1 Condiciones experimentales de reacción en medio ácido

Agente	Concentración (M)	Tiempo de reacción (h)
HCl	0,1	2
		24
HCl	1	2
		24

b. Hidrólisis en medio básico

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de HQ en un matraz aforado de 25 ml. Añadir y enrasar con Na₂CO₃ 0,02M. Dejar reaccionar con agitación constante durante un tiempo determinado a temperatura ambiente (ver condiciones en Tabla 10.1.2). A continuación, homogeneizar y transferir una alícuota de 1 ml a un matraz aforado de 10 ml. Neutralizar con la cantidad necesaria de HCl 0,01M hasta pH 6 aproximadamente. Enrasar con diluyente y homogeneizar.

Tabla 10.1.2 Condiciones experimentales de reacción en medio básico

Agente	Concentración (M)	Tiempo de reacción
Na ₂ CO ₃	0,02	2 horas
		1 día
		5 días
		15 días

c. Hidrólisis neutra

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de HQ en un matraz aforado de 25 ml. Añadir y enrasar con agua purificada Milli-Q. Dejar reaccionar con agitación constante durante 24 horas a 40 °C. A continuación, homogeneizar y transferir una alícuota de 1 ml a un matraz aforado de 10 ml. Enrasar con diluyente y homogeneizar.

d. Oxidación

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de HQ en un matraz aforado de 25 ml. Añadir y enrasar con H₂O₂ 10%. Dejar reaccionar con agitación constante durante un tiempo determinado a temperatura ambiente (ver condiciones en Tabla 10.1.3). A continuación, homogeneizar y transferir una alícuota de 1 ml a un matraz aforado de 10 ml. Enrasar con diluyente y homogeneizar.

Tabla 10.1.3 Condiciones experimentales de reacción en medio oxidante

Agente	Concentración (%)	Tiempo de reacción (h)
H ₂ O ₂	10	2
		24

e. Fotólisis

Pesar exactamente alrededor de 20 mg en un matraz aforado de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Se llena una cubeta de cuarzo de 5 cm con la solución preparada. Se llena otra cubeta de cuarzo de la misma forma y se envuelve en papel de aluminio, utilizar esta muestra como control oscuro para evaluar el efecto de la temperatura.

Llenar dos cubetas de cuarzo de 1 cm con solución de quinina al 2%, una de ellas envolverla en papel de aluminio para protegerla de la luz completamente y utilizarla como control.

Introducir todas las cubetas en el equipo de fotólisis Suntest Atlas y exponer las muestras a la radiación UV-A (200 Wh / m²) y la radiación visible (1,2 millones lux-hora) de acuerdo con la opción1 de la directriz ICH Q1B [137].

Después de 48 horas de exposición, se determina las absorbancias de la muestra de quinina y del control de quinina a 400 nm en el espectrofotómetro. Calcular el cambio en la absorbancia, $\Delta A = A_T - A_0$, que debe ser como mínimo de 0,5.

II. Degradaciones en estado sólido

f. **Temperatura**

Se extiende una capa de HQ en estado sólido de aproximadamente 1 mm de espesor en una placa de Petri. Se mantiene en las siguientes condiciones: estufa a 50 °C durante 1 mes y estufa a 105 °C durante 5 días. Una vez atemperada la muestra, pesar exactamente alrededor de 20 mg en un matraz aforado de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

g. **Humedad**

Se extiende una capa de HQ en estado sólido de aproximadamente 1 mm de espesor en una placa de Petri. Se mantiene en un desecador al 80% de humedad, sobre una solución saturada de sulfato amónico, durante 10 días. Una vez atemperada la muestra, pesar exactamente alrededor de 20 mg en un matraz aforado de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

10.1.3.2. Análisis de las degradaciones forzadas: desarrollo del método

A través de la búsqueda bibliográfica se puso de manifiesto que ningún método descrito hasta la fecha era *stability-indicating* y por tanto, apto para su aplicación en esta fase.

Dado que HQ tiene un buen espectro UV-Vis pudiéndose cuantificar a diferentes longitudes de onda y que además muestra un buen perfil de solubilidad tanto en metanol como en acetonitrilo, se pensó en desarrollar un método RP-HPLC con detección UV. Se llevaron a cabo varios ensayos para lograr una separación adecuada entre HQ y sus productos de degradación, incluyendo:

- Uso de varios disolventes orgánicos tales como acetonitrilo y metanol.

- Uso de varias soluciones y soluciones tampón (acuosa), a diferente pH, tales como ácido acético, fosfato potásico y acetato amónico.
- Uso de varias columnas cromatográficas con diferentes fases estacionarias incluyendo C8, C18 y fenilo.

La separación fue ensayada mediante la elución en gradiente – diferentes proporciones de fase acuosa y fase orgánica – en las diferentes columnas seleccionadas.

10.1.3.3. Estudios MS/TOF y LC-MS/TOF

La identificación de los productos de degradación se llevó a cabo mediante estudios de LC-MS/TOF (cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas/analizador de tiempo de vuelo) en ionización química atmosférica (APCI) en modo negativo en un rango de masas de 70 a 800 Da.

Los estudios espectrales de masas de alta resolución se llevaron a cabo después de una calibración adecuada del equipo. La optimización de las condiciones de MS se realizó mediante infusión directa de una solución patrón de HQ al 10% (40 µg/ml) y los parámetros de MS fueron optimizados de forma adecuada para obtener información clara sobre el pico del ion molecular de HQ.

Posteriormente, el método desarrollado (compatible con MS) se adaptó a LC-MS/TOF dividiendo (1:3) el flujo de fase móvil procedente del sistema HPLC, antes de la introducción en la fuente de ionización. Las muestras de degradación forzada se analizaron mediante LC-MS/TOF utilizando los parámetros optimizados para HQ. La identidad de cada producto de degradación se estableció con el análisis conjunto de los espectros de UV-Vis, de los espectros de masas y una búsqueda bibliográfica intensiva.

10.1.3.4. Validación del método

El método de HPLC es validado según la guía ICH Q2 [129] evaluándolo con respecto a la selectividad, linealidad, precisión y exactitud.

I. Selectividad

Tal y como se ha dicho anteriormente, la selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analitos, de

forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra [133].

Para demostrar la selectividad del método se estudia la pureza de pico de HQ, utilizando un detector DAD, en una mezcla de las siguientes soluciones de degradación forzada en una relación (1:1): degradación forzada por humedad y degradación forzada en medio básico 24 h (soluciones representativas de las degradaciones forzadas).

Verificar que la pureza de cada uno de los picos está por debajo del valor umbral de la pureza.

II. Límite de detección y cuantificación

La guía ICH Q2 [129] define el límite de detección como la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificado de forma exacta. Mientras que el límite de cuantificación es definido como la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser determinado cuantitativamente con una precisión y exactitud adecuadas.

El límite de detección de HQ se determina visualmente siendo la mínima concentración que pueda ser detectada cumpliéndose que la relación S/N (señal/ruido) para el pico de HQ sea superior o igual a 3.

El límite de cuantificación se determina a partir de la inyección de soluciones patrón de aquella concentración que cumpla que la relación S/N para el pico de HQ sea superior o igual a 10. Se verifica la concentración con la inyección de 6 soluciones patrón a dicha concentración.

Para el límite de cuantificación, calcular el RSD. El criterio de aceptación es $RSD \leq 10\%$.

III. Linealidad

Se estudia la linealidad del método en el rango desde el límite de cuantificación hasta el 120% del valor nominal de HQ: 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 50%, 80%, 100% y 120%, inyectando cada una de las soluciones en el sistema cromatográfico por triplicado.

Solución HQ 200%: Pesar exactamente alrededor de 40 mg de HQ en un matraz aforado de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

El resto de soluciones se preparan siguiendo la cascada de diluciones que se presenta en la Figura 10.1.1.

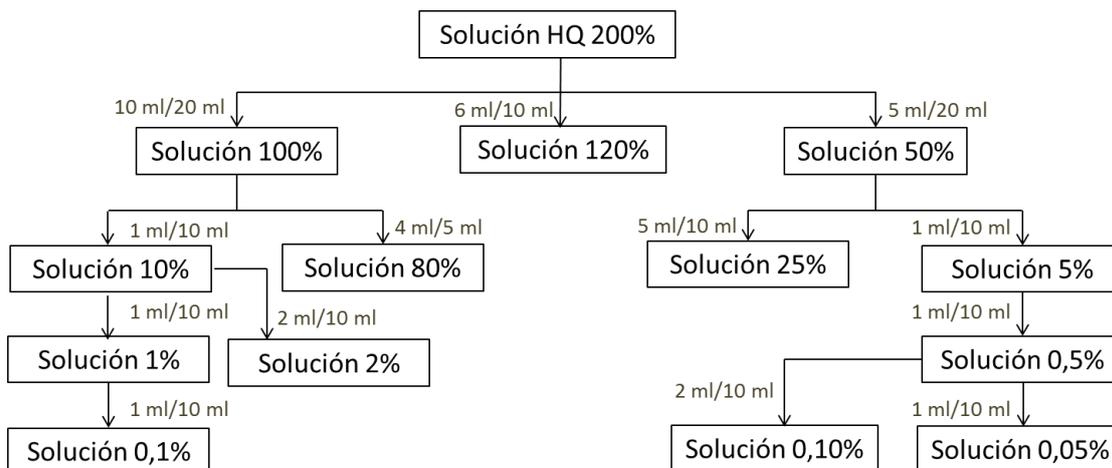


Figura 10.1.1 Esquema de diluciones para linealidad

Representar la respuesta *versus* concentración y calcular el coeficiente de correlación, la pendiente de la recta, la ordenada en el origen y el factor respuesta (respuesta/concentración). El criterio de aceptación es:

- $R^2 > 0.9990$
- La pendiente debe ser positiva
- La recta debe pasar por el origen

IV. Precisión

a. Instrumental

Para determinar la precisión instrumental para riqueza, se realizan 6 inyecciones consecutivas de una misma solución patrón al 100% y para determinar la precisión instrumental para productos de degradación, se realizan 6 inyecciones consecutivas de una misma solución patrón al 0,2%.

Solución patrón 100%: Pesar exactamente alrededor de 20 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución patrón 2%: Diluir 2 ml de la solución patrón 100% en un matraz aforado de 100 ml. Enrasar con diluyente y homogeneizar.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Solución patrón 0,2%: Diluir 1 ml de la solución patrón 2% en un matraz aforado de 10 ml. Enrasar con diluyente y homogeneizar.

Calcular el coeficiente de variación de las áreas obtenidas. El criterio de aceptación es:

- Para riqueza: $RSD \leq 1,5\%$
- Para productos de degradación: $RSD \leq 3,0\%$

b. Repetibilidad

Se estudia la repetibilidad del método mediante la realización de 3 análisis independientes de un lote de HQ API. Para cada uno de los análisis se preparan 2 soluciones patrón y 2 soluciones problemas siguiendo el procedimiento analítico (Anexo I).

Solución patrón 100%: Pesar exactamente alrededor de 20 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución problema: Pesar exactamente alrededor de 20 mg de API en un matraz aforados de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente y homogeneizar la solución.

La secuencia de inyección será:

- Inyectar 2 blancos
- Inyectar cada solución patrón por triplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Calcular la concentración de cada compuesto frente al patrón. El criterio de aceptación es:

- $RSD \leq 2,0\%$

c. Precisión intermedia

Se estudia la precisión intermedia mediante la realización de 3 análisis independientes, de la misma forma que en la repetibilidad, en un día distinto, realizado por un analista diferente, utilizando un HPLC y columna cromatográfica distintos.

Calcular el coeficiente de variación entre los resultados obtenidos para la repetibilidad y los resultados obtenidos en este segundo análisis. El criterio de aceptación es:

$$\text{RSD} \leq 2 \cdot \text{RSD}_{\text{REPETIBILIDAD}}$$

V. Exactitud

Se estudia la exactitud del método mediante la realización del análisis mediante 2 soluciones patrón y 3 problemas a 3 niveles diferentes de concentración de HQ.

Solución patrón 100%: Pesar exactamente alrededor de 20 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución problema: Pesar exactamente la cantidad de HQ indicada en la Tabla 10.1.4 en un matraces aforados de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente y homogeneizar la solución.

Tabla 10.1.4 Cantidades de HQ para la determinación de la exactitud

HQ (%)	Peso de HQ (mg)
50	10
100	20
150	30

La secuencia de inyección será:

- Inyectar 2 blancos
- Inyectar cada solución patrón por triplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Calcular la concentración de cada compuesto frente al patrón. El criterio de aceptación es:

- Recuperación: 98,0 – 102,0%

VI. Estabilidad de la solución

Se prepara la solución de HQ, se llenan viales de HPLC y se guarda en el carro del inyector a 15 °C. Inyectar la solución en los intervalos de tiempo 0, 24 y 48 horas después de su preparación. Calcular el RSD (%) de las áreas del pico de principio activo de las diferentes inyecciones así como la variación relativa entre la primera y la última inyección que no debe ser superior a 2,0%.

10.1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1.4.1. *Desarrollo del método*

El objetivo principal del método cromatográfico es separar HQ de sus productos de degradación para realizar los estudios de la etapa de preformulación, entre los cuales cabe destacar el estudio de compatibilidad con excipientes.

Se realiza una búsqueda bibliográfica en la que se encuentra la monografía de HQ principio activo, HQ crema y HQ solución tópica en la USP [45,141-142]. En ninguna de estas monografías se describe el ensayo de impurezas y sólo en la monografía de HQ solución tópica se describe un método de HPLC isocrático para la determinación de la valoración. Por tanto, no hay ninguna impureza de HQ descrita en USP. Así, se decide desarrollar un método a partir de las soluciones de degradación forzadas.

HQ es un compuesto fenólico que su estructura se compone de un anillo de benceno con dos grupos alcohol en posición para. Es un ácido débil con un pKa: 10,33 y un compuesto muy polar con un log P: -0,62 [43]. Es muy soluble en agua y disolventes orgánicos polares como acetonitrilo y metanol, mientras que es insoluble en disolventes orgánicos apolares tal como benceno o tolueno [143]. Por otro lado, los excipientes considerados para formulaciones tópicas y que participan en el estudio de compatibilidad con excipientes tienen muy diferentes naturalezas. Entonces, el método desarrollado debe ser capaz de separar un gran número de compuestos que abarcan una amplia gama de polaridad: HQ, productos de degradación y excipientes.

Como resultado, se considera más apropiado desarrollar un método de fase reversa para lograr una adecuada retención de compuestos polares sin una excesiva retención de los compuestos menos polares [140,144]. Con el fin de lograr una elución adecuada

de esta amplia gama de compuestos, dos parámetros son críticos: la fase móvil y la columna, ya que es un proceso de adsorción dinámica. Para estudiar estos dos parámetros en profundidad y evaluar la idoneidad de cada una de las opciones de forma correcta, se utiliza un gradiente de elución genérico (t (min) /% B: 0/10, 10/10, 30/90, 35 / 90, 40/10, y 45/10) a una velocidad de 1.0 ml/min.

I. Fase Móvil

El pH de la fase móvil es un parámetro fundamental ya que incide directamente sobre el estado de ionización del compuesto y en consecuencia, sobre su tiempo de retención ya que los compuestos ionizados representan analitos altamente polares eluyen más rápidamente.

De la ecuación de Henderson-Hasselbach, se puede determinar que el 99% de un compuesto está en una sola forma, iónica o neutra, si el pH de la solución es de 2 unidades por encima o por debajo del pKa del compuesto [145].

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Donde,

[A⁻] concentración del compuesto ionizado

[HA] concentración del compuesto neutro

Para lograr una buena forma de pico, los compuestos ionizables deben estar en una sola forma. Una selección incorrecta del pH de la fase móvil con valores de pH cercanos al valor de pKa implica que el logaritmo de la relación entre las dos especies (iónica y neutra) tienda a cero, es decir, que la concentración de las dos especies sea la misma. Esto a menudo conduce a picos asimétricos que son anchos, con cola o con hombro que hacen imposible su utilización en el análisis cuantitativo. Por tanto, el pH de la fase móvil debe ser como máximo de 8,3. Si además, se tiene en cuenta que HQ es inestable en medio básico a temperatura ambiente [104], se realizan una serie de experimentos preliminares en los que se ensayan distintas fases móviles acuosas con diferentes valores de pH entre 3 y 6 en combinación con diferentes solventes orgánicos (ACN y MeOH).

- pH ~ 3 Solución acuosa de ácido acético al 0,1% (v/v): Diluir 1 ml de ácido acético glacial en 1 l de agua Milli-Q.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

- pH ~ 4.5 Tampón acetato amónico 20 mM a pH 4,5: disolver 1,54 g de acetato amónico en 1 l de agua purificada Milli-Q. Dejar reposar y medir pH. Ajustar a pH 4,5 si es necesario, con ácido acético diluido.
- pH ~ 6 Tampón fosfato 20 mM a pH 6.0: disolver 3,48 g de hidrogenofosfato de di-potasio en 1 l de agua purificada Milli-Q. Ajustar a pH 6,0 si es necesario, con ácido fosfórico diluido.

Se escoge la solución acuosa de ácido acético al 0,1% (v/v) como fase móvil acuosa porque el pico tiene mejor forma y además, es compatible con LC/MS. Como fase móvil orgánica se selecciona acetonitrilo porque la presión del sistema es menor.

Columna

Se realiza un estudio de cribado de fases estacionarias en el que se incluyen las siguientes columnas cromatográficas:

- Zorbax SB-Phenyl 5 μm , 80 Å, 4.6 x 250 mm
- Luna C18 5 μm , 100 Å, 4.6 x 250 mm
- Symmetry C8 5 μm , 100 Å, 4.6 x 250 mm

Se selecciona la columna Zorbax SB-phenyl porque proporciona una selectividad complementaria debido a las interacciones π - π producida entre los electrones π de la funcionalidad aromática de la fase estacionaria y los electrones π del anillo bencénico de HQ [146,147]. También se prueba la misma columna con una longitud menor: 4.6 x 150 mm. La columna Zorbax SB-Phenyl 5 μm , 80 Å, 4.6 x 250 mm es la única columna que aporta una resolución adecuada entre HQ y el producto de degradación formado en la solución de degradación básica.

La temperatura de la columna se mantiene a 40 °C para reducir la presión alcanzada en columna y así alargar la vida de la columna. La detección se realiza a 230 nm debido a que confiere considerable sensibilidad para todos los picos inyectando 25 μl de las soluciones.

Se decide no optimizar el gradiente de elución debido a que en esta fase inicial se prioriza la adquisición de conocimientos acerca de HQ, sus rutas de degradación y la compatibilidad con otras sustancias que puedan estar presentes en la formulación ante la rapidez del método.

Las condiciones cromatográficas del método desarrollado son las que se muestran en la Tabla 10.1.5.

Tabla 10.1.5 Condiciones cromatográficas del método HPLC-UV

Columna	Zorbax SB-Phenyl 5 μm 80 Å, 4,6x 250 mm																					
Temperatura de columna	40 °C																					
Volumen de inyección	10 μl																					
Temperatura de carro muestras	25 °C																					
Fase móvil	A: ACN B: H ₂ O al 0,1% HAcO																					
Elución	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,0</td> <td>10,0</td> <td>90,0</td> </tr> <tr> <td>10,0</td> <td>10,0</td> <td>90,0</td> </tr> <tr> <td>30,0</td> <td>90,0</td> <td>10,0</td> </tr> <tr> <td>35,0</td> <td>90,0</td> <td>10,0</td> </tr> <tr> <td>45,0</td> <td>10,0</td> <td>90,0</td> </tr> <tr> <td>50,0</td> <td>10,0</td> <td>90,0</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo	A (%)	B (%)	0,0	10,0	90,0	10,0	10,0	90,0	30,0	90,0	10,0	35,0	90,0	10,0	45,0	10,0	90,0	50,0	10,0	90,0
Tiempo	A (%)	B (%)																				
0,0	10,0	90,0																				
10,0	10,0	90,0																				
30,0	90,0	10,0																				
35,0	90,0	10,0																				
45,0	10,0	90,0																				
50,0	10,0	90,0																				
Flujo	1,0 ml/min																					
Detección	UV a 230 nm																					
Tiempo de cromatograma	50 minutos																					

10.1.4.2. Preparación muestra

Se realiza un estudio para evaluar en qué mezcla de disolventes (acuosos y orgánicos) se disuelve mejor HQ. El método de HPLC desarrollado utiliza un gradiente de elución con la fase móvil que consta de (A) solución acuosa de ácido acético al 0,1% (v/v) y (B) acetonitrilo.

En general, se disuelve la muestra en fase móvil para evitar cualquier tipo de distorsión y así asegurar una correcta simetría de pico. Por este motivo se realiza un estudio para evaluar que proporciones de agua y acetonitrilo dan un mejor resultado en cuanto a solubilización y simetría de pico. Se estudian 3 proporciones diferentes: (30:70), (50:50) y (70:30) ACN:H₂O. La proporción que da mejor simetría de pico es (70:30) ACN:H₂O.

También se estudia el proceso de disolución y se establece que es necesario sonicar la solución 5 minutos en el baño de ultrasonidos.

10.1.4.3. Degradaciones forzadas

Según la ICH Q1A [136], los estudios de degradación forzada se llevan a cabo para elucidar las características intrínsecas de estabilidad. Estos estudios son parte de la estrategia de desarrollo y, normalmente, se lleva a cabo en condiciones más severas que las utilizadas para los estudios de estabilidad acelerada. Los estudios de degradación forzada, también conocidos como *stress testing*, se llevan a cabo para proporcionar datos sobre los productos de descomposición y los mecanismos de descomposición del API y del producto acabado. Las condiciones severas en las que se puede encontrar el producto acabado durante su distribución deben ser cubiertas por estos estudios realizados sobre la fórmula definitiva del producto acabado.

Así, los estudios de degradación forzada deben realizarse cada vez que se requiere un método *stability-indicating* [129] y por tanto, es necesario repetirlos a medida que cambian los métodos, procesos o formulaciones. Los estudios de degradación forzada pueden realizarse antes de la validación formal del método y/o antes del inicio de los estudios de estabilidad. Aunque en algunos casos, como el presente, en los que no se conocen ni se disponen de los productos de degradación, se puede desarrollar el método a partir de las soluciones obtenidas en estos estudios.

La elección de las condiciones de degradación debe ser coherente con la descomposición del producto (principio activo o producto acabado). Los factores de degradación recomendados dependerán del tipo de API y/o del tipo de producto acabado incluyendo la hidrólisis a pH alto (medio básico) y pH bajo (medio ácido), oxidación, temperatura elevada y fotólisis tal y como se muestra en la Tabla 10.1.6 [148-150].

Tabla 10.1.6 Protocolo general para degradaciones forzadas de API y producto acabado [148]

Condition	Drug Substance		Drug Product	
	Solid	Solution/ Suspension	Solid (Tablets, Capsules, Blends)	Solution (IV, Oral Suspension)
Acid/base		✓		X
Oxidative	X	✓	✓	✓
Photostability	✓	X	✓	✓
Thermal	✓		✓	✓
Thermal/humidity	✓		✓	

*✓ = recommended; X = optional, suggested for some compounds.

Se considera una exposición suficiente del API o producto acabado cuando se logra que el API se haya degradado alrededor de un 5-20% de su cantidad inicial cuando el objetivo sea el de garantizar que el método analítico es *stability-indicating* ya que lo que se persigue es generar un perfil de degradación que imite lo que se observará en los estudios formales de estabilidad en condiciones ICH. Por tanto, se pone todo el énfasis en hallar una serie de factores degradantes que pueda provocar la formación de los productos de degradación primaria en el API y el producto acabado [148-154].

I. Degradaciones en solución

a. Hidrólisis en medio ácido

HQ fue sometida a degradación en medio ácido bajo las siguientes condiciones: HCl 1 M, 24 horas, 40 °C (Figura 10.1.2) y HCl 0,1M, 48 horas, 40 °C (Figura 10.1.3). La degradación sufrida en ambas condiciones es muy ligera, inferior al 1,0%, conduciendo a la formación de dos productos de degradación minoritarios: DP-1 y DP-2 con tiempos de retención de 2,47 min ($t_{RR}:0,46$) y 8,47 min ($t_{RR}:1,60$), respectivamente.

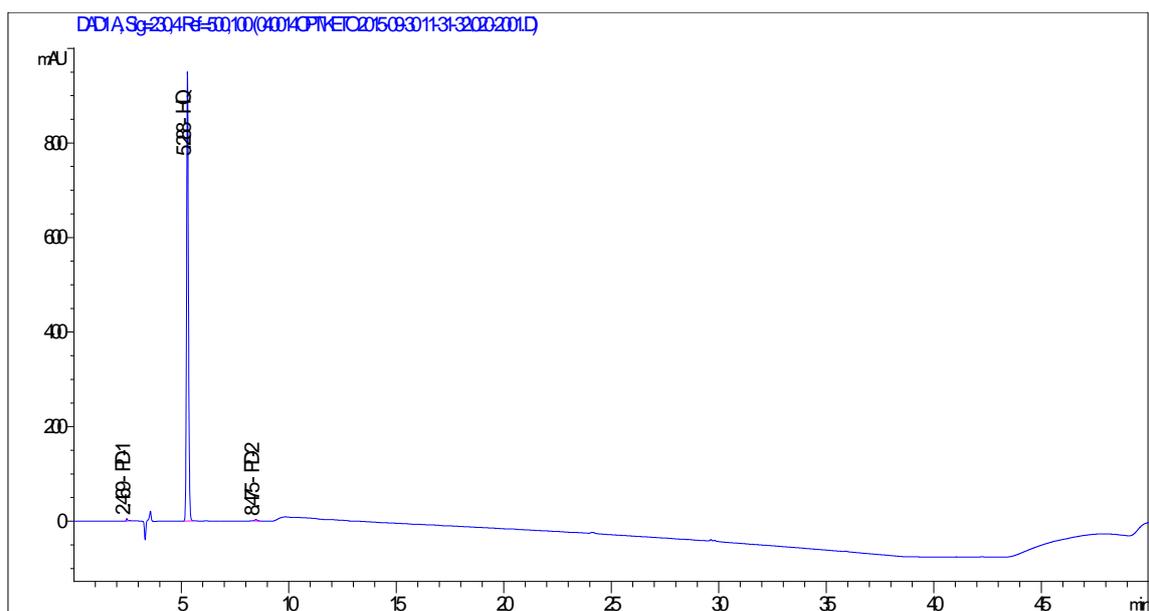


Figura 10.1.2 Cromatograma de la solución de HQ estresada mediante hidrólisis ácida: HCl 0,1M, 24 h, 40 °C

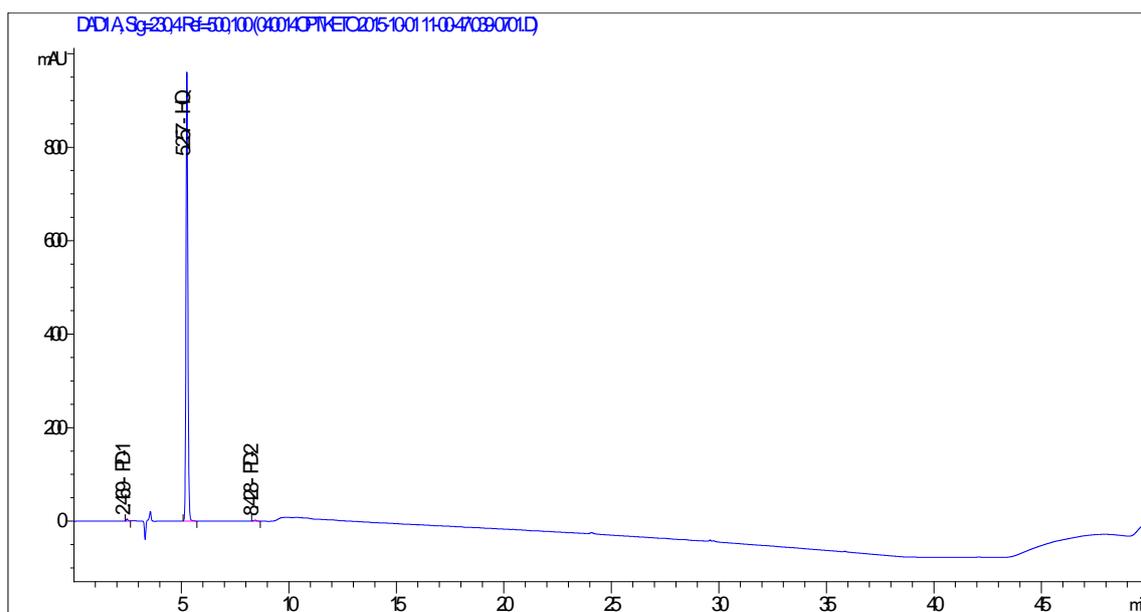


Figura 10.1.3 Cromatograma de la solución de HQ estresada mediante hidrólisis ácida: HCl 1 M, 24 h, 40 °C

b. Hidrólisis en medio básico

Los resultados obtenidos con la degradación en medio básico de HQ demuestran que HQ es susceptible a la hidrólisis en medio básico escogiendo como agente degradante una solución de Na_2CO_3 0,02M temperatura ambiente dejando la solución tapada con papel de aluminio durante 2 días.

HQ se degradó gradualmente con el tiempo en Na_2CO_3 0,02M a temperatura ambiente. Se observa una degradación de prácticamente el 79% a las 24 horas. Esta pérdida progresiva de HQ va acompañada de la generación de un producto de degradación, DP-1, que eluye a un t_{RR} : 0,46 (Figura 10.1.4).

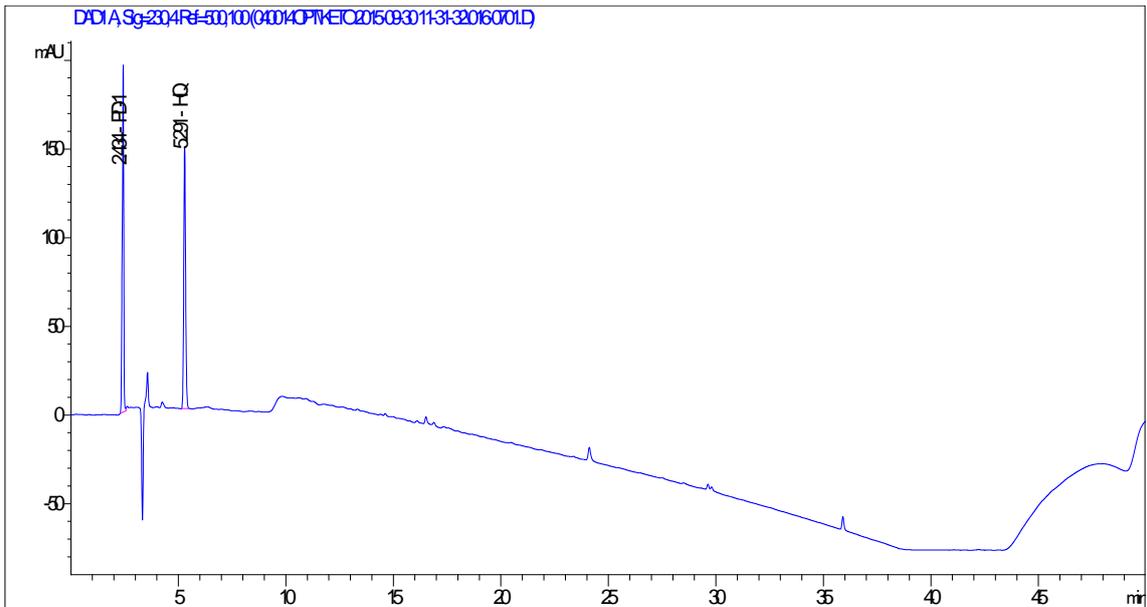


Figura 10.1.4 Cromatograma de la solución de HQ estresada mediante hidrólisis básica: Na_2CO_3 0,02M, 2 h, temperatura ambiente

c. Hidrólisis neutra

En condiciones neutras, sólo se observa un 1,50% de degradación en forma de DP-2 (t_{RR} : 1,60) después de calentar la solución durante 24 horas a 40 °C (Figura 10.1.5). Por tanto, HQ se considera estable en medio neutro.

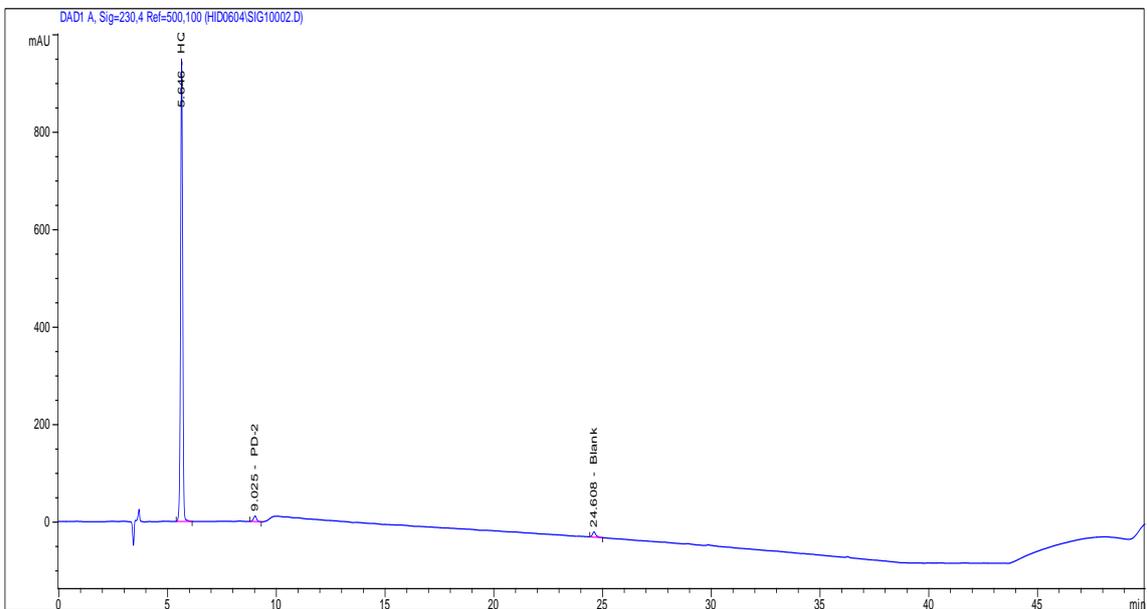


Figura 10.1.5 Cromatograma de la solución de HQ estresada mediante hidrólisis neutra: H_2O , 24 h, 40 °C

d. Oxidación

HQ fue degradada en H₂O₂ al 10% durante 24 horas a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones, se forma un sólo el producto de degradación (PD-2) de forma mayoritaria que resulta más retenido que HQ en el cromatograma con un tiempo de retención de 8,46 minutos (t_{RR} 1,60). Se cuantifica el pico de HQ respecto al patrón de HQ encontrándose que HQ experimentó un 41,6% de degradación total. Aunque la degradación alcanzada es mayor al 20% indicada para garantizar un método como *stability-indicating*, al generarse un sólo producto de degradación debe considerarse como un producto de degradación primaria (producto de degradación procedente de HQ). En el cromatograma también se observa un pico eluído a un tiempo de retención de 2,61 minutos (t_{RR} : 0,50) que corresponde al blanco de H₂O₂ (Figura 10.1.6).

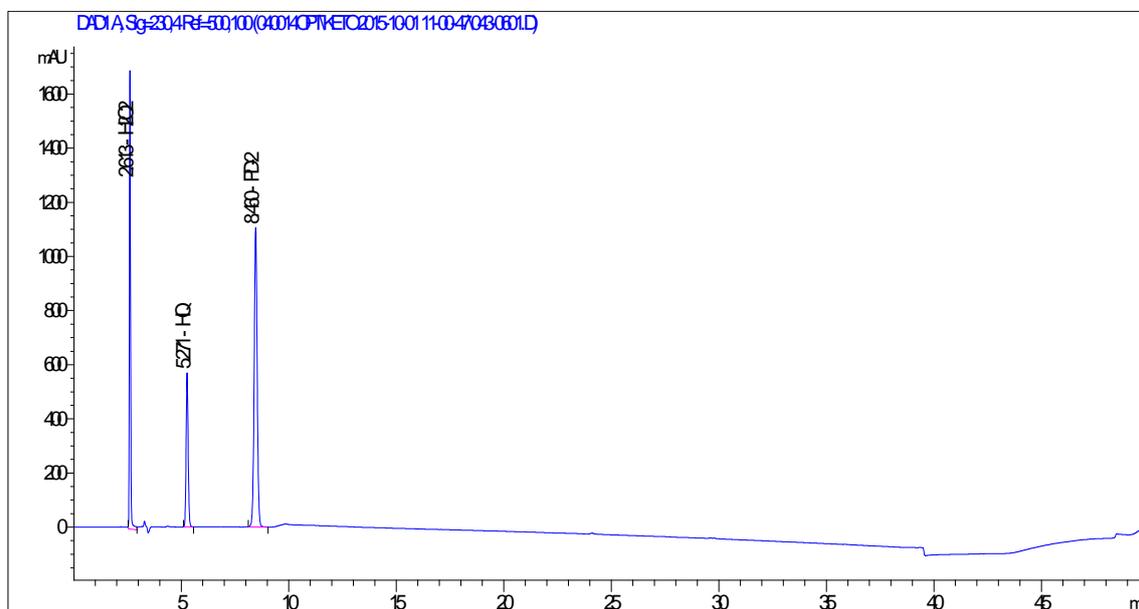


Figura 10.1.6 Cromatograma de la solución de HQ estresada mediante oxidación: H₂O₂ 10%, 24 horas, temperatura ambiente

HQ reacciona fácilmente con el oxígeno disuelto en un sistema acuoso (auto-oxidación). La velocidad de reacción es una función de la temperatura, pH de la solución, y la relación entre HQ y O₂ disuelto en el sistema [28].

En medios acuosos, la velocidad de auto-oxidación depende del pH. En medios alcalinos, la reacción se da rápidamente generando una solución de color marrón. Mientras que en medios ácidos o neutros, la reacción también se da pero de forma muy lenta [155].

e. Fotólisis

Se demostró que HQ en solución con el diluyente de muestra fue lábil a la exposición de la radiación UV-A (200 Wh / m^2) y de la radiación visible (1,2 millones lux-hora) de acuerdo con la opción 1 de la directriz ICH Q1B [137]. La solución de HQ fue expuesta durante 48 horas ya que a este tiempo se valoró la evolución de la solución de quinina frente a la solución de quinina control cumpliendo el requisito de $\Delta A > 0,5$. El principio activo se descompone al mismo producto de degradación principal PD-2 formado en muchas de la soluciones de degradación forzadas. No se observó ningún tipo de degradación en la muestra de control oscuro.

Se observó la degradación del 50% del principio activo en 48 horas de exposición estando esta disminución del pico del principio activo en correspondencia con la formación del producto de degradación DP-2 (t_{RR} : 1,60) (Figura 10.1.7).

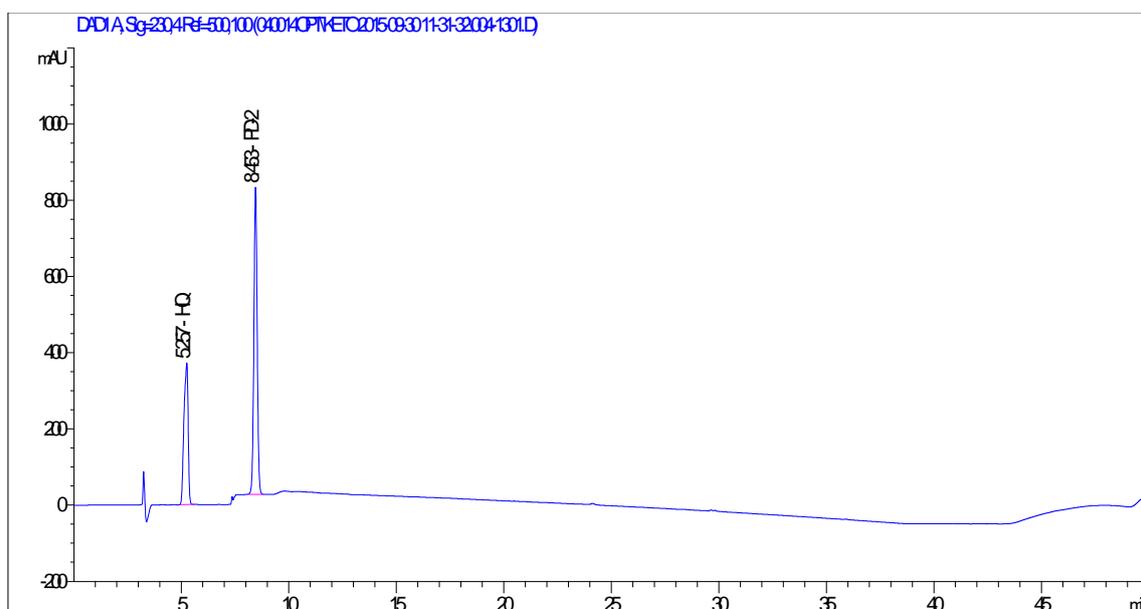


Figura 10.1.7 Cromatograma de la solución de HQ estresada mediante fotólisis

II. Degradaciones en estado sólido

f. Temperatura

Se observa que alrededor de un 3% del principio activo se degradó después de su exposición directa a 50°C durante 1 mes generándose el producto de degradación PD-2 (t_{RR} : 1,60). En el cromatograma se observa un pico adicional a t_R : 19,4 min que corresponde al blanco de diluyente de muestras del día (Figura 10.1.8). Por tanto, se considera que HQ es estable a 50°C al disminuir su valoración cuantitativa en tan sólo un 3%.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Por otro lado, la exposición del principio activo a 105 °C durante 5 días generó una degradación de aproximadamente el 31% del principio activo generándose alrededor de un 15% de PD-2 comparándolo con el patrón de trabajo (Figura 10.1.9). En el cromatograma se observa un pico adicional a t_R : 24,5 min que corresponde al blanco de diluyente de muestras del día. Por tanto, no hay conciliación en el balance de masas indicando que parte del principio activo se degrada a compuestos no-cromofóricos de bajo peso molecular ya que no genera respuesta alguna ni en el detector de UV-Visible y en el MS no se detecta porque está fuera del rango de pesos especificado.

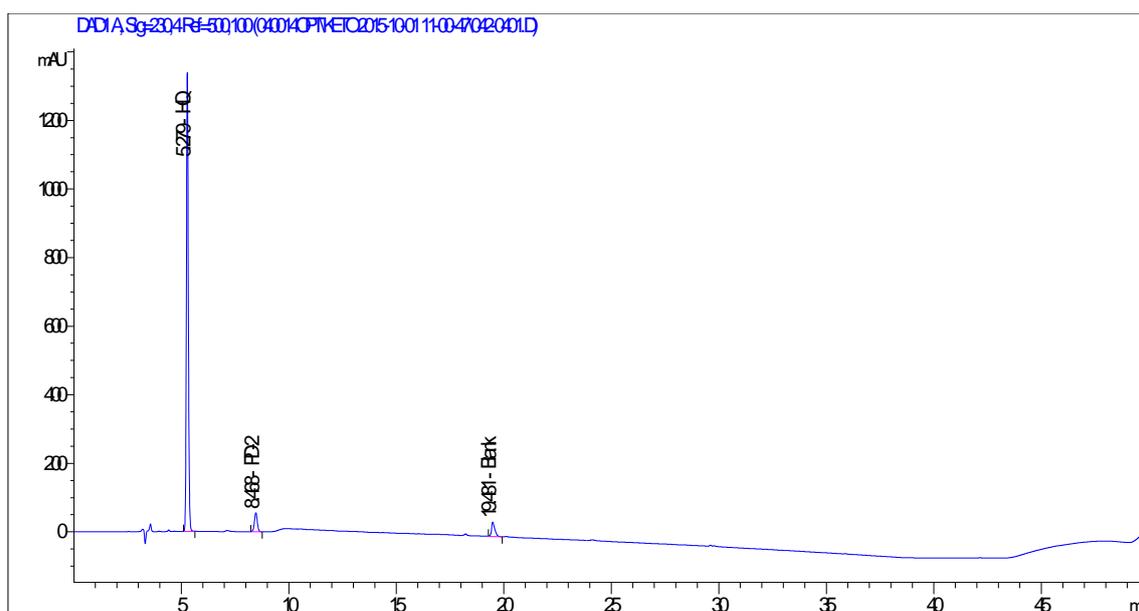


Figura 10.1.8 Cromatograma de la solución de HQ estresada en estado sólido a 50°C durante 1 mes

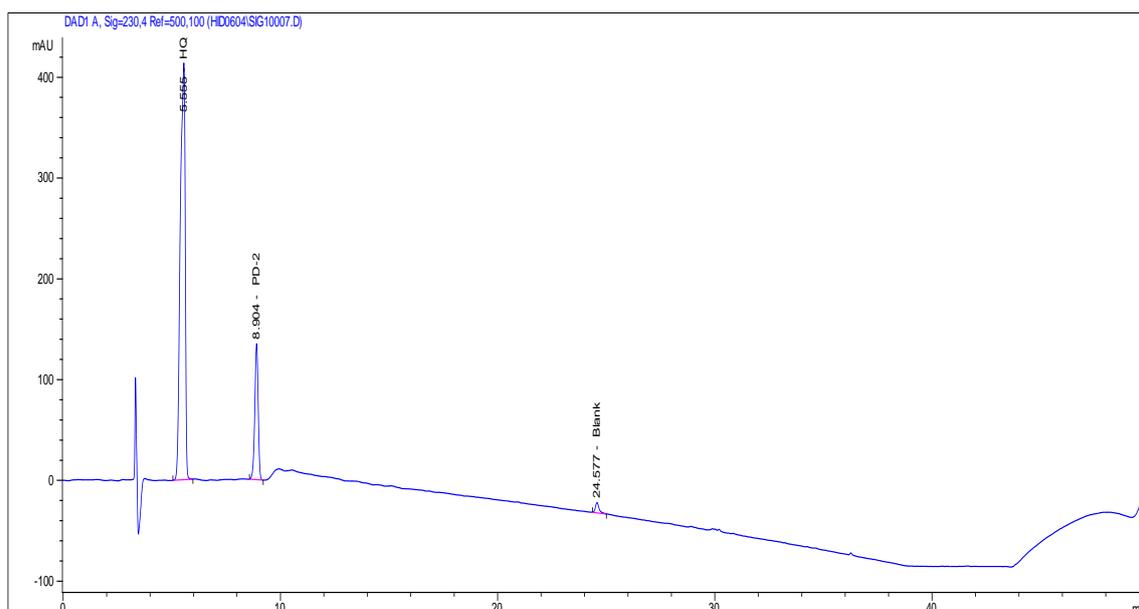


Figura 10.1.9 Cromatograma de la solución de HQ estresada en estado sólido a 105 °C durante 5 días

g. Humedad

El principio activo se degrada ligeramente al exponerlo a un ambiente de humedad al 80% durante 10 días dando lugar a la formación del producto de degradación DP-2 (t_{RR} : 1,60). El principio activo experimentó una degradación de sólo un 10,8% cuantificada respecto un patrón de trabajo (Figura 10.1.10).

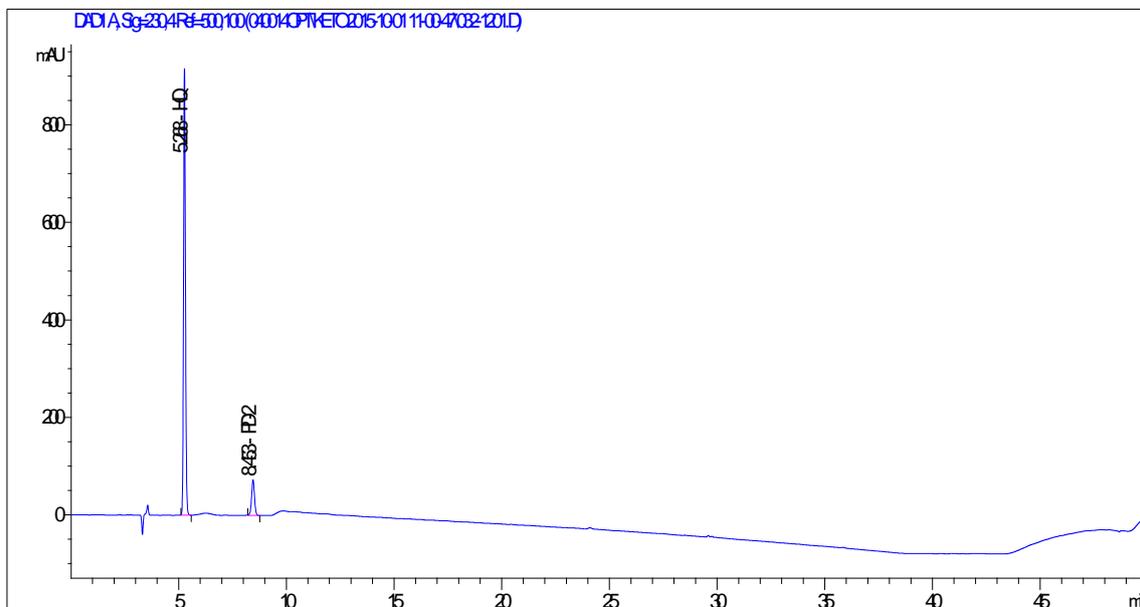


Figura 10.1.10 Cromatograma de la solución de HQ estresada en estado sólido a 80% humedad durante 10 días

HQ fue degradada a uno o dos productos de degradación en todas las condiciones de degradación estudiadas. El tiempo de retención (t_R) y el tiempo de retención relativo (t_{RR}) de HQ y de los productos de degradación se resumen en la Tabla 10.1.7. Los productos de degradación llevan los nombres de DP-1 y DP-2 de acuerdo con la secuencia en la que los picos aparecían de izquierda a derecha en los cromatogramas HPLC.

Tabla 10.1.7 Tiempos de retención de los picos generados en las degradaciones forzadas

Pico	Tiempo de retención (t_R , min)	Tiempo de retención relativo (t_{RR})
DP-1	2,44	0,46
HQ	5,27	1,00
DP-2	8,46	1,61

10.1.4.4. Cinética de degradación

Debido a la labilidad de HQ en medio básico, se analiza la solución a diferentes intervalos de tiempo y se llevó a cabo el estudio cinético de la hidrólisis en medio básico a temperatura ambiente y 40 °C. Los resultados mostraron que en la hidrólisis básica se forma un sólo producto de degradación principal: DP-1.

La solución fue analizada por HPLC a los tiempos de 0, 0,25, 2, 4, 24 y 48 horas de hidrólisis básica.

La hidrólisis de fármacos en solución acuosa está gobernada por un comportamiento típico de una cinética de primer orden o, más bien, de pseudo-primer orden, ya que la concentración de medio básico está en gran exceso y se considera constante aunque participe en la reacción. La velocidad de reacción del fármaco viene descrita por la siguiente ecuación [156-157]:

$$\ln C_t = \ln C_0 - k \cdot T$$

Representando los datos obtenidos en el estudio en medio básico, el gráfico semi-logarítmico de la concentración de HQ (mg/ml) frente al tiempo es lineal, con coeficientes de correlación mayores a 0,9990 a las dos temperaturas estudiadas, 22 °C y 40 °C, tal y como se observa en la Figura 10.1.11. Se encontraron que las constantes de la velocidad de degradación eran $2,206 \cdot 10^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y $4,644 \cdot 10^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a 22 °C y 40 °C, respectivamente. Los análisis de los residuales no muestran ninguna tendencia o correlación. Los periodos de semivida también se calcularon y se encontraron que eran de 3,1 y 1,5 h, respectivamente.

Con la siguiente ecuación, derivada de la ecuación de Arrhenius [157], se calcula la energía de activación para el proceso de degradación en medio básico encontrándose que era de 7,59 kcal/mol.

$$\log \left(\frac{k_1}{k_2} \right) = \frac{E_a (T_2 - T_1)}{2.303 R T_1 T_2}$$

Donde,

T_1 y T_2 son las temperaturas absolutas de reacción, 295 y 313 K, respectivamente

R es la constante de los gases ideales, 1,987 cal/mol

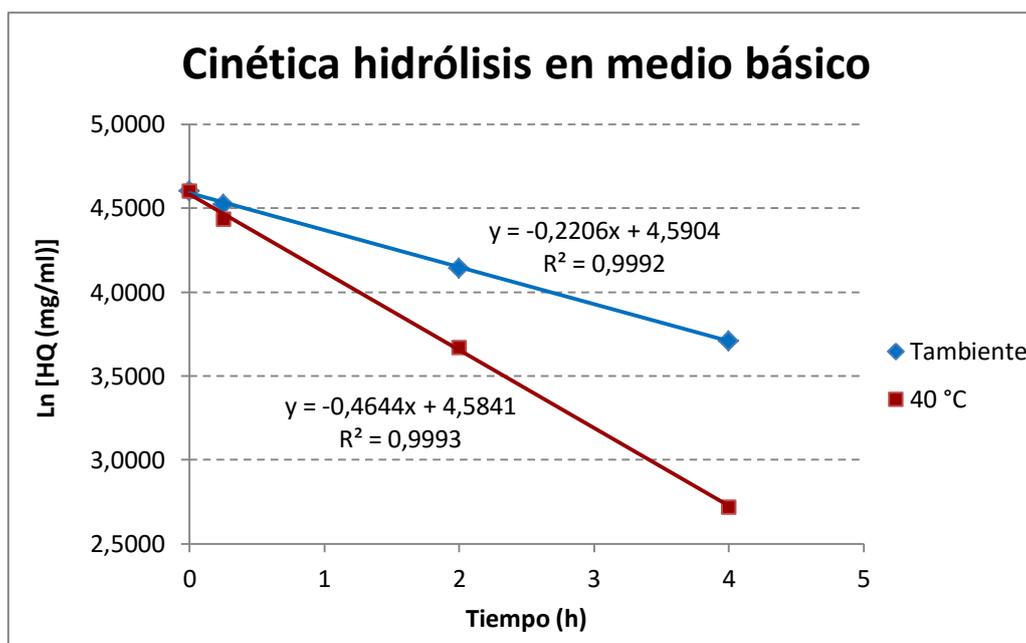


Figura 10.1.11 Cinética de pseudo-primer orden de la hidrólisis de HQ en medio básico

10.1.4.5. Estudios de las degradaciones forzadas mediante LC-MS/TOF

Para identificar los productos de degradación generados en las soluciones de degradación forzada se llevó a cabo el análisis de estas soluciones con la modificación del método para su extensión a los estudios de LC-MS/TOF.

Los estudios espectrales de masas de alta resolución de las soluciones de degradación forzada se llevaron a cabo después de una calibración adecuada del equipo. La ionización de los compuestos presentes en cada una de las soluciones de degradación forzada previa al análisis de MS puede ser realizada por ionización química atmosférica (APCI) o ionización por electrospray (ESI) tanto en modo positivo como negativo en un rango de masas de 70 a 800 Da. Se probaron las 4 posibles combinaciones de ionización con el fin de obtener el método de detección más eficiente tanto para HQ como para sus productos de degradación.

Los espectros del pico de HQ obtenidos mediante los diferentes tipos de ionización se muestran en la Figuras 11.1.12 a 11.1.15. Se observa que los espectros adquiridos en ionización ESI son mucho menos intensos que en APCI. Por tanto, HQ ioniza mucho mejor en APCI dando una señal más abundante y así, los espectros generados tienen una relación S/N mucho mejor, y por tanto, el método es más selectivo. Consecuentemente, se estudiaron los espectros adquiridos en APCI en modo positivo y negativo optando por realizar el estudio de LC-MS en APCI negativo.

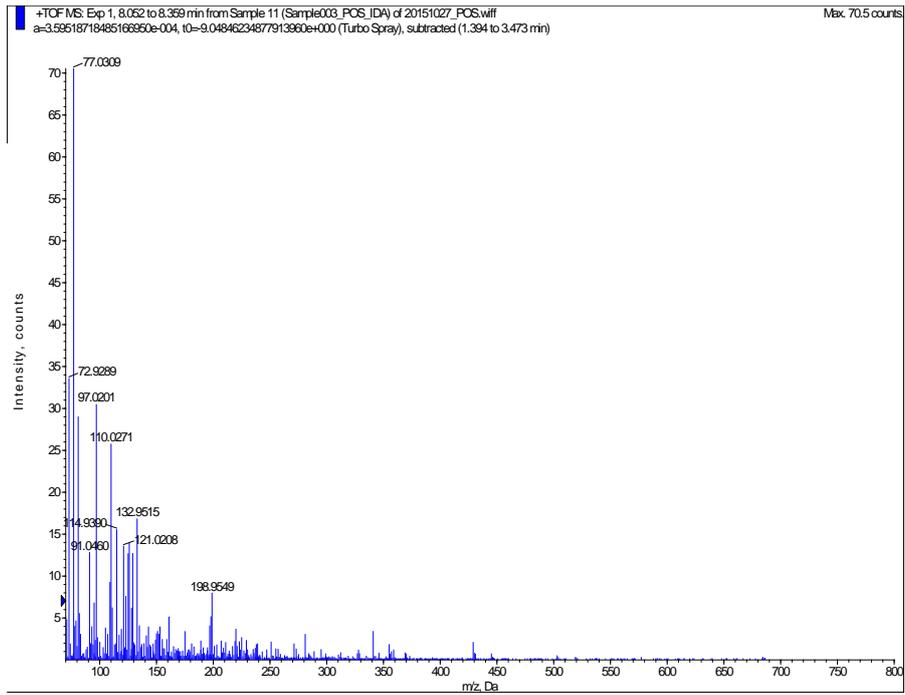


Figura 10.1.12 Espectro de masas de HQ en ESI positivo

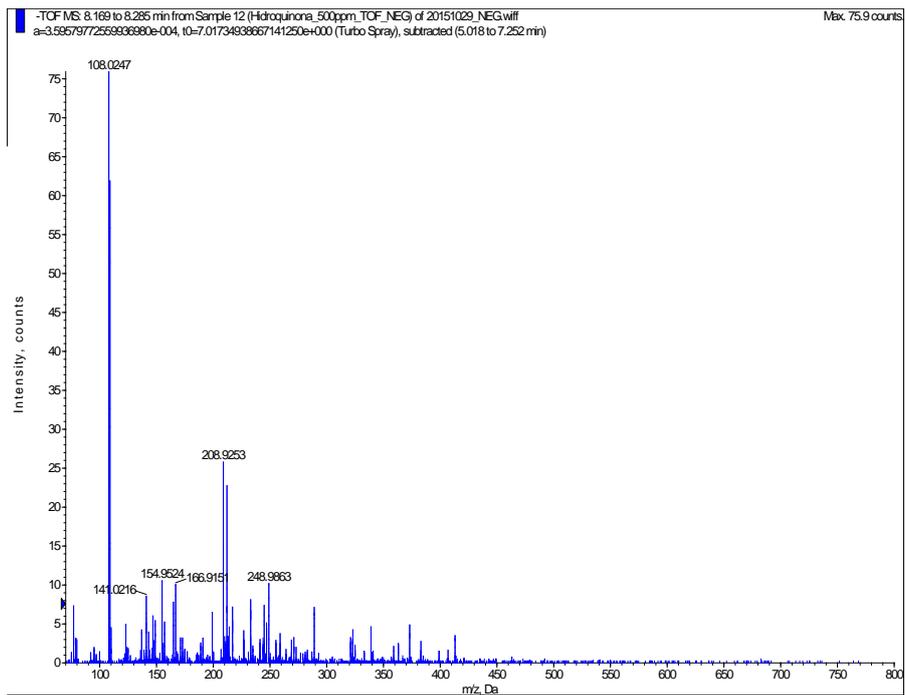


Figura 10.1.13 Espectro de masas de HQ en ESI negativo

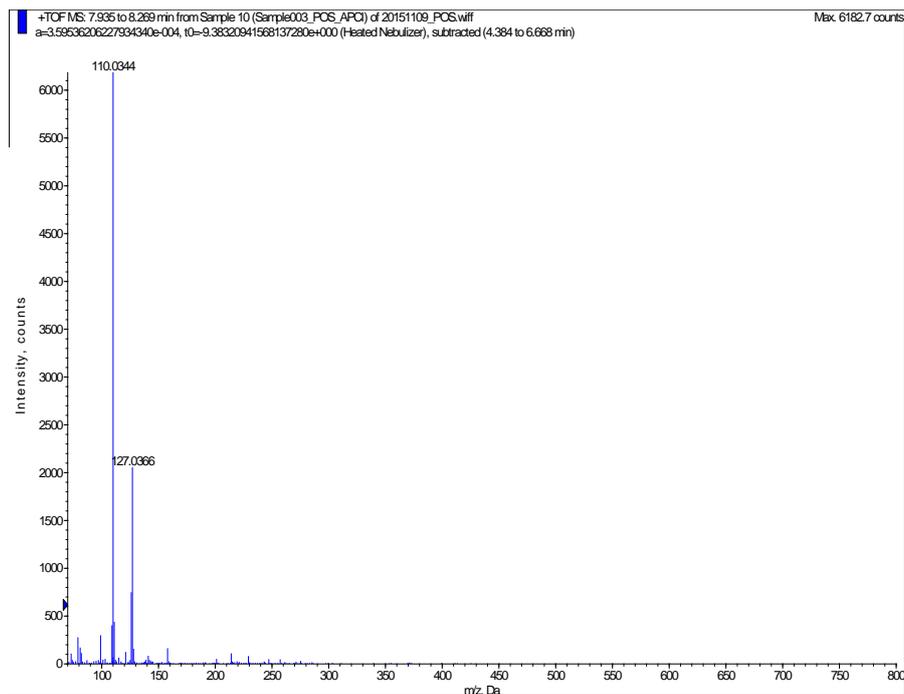


Figura 10.1.14 Espectro de masas de HQ en APCI positivo

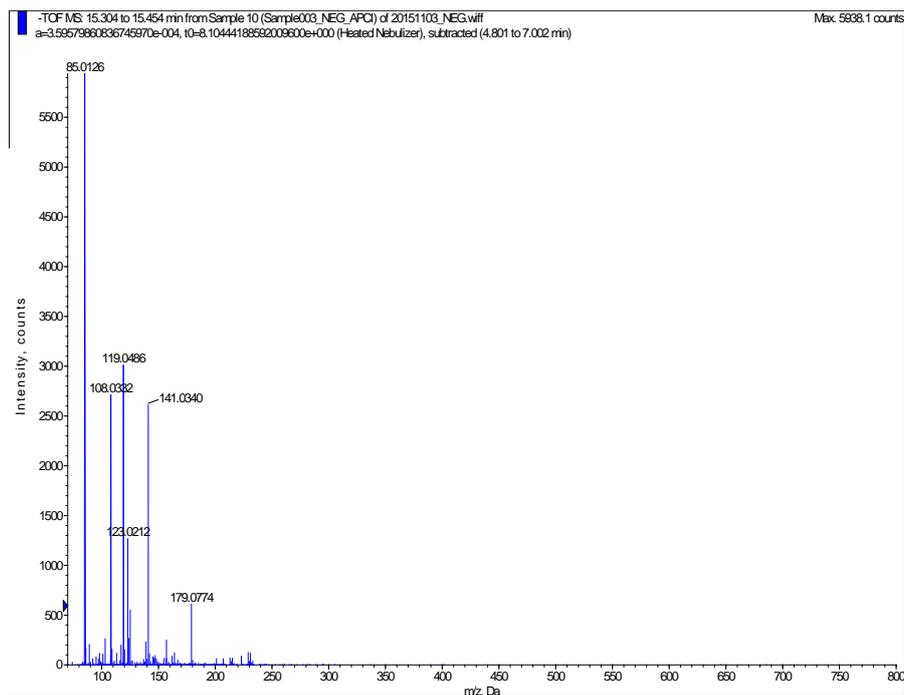


Figura 10.1.15 Espectro de masas de HQ en APCI negativo

Una vez seleccionada la forma de ionización, APCI negativo, los parámetros de MS fueron optimizados de forma adecuada para obtener información clara sobre el pico del ion molecular de HQ (Tabla 10.1.8).

Tabla 10.1.8 Condiciones LC-MS-APCI/TOF

Intensidad de corriente (μA)	-3
Temperatura de la fuente ($^{\circ}\text{C}$)	500
Potencial de desagregación (V)	-80
Potencial de enfoque (V)	-380
Tiempo de residencia de los iones (ms)	6,00
Ventana de masa de los iones a analizar (Da)	5,00

Las soluciones generadas en la degradación forzada fueron analizadas mediante el método de HPLC-MS/TOF para estudiar los espectros de masas de cada uno de los picos y así, identificar los productos de degradación formados.

I. HQ

En el espectro de masas correspondiente al pico de HQ se observa una señal principal con m/z 108,0297, si bien al ampliar la zona también, se observa otra señal, de menor intensidad, de m/z 109,0358 (Figura 10.1.16 y Figura 10.1.17).

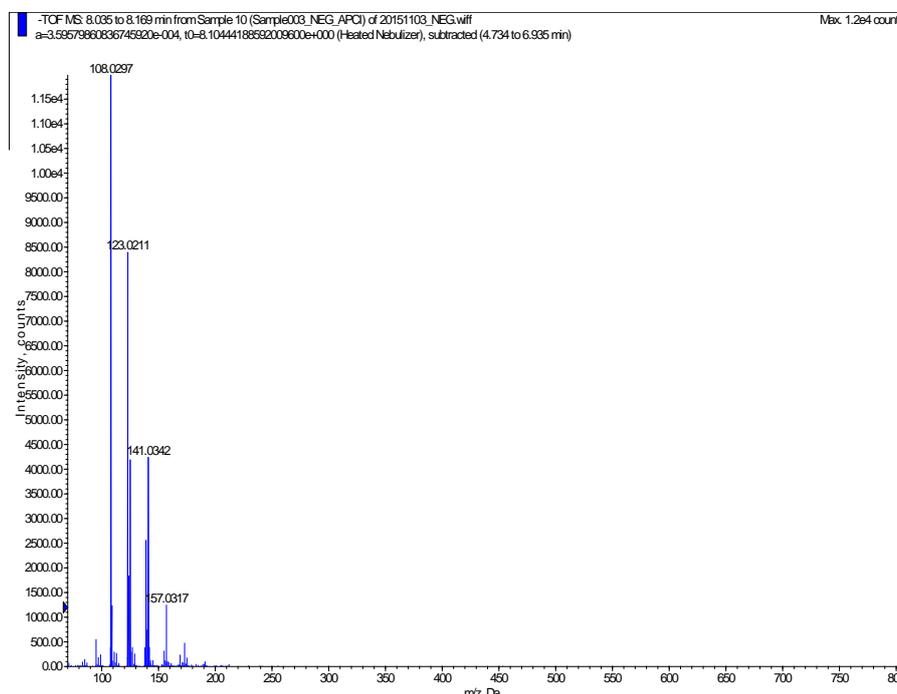


Figura 10.1.16 Espectro de masas del pico de HQ

HQ formalmente es un enol, compuesto que tiene un grupo hidroxilo unido a un carbono que a su vez está unido a otro carbono mediante un doble enlace. En general, los enoles son especies poco estables, por lo que el protón del grupo hidroxilo del

alcohol migra al carbono vecino y el doble enlace pasa de ser C=C a C=O. Este proceso es un equilibrio entre las dos formas, ceto y enol, con predominio de la forma ceto – forma más estable –, llamado equilibrio ceto-enólico (Figura 10.1.18). La cantidad de cada tautómero depende de su estabilidad relativa que viene afectada por la capacidad de formación de puentes de hidrógeno por parte del disolvente, una posible conjugación de los dobles enlaces o la formación de un puente de hidrógeno intramolecular [158].

En este caso, HQ es disuelta en diluyente de muestras – mezcla (70:30) ACN:H₂O –, de carácter ligeramente ácido. En estas condiciones, el equilibrio esta desplazado a una relación de 9 a 1 hacia la forma ceto, señal m/z 108,0297.

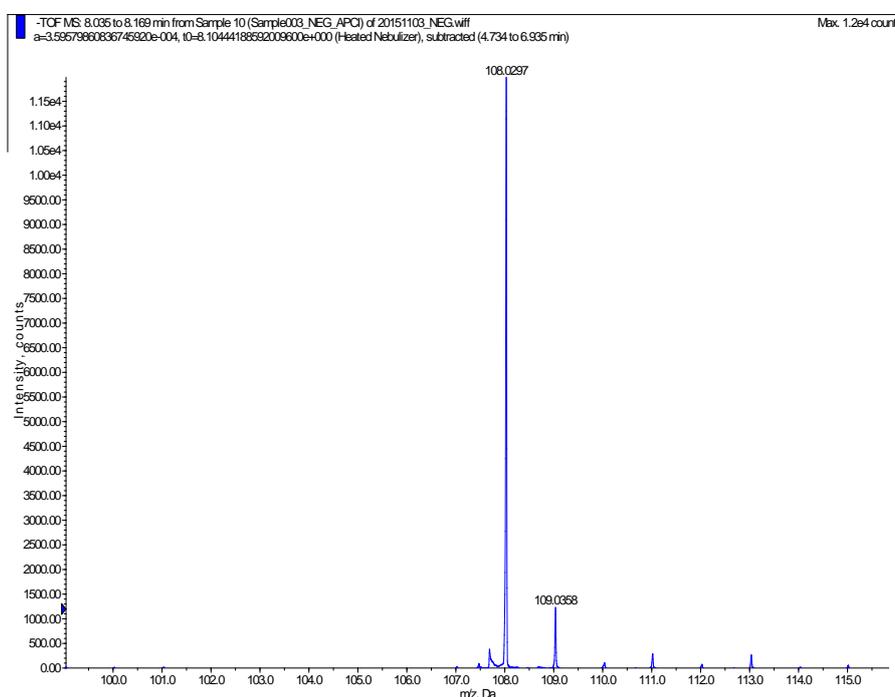


Figura 10.1.17 Ampliación del espectro de masas del pico de HQ

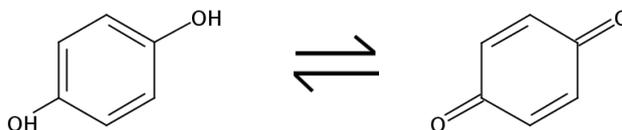


Figura 10.1.18 Equilibrio ceto-enólico de HQ

DP-1

DP-1 es un producto de degradación primario formado en la hidrólisis en medio básico (Na₂CO₃ 0,02M) de forma mayoritaria y en la hidrólisis en medio ácido (HCl 1M y HCl 0,1M) de forma minoritaria.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

En el espectro de masas correspondiente al pico de DP-1 no se observa una única señal principal sino una serie señales de m/z : 141,0014, 223,0274, 305,0403, 387,0521 y 469,0657, de distintas intensidades (Figura 10.1.19). La diferencia de m/z entre dos señales consecutivas se mantiene constante en toda la serie, siendo esta diferencia de $82,0161 \pm 0,0067$. Por tanto, las diferentes señales del espectro de masas corresponden a aductos entre la molécula de m/z 141,0014 y uno o varias moléculas de m/z 82,016.

Se identifica la molécula de m/z $82,0161 \pm 0,0067$, por comparación con los resultados obtenidos en la búsqueda en bases de datos, como (2Z)-1,4-dioxobut-2-en-2,3-diilo de fórmula empírica $C_4H_2O_2$ (Figura 10.1.20).

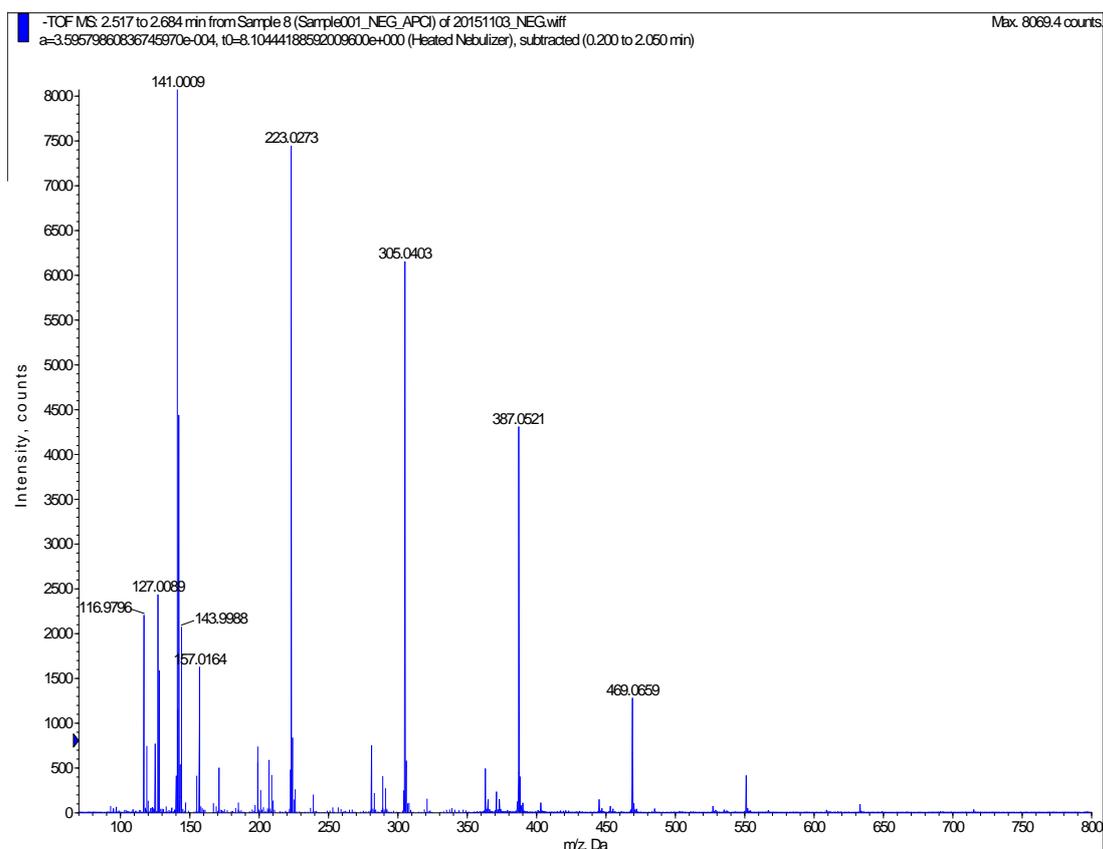


Figura 10.1.19 Espectro de masas del pico DP-1

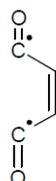


Figura 10.1.20 Fragmento m/z 82,01 Da

Se identifican las moléculas detectadas en el espectro de masas del pico DP-1, de forma similar, buscando las fórmulas a las que puede corresponder cada una de las m/z. Para ello, se tiene en cuenta que la adquisición se realizó en APCI-negativo y, por tanto, a la m/z se le debe sumar 1,073 Da del protón perdido. Así las estructuras moleculares de las diferentes m/z del espectro de masas son las que se muestran en la Figura 10.1.21.

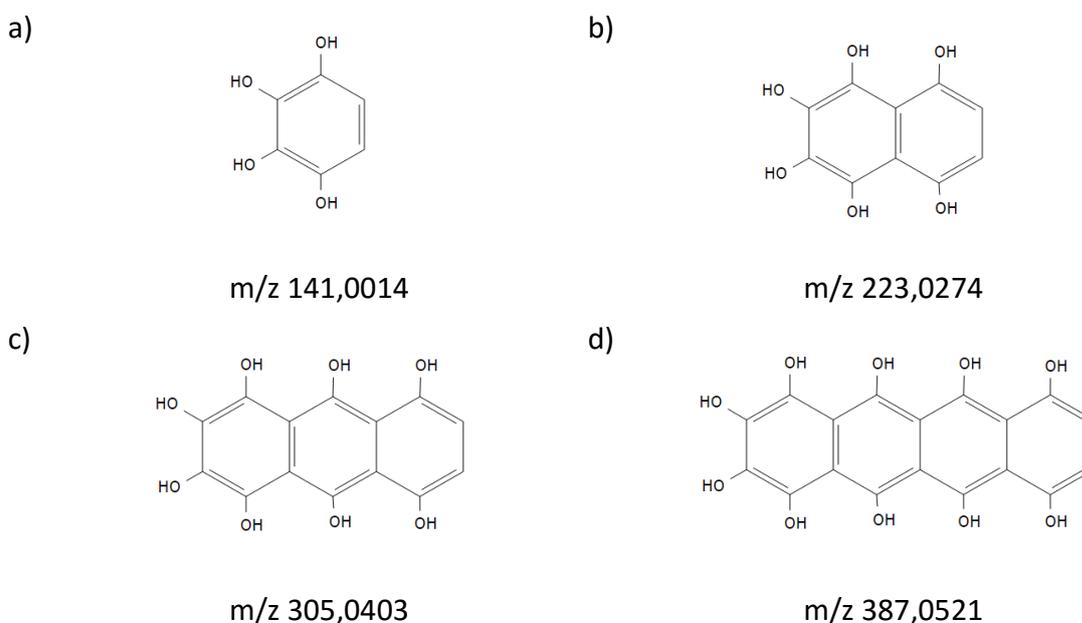


Figura 10.1.21 Moléculas detectadas en espectro de masas del pico de DP-1

Del estudio del espectro de masas correspondiente a pico cromatográfico DP-1 se puede concluir que al detector de masas le llega este conjunto de moléculas pero no su origen. Es decir, no se puede saber si este conjunto de moléculas existen en la solución de degradación forzada en medio básico o si se forman en la fuente de ionización a partir de la ruptura de la molécula de m/z 387,0521.

En un primer intento para investigar el origen de estas moléculas, se analiza la misma solución ionizando en dos fuentes distintas: ESI y APCI, consideradas fuentes de ionización suaves, en modo positivo y negativo. Pero los resultados no aportan ningún dato que indique su origen.

Para establecer su origen, se deberían realizar más experimentos tales como infusionar la misma solución directamente al MS y comparar. Posteriormente analizar la solución por LC-MS/TOF con diferentes gradientes de elución o diferentes tipos de cromatografía y así, con el conjunto de datos obtenidos intentar deducir si estas moléculas provienen directamente de la solución o son fragmentos de una molécula más grande.

La polimerización oxidativa de compuestos fenólicos en condiciones alcalinas ha sido reportada durante los últimos 80 años. Las condiciones alcalinas utilizadas en estos estudios fueron KOH o NaOH diluido que reacciona rápidamente con los fenoles dando como producto los aniones fenolato que en unas condiciones determinadas polimerizan [159-165]. Por este motivo, para realizar las degradaciones forzadas en medio básico se escogió Na_2CO_3 0,02M (pH ~ 11), solución básica más suave ya que los hidróxidos, además de ser soluciones básicas, son oxidantes potentes que junto con HQ, compuesto reductor, reaccionan rápidamente.

Por otra parte, los fenoles, y en particular los fenoles polihidroxilados, en determinadas condiciones alcalinas, reaccionan formando productos con más grupos hidroxilo unidos al fenol inicial [155,165-166]. Este hecho podría explicar la formación del compuesto de m/z 141,0014 – 1,2,3,4-bencenotetrol –.

DP-2

El producto de degradación DP-2 se forma, en mayor o menor proporción, en la mayoría de las soluciones de degradación forzada: medio ácido, neutro y oxidante, fotólisis, temperatura y humedad.

Se analizan todas las señales del espectro de masas correspondiente al pico de DP-2, siendo la única que posee identidad cromatográfica la señal m/z: 108,0322 (Figura 10.1.22). Ésta corresponde a la fórmula empírica de $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$, cumpliendo con la distribución isotópica.

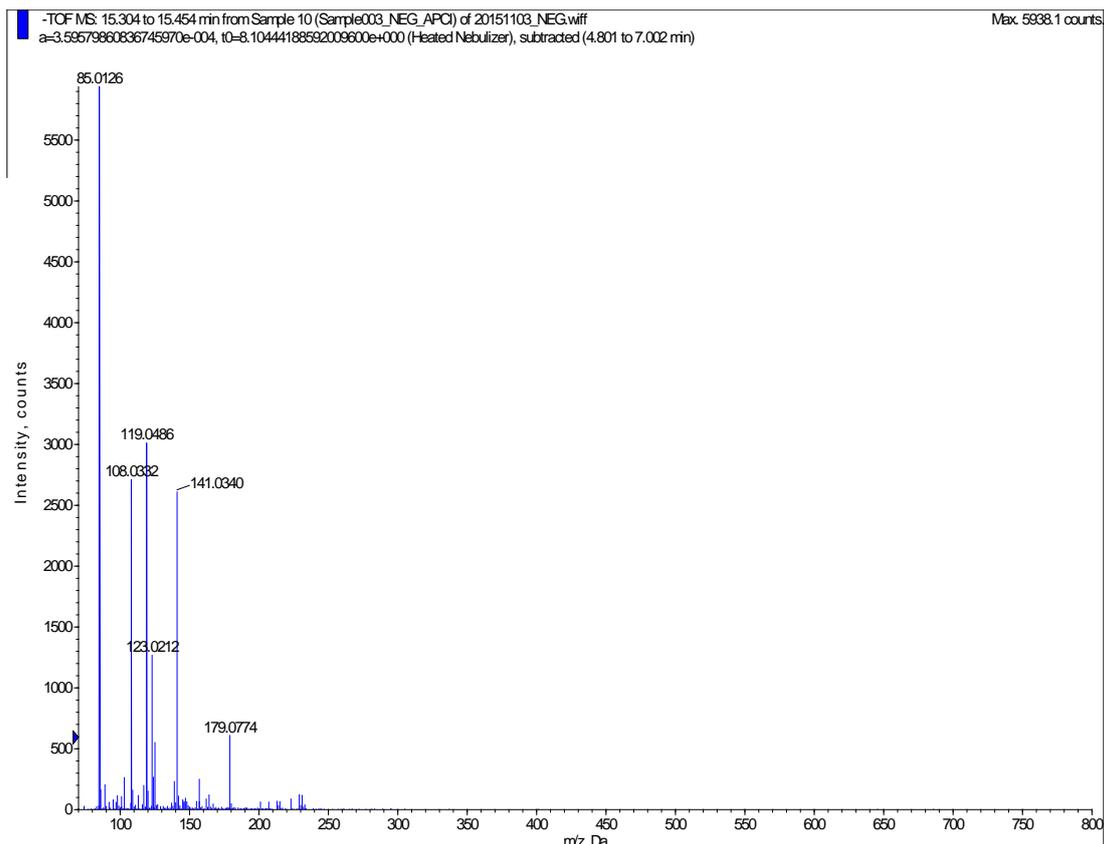


Figura 10.1.22 Espectro de masas del pico DP-2

Se analiza toda la información disponible tanto del espectro de MS como del espectro UV-Visible (Figura 10.1.23) y se elucida que el compuesto DP-2 es *p*-benzoquinona de masa molecular media de 108,095 Da (Figura 10.1.24).

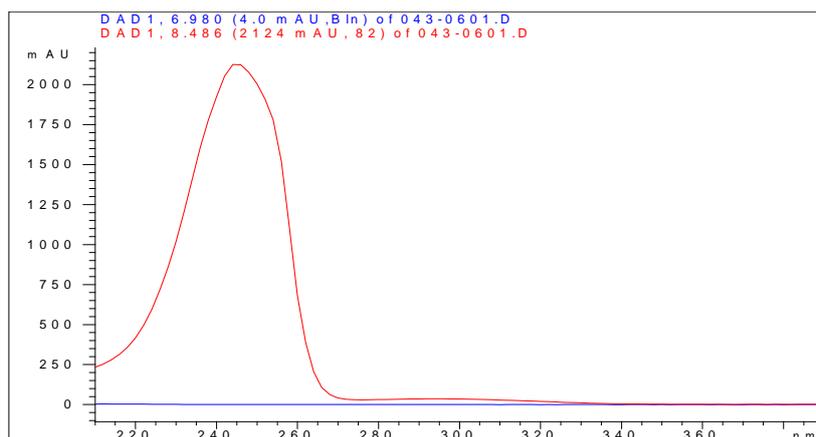


Figura 10.1.23 Espectro UV-Vis del pico DP-2

Por tanto, el valor de la masa molecular media coincide con el valor de m/z . En consecuencia, esta fórmula molecular corresponde a un ion radicalario molecular M^{\bullet} . La fuente de ionización APCI sirvió como fuente de electrones térmicos, de baja energía, generados cuando los electrones creados en la aguja de descarga de la corona

interactúan con el gas nebulizador [167]. Los iones radicalarios moleculares se producen por un mecanismo de captura de electrones atribuido al bajo potencial redox de las quinonas y la estabilización del electrón desapareado por resonancia [168]. La formación de iones radicalarios negativos ($M^{\bullet-}$) de quinonas ha sido reportado tanto en ESI [168] como en APCI [169] así como su correlación con los potenciales redox [170].

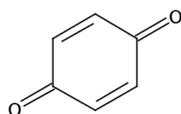


Figura 10.1.24 p-benzoquinona

La oxidación de HQ a p-benzoquinona en agua oxigenada catalizada por varios iones metálicos ha sido reportada en varias ocasiones [171-173]. En este caso, la ausencia de iones metálicos o catalizadores hace pensar que HQ reacciona con el oxígeno molecular presente en el medio acuoso de H_2O_2 para auto-oxidarse. La velocidad de auto-oxidación es dependiente del pH, que se producen rápidamente a pH alcalino y en medio ácido pero más lentamente. En este caso, en condiciones de neutralidad, HQ se puede oxidar de forma espontánea para producir semiquinona y p-benzoquinona (Figura 10.1.25) [174].

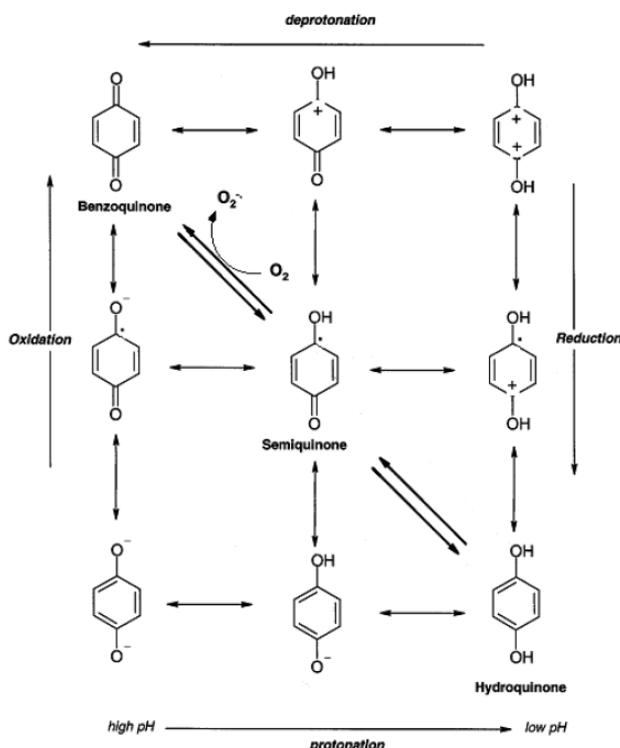


Figura 10.1.25 Esquema de oxidación-reducción de HQ [174]

10.1.4.6. Validación del método

El método desarrollado fue validado respecto a los siguientes parámetros según ICH Q2 [129]: selectividad, linealidad, límite de detección y de cuantificación, precisión, exactitud y estabilidad de la solución.

I. Selectividad

La especificidad del método fue demostrada mediante el análisis de la pureza de pico de una mezcla de soluciones degradadas (Figura 10.1.26) donde el valor de pureza para el pico de HQ es mayor que el valor umbral de pureza (990,0), como se observa en el diagrama de pureza (Figura 10.1.27), lo que indica que el pico es homogéneo espectralmente (Figura 10.1.28) y, por tanto, se demuestra que junto con el pico de HQ no coeluye ningún otro compuesto. Además, la resolución entre el pico de HQ y el pico de DP-1 (pico más cercano) fue de 16,27.

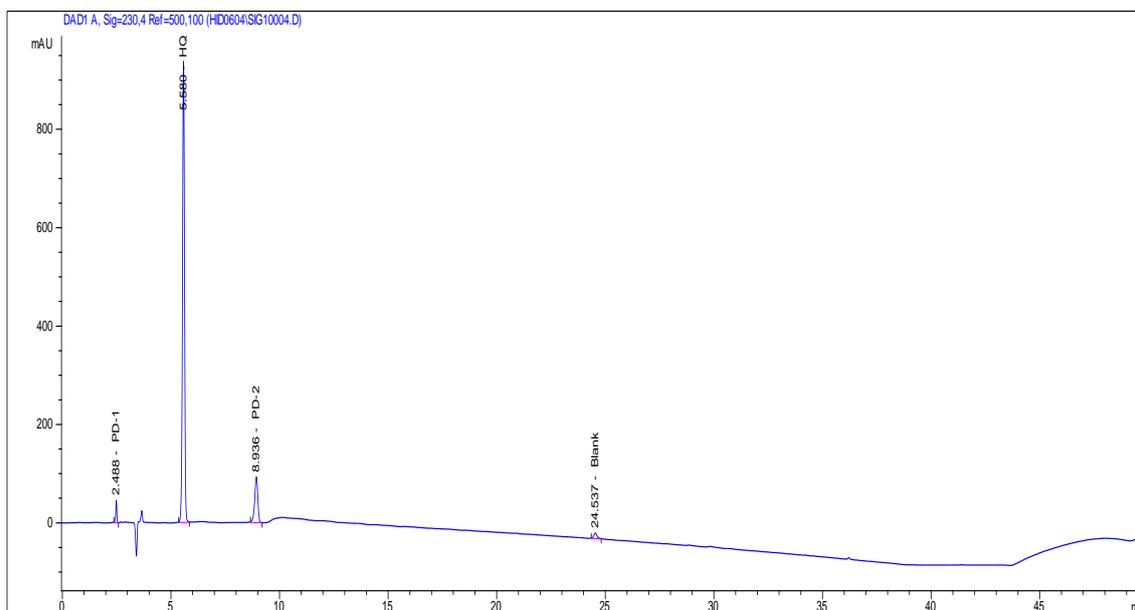


Figura 10.1.26 Cromatograma de una mezcla de soluciones degradadas

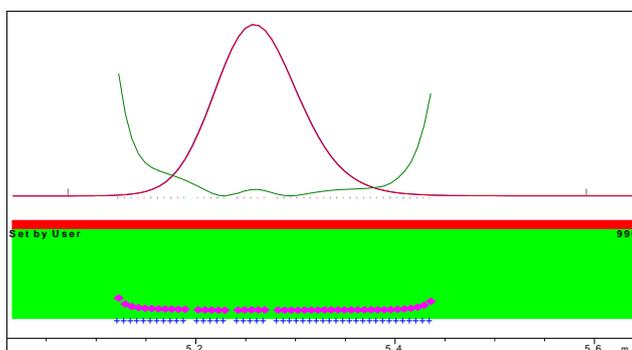


Figura 10.1.27 Diagrama de pureza de pico del pico de HQ

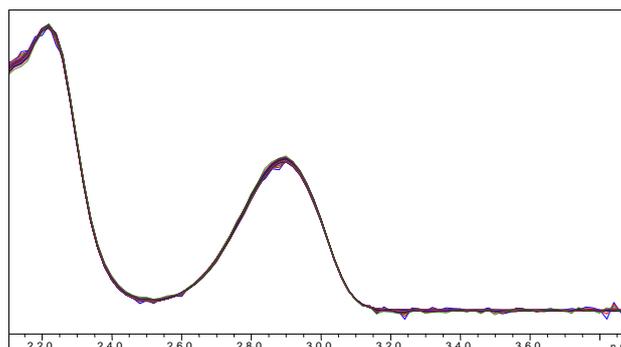


Figura 10.1.28 Homogeneidad de los espectros UV-Vis del pico de HQ

II. Límites de detección y cuantificación

Se establece como límite de detección (LOD) de HQ la solución al 0,05% ya que es la concentración más baja de la linealidad en la que se detecta el pico de HQ con una relación señal/ruido (S/N) de 4,2, superior a 3, y corresponde a una concentración de 2 ng de analito inyectado.

Se establece como límite de cuantificación (LOQ) de HQ la solución al 0,10% ya que es la concentración más baja de la linealidad en la que relación señal/ruido (S/N) es 11,5, superior a 10. Se inyecta esta solución por sextuplicado. El resultado medio del área de las seis inyecciones es de $15,8215 \pm 1,0226$ con un RSD: 6,46%, por tanto, encontrándose por debajo de 10%.

III. Linealidad

Se comprueba la linealidad en el rango de concentraciones de 0,10-120% de la concentración nominal. Se preparan 12 soluciones patrón inyectándose por triplicado: 0,10%, 0,20%, 0,50%, 1%, 2%, 5%, 10%, 25%, 50%, 80%, 100% y 120%.

Las áreas de los picos de HQ se representaron frente a la concentración y se realizó una regresión lineal por mínimos cuadrados tal como se muestra en la Tabla 10.1.9 y la Figura 10.1.29.

Tabla 10.1.9 Resumen resultados linealidad HQ

$Area = a \cdot Concentración + b$	
Pendiente (a)	15,996
Ordenada en el origen (b)	30,619
Coefficiente de correlación (r)	0,9996
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9993

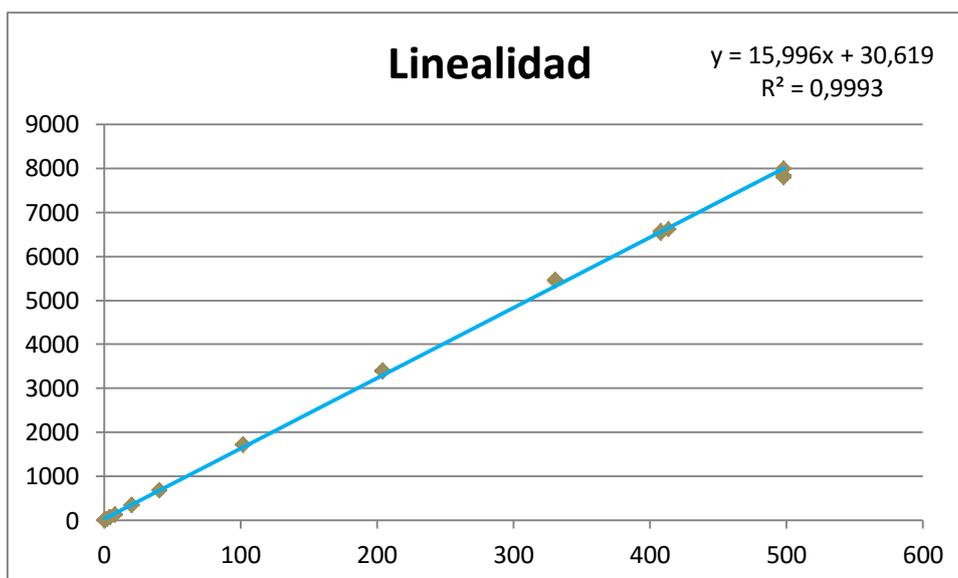


Figura 10.1.29 Gráfica de la linealidad de HQ

Se calcula el factor respuesta (FR) que expresa la relación entre el área y la concentración para cada una de las inyecciones de la linealidad. El coeficiente de variación (RSD) es 3,54, inferior al 5,0% demostrando una relación lineal (Tabla 10.1.10).

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.1.10 Datos de la linealidad de HQ

Nivel	Concentración (µg/ml)	Área	FR	Media	SD	RSD
0,10	0,41	6,741	16,30			
	0,41	6,142	14,85	15,94	0,96	6,00
	0,41	6,990	16,66			
0,20	0,83	13,511	16,33			
	0,83	14,011	16,94	16,33	0,61	3,74
	0,83	13,001	15,72			
0,50	2,04	34,152	16,73			
	2,04	33,677	16,50	16,40	0,39	2,40
	2,04	32,586	15,96			
1	4,14	69,124	16,71			
	4,14	70,059	16,94	16,76	0,16	0,94
	4,14	68,797	16,63			
2	8,27	134,874	16,30			
	8,27	133,842	16,18	16,16	0,16	1,01
	8,27	132,210	15,98			
5	20,42	356,480	17,46			
	20,42	344,507	16,88	17,13	0,30	1,75
	20,42	348,158	17,05			
10	40,83	685,928	16,80			
	40,83	688,034	16,85	16,81	0,03	0,19
	40,83	685,667	16,79			
25	102,08	1719,844	16,85			
	102,08	1729,860	16,95	16,93	0,07	0,44
	102,08	1734,740	16,99			
50	204,15	3395,726	16,63			
	204,15	3407,105	16,69	16,62	0,07	0,45
	204,15	3376,837	16,54			
80	330,90	5445,695	16,46			
	330,90	5458,662	16,50	16,50	0,04	0,25
	330,90	5473,049	16,54			
100	413,60	6611,175	15,98			
	408,30	6533,512	16,00	16,03	0,06	0,36
	408,30	6569,809	16,09			
120	498,30	7796,854	15,65			
	498,30	7989,073	16,03	15,80	0,20	1,29
	498,30	7837,058	15,73			
		Media	16,42			
		SD	0,58			
		RSD	3,54			

Se comprueba que la pendiente es significativamente diferente de cero mediante la prueba t-Student. Además, se calculan los intervalos de confianza que no deben incluir el cero. Ver Tabla 10.1.11.

Tabla 10.1.11 Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente

Test de la pendiente	
t _a experimental	227,924
t tabulada (ρ:0,05; 33)	2,042
Criterio aceptación: t _{a,exp} >t _{tab}	Cumple
Intervalo de confianza: (15,853;16,138)	Cumple

Se comprueba que la recta pasa por el origen de coordenadas mediante la prueba t-Student resultando la ordenada en el origen estadísticamente igual a cero. También se determinan los intervalos de confianza que incluye el cero. Ver Tabla 10.1.12.

Tabla 10.1.12 Significación estadística de la ordenada en el origen

Test de proporcionalidad	
t _b experimental	1,984
t tabulada (ρ:0,05; 33)	2,042
Criterio aceptación: t _{b,exp} <t _{tab}	Cumple
Intervalo de confianza: (0,743;61,980)	Cumple

IV. Precisión

a. Instrumental

Se realizan 6 inyecciones consecutivas de la solución patrón de HQ al 100% para la riqueza y 6 inyecciones consecutivas de la solución patrón de HQ al 0,2% para los productos de degradación.

Tabla 10.1.13 Resultados de la precisión instrumental a nivel de riqueza y de productos de degradación

Nº Inyección	Patrón 100% Área	Patrón 0,2% Área
1	6533,51172	13,51057
2	6502,74123	14,01055
3	6574,01233	13,00121
4	6522,52846	13,82601
5	6540,01082	13,58235
6	6538,69531	13,42698
Media	6535,25	13,56
SD	23,49	0,35
RSD	0,36	2,57

Los resultados obtenidos para la precisión instrumental tanto a nivel de riqueza como a nivel de productos de degradación cumplen con los respectivos criterios de aceptación previamente preestablecidos como $RSD \leq 1,5\%$ y $RSD \leq 3,0\%$, respetivamente.

b. Repetibilidad

Para demostrar la repetibilidad del método se realizan 3 análisis completos e independientes entre sí – pesadas diferentes tanto de patrones como de muestras – de forma consecutiva según el procedimiento descrito en el Anexo I de una misma alícuota homogénea del lote de HQ TS4036000. Según el procedimiento, se preparan por duplicado tanto la solución patrón como la solución problema.

La Tabla 10.1.14 muestra los resultados de la repetibilidad tanto para la valoración de riqueza como de los productos de degradación cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos.

Tabla 10.1.14 Resultados repetibilidad del método

Análisis	Problema	HQ (%)
A1	P1	98,71
	P2	99,34
A2	P3	100,16
	P4	100,78
A3	P5	101,45
	P6	99,45
Media		99,98
SD		1,013
RSD		1,01
Criterio aceptación		RSD ≤ 2,0%

c. Precisión intermedia

Se realizan 3 análisis completos e independientes entre sí, de la misma forma que en la repetibilidad, bajo distintas condiciones operacionales: un día distinto, analista distinto, HPLC distintos y diferente lote de columna cromatográfica.

Los resultados cumplen con los criterios de aceptación preestablecidos tal y como se muestra en la Tabla 10.1.15.

Tabla 10.1.15 Resultados de la precisión intermedia

HPLC	Analista	Día	Columna	Análisis	Problema	HQ (%)
CQ51	A	Día 1	176	A1	P1	98,71
					P2	99,34
				A2	P3	100,16
					P4	100,78
				A3	P5	101,45
					P6	99,45
CQ33	B	Día 2	182	A4	P7	98,80
					P8	99,70
				A5	P9	98,10
					P10	100,20
				A6	P11	101,40
					P12	99,90
				Media		99,83
				SD		1,042
				RSD		1,04
				Criterio de aceptación:	$RSD \leq 2 \cdot RSD_{REPETIBILIDAD}$	2,0%

V. Exactitud

Las soluciones para determinar la exactitud del método se han preparado por triplicado. Se han pesado las cantidades exactas de HQ equivalentes al 50, 100 y 150% de la cantidad nominal. Cada una de las soluciones se inyecta por duplicado. Se cuantifica HQ utilizando la media del factor respuesta de las dos soluciones patrón 100%.

En la Tabla 10.1.16 se muestran los valores de la recuperación para HQ donde cada uno de los valores individuales en todas las concentraciones estudiadas cumplen con el criterio de aceptación, para principio activo, preestablecido: 98,0-102,0%.

Tabla 10.1.16 Resultados de la recuperación de HQ

Nivel	Recuperación	Recuperación *	Media	SD	SD ²	RSD
50	49,8	99,6	99,4	1,114	1,240	1,12
	49,1	98,2				
	50,2	100,4				
100	98,7	98,7	99,6	1,082	1,170	1,09
	99,3	99,3				
	100,8	100,8				
150	150,7	100,5	100,2	0,897	0,804	0,90
	148,8	99,2				
	151,4	100,9				
	Media	99,73		SD ² _T	3,21	
	SD	0,966				
	RSD	0,97				

*: Recuperación respecto al valor teórico

Además, se aplica el test de Cochran para determinar si el factor concentración tiene influencia en los resultados y el test t-Student para evaluar si la recuperación es satisfactoria. Se demuestra que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados y que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100%, y en consecuencia, la exactitud del método es correcta (ver Tabla 10.1.17).

Tabla 10.1.17 Análisis estadístico de la exactitud

Compuestos	Test de Cochran ^{a,b}		Test t-Student ^{a,b}	
	G _{EXP}	G _{TAB}	t _{EXP}	t _{TAB}
HQ	0,386	0,871	0,826	2,306
	G _{EXP} < G _{TAB}		t _{EXP} < t _{TAB}	

^b ρ=0,05

^c degree of freedom=8

Se calcularon el factor respuesta relativo (FR_R) y el factor de corrección (Fcor) para DP-2 (p-benzoquinona), producto que se ha podido encontrar comercializado. En el caso de la DP-1 no se ha realizado al no tenerla comercialmente accesible. El Fcor se calcula a partir de una solución de 1.0 % de HQ y DP-2, la aplicación de la siguiente fórmula:

$$Fcor = \frac{A_A}{A_B} \times \frac{5,0}{P_A} \times \frac{100}{R_A} \times \frac{P_B}{5,0} \times \frac{R_B}{100}$$

Donde,

- A_A Área del pico de HQ
- A_B Área del pico del producto de degradación
- 5,0 Cantidad teórica de HQ y del producto de degradación
- P_A Peso real de HQ, en mg
- P_B Peso real del producto de degradación, en mg
- R_A Riqueza del patrón de HQ
- R_B Riqueza del patrón del producto de degradación

Los resultados para DP-2 se muestran en la Tabla 10.1.18. Sólo debe aplicarse el Fcor para aquellos productos de degradación o impurezas los cuales su FR_R esté fuera del rango 0,80-1,20. Por tanto, en el caso de la DP-2 es necesario aplicar el Fcor para su correcta cuantificación.

Tabla 10.1.18 FR_R y Fcor para DP-2

	Peso (mg)	Riqueza (%)	Área media	FR	FR _R	Fcor
HQ	5,09	99,9	1764,88123	347,082	1,00	-
DP-2 (p-benzoquinona)	4,98	99,8	4194,64404	843,986	2,43	0,41

VI. Estabilidad de la solución

Los valores de RSD para el ensayo de estabilidad de la solución se encuentran dentro de 1,5%. No se observan cambios significativos en el área de HQ. Los resultados de la estabilidad de la solución confirman que las soluciones son estables durante 36 horas (Tabla 10.1.19).

Tabla 10.1.19 Resultados de la estabilidad de la solución durante 48 h

Intervalo	Inyección	Área HQ
0	1	6688,03652
	2	6698,03232
12	1	6651,03217
	2	6643,98963
24	1	6630,89210
	2	6624,06589
36	1	6581,01458
	2	6572,74321
48	1	6521,03256
	2	6505,03179
Media		6611,587077
SD		65,362
RSD		0,99
VR a las 48 horas		2,49
VR a las 36 horas		1,72

VR: variación relativa

10.1.5. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado y optimizado un método de RP-HPLC *stability-indicating* preliminar para la determinación de HQ y sus productos de degradación, con un tiempo de análisis de 50 minutos, adecuado al objetivo previsto.
- Debido a que no se encontró información sobre los productos de degradación de HQ en las monografías, ha sido necesario llevar cabo el estudio de degradaciones forzadas con el método de RP-HPLC desarrollado adaptado a LC/MS.
- En las degradaciones forzadas sólo se han generado dos productos de degradación diferentes que han sido identificados mediante LC/MS como p-benzoquinona y 1,2,3,4-bencenotetrol, y una serie de aductos formados por la unión de un fragmento procedente de la ruptura del anillo de HQ.

- El espectro de MS del pico correspondiente a HQ tiene dos señales correspondientes a los dos tautómeros, en equilibrio, existentes en la solución con el diluyente de muestra (70:30 ACN:H₂O) en una relación 9:1.
- El proceso de extracción es simple obteniéndose unos buenos resultados en la recuperación de HQ.
- El método ha sido validado mostrando unos datos satisfactorios en cuanto a selectividad, linealidad, precisión, exactitud y estabilidad de la solución.
- El método ha sido aplicado satisfactoriamente en el análisis del estudio de compatibilidad con excipientes y la caracterización de HQ durante la etapa de preformulación.

10.2. DETERMINACIÓN DE DPK POR GPC

10.2.1. INTRODUCCIÓN

Una vez realizada la etapa de preformulación, en la que se han realizado los estudios necesarios para evaluar qué tipo de formulación es viable desarrollar, qué combinación de principios activos al qué excipientes son los más adecuados, se inicia la etapa de desarrollo de la formulación. Los métodos analíticos en la etapa de preformulación generalmente no son cortos ni están optimizados ya que lo que se busca es obtener la máxima información posible sobre el API o sustancia bajo estudio [140].

En la etapa de desarrollo de la formulación es necesario disponer de métodos analíticos adecuados para evaluar la idoneidad de los prototipos de formulación que se realizan y así, tener una información clara sobre qué cambios realizar para conseguir un prototipo con las características adecuadas. Así, basado en los resultados de la etapa de preformulación y más concretamente del estudio de compatibilidad con excipientes, se desarrolló una nueva crema despigmentante que consistía en la combinación de tres principios activos (HQ, KA y DPK), dos filtros solares (OCT y AVB) y dos antioxidantes (BHA y BHT). La cantidad presente de cada uno de ellos en la formulación es la siguiente: 4,00% HQ, 2,00% KA, 2,00% DPK, 7,50% OCT, 2,00% AVB, 0,10% BHA y 0,10% BHT. Todos ellos deben ser controlados en control de calidad según las guías actuales [175] y por tanto, deben ser monitorizados desde la etapa de desarrollo de la formulación.

Las prestaciones del método analítico deben estar adecuadas a las características de esta fase: rapidez. Debido a la cantidad de prototipos a analizar, el método debe ser corto [176]. Por tanto, el método desarrollado para llevar a cabo la fase de preformulación, de 50 minutos de tiempo de análisis o *runtime*, se debe optimizar.

Debido a la naturaleza extremadamente distinta de DPK, compuesto altamente apolar y de peso molecular elevado, y a la diferencia de contenidos de cada uno de los componentes a controlar, se evaluaron todas las opciones cromatográficas disponibles para determinar si alguno de los tipos de cromatografía era adecuado para determinar los 7 compuestos simultáneamente en un tiempo de ejecución medio o corto. La elución del conjunto de compuestos de polaridad tan diversa en un tiempo de cromatograma relativamente corto fue valorado como muy difícil. Por tanto, se decidió desarrollar dos métodos cromatográficos distintos: uno para la determinación de DPK

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

y otro para el control del resto de compuestos a controlar (HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT).

En este capítulo se describe el desarrollo analítico del método cromatográfico para cuantificar DPK presente en la formulación y su posterior validación.

10.2.2. MATERIALES

10.2.2.1. Patrones

DPK (KAD-15, Min. 95%). Sino Lion (Massó, Barcelona, España)

10.2.2.2. Reactivos y soluciones

Reactivos:

Metanol (para UV, IR, HPLC, GPC). Panreac (Barcelona, España)	(MeOH)
Acetonitrilo (para UV, IR, HPLC, ACS). Panreac (Barcelona, España)	(ACN)
Tetrahidrofurano (para UV, IR, HPLC, GPC). Panreac (Barcelona, España)	(THF)
Dimetilsulfóxido (para UV, IR, HPLC, GPC). Panreac (Barcelona, España)	(DMS)
Diclorometano (estabilizado con ~ 20 ppm de amileno; USP-NF, BP, Ph. Eur.; puro, grado farma). Panreac (Barcelona, España)	(DCM)
Hexano (Reag. USP, Ph. Eur. para análisis, ACS). Panreac (Barcelona, España)	(HEX)
Ciclohexano (Reag. Ph. Eur. para análisis, ACS, ISO). Panreac (Barcelona, España)	(CHX)
Alcohol bencílico (Ph. Eur. grado farma). Panreac (Barcelona, España)	(ABC)
2-metil-1-propanol (CHROMASOLV®, for HPLC, 99,5%). Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA)	(MPR)

10.2.2.3. Aparatos y fungibles

Aparatos:

Balanza analítica BP211D Sartorius (Gotinga, Alemania)

Baño de ultrasonidos Ultrasons 9 L Selecta (Barcelona, España)

HPLC 1100 Agilent que consiste en un horno de columna, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de red de diodos (DAD), controlado por el software Chemstation versión B04.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA); código interno CQ3

HPLC 1100 Agilent que consiste en un horno de columna, una bomba binaria, un inyector automático y un detector de red de diodos (DAD), controlado por el software Chemstation versión B04.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA); código interno CQ2

Utillaje:

Espátulas de acero inoxidable de diferentes dimensiones

Vasos de precipitados de distintos volúmenes (25 ml, 100 ml, 1 l)

Probetas de distintos volúmenes (10 ml, 100 ml, 1 l) Clase A graduada

Pesasustancias

Matraces aforados de 10, 25, 50 y 100 ml Clase A

Botella 1 l Pyrex con tapón

Jeringas plástico 10 ml

Filtros de jeringa 33 0,45 μm Millex PVDF Millipore

Viales 2 ml HPLC

Pipetas Pasteur

Cronómetro Oregon Scientific

Columna cromatográfica Phenogel 5 μm , 50 Å, 4,6 x 300 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

Precolumna cromatográfica Phenogel 5 μm , 50 \AA , 4,6 x 30 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

10.2.3. METODOLOGIA

10.2.3.1. Validación del método

El método de HPLC es validado según la guía ICH Q2 [129] evaluándolo con respecto a la selectividad, linealidad, precisión, exactitud y robustez.

I. Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analitos, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra [133].

Para demostrar la selectividad del método se evalúa la identificación de DPK, los tiempos de retención de DPK muestra (solución problema) *versus* patrón (solución patrón) y también se comprueba la ausencia de interferencias con la solución placebo.

II. Linealidad

Se estudia la linealidad del método en el rango desde el 40% hasta el 160% del valor nominal de DPK: 40%, 60%, 80%, 100%, 120%, 140% y 160%. Las soluciones patrón de DPK a las diferentes concentraciones se prepararon por pesadas independientes, inyectando cada una de las soluciones en el sistema cromatográfico por triplicado.

Solución DPK Linealidad: Pesar exactamente la cantidad de DPK patrón de trabajo indicada en la Tabla 10.2.1 en un matraz aforado de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF. Homogeneizar la solución. Filtrar la solución a través de un filtro PVDF de 0,45 μm desechando los primeros 3 ml del filtrado.

Tabla 10.2.1 Cantidades de DPK para la preparación de la linealidad

Nivel Linealidad (%)	Peso de DPK (mg)
40	4,0
60	6,0
80	8,0
100	10,0
120	12,0
140	14,0
160	16,0

Representar la respuesta *versus* concentración y calcular el coeficiente de correlación, la pendiente de la recta, la ordenada en el origen y el factor respuesta (respuesta/concentración). El criterio de aceptación es:

- $R^2 > 0.9990$
- La pendiente debe ser positiva
- La recta debe pasar por el origen

III. Precisión

a. Instrumental

Para determinar la precisión instrumental se realizan 6 inyecciones consecutivas de una misma solución patrón al 100% (concentración de trabajo).

Solución patrón 100%: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de DPK patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF. Homogeneizar la solución. Filtrar a través de un filtro PVDF de 0,45 μm desechando los primeros 3 ml del filtrado.

Calcular el coeficiente de variación de las áreas obtenidas. El criterio de aceptación es:
 $\text{RSD} \leq 1,5\%$

b. Repetibilidad

Se estudia la repetibilidad del método a tres niveles de concentración (40, 100 y 160%) mediante la preparación de 13 soluciones independientes, tanto de solución patrón como de solución problema, según Tabla 10.2.2.

Tabla 10.2.2 Cantidades de DPK patrón de trabajo y de crema para la determinación de la repetibilidad

Número de soluciones	Nivel (%)	Peso de DPK patrón de trabajo (mg)	Peso de crema (mg)
3	40	4,0	200
7	100	10,0	500
3	160	16,0	800

Solución patrón: Pesar exactamente la cantidad de DPK patrón de trabajo indicada en la Tabla 10.2.2 en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF. Homogeneizar la solución. Filtrar a través de un filtro PVDF de 0,45 µm desechando los primeros 3 ml del filtrado.

Solución problema: Pesar exactamente la cantidad de crema indicada en la Tabla 10.2.2 en un matraz aforados de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF y homogeneizar la solución. Filtrar a través de un filtro PVDF de 0,45 µm desechando los primeros 3 ml del filtrado.

La secuencia de inyección para cada nivel de concentración será:

- Inyectar 2 blancos
- Inyectar cada solución patrón por duplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Calcular la concentración en DPK de las soluciones problema de cada nivel frente a los patrones de ese mismo nivel. El criterio de aceptación es: $RSD \leq 2,0\%$.

c. Precisión intermedia

Se estudia la precisión intermedia mediante la realización de 13 soluciones independientes a tres niveles de concentración (40, 100 y 160%), de la misma forma que en la repetibilidad, en un día distinto, realizado por un analista diferente, utilizando un HPLC y columna cromatográfica distintos.

Calcular el coeficiente de variación entre los resultados obtenidos para la repetibilidad y los resultados obtenidos en este segundo análisis.

El criterio de aceptación es: $RSD \leq 2 \cdot RSD_{\text{REPETIBILIDAD}}$

IV. Exactitud

Para determinar la exactitud se utiliza el método del placebo cargado. Para ello, se prepararan por triplicado soluciones de placebo a las que se añaden cantidades conocidas de DPK patrón de trabajo a tres niveles de concentración (40, 100 y 160%). Cada solución se inyecta por triplicado.

Solución patrón 100%: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de DPK patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF. Homogeneizar la solución. Filtrar a través de un filtro PVDF de 0,45 μm desechando los primeros 3 ml del filtrado.

Solución problema: Pesar exactamente las cantidades indicadas en la Tabla 10.2.3 tanto de placebo como de DPK patrón de trabajo en matraces aforados de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF y homogeneizar la solución. Filtrar a través de un filtro PVDF de 0,45 μm desechando los primeros 3 ml del filtrado.

Tabla 10.2.3 Cantidades de DPK patrón de trabajo y placebo para la realización de la exactitud

Número de soluciones	Nivel (%)	Peso de DPK (mg)	Peso de placebo (mg)
3	40	4,0	500
3	100	10,0	500
3	160	16,0	500

La secuencia de inyección será:

- Inyectar 2 blancos
- Inyectar cada solución patrón por triplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Calcular la concentración de DPK frente al patrón. El criterio de aceptación para DPK en producto terminado es: Recuperación: 97,0 – 103,0%.

V. Robustez

Para determinar la robustez del método, las condiciones experimentales del método cromatográfico son cambiadas deliberadamente. Se estudia el efecto de pequeñas variaciones en los parámetros considerados críticos sobre la resolución de DPK (Tabla 10.2.4): el flujo de FM y la temperatura de la columna. También se estudia la robustez de la columna testando diferentes lotes de la columna.

Tabla 10.2.4 Parámetros a evaluar en la robustez del método

Parámetros	Variaciones		
Flujo FM (ml/min)	1,3	1,5	1,7
Temperatura de columna (°C)	37	40	43
Código / Lote de columna	162 (363661-3)	163 (363661-8)	

Para llevar a cabo el estudio de la robustez del método se prepara un análisis que consta de dos soluciones patrón y tres soluciones problema. Una de las soluciones problema se inyecta en el cromatógrafo modificando ligeramente los siguientes parámetros: el flujo de FM y la temperatura de la columna. Por otro lado, el estudio de la robustez de la columna se realiza mediante la inyección del análisis completo preparado en las dos columnas.

Solución patrón 100%: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de DPK patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF. Homogeneizar la solución. Filtrar a través de un filtro PVDF de 0,45 µm desechando los primeros 3 ml del filtrado.

Solución problema: Pesar exactamente alrededor de 500 g de crema del lote A02 en un matraz aforado de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF y homogeneizar la solución. Filtrar a través de un filtro PVDF de 0,45 µm desechando los primeros 3 ml del filtrado.

Para la evaluación de la variación del flujo de FM y de la temperatura de la columna sólo se inyectaron una de la soluciones problema por duplicado.

Para determinar la robustez de la columna, la secuencia de inyección es:

- Inyectar 2 blancos
- Inyectar cada solución patrón por triplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Calcular la concentración de DPK frente al patrón y comparar los resultados obtenidos mediante un test estadístico adecuado para demostrar si existen o no diferencias estadísticamente significativas.

VI. Estabilidad de la solución

Se prepara una solución patrón y una solución problema, se llenan viales de HPLC y se guarda en el carro del inyector a 20 °C. Inyectar las soluciones en los intervalos de tiempo 0, 24 y 48 horas después de su preparación. Calcular el RSD (%) de las áreas del pico de principio activo de las diferentes inyecciones así como la variación relativa entre la primera y la última inyección. El criterio de aceptación es: la variación relativa entre la primera y la última inyección no debe ser superior a 2,0%.

10.2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.2.4.1. *Estudio de solubilidad*

Con el objetivo de seleccionar un disolvente adecuado para extraer y disolver DPK de la crema y evaluar el tipo de cromatografía a utilizar para su análisis, se realiza un estudio de solubilidad en el que se incluyeron los siguientes disolventes: tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo (ACN), hexano (HEX), dimetilsulfóxido (DMSO), ciclohexano (CHX), diclorometano (DCM), metanol (MeOH), alcohol bencílico (ABC) y 2-metil-1-propanol (MPR).

Mezclas acuosas de estos disolventes se descartan debido a la naturaleza apolar de DPK – log P: 14,0 –. De todos los disolventes estudiados, Tabla 10.2.5, los únicos capaces de disolver DPK son el THF y el DCM. De estos, el THF también solubiliza toda la matriz de la crema mientras que con el DCM se obtiene una suspensión. Por tanto, se escoge como disolvente de la muestra el THF ya que se evita la introducción de una etapa de centrifugación necesaria en el caso del DCM para separar el disolvente de las partículas en suspensión.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.2.5 Resultados del estudio de solubilidad de DPK

	Solución patrón	Solución problema
ACN	Insoluble	Insoluble
MeOH	Insoluble	Insoluble
DCM	Soluble	Prácticamente insoluble
DCM/ACN (50/50 v/v)	Precipita	Precipita
DMS	Precipita	Insoluble
HEX	Insoluble	Insoluble
CHX	Poco soluble	Prácticamente insoluble
MPR	Insoluble	Insoluble
ABC	Poco soluble	Poco soluble
THF	Soluble	Soluble

10.2.4.2. Desarrollo del método

El objetivo principal del método cromatográfico es determinar el contenido en DPK de los diferentes prototipos de formulación realizados durante la etapa de desarrollo de la formulación.

Se realiza una búsqueda bibliográfica en la que se encuentra una patente china de un método de RP-HPLC isocrático que utiliza una columna μ Bondpack C18 (10 μ m) 3,9 x 300 mm a 35 °C con una fase móvil 25/75 THF/MeOH [177]. También se encuentra una tesis doctoral en la que se describe un método de RP-HPLC isocrático en una columna Luna C 18 (5 μ m) 150 x 4,6 mm con una fase móvil compuesta por (35:30:29:5:1) THF:ACN:MeOH:H₂O:HAcO de duración aproximada de unos 15 minutos [178].

Aunque los métodos hallados podrían ser válidos para la determinación de DPK presente en los prototipos, se decide desarrollar un método distinto, más corto, aprovechando el hecho de su elevado peso molecular (Pm: 618,93 g/mol).

DPK es el éster dipalmítico del ácido kójico (Figura 10.2.1) siendo las dos cadenas palmitato (C₁₆) las que confieren a la molécula su carácter apolar, log P: 14,0. Esto le confiere un carácter liposoluble y en consecuencia, prácticamente insoluble en medios acuosos.

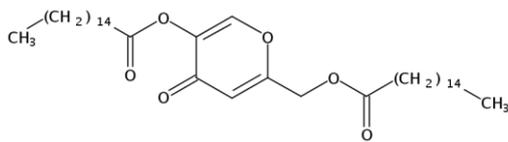


Figura 10.2.1 Molécula de DPK

Como resultado del estudio de solubilidad realizado (apartado 10.2.4.1) se observa que en el único disolvente que es capaz de solubilizar tanto DPK patrón de trabajo como la crema es el THF. Para moléculas pequeñas y solubles en disolventes orgánicos, especialmente en THF, una opción cromatográfica a contemplar es el análisis por cromatografía de permeación en gel (PGC), tal y como se observa en la Figura 10.2.2 [179].

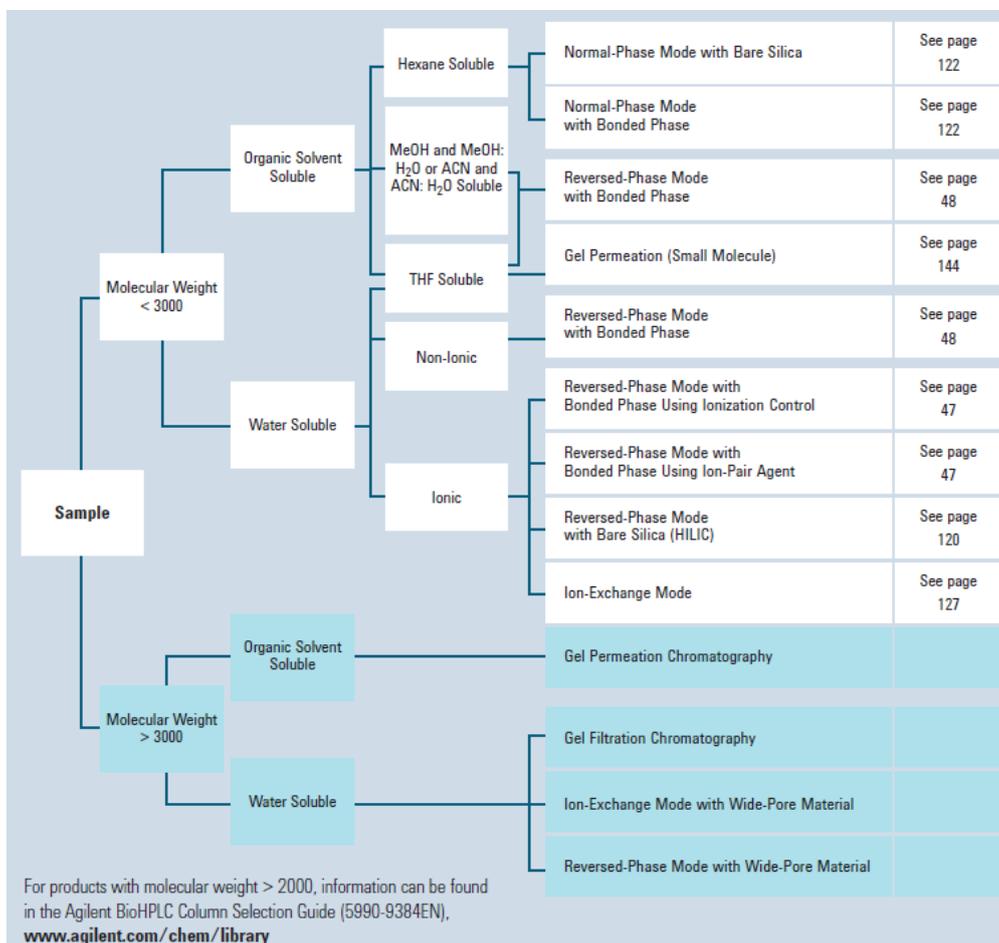


Figura 10.2.2 Diagrama para la selección del tipo de cromatografía según las características de la molécula a analizar [179]

En la GPC, las moléculas pequeñas penetran en los poros de las partículas de gel, por lo que necesitan más tiempo para salir al final de la columna. Las moléculas grandes, en cambio, al no penetrar en las partículas de gel se mueven con el disolvente a una velocidad mayor de elución y salen antes de la columna (Figura 10.2.3) [180-181].

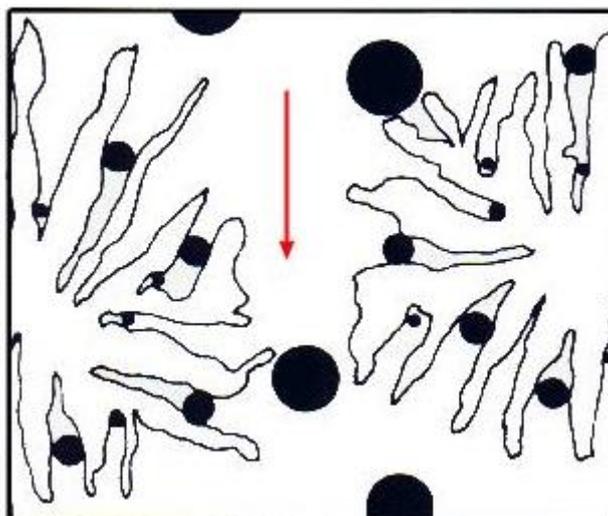


Figura 10.2.3 Mecanismo de elución en GPC [181]

Dado que DPK presenta un peso molecular y un volumen hidrodinámico – volumen efectivo ocupado por las cadenas de la molécula en disolución – mucho más alto que el resto de componentes de la crema, se desarrolla un método de GPC [182].

Existen dos factores que son críticos en el desarrollo de un método de separación GPC: columna y fase móvil. Se buscó una columna adecuada para separaciones de moléculas pequeñas y que fuese compatible con THF y se escogió la columna Phenogel™ 5 μm 50 Å, 4,6 x 300 mm. La fase estacionaria de la columna es un copolímero de estireno-divinilbenceno en THF.

Como fase móvil se elige el THF ya que, por un lado, es el único disolvente capaz de la solubilizar la totalidad de la crema y, por otro lado, es el disolvente en que se encuentra empaquetada la fase estacionaria de la columna. De esta forma, utilizando como fase móvil y como diluyente de muestra el mismo disolvente se evitan posibles precipitaciones. Se estudia el flujo de fase móvil en el rango de 0,5 a 1,5 ml/min, no observándose disminución en la resolución entre el pico de DPK y el pico del resto de componentes. Por tanto, el caudal seleccionado fue 1,5 ml/min debido a que, consecuentemente, el tiempo de retención de DPK es menor – t_R : 2,17 min –.

Las condiciones del método se optimizan utilizando una solución de DPK de concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. El volumen de inyección es estudiado en el rango de 10-100 μl , seleccionando 25 μl . La temperatura de columna también es estudiada desde 30 °C hasta 50 °C y se decide mantenerla a 40 °C para mantener bajo control la presión del sistema. La detección se realiza a 250 nm debido a que DPK presenta su máximo de absorción tal y como se observa en la Figura 10.2.4.

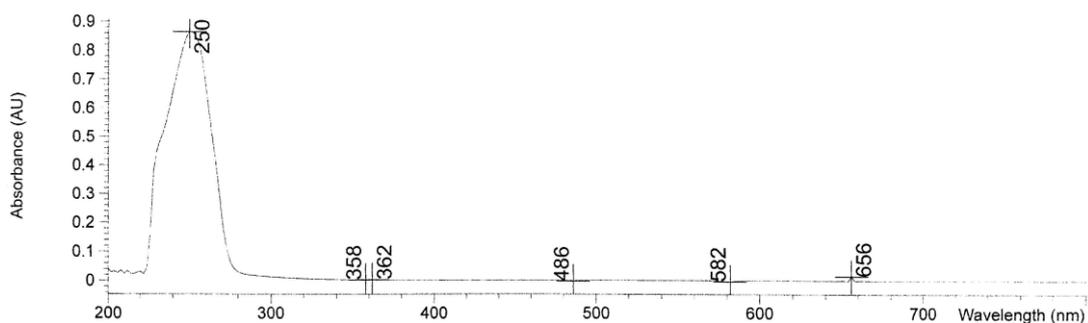


Figura 10.2.4 Espectro de absorción UV-Vis de DPK

Las condiciones cromatográficas del método desarrollado son las que se muestran en la Tabla 10.2.6 y la Figura 10.2.5 muestra el cromatograma típico de la solución de crema.

Tabla 10.2.6 Condiciones cromatográficas del método GPC-UV

Columna	Phenogel™ 5 μm 50 Å, 4,6 x 300 mm
Pre-columna	Phenogel™ 4,6 x 30 mm
Temperatura de columna	40 °C
Volumen de inyección	25 μl
Temperatura de carro muestras	25 °C
Fase móvil	Tetrahidrofurano
Flujo	1,5 ml/min
Detección	UV a 250 nm
Tiempo de cromatograma	5 minutos
Tiempo de retención	2,2 minutos

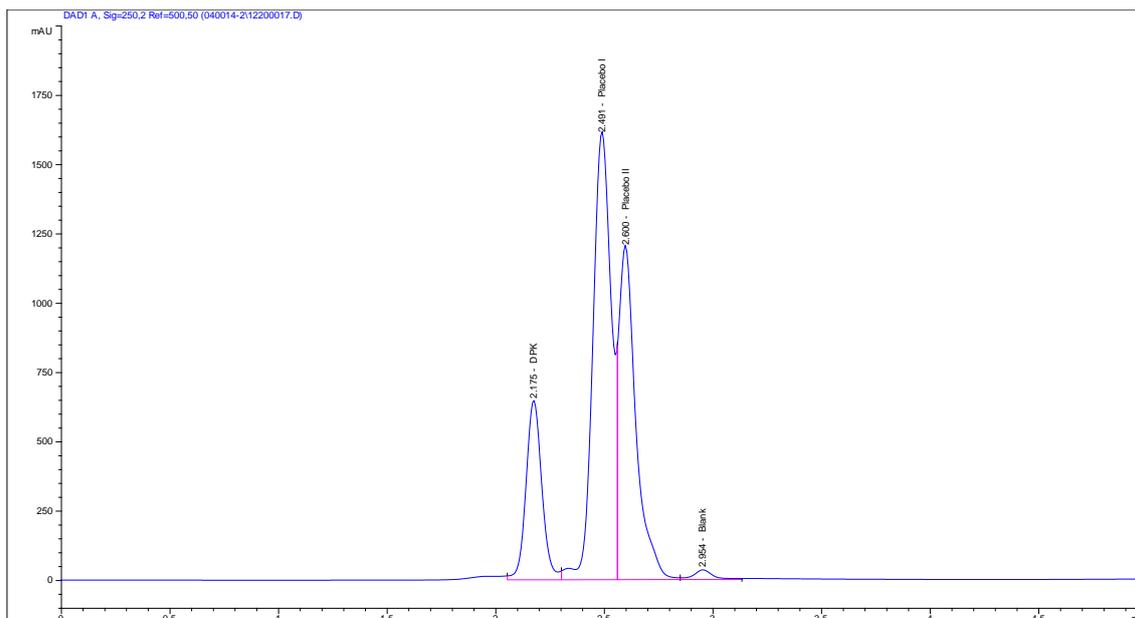


Figura 10.2.5 Cromatograma típico de la solución crema a una concentración de 200 µg/ml en DPK

10.2.4.3. Validación del método

I. Selectividad

La selectividad se lleva a cabo a través de la comparación del tiempo de retención del pico de DPK tanto en la solución patrón como en la solución problema. No se detecta ninguna interferencia procedente del disolvente utilizado (solución blanco) ni del resto de compuestos de la crema (solución placebo) tal y como se muestra en las Figuras 10.2.6 A 10.2.9 demostrando así su selectividad. En las condiciones cromatográficas desarrolladas, DPK presenta un tiempo de retención de aproximadamente 2,2 minutos permitiendo así una determinación rápida que es esencial para los análisis en la etapa de desarrollo de la formulación.

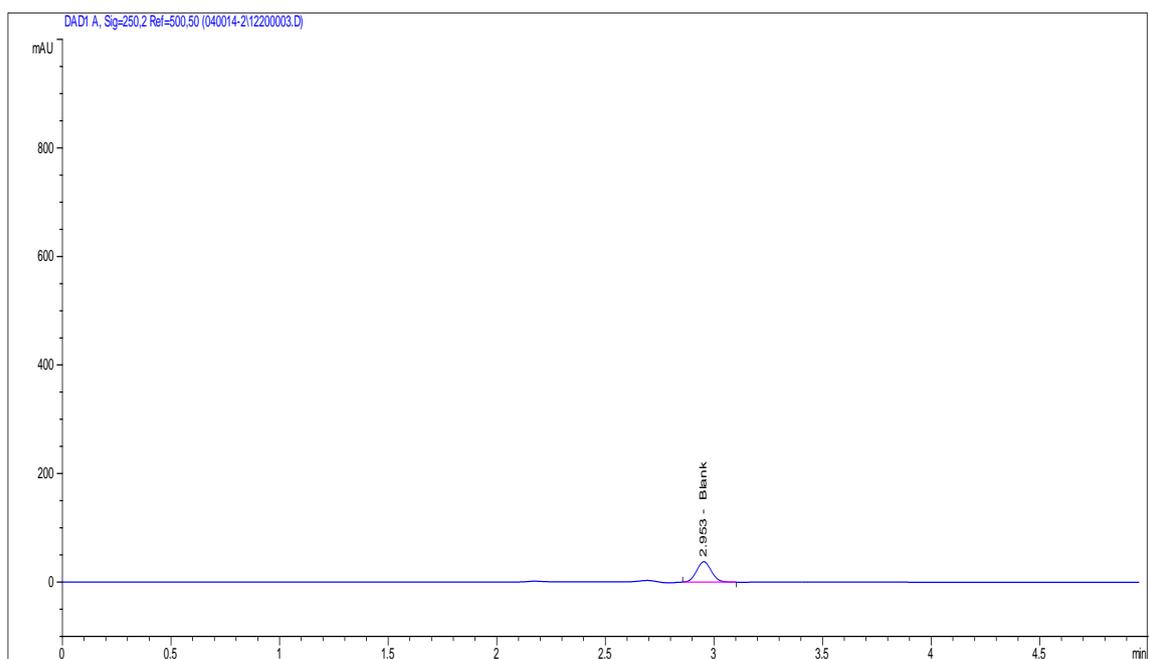


Figura 10.2.6 Cromatograma del blanco

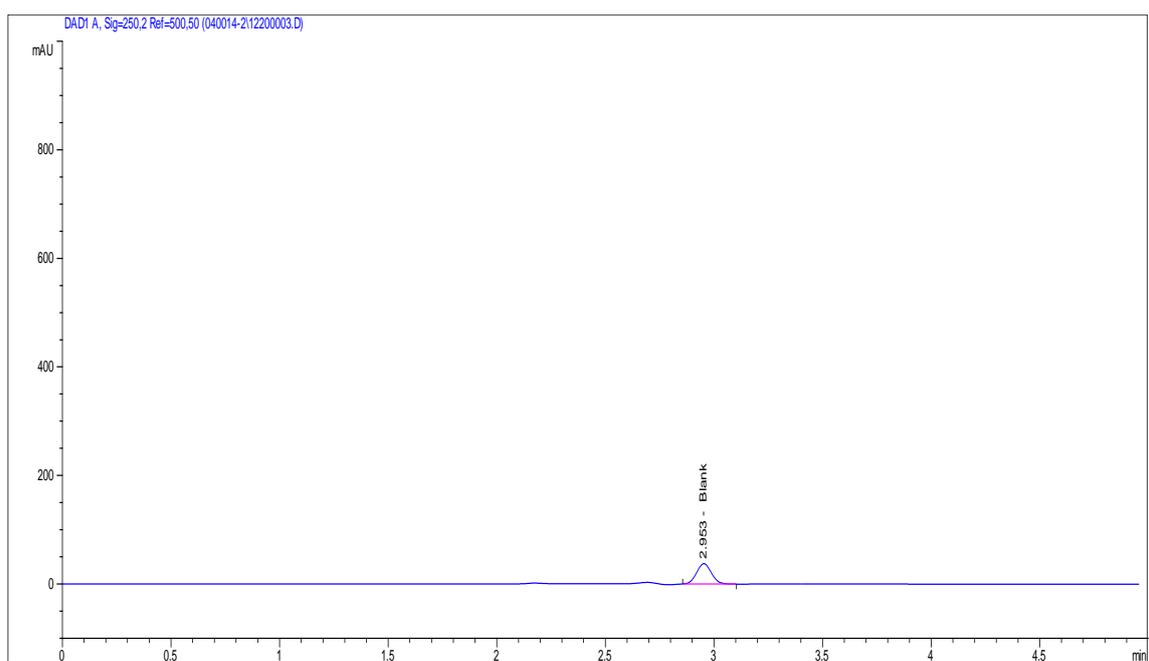


Figura 10.2.7 Cromatograma de la solución placebo

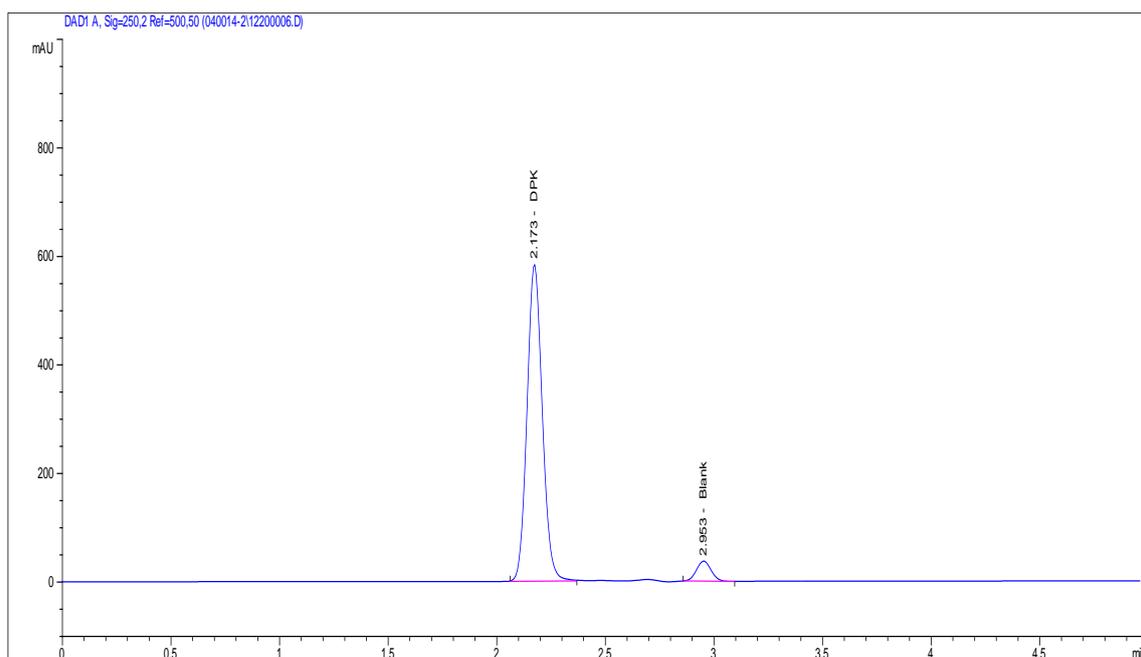


Figura 10.2.8 Cromatograma de la solución patrón de DPK a una concentración de 200 µg/ml

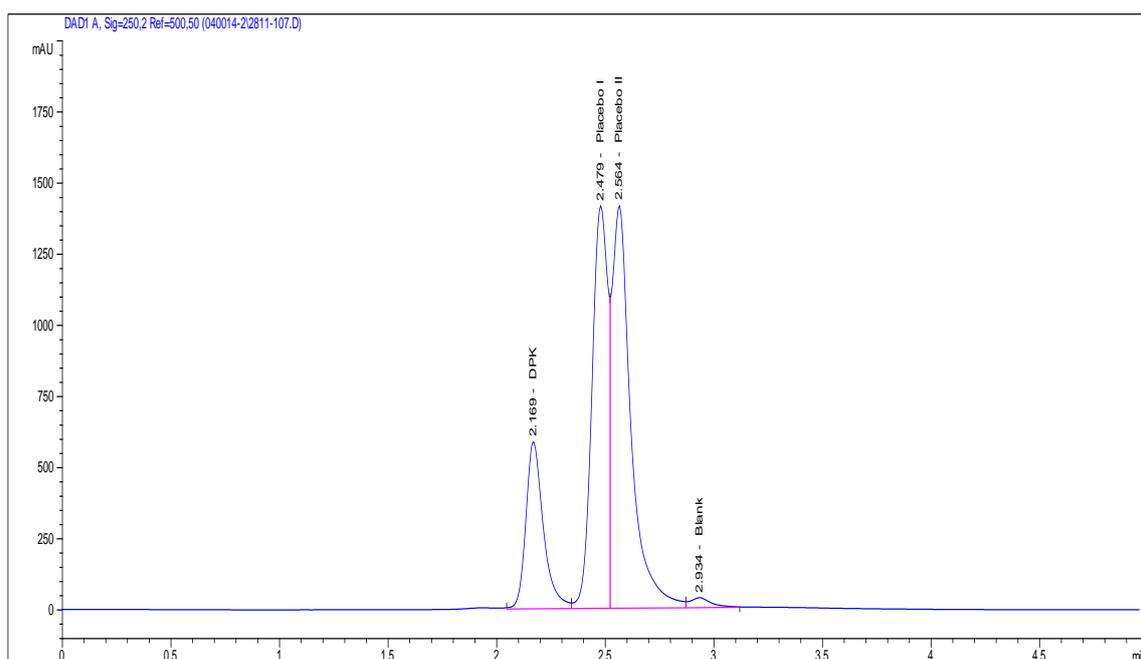


Figura 10.2.9 Cromatograma de la solución problema de la crema a una concentración de 200 µg/ml en DPK

El cromatograma de la solución placebo (Figura 10.2.7) no se observa el doble pico a t_R : 2,4-2,5 minutos que sí se observa en el cromatograma correspondiente a la solución problema (Figura 10.2.9). Esto es debido a que el placebo elaborado no contiene ninguno de los compuestos a controlar: HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA y BHT. De todo este conjunto de compuestos, los únicos capaces de producir este doble pico son AVB

y OCT, cuyo peso molecular es suficientemente grande (310,39 g/mol y 290,40 g/mol, respectivamente) como para eluir después de DPK (618,93 g/mol) y antes del resto de compuestos de peso molecular más pequeño (entre 100 y 200 g/mol).

II. Linealidad

Se comprueba la linealidad en el rango de concentraciones de 40-160% de la concentración nominal. Se preparan 7 soluciones patrón inyectándose por triplicado: 40%, 60%, 80%, 100%, 120%, 140% y 160%.

Las áreas de los picos de DPK se representan frente a la concentración y se realiza una regresión lineal por mínimos cuadrados presentándose los resultados en la Tabla 10.2.7 y la Figura 10.2.10.

Tabla 10.2.7 Resumen resultados linealidad DPK

<i>Area = a · Concentración + b</i>	
Pendiente (a)	14,503
Ordenada en el origen (b)	-6,072
Coefficiente de correlación (r)	0,9996
Coefficiente de determinación (r ²)	0,9993

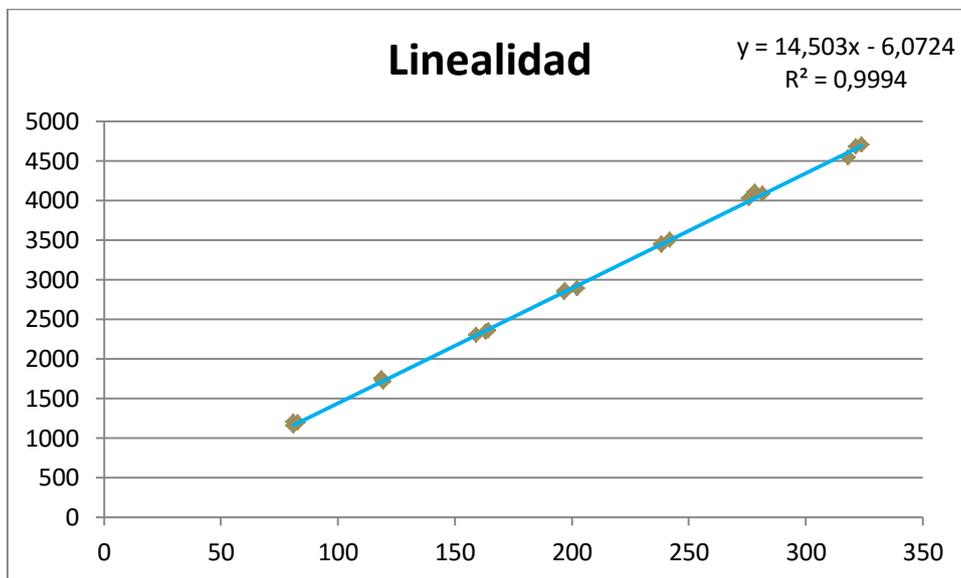


Figura 10.2.10 Gráfica de la linealidad de la DPK

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.2.8 Datos de la linealidad de DPK

Nivel (%)	Concentración (µg/ml)	Área	FR	Media	SD	RSD
40	81,00	1154,99333	14,26	14,50	0,29	2,00
	81,00	1200,70000	14,82			
	83,00	1197,55333	14,43			
60	118,60	1747,44333	14,73	14,52	0,21	1,43
	118,80	1723,51667	14,51			
	119,40	1709,82667	14,32			
80	159,20	2298,51667	14,44	14,37	0,06	0,40
	163,20	2342,08333	14,35			
	164,40	2355,93333	14,33			
100	196,80	2838,64333	14,42	14,40	0,13	0,92
	197,00	2861,71667	14,53			
	202,40	2886,87333	14,26			
120	238,20	3437,46000	14,43	14,45	0,02	0,16
	238,40	3450,74000	14,47			
	242,00	3495,31667	14,44			
140	275,60	4021,48333	14,59	14,61	0,13	0,89
	278,20	4103,13000	14,75			
	281,60	4080,74333	14,49			
160	318,20	4537,29667	14,26	14,44	0,16	1,08
	321,40	4672,33333	14,54			
	323,80	4701,73000	14,52			
		Media	14,47			
		SD	0,157			
		RSD	1,09			

Se calcula el factor respuesta (FR) que expresa la relación entre el área y la concentración para cada una de las inyecciones de la linealidad. El coeficiente de variación (RSD) es 1,1%, muy inferior al criterio de aceptación del 5,0% demostrando una relación lineal (Tabla 10.2.8).

Se comprueba que la pendiente es significativamente diferente de cero mediante la prueba t-Student. Además, se calcula el intervalo de confianza que no incluye el cero. Ver Tabla 10.2.9.

Tabla 10.2.9 Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente

Test de la pendiente	
t_a experimental	173,376
t tabulada ($\rho:0,05; 33$)	2,093
Criterio aceptación: $t_{a,exp} > t_{tab}$	Cumple
Intervalo de confianza: (14,328;14,678)	Cumple

Se comprueba que la recta pasa por el origen de coordenadas mediante la prueba t-Student resultando la ordenada en el origen estadísticamente igual a cero. También se determina el intervalo de confianza que incluye el cero. Ver Tabla 10.2.10.

Tabla 10.2.10 Significación estadística de la desviación estándar de la ordenada en el origen

Test de proporcionalidad	
t_b experimental	-0,337
t tabulada ($\rho:0,05; 33$)	2,093
Criterio aceptación: $t_{b,exp} < t_{tab}$	Cumple
Intervalo de confianza: (-43,781,31,637)	Cumple

III. Precisión

a. Instrumental

Para demostrar la repetibilidad del sistema se utilizan los resultados correspondientes a 6 inyecciones consecutivas de una misma solución patrón al 100 % a la concentración de trabajo (Tabla 10.2.11).

Tabla 10.2.11 Resultados de la precisión instrumental

Nº Inyección	t _R (min)	Área
1	2,167	3313,64185
2	2,166	3305,90674
3	2,166	3305,95557
4	2,167	3297,77319
5	2,166	3299,15161
6	2,166	3294,32129
Media	2,166	3302,79171
SD	0,001	6,355
RSD	0,03	0,19

Los resultados obtenidos para la precisión instrumental cumplen con el criterio de aceptación previamente preestablecidos como $RSD \leq 1,5\%$.

b. Repetibilidad

Para demostrar la repetibilidad del método se preparan 13 soluciones independientes entre sí – pesadas diferentes tanto de patrones como de muestras – de forma consecutiva, según el procedimiento descrito en el Anexo II, del lote de crema A02 procedente de la validación del proceso de fabricación. De las 13 muestras, se preparan 3 soluciones al 40 % de la concentración de trabajo, 7 soluciones a la concentración de trabajo, y las 3 restantes al 160 % de la concentración de trabajo. Se realizaron 3 secuencias de inyección en el HPLC, una para cada nivel y cada una de las soluciones problema, inyectada por duplicado, y cuantificada según los patrones del nivel correspondiente.

En la Tabla 10.2.12 se muestran los factores respuesta de todas las soluciones patrón preparadas y en la Tabla 10.2.13 se muestran los resultados de la repetibilidad para la valoración de DPK cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.2.12 Factores respuesta (FR) de la repetibilidad de los patrones de DPK por niveles estudiados

Nivel (%)	Concentración (µg/ml)	Área	FR	FR medio
40	78,80	1127,83	14,31	14,32
	81,00	1144,69	14,13	
	78,80	1143,18	14,51	
100	202,60	2957,78	14,60	14,64
	196,80	2859,35	14,53	
	191,40	2823,05	14,75	
	195,00	2893,47	14,84	
	179,20	2587,31	14,44	
	198,40	2905,17	14,64	
	202,20	2966,46	14,67	
160	322,20	4751,81	14,75	14,83
	319,60	4742,31	14,84	
	323,00	4816,21	14,91	
		Media	14,61	
		SD	0,22	
		RSD	1,53	

Tabla 10.2.13 Resultados de la repetibilidad del método

Nivel (%)	Problema	DPK (%)
40	P1	101,41
	P2	99,63
	P3	98,28
100	P1	99,55
	P2	102,07
	P3	99,83
	P4	98,05
	P5	100,01
	P6	102,32
	P7	100,44
140	P1	99,34
	P2	101,39
	P3	103,74
Media		100,5
SD		1,65
RSD		1,64
Criterio aceptación		RSD ≤ 2,0%

c. Precisión intermedia

La precisión intermedia del método analítico se determina analizando el contenido en DPK del mismo lote de crema, A02, según procedimiento analítico ejecutado para la determinación de la repetibilidad bajo diferentes condiciones: un día distinto, analista distinto, HPLC distintos y diferente lote de columna cromatográfica. Los HPLC involucrados en la ejecución de la precisión intermedia son el CQ2 y el CQ3. Mientras que las columnas utilizadas son las codificadas como 165 y 168.

Los resultados cumplen con los criterios de aceptación preestablecidos tal y como se muestra en la Tabla 10.2.14.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.2.14 Resultados de la precisión intermedia

Nivel (%)	Solución	Analista A		Analista B
		Día 1; CQ2; 165	Día 2; CQ3; 168	Día 2; CQ2; 165
40	P1	101,4	99,8	101,4
	P2	99,6	99,6	99,7
	P3	98,3	102,0	99,5
100	P1	99,6	101,3	97,1
	P2	102,1	100,7	98,5
	P3	99,8	101,2	100,3
	P4	98,0	101,4	101,6
	P5	100,0	101,1	102,1
	P6	102,3	102,0	99,4
140	P7	100,4	98,6	101,1
	P1	99,3	100,9	102,1
	P2	101,4	100,7	100,3
	P3	103,7	101,4	100,3
	Media	100,5	100,8	100,3
	SD	1,65	0,99	1,46
	RSD	1,64	0,98	1,45
			Media Global	100,5
			SD Global	1,37
			RSD Global	1,37
			Criterio de aceptación: $RSD \leq 2 \cdot RSD_{REPETIBILIDAD}$	3,28

IV. Exactitud

Las soluciones para evaluar la exactitud del método se preparan por triplicado, a 500 mg de placebo se añade una cantidad conocida de DPK equivalente al 40%, 100% y 150% de la concentración nominal. Cada una de las soluciones se inyecta por duplicado. Se cuantifica el contenido en DPK utilizando la media del factor respuesta de las dos soluciones patrón 100%.

En la Tabla 10.2.15 se muestran los valores de la recuperación para DPK donde cada uno de los valores individuales en todas las concentraciones estudiadas cumplen con el criterio de aceptación para producto terminado preestablecido: 97,0-103,0%.

Además, se aplica el test de Cochran para determinar si el factor concentración tiene ninguna influencia en los resultados y el test t-Student para evaluar si la recuperación es satisfactoria. Se demuestra que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados y que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100%, y en consecuencia, la exactitud del método es correcta (ver Tabla 10.2.16).

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.2.15 Resultados de la recuperación de DPK

Nivel	Recuperación (%)	Media	SD	SD ²	RSD
50	98,8	99,3	1,982	3,928	2,00
	97,6				
	101,5				
100	98,7	100,2	1,356	1,838	1,35
	100,5				
	101,3				
150	99,5	98,8	1,067	1,139	1,08
	97,6				
	99,4				
Media	99,4				
SD	1,442		SD _T ²	6,906	
RSD	1,45				

Tabla 10.2.16 Análisis estadístico de la exactitud

Compuesto	Test de Cochran ^{a,b}		Test t-Student ^{a,b}	
	G _{EXP}	G _{TAB}	t _{EXP}	t _{TAB}
PDK	0,569	0,871	1,174	2,306
	G _{EXP} < G _{TAB}		t _{EXP} < t _{TAB}	

^a ρ=0,05

^b degree of freedom=8

V. Robustez

La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros cromatográficos, proporcionando idea de su fiabilidad durante su empleo en rutina [133].

En todas las modificaciones cromatográficas realizadas, tanto en la temperatura de la columna como del flujo de FM, el pico de DPK se mantuvo resuelto del pico más próximo correspondiente al placebo, tal y como se observa en las Figuras 10.2.11 a 10.2.14.

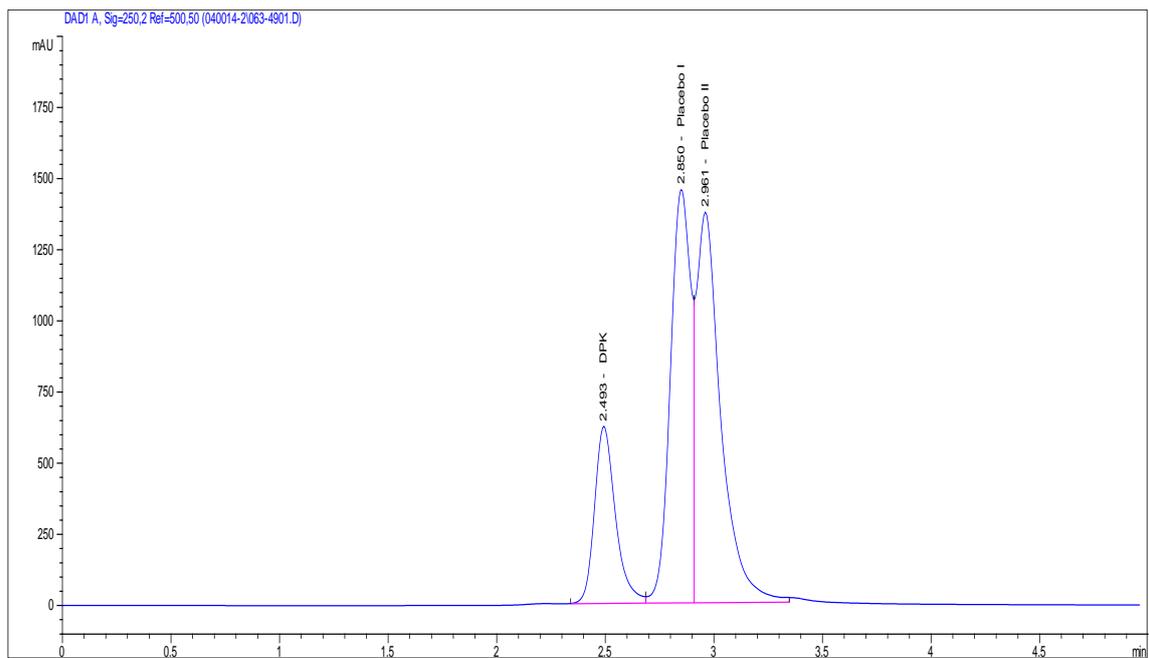


Figura 10.2.11 Cromatograma de la solución problema modificando el flujo de FM a 1,3 ml/min

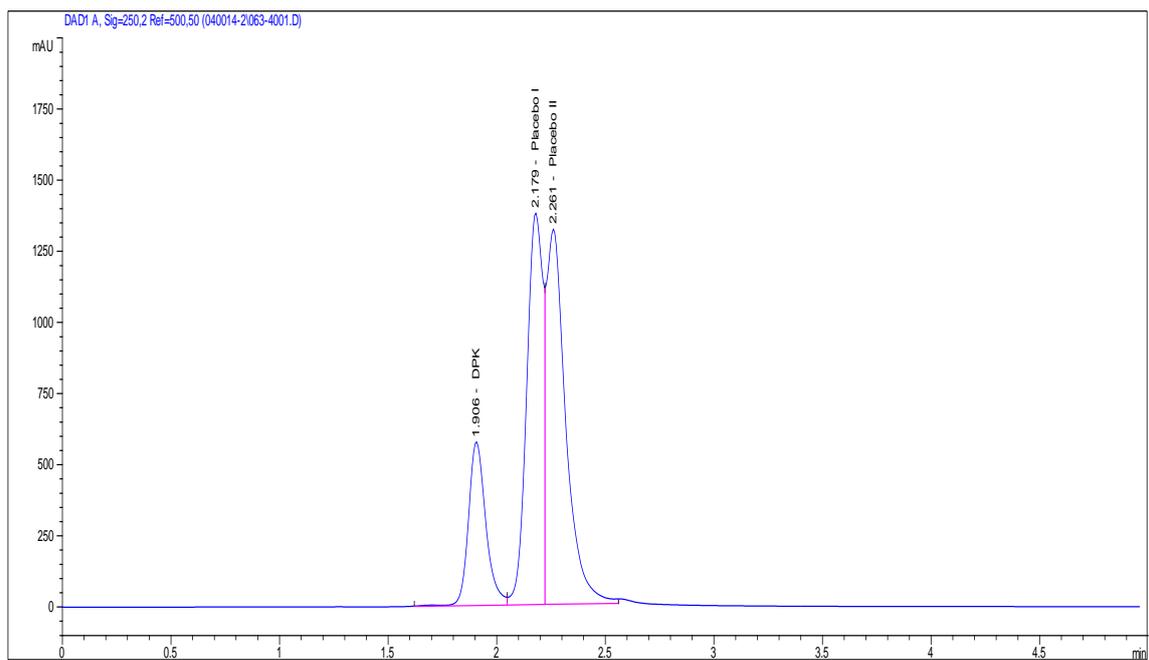


Figura 10.2.12 Cromatograma de la solución problema modificando el flujo de FM a 1,7 ml/min

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

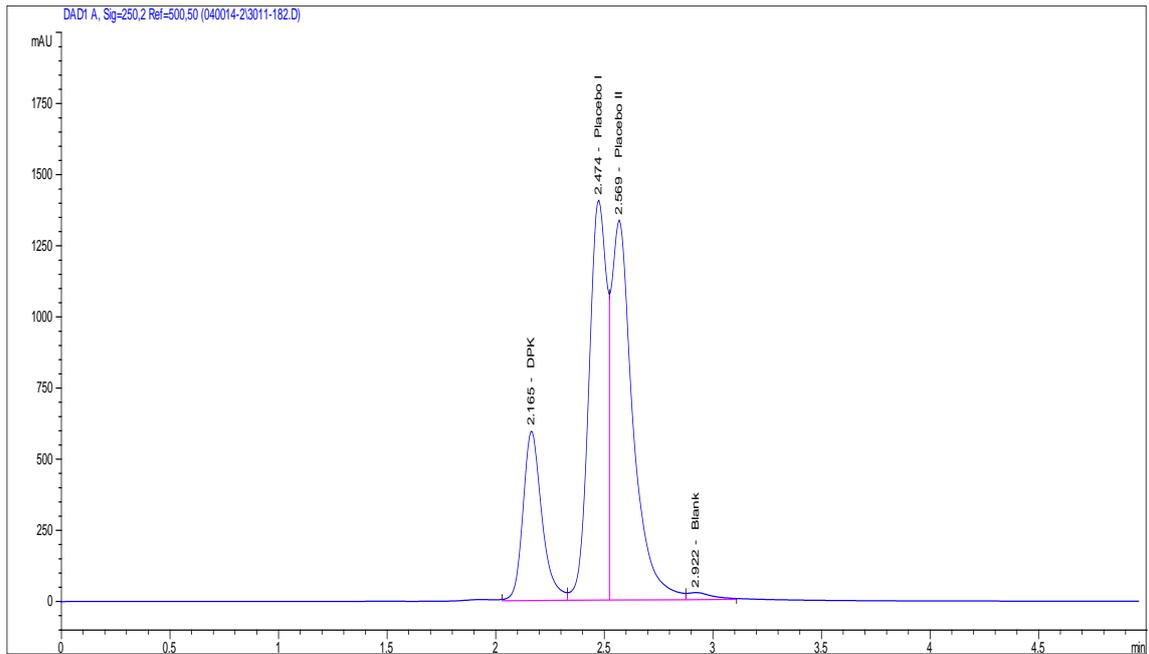


Figura 10.2.13 Cromatograma de la solución problema modificando la temperatura de la columna a 37 °C

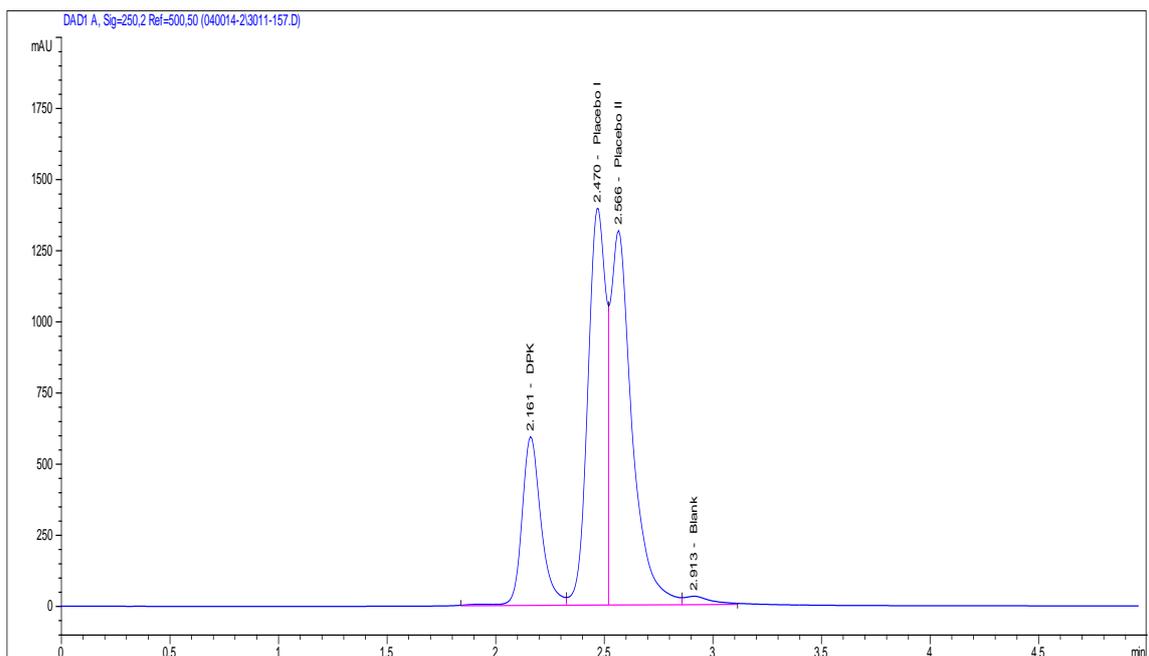


Figura 10.2.14 Cromatograma de la solución problema modificando la temperatura de la columna a 43 °C

Además, se realiza un estudio de la robustez del tipo de columna mediante un análisis completo del lote A02 que consta de 2 soluciones patrón y 3 soluciones problema, inyectándose en el HPLC en las siguientes dos columnas, iguales pero de distinto número de lote:

- Phenogel 5 µm, 50 Å, 4.6 x 300 mm, nº lote 36361-3, código 162
- Phenogel 5 µm, 50 Å, 4.6 x 300 mm, nº lote B36361-8, código 163

Los resultados obtenidos con las dos columnas se sometieron a análisis estadístico mediante la prueba t-Student suponiendo varianzas iguales (comprobado previamente mediante el análisis de la varianza de un factor). Como el t calculado (0,079) es menor que el t crítico (2,776, contraste de dos colas), la hipótesis nula se toma como cierta y las dos medias muestrales no difieren significativamente (Tabla 10.2.17). Se usa un contraste de dos colas ya que no interesa el sentido en que difieren las medias (es decir si la diferencia es positiva o negativa). Por tanto, se puede concluir que el método es robusto en cuanto a columna cromatográfica.

Tabla 10.2.17 Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	Columna 162	Columna 163
Media	100,46	100,37
Varianza	2,175	1,807
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	1,991	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,0796	
P(T<=t) una cola	0,4702	
Valor crítico de t (una cola)	2,1318	
P(T<=t) dos colas	0,9404	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7765	

VI. Estabilidad de la solución

Los valores de RSD para el ensayo de estabilidad de las soluciones se encuentran dentro de 1,5% y la variación relativa entre la primera y la última inyección, en ningún caso, es superior al 2,0%. No se observan cambios significativos en el área de DPK. Los resultados de la estabilidad de la solución confirman que las soluciones son estables durante 48 horas (Tabla 10.2.18).

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.2.18 Resultados de la estabilidad de la solución durante 48 h

Intervalo	Inyección	Solución patrón Área DPK	Solución problema Área DPK
0	1	3015,25874	2837,05215
	2	3020,21011	2833,96584
12	1	3016,98986	2836,12458
	2	3009,65429	2821,01259
24	1	2990,01983	2802,87459
	2	2993,23574	2814,32674
36	1	2986,98673	2789,65498
	2	2979,45665	2793,02543
48	1	2960,01202	2785,36297
	2	2964,32963	2789,36982
Media		2993,61536	2810,27697
SD		21,663	20,852
RSD		0,72	0,74
Variación relativa		1,83	1,68

10.2.5. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado y optimizado un método cromatográfico de permeación en gel (GPC) para la determinación de DPK en 5 minutos, con el objetivo de dar soporte analítico a la fase de desarrollo de la formulación.
- El proceso de extracción de DPK es muy simple y corto obteniéndose unos buenos resultados en la recuperación del compuesto.
- El método ha sido validado mostrando unos datos satisfactorios en cuanto a selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez y estabilidad de la solución.
- El método ha sido aplicado satisfactoriamente en el análisis de prototipos generados durante la etapa de desarrollo de la formulación.

10.3. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT POR HPLC

10.3.1. INTRODUCCIÓN

Tal y como se ha explicado en el capítulo 10.2, de los compuestos de la formulación que son necesarios controlar desde etapas tempranas son los tres APIs (HQ, KA y DPK), los dos filtros solares (OCT y AVB) y los dos antioxidantes (BHA y BHT). Debido a la naturaleza extremadamente distinta de DPK, se decide desarrollar un método para su determinación, descrito en el Anexo II. Para la determinación del resto de compuestos se desarrolla otro método.

Se realiza una búsqueda bibliográfica sobre los compuestos en estudio y no se encuentra ningún método para la determinación simultánea de todos ellos. Aunque se han encontrado varios métodos para la determinación de cada uno de los compuestos solos o en combinación con otros compuestos. Se han publicado varios métodos analíticos para la determinación de la HQ y sus combinaciones en formulaciones farmacéuticas, cosméticas o en fluidos biológicos utilizando diferentes técnicas tales como volumetría redox [45], electroforesis capilar [183-184], espectrofotometría UV-Visible [141,185-186], voltametría [187] y HPLC [188-191]. También se han encontrado varios métodos analíticos para la determinación de KA sólo o en combinación con otras sustancias por HPLC [190-195]. Para la determinación de OCT y AVB, por separado, la USP recomienda el análisis por GC [196,197] aunque también hay artículos publicados en los que se analizan mediante HPLC [198,199] y HPLC/SBWC [200]. Para el caso de los antioxidantes, la USP describe en cada una de sus monografías la valoración por HPLC [201,202]. Por otra parte, se han encontrado publicaciones en las que se describen métodos analíticos para su determinación de forma simultánea mediante distintas técnicas como GC [203], voltametría [204] y varios HPLC [205,206].

Por tanto, en este capítulo se describe el desarrollo y validación de un método de RP-HPLC para la determinación simultánea de HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT [207]. Partiendo del método de HPLC *stability-indicating* preliminar desarrollado para dar soporte a la fase de preformulación, se optimiza para la determinación simultánea de los compuestos en estudio en un tiempo de análisis adecuado a la fase de desarrollo de la formulación (14 minutos).

10.3.2. MATERIALES

10.3.2.1. *Patrones*

HQ (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

KA (analytical standard $\geq 99.0\%$). Fluka (Buchs, Switzerland)

OCT (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

AVB (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

BHA (Pharmaceutical secondary standard – traceable to Ph.Eur. and USP). Fluka (Buchs, Switzerland)

BHT (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

10.3.2.2. *Reactivos y soluciones*

Reactivos:

Acetonitrilo (para UV, IR, HPLC, ACS). Panreac (Barcelona, España) (ACN)

Ácido acético glacial (para HPLC). Panreac (Barcelona, España) (HAcO)

Ácido clorhídrico 37% (RFE, BP, Ph.Eur.) PRS-CODEX. Panreac (Barcelona, España)

Sodio Hidróxido 0,1 mol/l (0,1N) SV (solución valorada). Panreac (Barcelona, España)

Hidrógeno Peróxido 33% p/v (110 vol.) estabilizado (USP, BP, Ph. Eur.) puro, grado farma. Panreac (Barcelona, España)

Soluciones preparadas en el laboratorio:

- Hidróxido sódico 0,01 N: Transferir 10 ml de la solución hidróxido sódico 0,1 N SV a un matraz aforado de 100 ml. Enrasar con agua purificada y homogeneizar.
- Ácido clorhídrico 1 N: En un matraz aforado de 1 l, que contenga unos 700 ml de agua purificada, transferir 83 ml de ácido clorhídrico 37% (RFE, BP, Ph.Eur.). Enrasar a 1 l con agua purificada.
- Ácido clorhídrico 0,1 N: Transferir 10 ml de la solución de ácido clorhídrico 1 N a un matraz aforado de 100 ml. Enrasar con agua purificada y homogeneizar.

- Agua oxigenada al 3%: Transferir 100 ml de hidrógeno peróxido 33% (USP, BP, Ph.Eur.) a un matraz aforado de 1000 ml. Enrasar con agua purificada y homogeneizar.

10.3.2.3. *Aparatos y utillaje*

Aparatos:

Balanza analítica BP211D Sartorius (Gotinga, Alemania)

Baño de ultrasonidos Ultrasons 9 L Selecta (Barcelona, España)

Agitador magnético Agimatic ED Selecta (Barcelona, España)

Centrifuga Meditronic P Selecta (Barcelona, España)

HPLC 1200 Agilent que consiste en un horno de columna, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de red de diodos (DAD), controlado por el software Chemstation versión B04.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA); código interno CQ33 y CQ51

Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) acoplado a un detector de espectrometría de masas (cuadrupolo híbrido) de tiempo de vuelo QSTAR Elite (ABSciex, Concord, Ontario, Canada) equipado con una fuente de ionización pro electrospray (ESI), controlado por el software Analyst QS 2.0 software (ABSciex, Concord, Ontario, Canada).

Utillaje:

Espátulas de acero inoxidable de diferentes dimensiones

Portaobjetos

Vasos de precipitados de distintos volúmenes (25 ml, 100 ml, 1 l)

Probetas de distintos volúmenes (10 ml, 100 ml, 1 l) Clase A graduada

Desecador de vidrio Simax con grifo en la tapa esmerilada

Pesasustancias

Matraces aforados de 10, 25, 50 y 100 ml Clase A

Tubos centrífuga de 10 ml

Pipeta doble aforo 1, 2, 5 y 10 ml Clase A

Botella 1 l Pyrex con tapón

Jeringas plástico 10 ml

Filtros de jeringa 33 0,45 μm Millex PVDF Millipore

Filtros de membrana 0,45 μm Durapore PVDF Millipore

Viales 2 ml HPLC

Pipetas Pasteur

Cronómetro Oregon Scientific

Columna cromatográfica Zorbax SB-Phenyl 5 μm , 80 Å , 4,6 x 250 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Columna cromatográfica Zorbax SB-Phenyl 5 μm , 80 Å , 4,6 x 150 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

10.3.3. METODOLOGIA

10.3.3.1. Estudio LC-MS/TOF

La identificación de un pico desconocido procedente de las soluciones de AVB se lleva a cabo mediante estudios de LC-MS/TOF (cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas/analizador de tiempo de vuelo) con previa ionización por electrospray en modo negativo en un rango de masas de 70 a 800 Da.

Los estudios espectrales de masas de alta resolución se llevan a cabo después de una calibración adecuada del equipo. La optimización de las condiciones de MS se realiza mediante infusión directa de una solución patrón de AVB al 10% (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y los parámetros de MS son optimizados de forma adecuada para obtener información clara sobre el pico del ion molecular de AVB.

Posteriormente, el método desarrollado (compatible con MS) se adapta a LC-MS/TOF dividiendo (1:3) el flujo de fase móvil procedente del sistema HPLC, antes de la introducción en la fuente de ionización. Las soluciones se analizan mediante LC-MS/TOF utilizando los parámetros optimizados para la AVB. La identidad del

compuesto se establece con el análisis conjunto del espectro de UV-Vis, del espectro de masas y una búsqueda bibliográfica intensiva.

10.3.3.2. Validación del método

El método de HPLC es validado según la guía ICH Q2 [4] evaluándolo con respecto a la selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez y estabilidad de la solución. El límite de detección y cuantificación no se evalúa porque el método es desarrollado y optimizado para la cuantificación de componentes mayoritarios.

I. Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analitos, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra [133].

Para demostrar la selectividad del método se evalúa la identificación de cada uno de los compuestos frente a los patrones de trabajo, se comprueba la ausencia de interferencias con la solución placebo y se estudia la pureza de cada uno de los picos en una solución problema utilizando un detector DAD.

Además, se realiza un estudio de degradaciones forzadas para ver los posibles productos de degradación que se pueden generar en producto acabado, es decir, en la crema.

a. Hidrólisis en medio ácido

Preparar una solución pesando 500 mg de crema en un matraz aforado de 50 ml y añadir 25 ml de HCl 0,1 N. Tapar el matraz con papel de aluminio. Dejar reaccionar con agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente. Homogeneizar y añadir 15 ml de diluyente de muestra (70:30 ACN:H₂O) y sonicar durante 15 minutos. Posteriormente, enrasar a 50 ml con diluyente de muestra y agitar durante 15 minutos. Una alícuota de 10 ml de la suspensión resultante se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos. Preparar un vial de HPLC con el líquido sobrenadante.

b. Hidrólisis en medio básico

Preparar una solución pesando 500 mg de crema en un matraz aforado de 50 ml y añadir 25 ml de NaOH 0,1 M. Tapar el matraz con papel de aluminio. Dejar reaccionar con agitación constante durante 12 horas a temperatura ambiente. Homogeneizar y añadir 15 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 15 minutos. Posteriormente,

enrasar a 50 ml con diluyente de muestra y agitar durante 15 minutos. Una alícuota de 10 ml de la suspensión resultante se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos. Preparar un vial de HPLC con el líquido sobrenadante.

c. Oxidación

Preparar una solución pesando 500 mg de crema en un matraz aforado de 50 ml y añadir 25 ml de H₂O₂ 3%. Tapar el matraz con papel de aluminio. Dejar reaccionar con agitación constante durante 3 horas a temperatura ambiente. Homogeneizar y añadir 15 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 15 minutos. Posteriormente, enrasar a 50 ml con diluyente de muestra y agitar durante 15 minutos. Una alícuota de 10 ml de la suspensión resultante se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos. Preparar un vial de HPLC con el líquido sobrenadante.

d. Temperatura

Se introduce en un pesasustancias una porción de crema y se mantiene en las siguientes condiciones: estufa a 105 °C durante 24 horas. Una vez atemperada la muestra, pesar exactamente alrededor de 500 mg en un matraz aforado de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 15 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente de muestra y agitar durante 15 minutos. Una alícuota de 10 ml de la suspensión resultante se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos. Preparar un vial de HPLC con el líquido sobrenadante.

e. Luz UV

Se introduce en un pesasustancias una porción de crema y se deja expuesto a la luz ultravioleta durante 24 horas. Posteriormente, pesar exactamente alrededor de 500 mg en un matraz aforado de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 15 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente de muestra y agitar durante 15 minutos. Una alícuota de 10 ml de la suspensión resultante se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos. Preparar un vial de HPLC con el líquido sobrenadante.

II. Linealidad

Para establecer la linealidad de cada compuesto, se preparan una serie de soluciones conjuntas entre el 10 y el 160%, de la concentración nominal de cada compuesto, por dilución a partir de un único patrón conjunto de trabajo al 200%: 10%, 32%, 50%, 60%,

80%, 100%, 120% y 160%. Cada una de las soluciones se inyecta en el sistema cromatográfico por triplicado.

Solución madre HQ: Pesar exactamente alrededor de 200 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución madre KA: Pesar exactamente alrededor de 100 mg de KA patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución madre BHA: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHA patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 40 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución madre BHT: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHT patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 40 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución madre OCT: Pesar exactamente alrededor de 375 mg de OCT patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución madre AVB: Pesar exactamente alrededor de 100 mg de AVB patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución conjunta al 200%: Diluir 5 ml de cada una de las soluciones madres preparadas anteriormente en un matraz de 50 ml. Enrasar con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

El resto de soluciones se preparan siguiendo la cascada de diluciones que se presenta en la Figura 10.3.1.

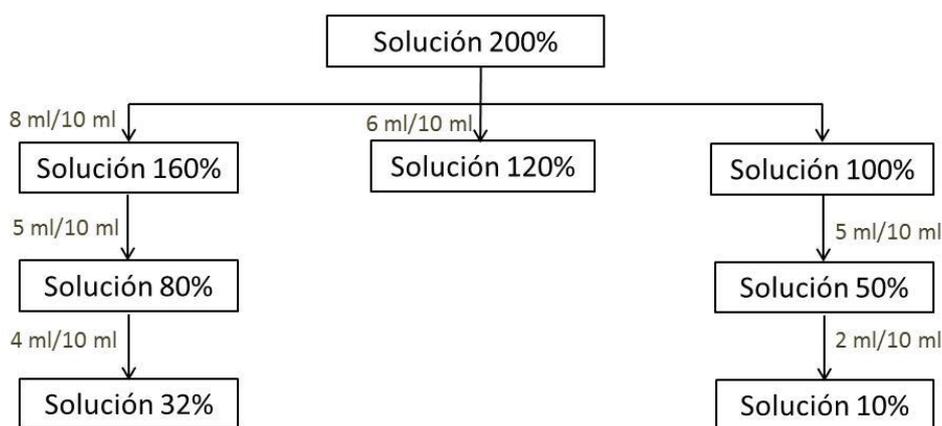


Figura 10.3.1 Esquema de diluciones para linealidad

Para cada compuesto, representar la respuesta *versus* concentración y calcular el coeficiente de correlación, la pendiente de la recta, la ordenada en el origen y el factor respuesta (respuesta/concentración). El criterio de aceptación es:

- $R^2 > 0,9990$
- La pendiente debe ser positiva
- La recta debe pasar por el origen

III. Precisión

a. Instrumental

Para determinar la precisión instrumental se realizan 6 inyecciones consecutivas de una misma solución patrón al 100%, según Anexo III.

Solución madre HQ: Pesar exactamente alrededor de 200 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución madre KA: Pesar exactamente alrededor de 100 mg de KA patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución madre BHA: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHA patrón de trabajo en un matraz de 100 ml. Introducir unos 80 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 100 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución madre BHT: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHT patrón de trabajo en un matraz de 100 ml. Introducir unos 80 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 100 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución madre OCT: Pesar exactamente alrededor de 187,5 mg de OCT patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución madre AVB: Pesar exactamente alrededor de 100 mg de AVB patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Solución patrón al 100%: Diluir 1 ml de cada una de las soluciones madres preparadas anteriormente en un matraz de 10 ml. Enrasar con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Para cada compuesto, calcular el coeficiente de variación de las áreas obtenidas. El criterio de aceptación es: $RSD \leq 1,5\%$

b. Repetibilidad

Se estudia la repetibilidad del método mediante la realización de tres análisis independientes de un mismo lote de crema. Para cada uno de los análisis se preparan dos soluciones patrón y dos soluciones problemas.

Solución patrón 100%: preparar una solución patrón tal y como se indica en el apartado 10.3.3.2.III.a.

Solución problema: Pesar exactamente alrededor de 500 mg de crema en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 15 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Posteriormente, enrasar a 50 ml con diluyente de muestra y agitar durante 15 minutos. Una alícuota de 10 ml de la suspensión resultante se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos. Preparar un vial de HPLC con el líquido sobrenadante.

La secuencia de inyección será:

- Inyectar 2 blancos

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

- Inyectar cada solución patrón por triplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Para cada compuesto, calcular el contenido frente al patrón. El criterio de aceptación es: $RSD \leq 2,0\%$

c. Precisión intermedia

Se estudia la precisión intermedia mediante la realización de tres análisis independientes, de la misma forma que en la repetibilidad, en un día distinto, realizado por un analista diferente, utilizando un HPLC y columna cromatográfica distintos.

Para cada compuesto, calcular el coeficiente de variación entre los resultados obtenidos para la repetibilidad y los resultados obtenidos en este segundo análisis.

El criterio de aceptación es: $RSD \leq 2 \cdot RSD_{REPETIBILIDAD}$

IV. Exactitud

Se determina la exactitud mediante el método del placebo cargado. Para ello, se prepararan por triplicado soluciones de placebo a las que se añaden cantidades conocidas de cada uno de los compuestos a tres niveles de concentración (50, 100 y 150%). Cada solución se inyecta por triplicado.

Solución patrón 100%: preparar una solución patrón tal y como se indica en el Anexo III.

Solución problema: Pesar exactamente las cantidades indicadas en la Tabla 10.3.1 de placebo en matraces aforados de 50 ml. Añadir el volumen indicado en la Tabla 10.3.1 de solución patrón al 200%, preparado tal y como se indica en el apartado 10.3.3.2.// y sonicar durante 15 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar con diluyente de muestra y agitar durante 15 minutos. Una alícuota de 10 ml de la suspensión resultante se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos. Preparar un vial de HPLC con el líquido sobrenadante.

Tabla 10.3.1 Volúmenes de patrón de trabajo y cantidades de placebo para la realización de la exactitud

Número de soluciones	Nivel (%)	Peso de placebo (mg)	Volumen de patrón 200% (ml)
3	50	500	12,5
3	100	500	25,0
3	150	500	37,5

La secuencia de inyección será:

- Inyectar 2 blancos
- Inyectar cada solución patrón por triplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Para cada compuesto, calcular su contenido frente al patrón. El criterio de aceptación sobre producto terminado es: la recuperación debe estar comprendida entre 97,0 – 103,0%.

V. Robustez

Para determinar la robustez del método, las condiciones experimentales del método cromatográfico son cambiadas deliberadamente. Se estudia el efecto de pequeñas variaciones en los parámetros considerados críticos sobre la resolución del conjunto de compuestos (Tabla 10.3.2): la temperatura de la columna, volumen de inyección y longitud de onda. También se estudia la robustez de la columna testando diferentes lotes de la columna.

Tabla 10.3.2 Parámetros a evaluar en la robustez del método

Parámetros	Variaciones		
Temperatura de columna (°C)	37	40	43
Volumen de inyección (µl)	23	25	27
Longitud de onda (nm)	227	230	232
Lote de columna	176 (USUU16095)	185 (USUU117161)	

Para llevar a cabo el estudio de la robustez del método se prepara un análisis completo que incluye dos soluciones patrón 100% y tres soluciones problema, tal y como se indica en el Anexo III.

La secuencia de inyección para cada modificación es:

- Inyectar 2 blancos
- Inyectar cada solución patrón por triplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Calcular la concentración de cada uno de los compuestos frente al patrón y comparar los resultados obtenidos mediante un test estadístico adecuado para demostrar si existen o no diferencias estadísticamente significativas.

VI. Estabilidad de la solución

Únicamente se prepara una solución problema, ya que la estabilidad de la solución patrón ya se ha demostrado en la validación del método preliminar *stability-indicating* (apartado 10.1.3.4.VI), preparada tal y como se indica en el Anexo III. Se llenan viales de HPLC con esta solución y se guarda en el carro del inyector a 20 °C. Inyectar la solución en los intervalos de tiempo 0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas después de su preparación. Para cada compuesto, calcular el RSD (%) de las áreas del pico de las diferentes inyecciones así como la variación relativa entre la primera y la última inyección. El criterio de aceptación es: la variación relativa entre la primera y la última inyección no debe ser superior a 2,0%.

10.3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.3.4.1. *Desarrollo del método*

El objetivo principal del método es separar los seis compuestos en estudio que tienen propiedades químicas muy distintas como consecuencia de su estructura molecular (Figura 10.3.2). Como se puede observar en sus estructuras, todos los compuestos son aromáticos pero mientras el OCT es una molécula neutra, el resto tienen un carácter ligeramente ácido, con $pK_a > 9$. Por otra parte, clasificándolos según polaridad ($\log P$) se concluye que mientras HQ y KA son muy polares, BHA es ligeramente polar y BHT, OCT y AVB son ligeramente apolares (Tabla 10.3.3).

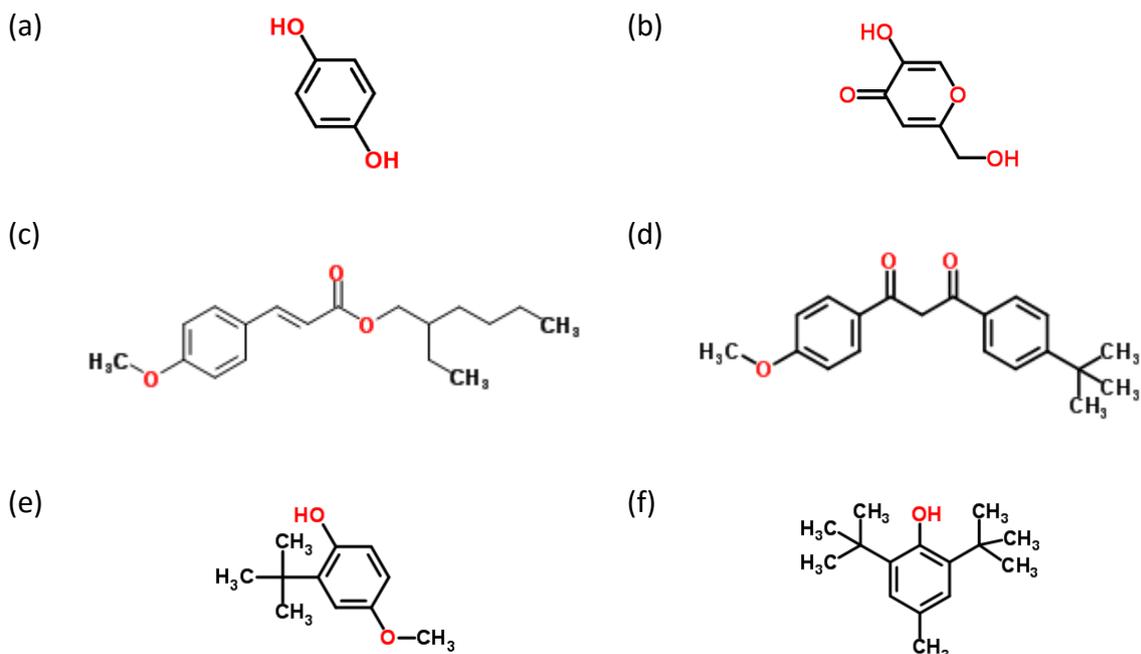


Figura 10.3.2 Compuestos en estudio
 (a) HQ; (b) KA; (c) OCT; (d) AVB; (e) BHA; (f) BHT

Tabla 10.3.3 Propiedades de los compuestos en estudio

Compuestos	Pm (g/mol)	pKa	Log P
HQ	110,11	10,33	0,62
KA	142,11	9,40	-0,66
BHA	180,24	10,01	3,06
BHT	220,35	12,76	5,17
OCT	290,40	-	5,66
AVB	310,39	9,74	4,91

Durante el estudio de compatibilidad con excipientes ejecutado con el método preliminar *stability-indicating* ya se observó que los seis compuestos eluían en el mismo cromatograma sin superposición entre ellos aunque la resolución entre los picos de OCT y AVB era inferior a la deseada y requerida para métodos robustos: $R_s: 1,55 < 2,0$, tal y como se observa en la Figura 10.3.3. Por tanto, se desarrolla un método para los seis compuestos en estudio, optimizando los parámetros cromatográficos para que su tiempo de ejecución sea lo más corto posible y la resolución entre todos los compuestos sea la adecuada.

Para mejorar la resolución entre OCT y AVB y reducir el tiempo de análisis, se combina el ajuste de las proporciones de fase acuosa y fase orgánica – agua al 0,1% ácido

acético y acetonitrilo respectivamente – con un gradiente del caudal de FM, también conocido como *dual mode gradient*.

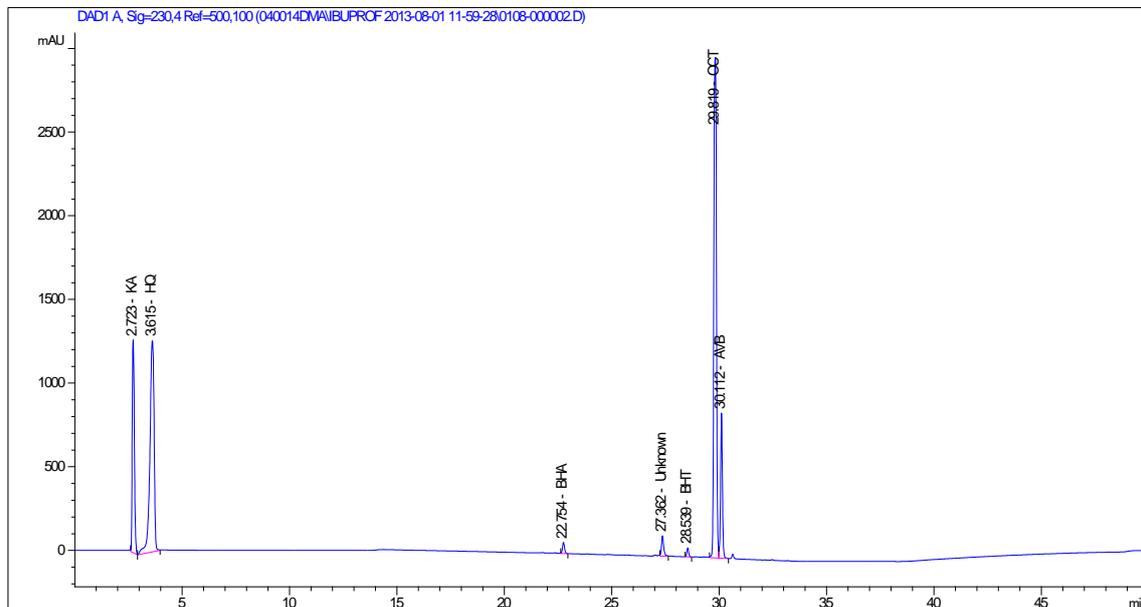


Figura 10.3.3 Cromatograma de la solución patrón obtenida con el método preliminar *stability-indicating*

Inicialmente, se plantea una etapa isocrática al 30% de ACN a una velocidad de flujo constante de 1,2 ml/min hasta los 3 minutos proporcionando una resolución correcta entre los picos de KA y HQ. En la siguiente etapa, se incrementa simultáneamente la proporción de ACN y el caudal a 70% de ACN y 2,0 ml/min, respectivamente, en 0,5 minutos (3,5 min). Y se mantienen las condiciones alcanzadas durante 4,5 minutos (8 min) con el fin de separar BHA, el pico desconocido, y BHT adecuadamente. A continuación, la proporción de ACN se mantiene constante mientras que el caudal se reduce a 0,8 ml/min en 0,5 minutos (8,5 min) y, seguidamente, se mantiene el caudal de FM constante durante 3,5 minutos (12 min) para separar correctamente los picos de OCT y AVB. Finalmente, se introduce una última etapa de 2 minutos en la que se vuelve y estabiliza el sistema a las condiciones iniciales del gradiente.

La temperatura de la columna se mantiene igual que el método preliminar *stability-indicating* a 40 °C para reducir la viscosidad de la FM y la presión del sistema. Se comprueba que la longitud de onda establecida en el método preliminar, 230 nm, es adecuada para el presente método después de evaluar los espectros de cada uno de los compuestos observándose una respuesta aceptable para todos ellos (Figura 10.3.4).

Se intenta reducir el tiempo de cromatograma, adaptando el gradiente desarrollado a una columna más corta: Zorbax SB-Phenyl 5 µm 150 x 4,6 mm. En esta columna no se da la correcta separación entre los picos de OCT y AVB ni tampoco entre los picos de KA e HQ (Figura 10.3.5). Por tanto, la columna a utilizar es la utilizada hasta ahora: Zorbax SB-Phenyl 5 µm 250 x 4,6 mm (Figura 10.3.4).

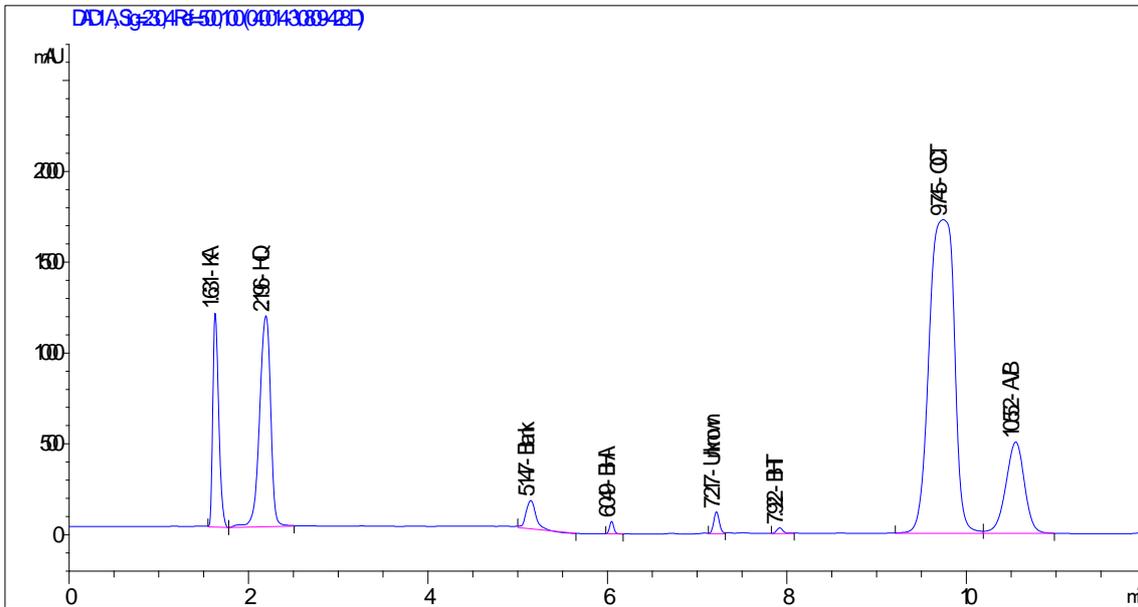


Figura 10.3.4 Cromatograma típico de la solución patrón obtenido con el método optimizado con la columna Zorbax SB-Phenyl 5 µm 250 x 4.6 mm

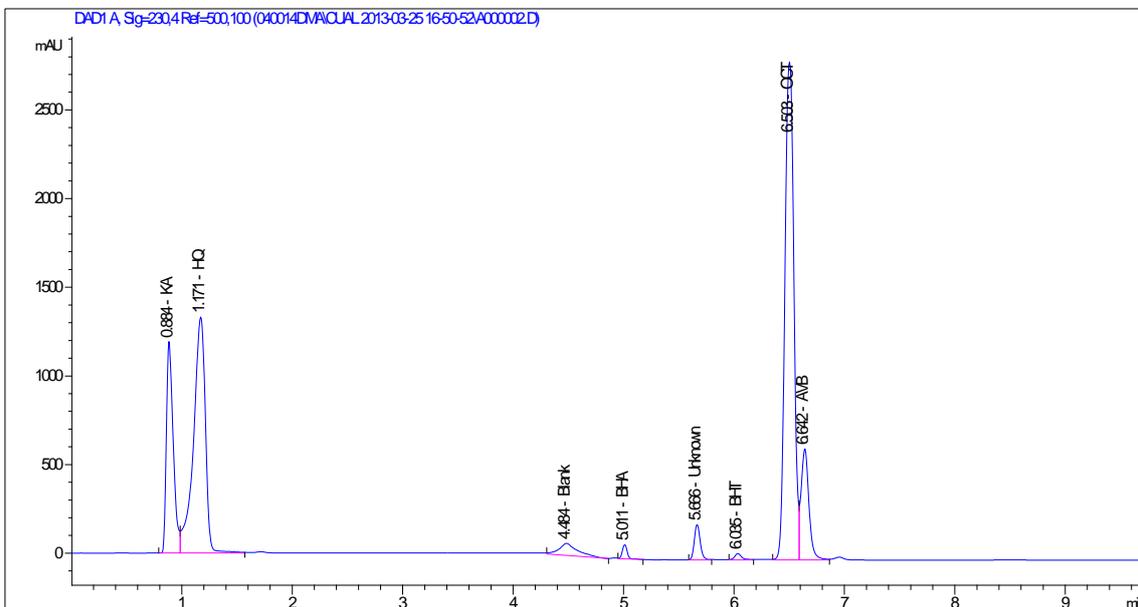


Figura 10.3.5 Cromatograma de la solución patrón obtenido con el método optimizado con la columna Zorbax SB-Phenyl 5 µm 150 x 4.6 mm Optimización de la preparación de la muestra

10.3.4.2. Optimización de la preparación de la muestra

La preparación de la muestra es una parte difícil y esencial del desarrollo de un método analítico debido a que la extracción de los diferentes compuestos puede verse afectada especialmente en las cremas que contienen bastantes excipientes. En general, la preparación de la muestra de una crema es un proceso complejo que implica procedimientos de pre-tratamiento, como la SPE [208] o extracción en fluidos supercríticos [209].

En este caso, se desarrolla un proceso de extracción rápido y fácil para obtener una suspensión de la crema en el diluyente de la muestra (70:30 ACN:H₂O) en tres pasos: tratamiento de sonicación durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos de agua-hielo, agitación magnética durante 15 minutos seguido de la centrifugación de una alícuota homogénea de la suspensión resultante a 4500 rpm durante 5 minutos.

Para confirmar la idoneidad del proceso de extracción para todos los compuestos, el proceso de extracción se estudia a través de un diseño de experimentos (DoE) en combinación con la evaluación estadística de los datos obtenidos. De todos los factores que podrían afectar a la extracción de los compuestos de la crema, se investigan sólo tres: tiempo de sonicación, el tiempo de agitación y la fuerza del diluyente de muestra (% ACN).

Para ello, se genera un diseño factorial completo con tres variables a tres niveles que incluyen dos repeticiones en el punto central utilizando el software JMP (Tabla 10.3.4). El proceso de extracción se estudia mediante la preparación de diez soluciones en las que el tiempo de sonicación, el tiempo de agitación y la fuerza disolvente (proporción de ACN en la mezcla final) se varían de acuerdo con el diseño. Todas las soluciones se analizan por el método propuesto y con los resultados obtenidos se realiza un análisis de varianza (ANOVA) por ajuste de mínimos cuadrados (Tabla 10.3.5).

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.3.4 DoE del estudio de extracción

Experimento	Modelo	ACN (%)	Tiempo sonicación (minutos)	Tiempo agitación (minutos)
E01	---	80	10	20
E02	+-	60	20	10
E03	---	60	10	10
E04	000	70	15	15
E05	++-	60	20	20
E06	--+	80	20	10
E07	000	70	15	15
E08	+++	80	20	10
E09	+++	80	20	20
E10	+-	60	10	20

Tabla 10.3.5 Resultados del estudio de extracción

	BHA				BHT			
Media	97,0	Observaciones	10		98,3	Observaciones	10	
Parámetros	E	SE	t Ratio	P*	E	SE	t Ratio	P*
Diluyente de muestra	2,12	0,5642	3,76	0,033	1,54	0,6683	2,30	0,105
Tiempo de sonicación	0,38	0,5642	0,68	0,548	0,77	0,6683	1,15	0,335
Tiempo de agitación	0,20	0,5642	0,36	0,742	-0,01	0,6683	-0,01	0,105
	OCT				AVB			
Media	98,1	Observaciones	10		98,2	Observaciones	10	
Parámetros	E	SE	t Ratio	P*	E	SE	t Ratio	P*
Diluyente de muestra	1,79	0,5544	3,23	0,048	2,21	0,3810	5,81	0,010
Tiempo de sonicación	0,59	0,5544	1,07	0,364	0,31	0,3810	0,80	0,480
Tiempo de agitación	0,08	0,5544	0,15	0,889	0,05	0,3810	0,13	0,902
	HQ				KA			
Media	99,0	Observaciones	10		98,4	Observaciones	10	
Parámetros	E	SE	t Ratio	P*	E	SE	t Ratio	P*
Diluyente de muestra	1,45	0,3484	4,17	0,025	1,64	0,4220	3,87	0,030
Tiempo de sonicación	0,37	0,3484	1,05	0,372	0,45	0,4220	1,07	0,362
Tiempo de agitación	0,18	0,3484	0,52	0,641	0,24	0,4220	0,57	0,609

E: Estimación

SE: Error estándar

P*: Prob>|t| representa la probabilidad de observar valor |t| el cual es mayor que t ratio. Se obtiene de la tabla de distribución t. Prob> 0,05 suele ser el límite de la significación estadística.

Los resultados indican que ni el tiempo de sonicación, ni el tiempo de agitación, son parámetros significativos para la extracción de los compuestos porque $\text{Prob}>|t|$ es mayor a 0,05 en todos los casos, es decir, no existen diferencias significativas al variar estos dos parámetros. La extracción de todos los compuestos, excepto la de BHT, está afectada significativamente por el diluyente de la muestra como muestra el hecho de que $\text{Prob}>|t|$ sea inferior a 0,05.

El valor de la estimación del parámetro diluyente de muestra está comprendido en todos los casos entre 1,4 y 2,2, mucho más bajo que los valores medios comprendidos entre 97,0 y 99,0. Por lo tanto, el diluyente de muestra no puede considerarse un factor primario en el cambio del proceso de extracción. Las interacciones entre los factores estudiados para la extracción de cada compuesto también se estudian y se encuentra que son estadísticamente no significativas.

10.3.4.3. Análisis mediante LC-MS/TOF

En todas las inyecciones realizadas, tanto de solución patrón como de solución problema, por el método optimizado se observa la elución de un pico adicional desconocido a un tiempo de retención de 7,22 min. Para aclarar su procedencia, se inyectan todas las soluciones madre y se descubre que el pico procede de la solución de AVB. El compuesto que eluye bajo este pico debe estar relacionado con la AVB ya el pico se presenta tanto en las soluciones problema como en las soluciones patrón preparadas extemporáneamente. Por tanto, no es un pico de degradación de la AVB formado a lo largo del tiempo.

Para investigar con mayor profundidad este pico adicional desconocido se lleva a cabo el análisis de las soluciones con la modificación del método para su extensión a los estudios de LC-MS/TOF.

Los estudios espectrales de masas de alta resolución de las soluciones, patrón y problema, se llevan a cabo después de una calibración adecuada del equipo. Se adquiere los espectros de masas en ESI negativo ya que la respuesta es mejor y los parámetros de MS fueron optimizados de forma adecuada para obtener información clara sobre el pico del ion molecular (Tabla 10.3.6).

Tabla 10.3.6 Condiciones LC-MS-ESI/TOF

Voltaje de nebulización (V)	-3500
Temperatura de la fuente (°C)	40
Potencial de desagregación (V)	-80
Potencial de enfoque (V)	-380
Tiempo de residencia de los iones (ms)	6.00
Ventana de masa de los iones a analizar (Da)	5.00

En el espectro de masas correspondiente al pico de AVB en el cromatograma de la solución patrón madre de AVB, se observa una señal principal con m/z 109,1506 que corresponde al ion molecular desprotonado ($[M-H]^-$). Mediante el análisis de las distribuciones isotópicas y los datos espectrales se concluye que corresponde a la fórmula molecular $C_{20}H_{21}O_3^-$, es decir, $C_{20}H_{22}O_3$ en forma neutra.

En el mismo cromatograma también se observa el pico adicional desconocido el cual presenta una señal principal a m/z 109,1506 en su espectro de masas que corresponde a ion molecular desprotonado ($[M-H]^-$). Igual que en el espectro de MS del pico correspondiente a AVB, se analizan todas las posibles fórmulas de iones moleculares desprotonados que da el software del equipo (Analyst) y se concluye que la única fórmula molecular desprotonada que cumple con su distribución isotópica es $C_{20}H_{21}O_3^-$ o $C_{20}H_{22}O_3$ en forma neutra. Es decir, la misma fórmula que AVB.

En consecuencia, se puede concluir que el pico adicional desconocido tiene la misma fórmula molecular que el AVB. Se realiza una búsqueda bibliográfica y se comprueba que esto es debido al hecho de que AVB en solución existe en dos formas tautoméricas: la forma enólica y la forma ceto (Figura 10.3.6) [210].

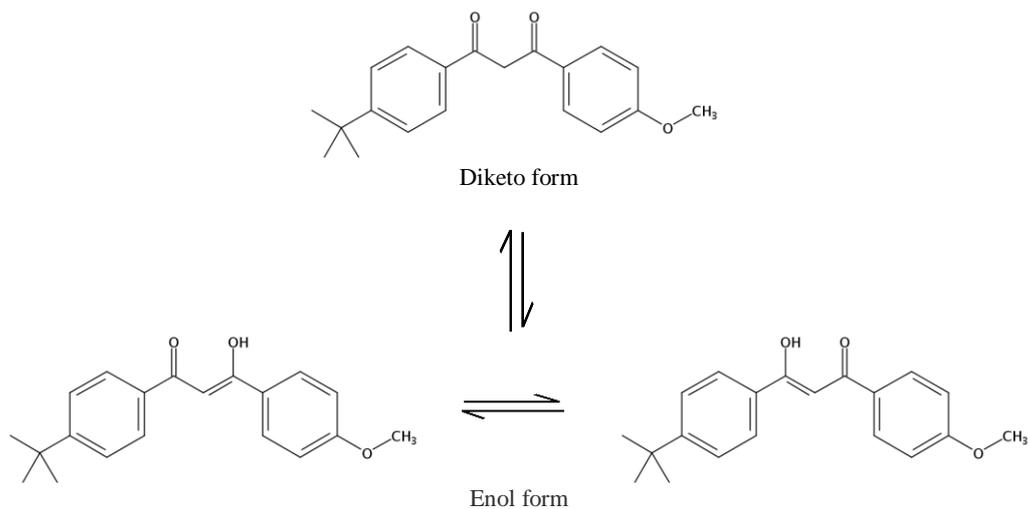


Figura 10.3.6 Equilibrio ceto-enólico de AVB en solución [207]

El pico que eluye a 9,81 minutos es el tautómero enol que absorbe alrededor de 355 nm, mientras que el tautómero ceto que absorbe alrededor de 260 nm corresponde a un pico adicional desconocida que eluye a los 7,08 minutos, tal y como se observan en las Figuras 10.3.7 a 10.3.11.

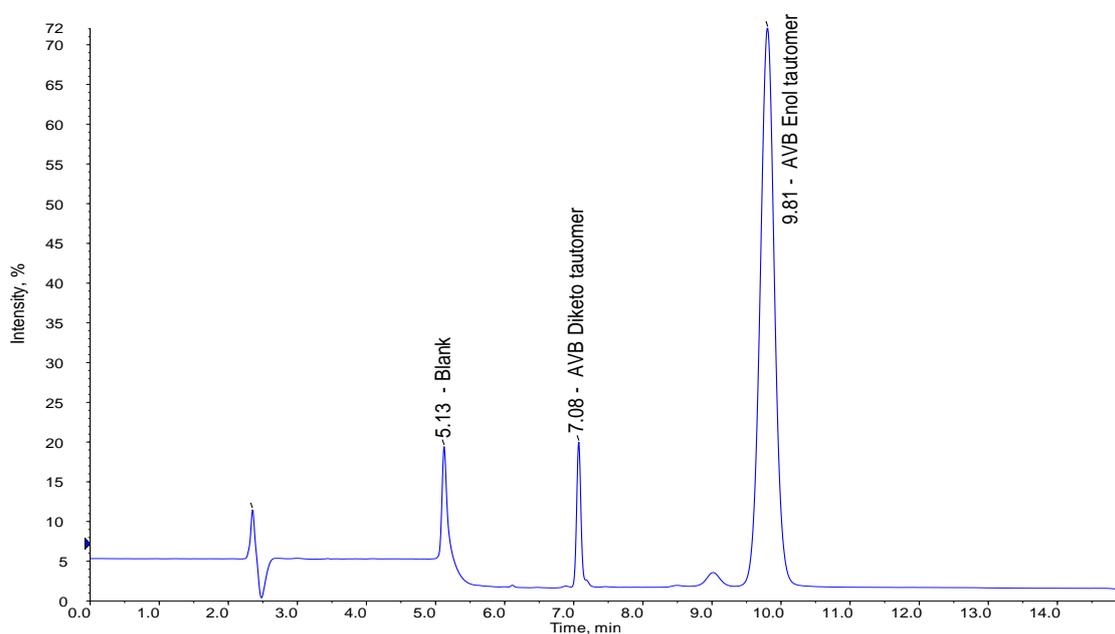


Figura 10.3.7 Cromatograma solución madre AVB

Las concentraciones relativas de cada tautómero dependen de la polaridad y de la proticidad del solvente en el que se encuentran disueltos [211]. En este caso, en que el diluyente de la muestra era una mezcla de ACN/H₂O (70:30, v/v), la concentración relativa de ceto tautómero es de aproximadamente un 20%.

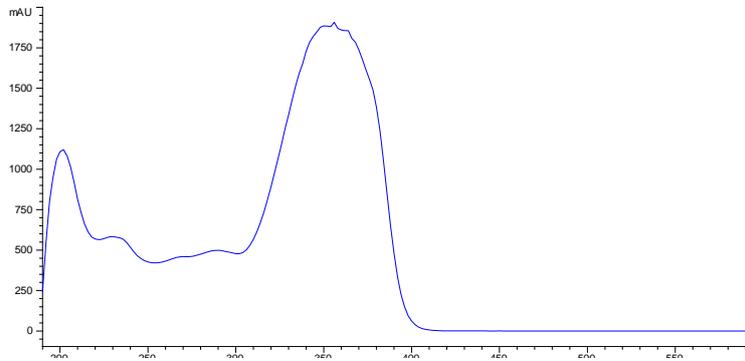


Figura 10.3.8 Espectro UV-Visible pico AVB tautómero Enol (t_R : 9,8 min)

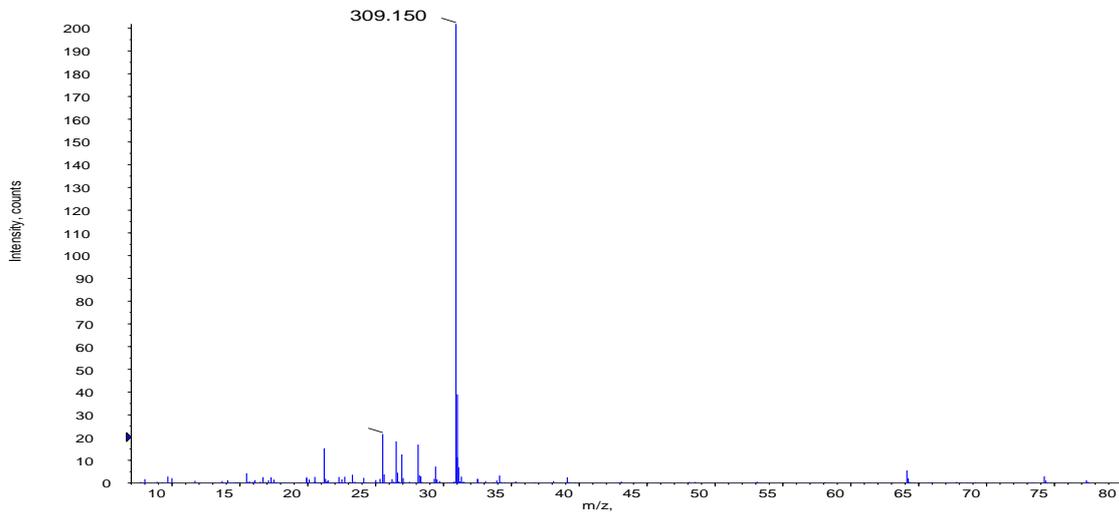


Figura 10.3.9 Espectro de MS del pico AVB tautómero Enol

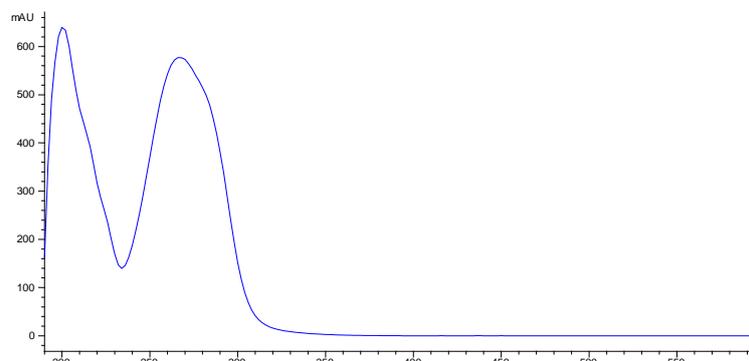


Figura 10.3.10 Espectro UV-Visible pico AVB tautómero Keto (t_R : 7,1 min)

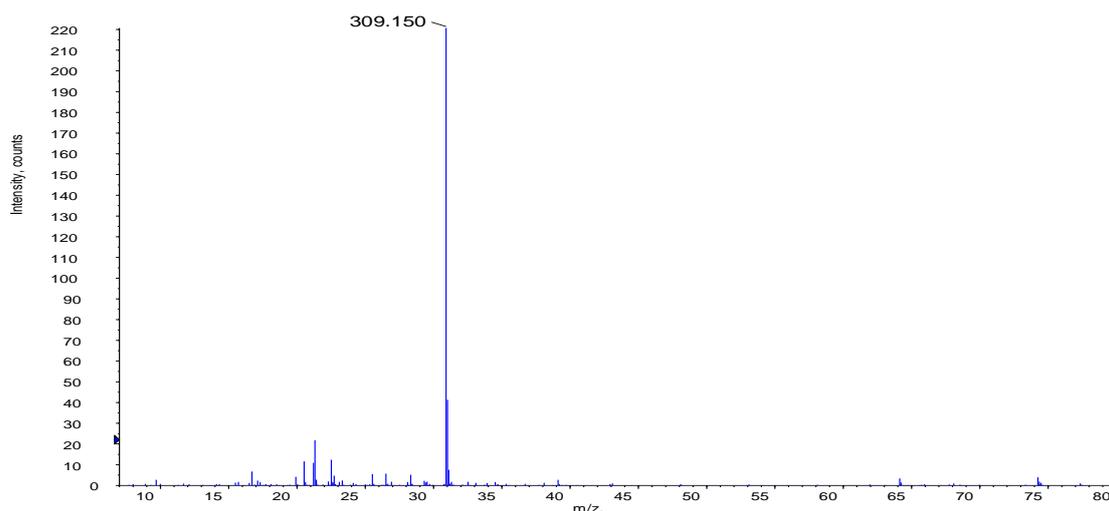


Figura 10.3.11 Espectro de MS del pico AVB tautómero Ceto

Para determinar la estabilidad del equilibrio entre las dos formas tautoméricas, se prepara una solución patrón de AVB y una solución problema y se analizan inmediatamente después de la preparación y después de diferentes intervalos de tiempo de hasta 48 h, mientras que la temperatura del carro de muestras del HPLC se mantiene a 20 °C. Los resultados de estos estudios indican que la proporción entre los 2 tautómeros es estable durante un período de 48 horas siendo la variación relativa entre la primera y la última inyección es inferior a 2,0%. Por lo tanto, la cuantificación se basa en el pico más intenso, el pico AVB tautómero enol.

10.3.4.4. Validación del método

El método desarrollado fue validado respecto a los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez y estabilidad de la solución [129].

I. Selectividad

La selectividad del método fue demostrada mediante la identificación de cada uno de los compuestos, comprobando la ausencia de interferencias procedentes del blanco y del placebo y realizando un estudio de degradaciones forzadas.

Se identifican todos los compuestos por tiempo de retención (Tabla 10.3.7) inyectando una solución patrón individual de cada uno de ellos (Figuras 10.3.12 a 10.3.17).

Tabla 10.3.7 Tiempos de retención de todos los compuestos

Compuestos	Tiempo de retención (min)
KA	1,63
HQ	2,20
BHA	6,05
AVB tautómero Ceto	7,22
BHT	7,92
OCT	9,75
AVB tautómero Enol	10,55

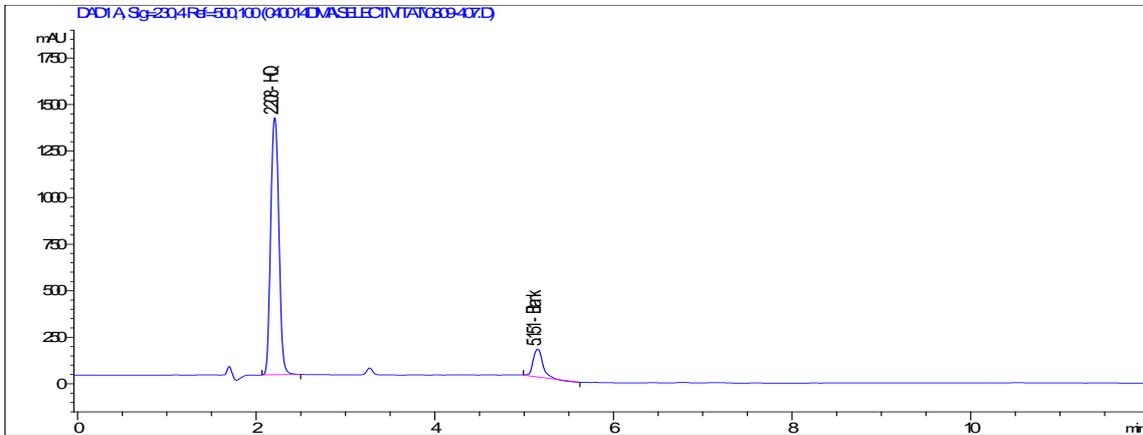


Figura 10.3.12 Cromatograma solución HQ

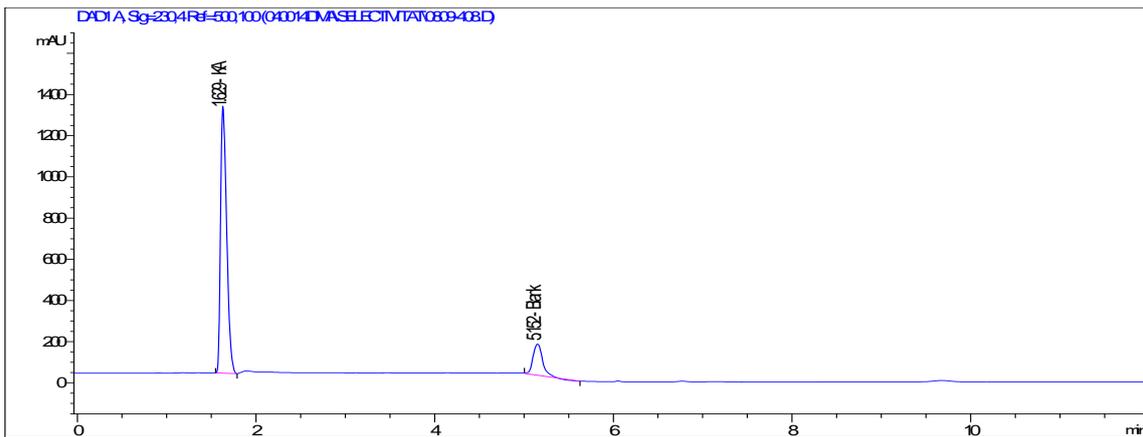


Figura 10.3.13 Cromatograma solución KA

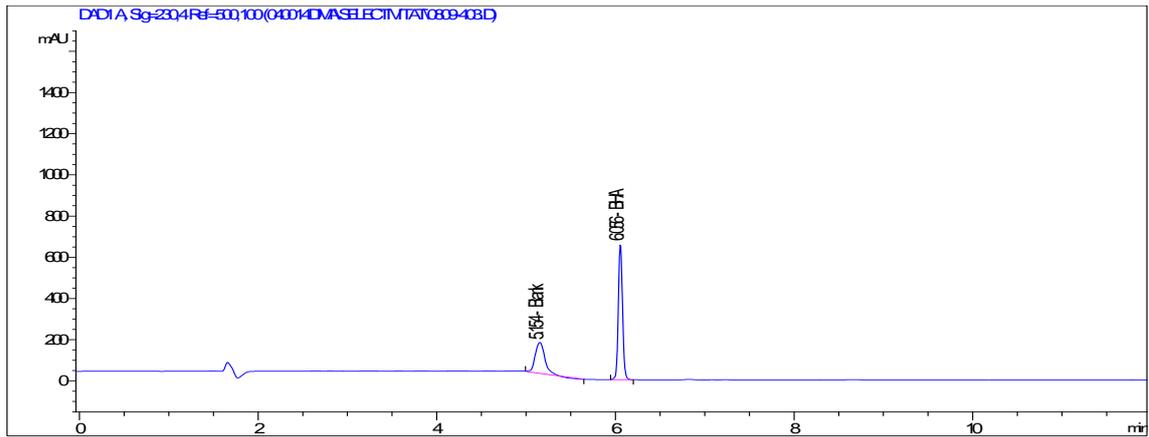


Figura 10.3.14 Cromatograma solución madre BHA

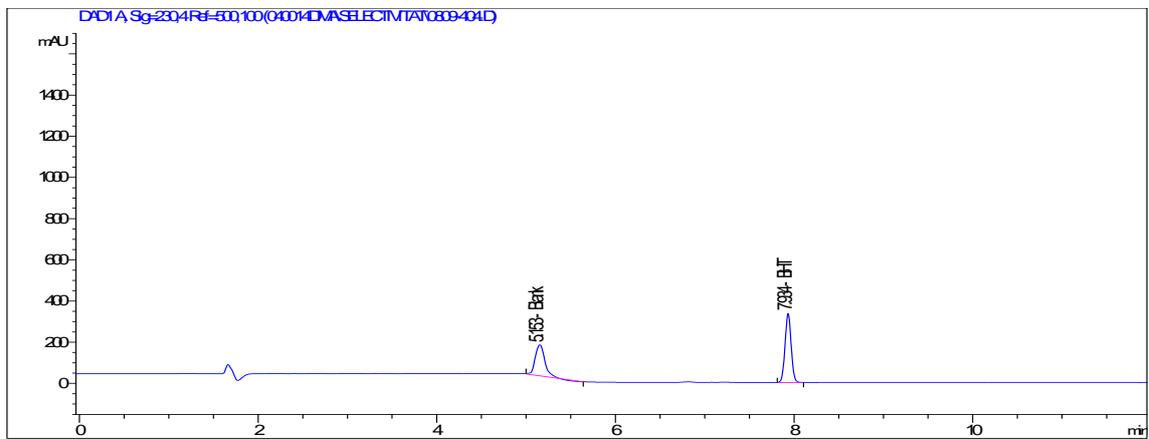


Figura 10.3.15 Cromatograma solución madre BHT

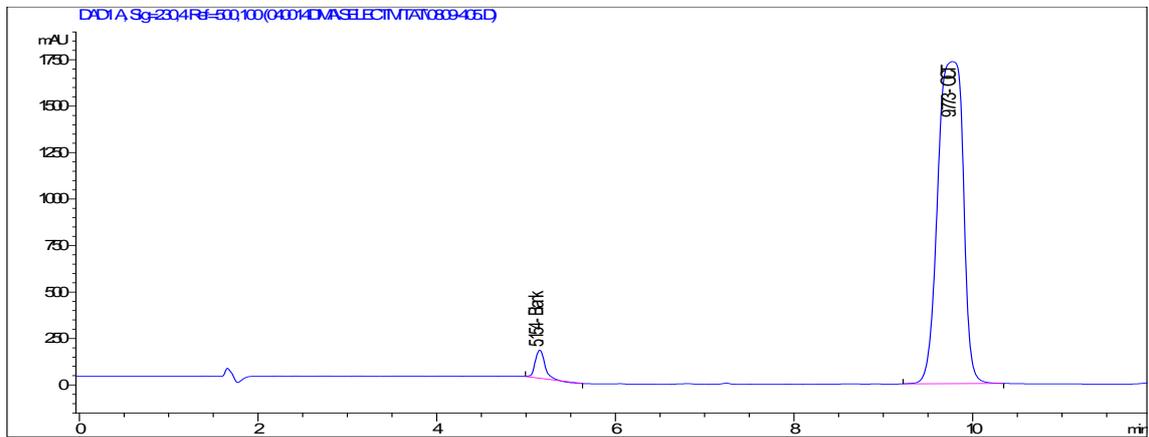


Figura 10.3.16 Cromatograma solución OCT

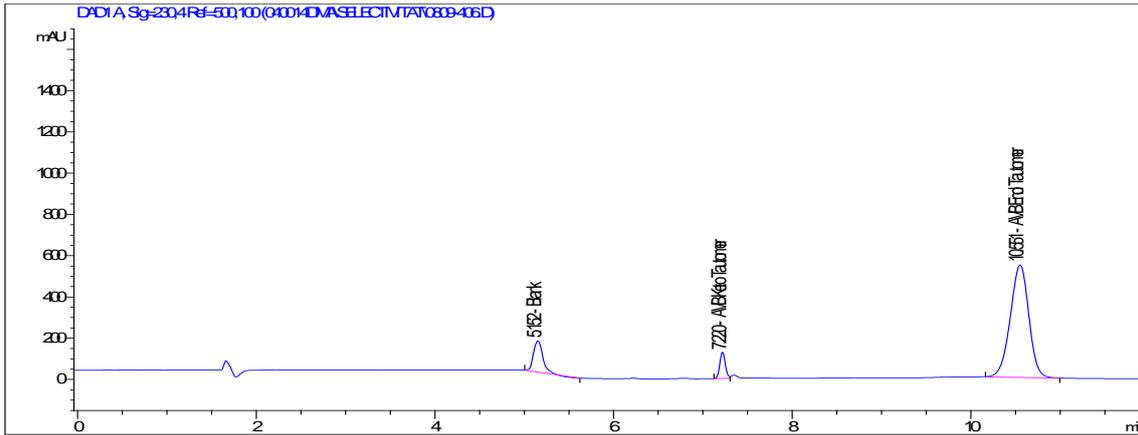


Figura 10.3.17 Cromatograma solución AVB

Se superponen todos los cromatogramas individuales de cada compuesto para verificar la ausencia de interferencias (Figura 10.3.18).

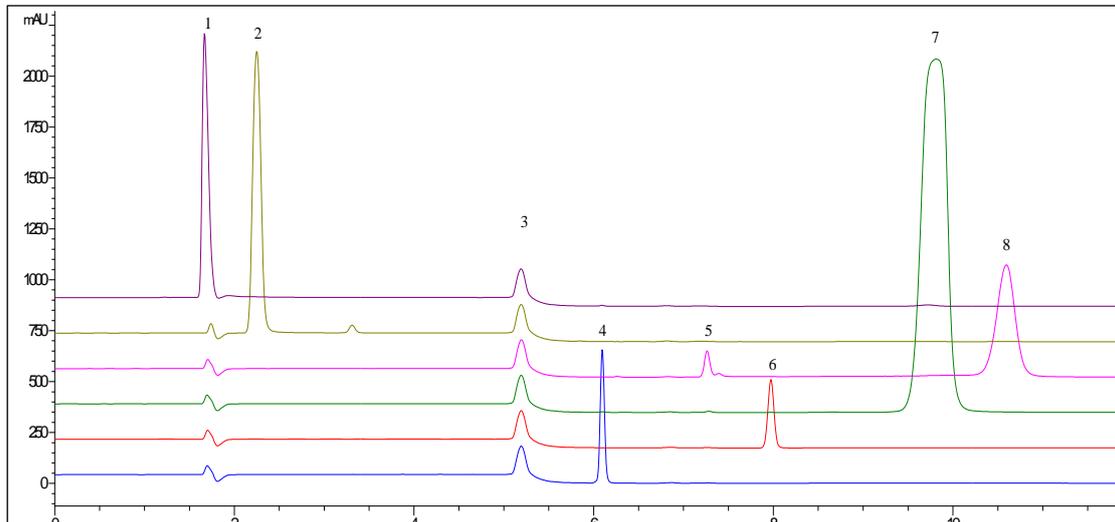


Figura 10.3.18 Superposición de los cromatogramas individuales de cada compuesto

En las Figuras 10.3.19 a 10.3.21 se demuestra la ausencia de interferencias entre los excipientes y los compuestos en estudio inyectando por un lado, un blanco y una solución de placebo y por otro, una solución problema de crema lote A02.

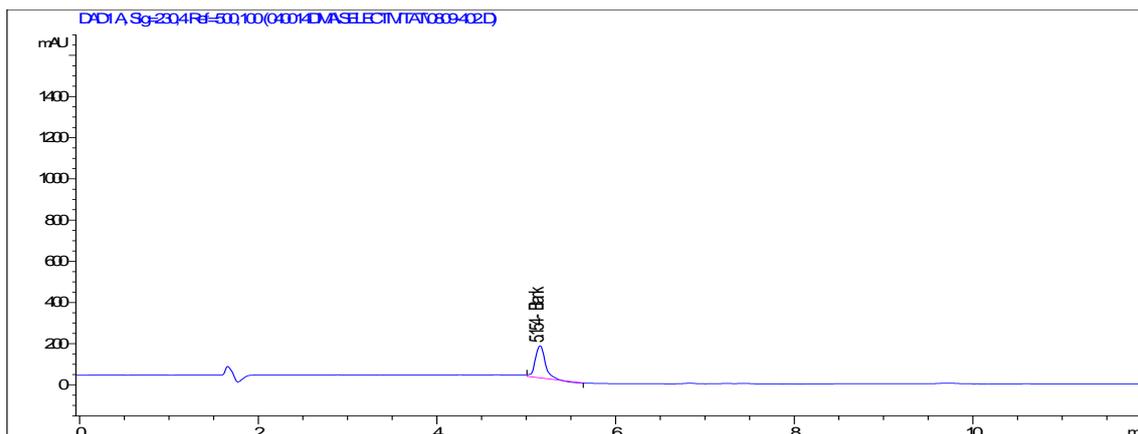


Figura 10.3.19 Cromatograma del blanco (diluyente de muestra)

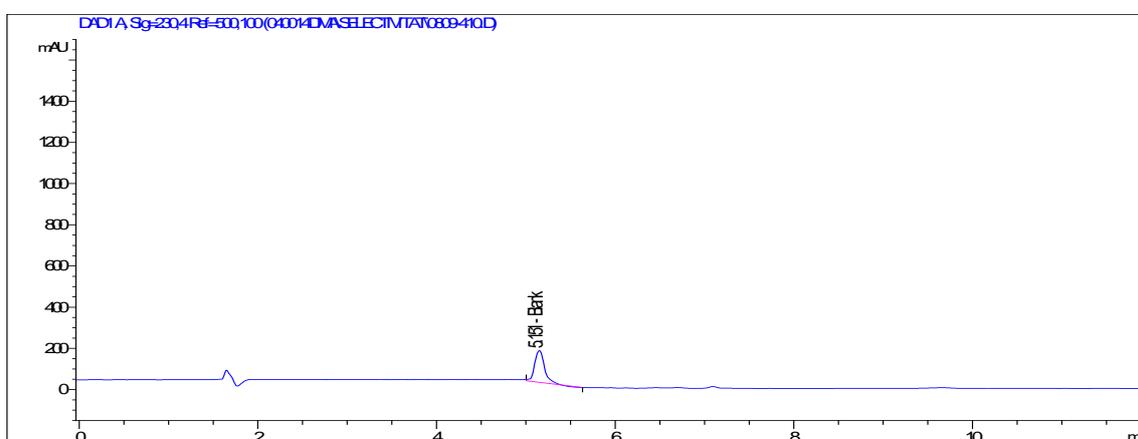


Figura 10.3.20 Cromatograma de la solución placebo

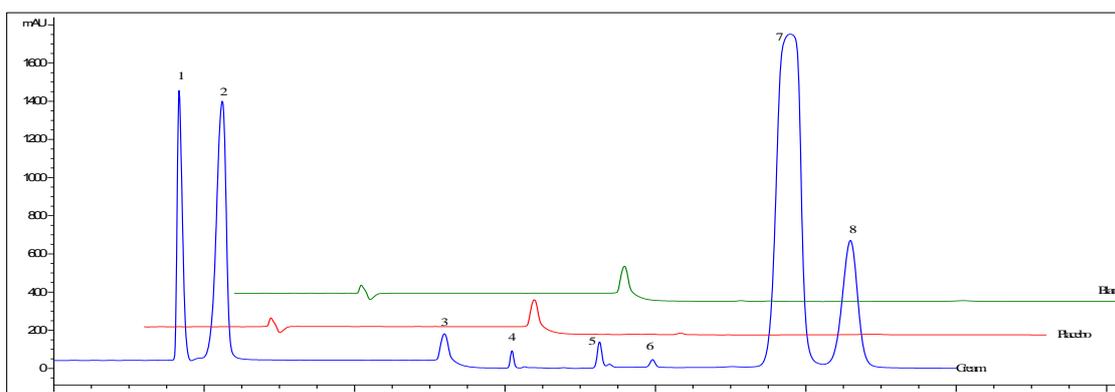


Figura 10.3.21 Superposición de cromatogramas: blanco, solución placebo y solución problema

Se realiza el estudio de degradaciones forzadas para ver los posibles productos de degradación que se pueden generar cuando la crema se somete a una serie de condiciones forzadas, demostrando así la selectividad del método.

Del estudio de degradación forzada en medio ácido (HCl 0,1M, 24 horas, temperatura ambiente) se observa que el compuesto que se degrada prácticamente en su totalidad

es AVB. En los picos de BHT y OCT se observa una disminución significativa. Mientras que HQ y KA permanecen estables. Se observan dos productos de degradación: el primero eluye a un tiempo de retención de 1,35 minutos y el segundo, muy minoritario, a un tiempo de retención de 5,92 minutos, produciéndose un solapamiento parcial con el pico de BHA (Figura 10.3.22).

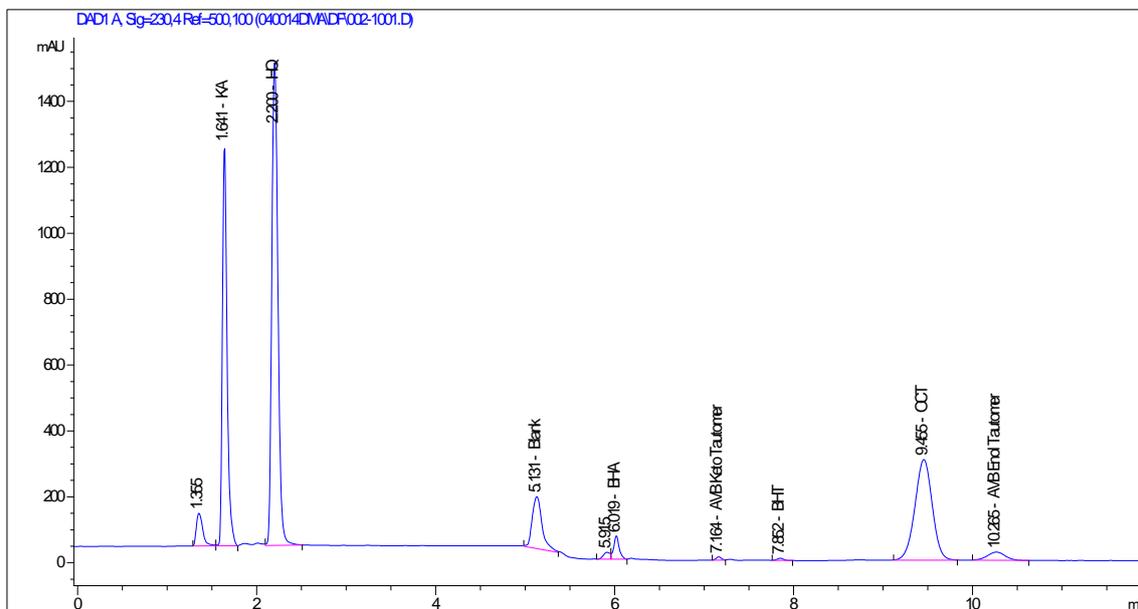


Figura 10.3.22 Cromatograma de la degradación forzada en medio ácido (HCl 0,1M, 24 h, Tamb) de la crema

En el estudio de la degradación forzada en medio básico (NaOH 0,1M, 12 horas, temperatura ambiente) se observa la completa desaparición de los picos correspondientes a HQ y BHT, y prácticamente completa desaparición del pico de OCT, se alcanza una degradación superior al 95%. Además, los picos correspondientes a AVB y BHA también muestran una disminución significativa. Por otro lado, el pico de KA permanece prácticamente estable. Los productos de degradación formados en medio básico, de forma mayoritaria, son los que eluyen a un tiempo de retención de: 1,64, 5,78 y 8,73 minutos, tal y como se observa en la Figura 10.3.23.

En este caso, se ha utilizado NaOH 0,1M como agente degradante ya que se quiere ver la degradación que sufre la totalidad de los componentes de la crema, no sólo la HQ. Parece que el producto de degradación que eluye a un t_R : 1,64 minutos podría ser un producto de degradación polimérico procedente de la oxidación de la HQ, que generalmente genera compuestos muy polares [163].

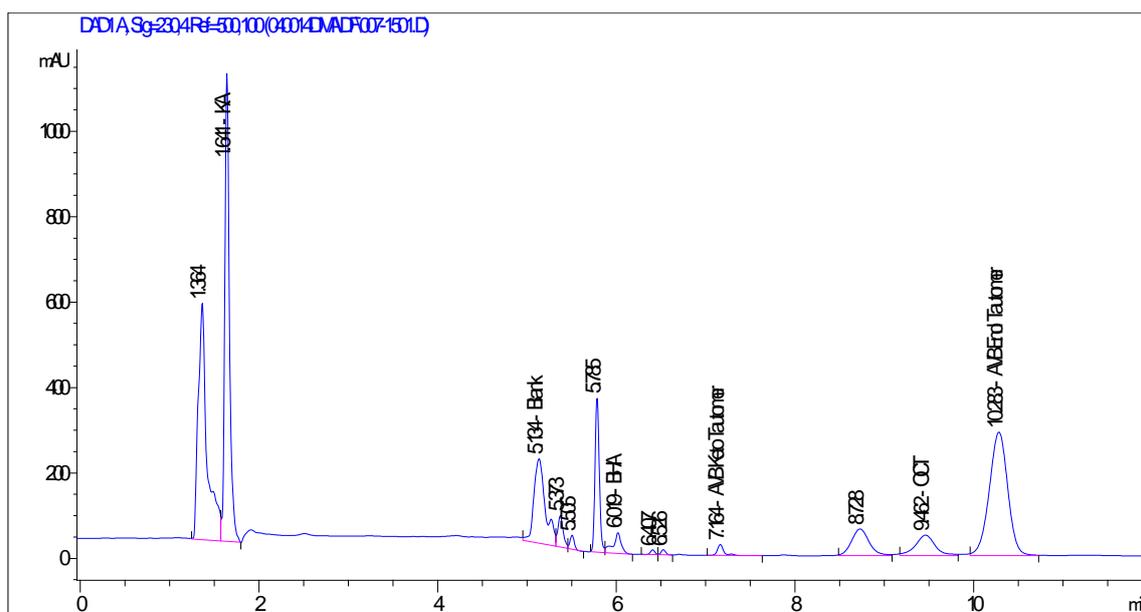


Figura 10.3.23 Cromatograma de la degradación forzada en medio básico (NaOH 0,1M, 24 h, Tamb de la crema

Se decide realizar la degradación forzada en medio oxidante en unas condiciones muy suaves debido a que la formulación a degradar es una crema. En consecuencia, por una parte, la mayoría de excipientes lipófilos se oxidan fácilmente y por otra parte, la HQ también se oxida fácilmente. Las condiciones de degradación son H₂O₂ 3%, 3 horas, temperatura ambiente. En la Figura 10.3.24 se observa una disminución mayor al 75% en los picos correspondientes a OCT y AVB. También se produce una ligera disminución en los picos de BHA y BHT. Por otro lado, la HQ parece que no se degrada de forma visible en estas condiciones mucho más suaves que las testadas en el método preliminar *stability-indicating*. Se observan varios picos minoritarios correspondientes a productos de degradación entre ellos uno que eluye a un t_R: 3,24 minutos, de tiempo de retención relativo a HQ igual a 1,47, que podría corresponder a BQ (con un tiempo de retención relativo a HQ igual a 1,46 en el método preliminar), producto de degradación de la HQ que se forma en medio oxidante. También se observa un pico muy grande (que coeluye junto al pico de KA) correspondiente a H₂O₂, ya que también es observado en el cromatograma del blanco de H₂O₂.

Al someter la crema a temperatura elevada (105 °C durante 5 días) se observa la completa desaparición del pico correspondiente a HQ mientras que BHA, BHT, OCT y AVB permanecen estables. Por otro lado, el KA también se degrada significativamente alrededor de un 30%. Se observa la formación de un producto de degradación principal a t_R: 2,95 minutos, con una mala simetría de pico y muy ancho (más de 1 minuto) que parece deberse a la coelución de dos productos de degradación, uno de ellos

procedente de la degradación de KA y el de HQ. El pico que procede de la degradación de la HQ a temperaturas elevada debe ser BQ (t_R : 3,2 minutos), tal y como se observó durante las degradaciones forzadas del método preliminar (Figura 10.3.25).

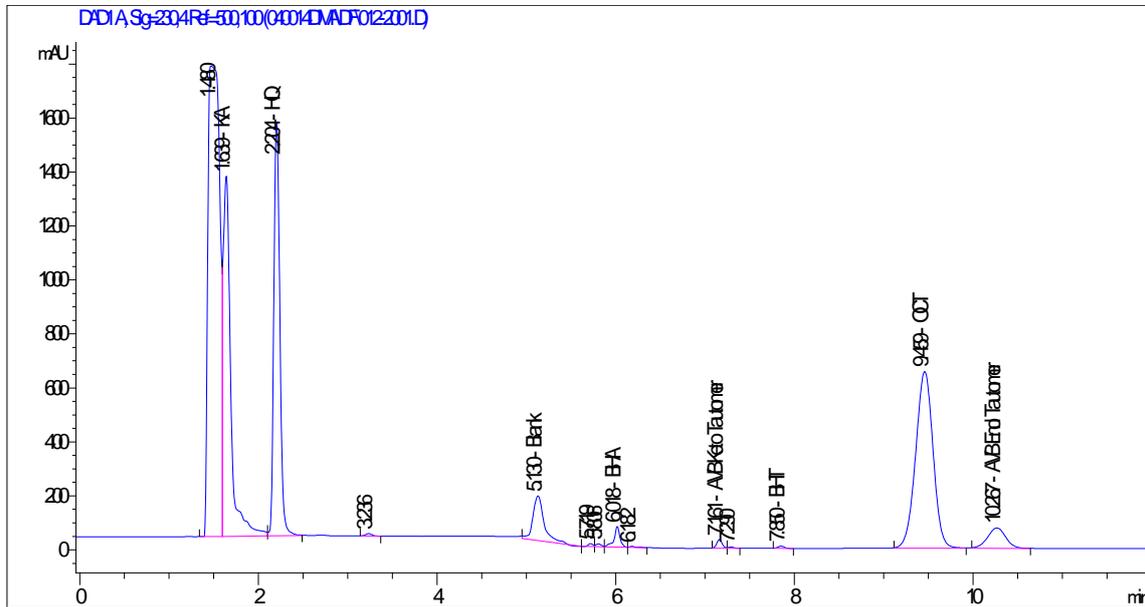


Figura 10.3.24 Cromatograma de la degradación forzada en medio oxidante (H_2O_2 3%, 1 h, T_{amb}) de la crema

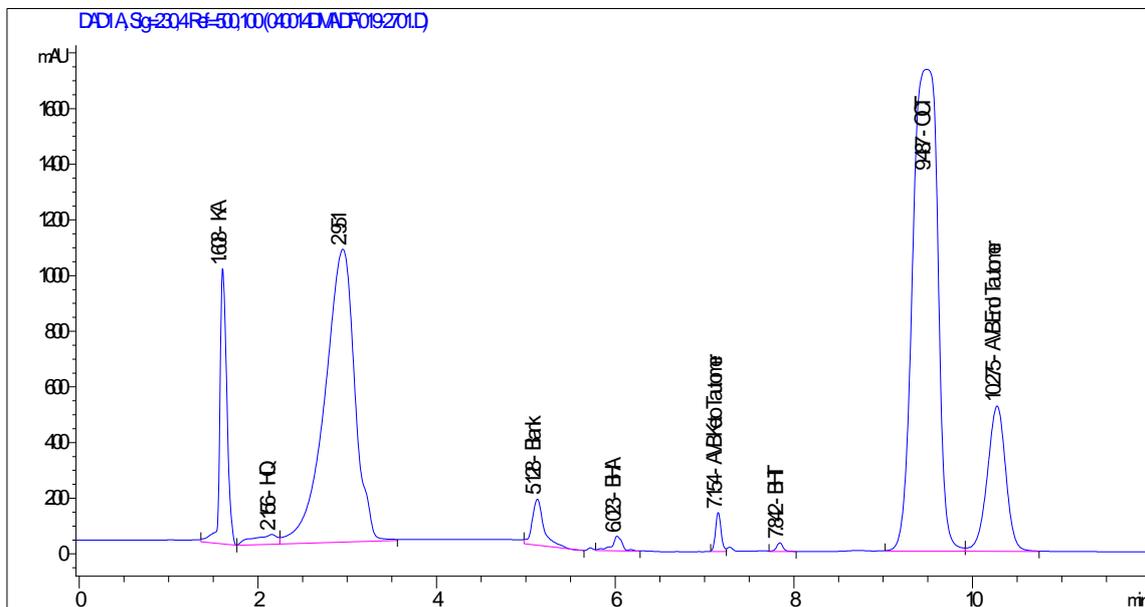


Figura 10.3.25 Cromatograma de la degradación forzada por temperatura ($105\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 días) de la crema

Al someter la muestra de crema a la luz UV, se observa que los picos de KA e HQ prácticamente desaparecen. También se observa una disminución importante en los picos de BHT, OCT y AVB mientras que el pico de BHA permanece bastante inalterado (Figura 10.3.26). Se observa la formación de un producto de degradación principal a un t_R : 2,66 minutos y otros minoritarios a lo largo del cromatograma.

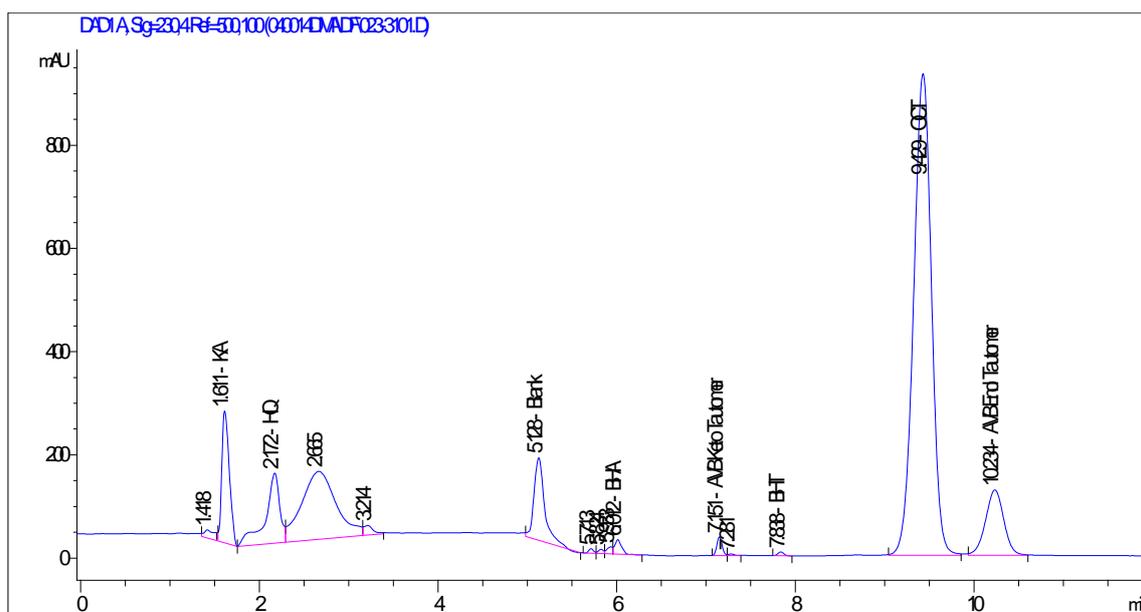


Figura 10.3.26 Cromatograma de la degradación forzada por exposición a luz UV (10 días) de la crema

II. Linealidad

Para demostrar que el método es lineal se prepara 1 linealidad conjunta para todos los compuestos en estudio en el rango de concentraciones comprendido entre 10 y 160% de la concentración nominal. Se preparan 8 soluciones patrón inyectándose por triplicado: 10%, 32%, 50%, 60%, 80%, 100%, 120% y 160%.

Las áreas de los picos de cada uno de los compuestos se representan frente a la concentración estableciéndose, de esta forma, los intervalos en que son lineales. Se realiza una regresión lineal por mínimos cuadrados tal y como se muestra en la Tabla 10.3.8. Las representaciones gráficas de las linealidades de cada uno de los compuestos se muestran en la Figuras 10.3.27 y la Figura 10.3.28 según el contenido de cada compuesto en la formulación, es decir, en función de la concentración nominal. Se demuestra de esta forma que el método es lineal para cada uno de los compuestos en estudio.

Tabla 10.3.8 Resumen de los resultados de las linealidades de cada compuesto

	$Area = a \cdot Concentración + b$					
	BHA	BHT	OCT	AVB	HQ	KA
Pendiente (a)	21,999	14,524	10,143	36,534	20,292	17,828
Ordenada origen (b)	-0,668	1,886	4,115	-18,346	-82,846	-10,007
C. Correlación (r)	0,9999	0,9965	0,9993	0,9999	0,9996	0,9999
C. Determinación (r ²)	0,9999	0,9930	0,9986	0,9999	0,9991	0,9999

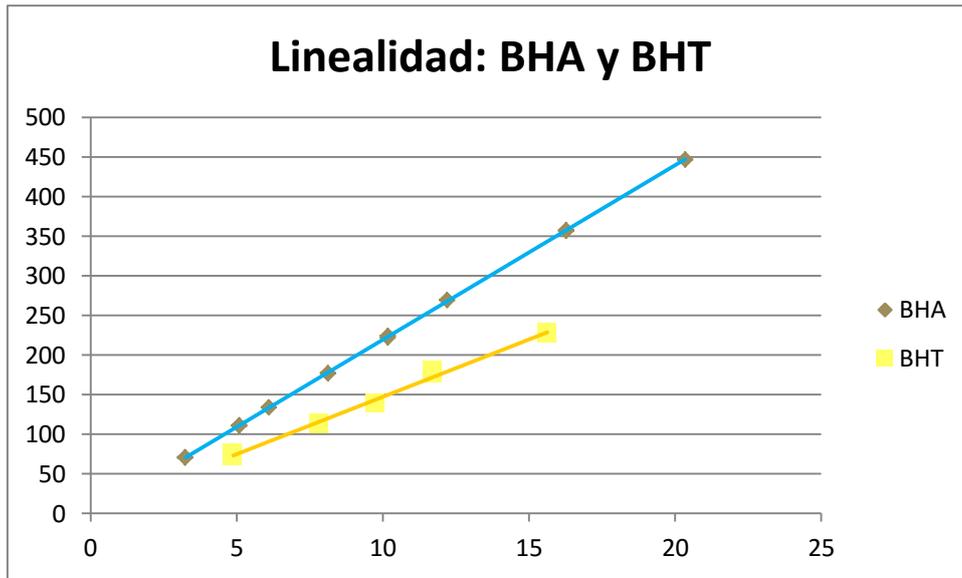


Figura 10.3.27 Representación gráfica de las linealidades de BHA y BHT

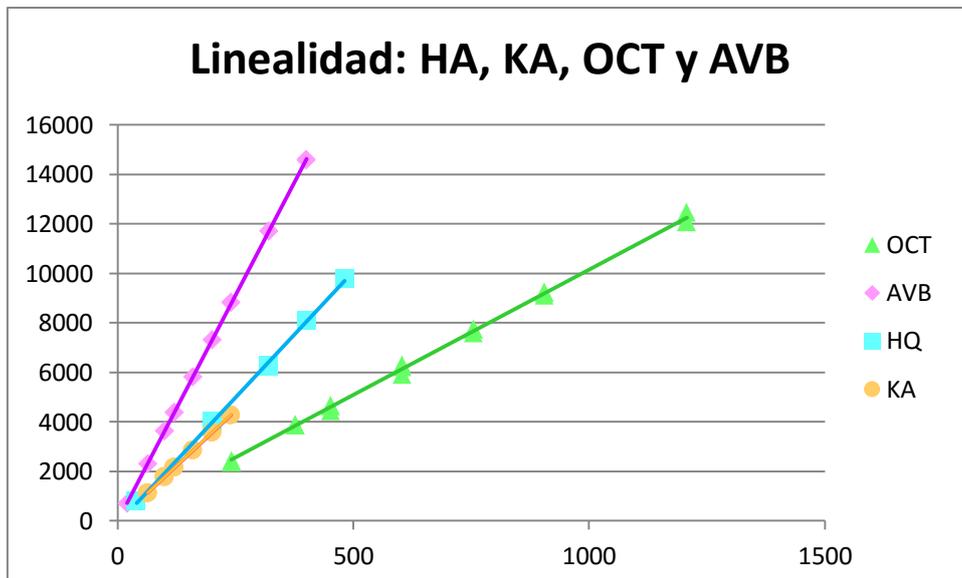


Figura 10.3.28 Representación gráfica de las linealidades de HQ, KA, OCT y AVB

En la Tabla 10.3.9 se muestra el resumen de los datos del factor respuesta (FR) y el rango de linealidad para cada uno de los compuestos. Todos los coeficientes de variación (RSD) de los factores respuesta son inferiores al 5,0% demostrando una relación lineal entre concentración y área.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.3.9 Resumen de los datos referentes al factor respuesta y el rango de linealidad para cada compuesto

	BHA	BHT	OCT	AVB	HQ	KA
Media	21,91	14,76	10,14	36,26	19,87	17,74
SD	0,12	0,50	0,19	0,43	0,36	0,11
RSD	0,53	3,40	1,84	1,19	1,82	0,64
Rango*	3.0-20.0	5.0-16.0	240-1200	20-400	40-480	64-240

*: expresado en $\mu\text{g}/\text{m}$

Se comprueba que las pendientes son significativamente diferentes de cero mediante la prueba t-Student. Además, se calculan los intervalos de confianza que no deben incluir el cero (ver Tabla 10.3.10).

Por otra parte, se comprueba que las rectas pasan por el origen de coordenadas mediante la prueba t-Student resultando que las ordenadas en el origen son estadísticamente igual a cero. También se determinan los intervalos de confianza que incluyen el cero (ver Tabla 10.3.11).

Tabla 10.3.10 Significación estadística de la desviación estándar de las pendientes de cada compuesto

Test de la pendiente						
	BHA	BHT	OCT	AVB	HQ	KA
t_a experimental	654,221	43,102	111,049	810,769	120,170	444,451
t tabulada ^a	2,093	2,093	2,093	2,093	2,093	2,093
C. aceptación ^b	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Int. confianza ^c	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

^a: valor de t-Student tabulado para $\rho:0,05$ y $(18-2=16)$ grados de libertad

^b: Criterio de aceptación: $t_{a,exp} > t_{tab}$

^c: Intervalo de confianza: no debe incluir el cero

Tabla 10.3.11 Significación estadística de la ordenada en el origen de cada compuesto

Test de proporcionalidad						
	BHA	BHT	OCT	AVB	HQ	KA
t_a experimental	-1,716	0,528	0,060	-1,894	-1,497	-1,565
t tabulada ^a	2,093	2,093	2,093	2,093	2,093	2,093
C. aceptación ^b	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Int. confianza ^c	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

^a: valor de t-Student tabulado para $\rho:0,05$ y $(18-2=16)$ grados de libertad

^b: Criterio de aceptación: $t_{a,exp} < t_{tab}$

^c: Intervalo de confianza: debe incluir el cero

III. Precisión

a. Instrumental

Se realizan 6 inyecciones consecutivas de la solución patrón de trabajo para estudiar la precisión instrumental. Los coeficientes de variación obtenidos tanto para el estudio del tiempo de retención (t_R) como para las áreas, se encuentran muy por debajo del límite establecido al inicio del estudio del 1,0%, por lo que se puede concluir que el instrumento utilizado es adecuado para el uso propuesto y que da valores repetitivos (Tabla 10.3.12).

Tabla 10.3.12 Resultados de la precisión instrumental para cada compuesto

Inyección	BHA		BHT		OCT	
	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área
1	5,997	243,26465	7,880	150,11723	9,683	7480,38379
2	5,997	243,42641	7,881	149,69810	9,684	7497,69971
3	5,997	242,33728	7,880	149,18962	9,679	7486,97705
4	5,997	242,79233	7,882	149,63025	9,688	7479,30713
5	5,996	241,97357	7,880	148,05132	9,684	7479,46826
6	5,998	241,59549	7,881	151,59633	9,687	7485,84912
Media	5,997	242,56496	7,881	149,71381	9,684	7484,94751
SD	0,001	0,725	0,001	1,162	0,003	7,074
RSD	0,01	0,30	0,01	0,78	0,03	0,09

Tabla 10.3.12 Resultados de la precisión instrumental para cada compuesto (continuación)

Inyección	AVB		HQ		KA	
	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área
1	10,530	8244,78027	2,278	8362,35840	1,730	3954,95337
2	10,529	8255,86035	2,292	8385,52051	1,743	4012,99097
3	10,526	8232,67871	2,277	8363,22559	1,727	3996,27759
4	10,535	8239,44922	2,284	8371,61035	1,733	4011,99121
5	10,528	8238,08008	2,285	8378,92773	1,735	4027,53540
6	10,535	8253,63184	2,284	8376,02051	1,735	4033,62451
Media	10,531	8244,08008	2,283	8372,94385	1,734	4006,22884
SD	0,004	9,143	0,005	9,074	0,005	28,325
RSD	0,04	0,11	0,24	0,11	0,31	0,71

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

b. Repetibilidad

Para estudiar la repetibilidad del método se realizan 3 análisis completos e independientes entre sí –pesadas diferentes tanto de patrones como de muestras – de forma consecutiva según el procedimiento descrito en el Anexo III de una misma alícuota homogénea del lote de crema A02. Según el procedimiento, se preparan por duplicado tanto la solución patrón como la solución problema y se sigue la secuencia de inyección descrita en el apartado 10.3.3.2.III.b.

En la Tabla 10.3.13 se presentan los resultados de la repetibilidad para cada uno de los compuestos cumpliendo con el criterio de aceptación establecido: $RSD \leq 2,0\%$.

Tabla 10.3.13 Resultados repetibilidad del método

Análisis	Problema	BHA	BHT	OCT	AVB	HQ	KA
A1	P1	99,47	98,05	99,85	99,11	99,05	100,17
	P2	99,40	99,78	97,40	100,37	100,10	98,87
A2	P3	100,56	101,97	99,32	99,66	99,93	100,87
	P4	99,54	100,86	98,17	97,22	100,14	99,74
A3	P5	101,88	99,78	98,56	99,26	98,64	98,13
	P6	101,19	100,28	99,78	97,45	100,21	99,95
Media		100,34	100,12	98,85	98,84	99,68	99,62
DS		1,041	1,304	0,974	1,252	0,665	0,974
RSD		1,04	1,30	0,99	1,27	0,67	0,98
Criterio de aceptación				RSD \leq 2,0%			

c. Precisión intermedia

Se realizan dos análisis completos e independientes entre sí, de la misma forma que en la repetibilidad, bajo distintas condiciones operacionales: un día distinto, analista distinto, HPLC distintos y diferente lote de columna cromatográfica.

Los resultados cumplen con los criterios de aceptación preestablecidos tal y como se muestra en la Tabla 10.3.14.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.3.14 Resultados de la precisión intermedia para cada uno de los compuestos

HPLC	Analista	Día	Columna	Análisis	Problema	BHA	BHT	OCT
CQ51	A	1	176	A1	P1	99,47	98,05	99,85
					P2	99,40	99,78	97,40
				A2	P3	100,56	101,97	99,32
					P4	99,54	100,86	98,17
				A3	P5	101,88	99,78	98,56
					P6	101,19	100,28	99,78
CQ33	B	2	185	A4	P7	100,23	98,42	101,22
					P8	98,23	98,23	101,80
				A5	P9	99,48	100,60	100,68
					P10	98,81	99,09	100,37
				A6	P11	101,31	97,05	99,65
					P12	99,90	98,01	100,07
Media						100,00	99,34	99,74
SD						1,075	1,443	1,255
RSD						1,08	1,45	1,26
Criterio de aceptación: $RSD \leq 2 \cdot RSD_{REPETIBILIDAD}$						2,08	2,60	1,97

Tabla 10.3.14 Resultados de la precisión intermedia para cada uno de los compuestos (continuación)

HPLC	Analista	Día	Columna	Análisis	Problema	AVB	HQ	KA
CQ51	A	1	176	A1	P1	99,11	99,05	100,17
					P2	100,37	100,10	98,87
				A2	P3	99,66	99,93	100,87
					P4	97,22	100,14	99,74
				A3	P5	99,26	98,64	98,13
					P6	97,45	100,21	99,95
CQ33	B	2	185	A4	P7	97,47	99,36	100,47
					P8	98,68	99,08	99,48
				A5	P9	96,82	98,83	98,91
					P10	97,47	98,18	102,33
				A6	P11	98,68	99,83	102,43
					P12	96,82	100,87	101,85
Media						98,25	99,52	100,27
SD						1,192	0,784	1,388
RSD						1,21	0,79	1,38
Criterio de aceptación: $RSD \leq 2 \cdot RSD_{REPETIBILIDAD}$						2,53	1,33	1,96

IV. Exactitud

Las soluciones para evaluar la exactitud del método se preparan por triplicado, a 500 mg de placebo se añade una cantidad conocida de cada uno de los compuestos en estudio equivalente al 50%, 100% y 150% de la concentración nominal. Cada una de las soluciones se inyecta por duplicado siguiendo la secuencia descrita en el apartado 10.3.3.2.IV. Se cuantifica el contenido de cada compuesto utilizando la media del factor respuesta de las dos soluciones patrón 100%.

Las recuperaciones de todos los compuestos están incluidas en el intervalo de 100 ± 3%, tanto para la recuperación en cada nivel como para la recuperación global (calculada para las nueve determinaciones) como se muestra en la Tabla 10.3.15. La independencia del factor concentración con respecto a la varianza de los resultados se comprueba mediante la aplicación del test de Cochran. Y además, se demuestra mediante la prueba t-Student que no hay diferencia significativa entre los resultados de recuperación obtenidos y el teórico 100% (Tabla 10.3.16).

Tabla 10.3.15 Resultados de la recuperación para cada uno de los compuestos en estudio

Compuestos	Nivel: 50%		Nivel I: 100%		Nivel: 150%		Global	
	Rec*	RSD	Rec*	RSD	Rec*	RSD	Rec*	RSD
BHA	97,8	1,17	99,9	0,26	99,6	0,63	99,1	1,22
BHT	100,3	1,77	100,1	1,89	99,1	1,74	99,8	1,64
OCT	100,6	0,21	100,2	0,33	99,5	0,05	100,1	0,51
AVB	100,7	1,17	100,6	1,59	101,0	0,97	100,7	1,11
HQ	100,0	0,28	99,5	0,87	98,1	1,09	99,2	1,14
KA	100,4	0,70	100,5	0,38	97,6	0,31	99,5	1,51

*Rec: Recuperación (%)

Tabla 10.3.16 Análisis estadístico de la exactitud

Compuestos	Test de Cochran ^{a,b}		Test de Student ^{a,b}	
	G _{EXP}	G _{TAB}	t _{EXP}	t _{TAB}
BHA	0,741		2,237	
BHT	0,367		0,300	
OCT	0,700	0,871	-0,348	2,306
AVB	0,523		1,965	
HQ	0,577		2,072	
KA	0,675		1,002	
Criterios de aceptación	G _{EXP} < G _{TAB}		t _{EXP} < t _{TAB}	

^a ρ=0,05

^b degree of freedom=8

V. Robustez

Para estudiar la robustez del método, se altera un sólo parámetro cromatográfico mientras que los otros se mantienen sin cambios. En todas las modificaciones cromatográficas realizadas – temperatura de la columna, longitud de onda y volumen de inyección – se analizan los resultados obtenidos por ANOVA de una vía ($\rho < 0,05$). Tal y como se observa en la Tablas 10.3.17 a 10.3.19, todos los $F_{\text{CALCULADO}}$ son menores al valor crítico (F_{CRITICO}) y por tanto, se evidencia que los resultados no se ven afectados por los cambios realizados en las condiciones cromatográficas testadas.

Tabla 10.3.17 Análisis estadístico del factor temperatura de columna

Compuesto	T_{COL} (°C)	Promedio	Varianza	F_{CALCULADO}	F_{CRITICO}
BHA	40	99,51	1,3422	0,66147	5,14325
	45	99,13	1,5536		
	35	98,58	0,0967		
BHT	40	100,92	0,6334	3,69723	5,14325
	45	100,27	1,4493		
	35	98,94	0,3892		
OCT	40	99,36	1,3436	4,58351	5,14325
	45	97,51	0,2932		
	35	98,26	0,0674		
AVB	40	98,10	1,1562	4,86471	5,14325
	45	99,92	0,3259		
	35	98,80	0,0814		
HQ	40	98,73	0,0394	0,04304	5,14325
	45	98,69	0,4450		
	35	98,79	0,0832		
KA	40	100,47	0,1957	0,54316	5,14325
	45	100,86	0,5113		
	35	101,00	0,5306		

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.3.18 Análisis estadístico del factor longitud de onda

Compuesto	λ (nm)	Promedio	Varianza	F _{CALCULADO}	F _{CRITICO}
BHA	290	99,51	1,3422	0,47880	5,14325
	292	99,66	0,4239		
	288	98,97	0,7178		
BHT	290	100,29	2,2640	0,09823	5,14325
	292	100,87	5,3189		
	288	100,58	0,1600		
OCT	290	100,18	0,9506	4,52559	5,14325
	292	101,65	0,1521		
	288	101,45	0,1694		
AVB	290	98,36	2,3322	0,30121	5,14325
	292	98,77	0,5918		
	288	99,01	0,2688		
HQ	290	98,73	0,0394	3,06814	5,14325
	292	98,58	0,0618		
	288	98,29	0,0430		
KA	290	100,47	0,1957	3,91373	5,14325
	292	100,01	0,2222		
	288	99,48	0,1460		

Tabla 10.3.19 Análisis estadístico del factor volumen de inyección

Compuesto	V _{iny} (μ l)	Promedio	Varianza	F _{CALCULADO}	F _{CRITICO}
BHA	25	99,51	1,3422	1,22861	5,14325
	27	100,31	0,4563		
	23	100,62	0,5889		
BHT	25	100,30	2,2481	0,42759	5,14325
	27	100,05	0,4197		
	23	100,88	1,1812		
OCT	25	100,18	0,9506	0,53565	5,14325
	27	100,67	0,1321		
	23	100,60	0,1039		
AVB	25	98,36	2,3322	1,31694	5,14325
	27	99,58	0,3310		
	23	99,35	0,1809		
HQ	25	98,73	0,0394	0,52137	5,14325
	27	98,54	0,0734		
	23	98,55	0,0782		
KA	25	100,47	0,1957	1,23800	5,14325
	27	99,95	0,2116		
	23	100,00	0,1956		

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Se comprueba también la robustez del tipo de columna, inyectándose en el HPLC utilizando las siguientes dos columnas, iguales pero de distinto número de lote:

- Zorbax SB-Phenyl 5 μm , 80 Å, 4,6 x 250 mm, nº lote USUU16095, código 176
- Zorbax SB-Phenyl 5 μm , 80 Å, 4,6 x 250 mm, nº lote USUU17161, código 185

Los resultados obtenidos con las dos columnas se sometieron a análisis estadístico mediante la prueba t-Student suponiendo varianzas iguales (comprobado previamente mediante el análisis de varianza de un factor). Para todos los compuestos se cumple que el t calculado es menor que el t crítico (2,776, contraste de dos colas), por lo que la hipótesis nula se toma como cierta y las dos medias muestrales no difieren significativamente entre ellas (Tabla 10.3.20). Se usa un contraste de dos colas ya que no interesa el sentido en que difieren las medias (es decir si la diferencia es positiva o negativa).

Tabla 10.3.20 Análisis estadístico de la robustez de la columna

	BHA		BHT	
	<i>Columna 176</i>	<i>Columna 185</i>	<i>Columna 176</i>	<i>Columna 185</i>
Media	99,51	98,39	100,30	100,63
Varianza	1,342	1,139	2,248	1,467
Observaciones	3	3	3	3
Varianza agrupada	1,240		1,858	
Dif. hipotética de las medias	0		0	
Grados de libertad	4		4	
Estadístico t	1,2314		-0,3025	
P(T<=t) una cola	0,1428		0,3887	
Valor crítico de t (una cola)	2,1318		2,1318	
P(T<=t) dos colas	0,2856		0,7773	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7765		2,7765	

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.3.20 Análisis estadístico de la robustez de la columna (continuación)

	OCT		AVB	
	Columna 176	Columna 185	Columna 176	Columna 185
Media	100,18	99,90	98,36	99,56
Varianza	0,951	2,212	2,332	0,814
Observaciones	3	3	3	3
Varianza agrupada	1,581		1,573	
Dif. hipotética de las medias	0		0	
Grados de libertad	4		4	
Estadístico t	0,2727		-1,1731	
P(T<=t) una cola	0,3993		0,1529	
Valor crítico de t (una cola)	2,1318		2,1318	
P(T<=t) dos colas	0,7983		0,3058	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7765		2,7765	

Tabla 10.3.20 Análisis estadístico de la robustez de la columna (continuación)

	OCT		AVB	
	Columna 176	Columna 185	Columna 176	Columna 185
Media	100,18	99,90	98,36	99,56
Varianza	0,951	2,212	2,332	0,813
Observaciones	3	3	3	3
Varianza agrupada	1,581		1,573	
Dif. hipotética de las medias	0		0	
Grados de libertad	4		4	
Estadístico t	0,2727		-1,1731	
P(T<=t) una cola	0,3993		0,1529	
Valor crítico de t (una cola)	2,1318		2,1318	
P(T<=t) dos colas	0,7986		0,3058	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7765		2,7765	

Por lo tanto, el método propuesto puede considerarse fiable y robusto.

VI. Estabilidad de la solución

Los valores de RSD para el ensayo de estabilidad de la solución cumplen el criterio de aceptación de $RSD \leq 1,5\%$, excepto para el pico de BHT que fue de 1,7% (pico muy pequeño para el cual puede considerarse un $RSD \leq 2,0\%$) y la variación relativa entre la primera y la última inyección, en ningún caso, es superior al 2,0% (Tabla 10.3.21). Por tanto, no se observan cambios significativos en el área de los compuestos bajo estudio. Todos los datos obtenidos en el estudio de estabilidad de la solución problema (Figura

10.3.29) sugieren que la solución problema puede ser almacenada sin ninguna degradación durante 48 horas.

Tabla 10.3.21 Variaciones de la solución durante el estudio de estabilidad

	HQ	KA	BHA	BHT	OCT	AVB
RSD	0,54	0,83	1,28	1,72	0,76	0,92
Varianza relativa	0,7	2,0	1,1	0,1	1,9	1,8

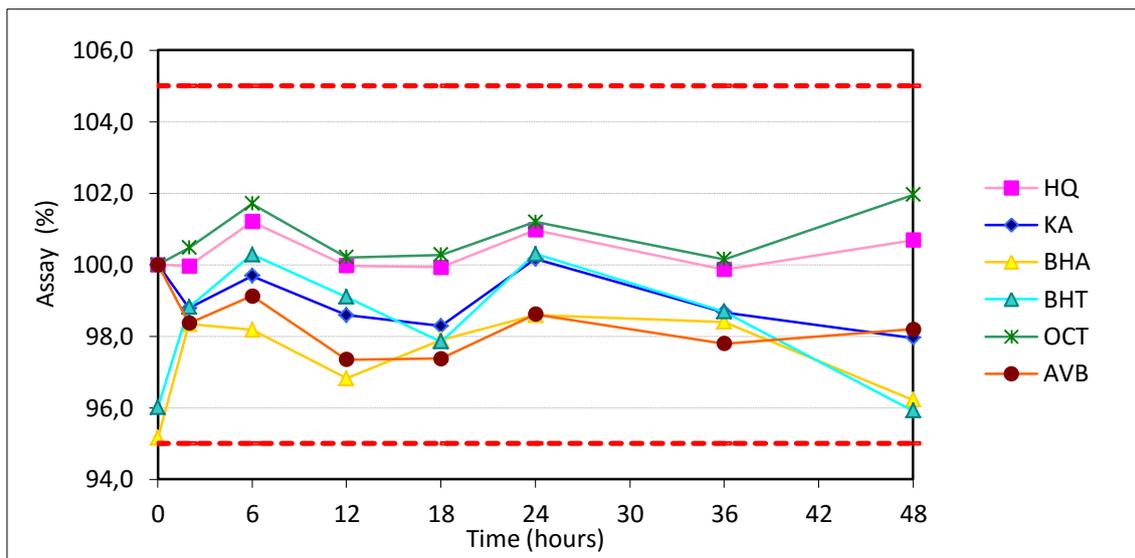


Figura 10.3.29 Representación gráfica de la estabilidad de la solución problema

10.3.5. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado y optimizado un método *dual mode gradient* de RP-HPLC, compatible con LC/MS, para la determinación simultánea de los seis compuestos en estudio (HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT) en 14 minutos para dar soporte analítico a la fase de desarrollo de la formulación.
- Un pico adicional desconocido es identificado como el tautómero ceto del compuesto AVB, la proporción del cual en la solución se mantiene constante alrededor del 20% en función sólo de la proticidad del disolvente. En este caso el diluyente de muestra es una mezcla (70:30) ACN:H₂O.
- El proceso de extracción es simple obteniéndose unos buenos resultados en la recuperación de los compuestos.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

- El método ha sido validado mostrando unos datos satisfactorios en cuanto a selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez y estabilidad de la solución.
- El método ha sido aplicado satisfactoriamente en el análisis de prototipos generados durante la etapa de desarrollo de la formulación.

10.4. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT POR UPLC

10.4.1. INTRODUCCIÓN

La fase de desarrollo de la formulación concluyó, con éxito, en un prototipo de crema con una estabilidad correcta (ver capítulo 6). El siguiente paso fue escalar el proceso a nivel industrial y validar el proceso de producción con tres lotes consecutivos de crema (ver capítulo 7). En este caso, la fase de escalado y la validación de producción se realizan en la planta de producción en que la empresa, comercializadora de la crema, la producirá.

En el caso ideal, los métodos de análisis deben durar toda la vida útil del producto pero, en realidad, evolucionan junto al producto durante todo el proceso de desarrollo.

Tanto en la fase de industrialización como en el departamento de Control de Calidad, una vez esté aprobado el medicamento, las muestras a analizar son numerosas. Por tanto, el objetivo principal del desarrollo y optimización de métodos de HPLC es que sean rápidos, robustos, exactos, precisos y transferibles [131,132].

En este caso, se evalúan los métodos analíticos desarrollados a lo largo de las diferentes fases del proyecto y se decide optimizar el método desarrollado para la determinación simultánea de HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT por HPLC, de 14 minutos. El método desarrollado para la determinación de DPK no se optimiza porque el tiempo de ejecución es de 5 minutos y se considera suficientemente rápido.

Durante la última década ha habido un esfuerzo intensivo para mejorar el rendimiento del HPLC aprovechándose de las columnas empaquetadas con tamaños de partícula más pequeños. La cromatografía líquida de ultra rendimiento o cromatografía líquida de ultra-alta presión (UPLC) es una nueva clase de cromatografía de líquidos que opera bajo los mismos principios que el HPLC rigiéndose por la ecuación de van Deemter. Las separaciones se llevan a cabo utilizando columnas con rellenos cuyo tamaño de partícula es inferior a 2 μm en sistemas adaptados para el funcionamiento a altas presiones (UPLC) resultan en una mejora de los atributos de rapidez, sensibilidad y resolución [210]. Durante estos años varios métodos de HPLC ya se han adaptado a UPLC [211-214].

Por tanto, en este capítulo se describe la optimización del método de RP-HPLC para la determinación simultánea de HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT [207]. Partiendo del método desarrollado para dar soporte a la fase de desarrollo de la formulación, se optimiza para que la determinación simultánea de los compuestos en estudio sea más rápida y eficiente. Para ello se realiza la transferencia del método a UPLC.

10.4.2. MATERIALES

10.4.2.1. *Patrones*

HQ (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

KA (analytical standard $\geq 99.0\%$). Fluka (Buchs, Switzerland)

OCT (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

AVB (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

BHA (Pharmaceutical secondary standard – traceable to Ph.Eur. and USP). Fluka (Buchs, Switzerland)

BHT (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

10.4.2.2. *Reactivos y soluciones*

Reactivos:

Acetonitrilo (para UV, IR, HPLC, ACS). Panreac (Barcelona, España) (ACN)

Ácido acético glacial (para HPLC). Panreac (Barcelona, España) (HAcO)

Agua calidad HPLC se obtiene a través de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

10.4.2.3. *Aparatos y utillaje*

Aparatos:

Balanza analítica BP211D Sartorius (Gotinga, Alemania)

Baño de ultrasonidos Ultrasons 9 L Selecta (Barcelona, España)

Agitador magnético Agimatic ED Selecta (Barcelona, España)

Centrífuga Meditronic P Selecta (Barcelona, España)

UPLC Acquity™ Waters equipado con una bomba binaria, un carro de muestras de 96 viales termostatzado y un detector de red de diodos (DAD), controlado por software Empower (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.); Código interno: SCT01, SCT02

Utillaje:

Espátulas de acero inoxidable de diferentes dimensiones

Vasos de precipitados de distintos volúmenes (25 ml, 100 ml, 1 l)

Probetas de distintos volúmenes (10 ml, 100 ml, 1 l) Clase A graduada

Desecador de vidrio Simax con grifo en la tapa esmerilada

Pesasustancias

Matraces aforados de 10, 25, 50 y 100 ml Clase A

Tubos centrífuga de 10 ml

Pipeta doble aforo 1, 2, 5 y 10 ml Clase A

Botella 1 l Pyrex con tapón

Jeringas plástico 10 ml

Filtros de jeringa 33 0,22 µm Millex PVDF Millipore

Filtros de membrana 0,22 µm Durapore PVDF Millipore

Papel de filtro plano para análisis cualitativo

Viales 2 ml HPLC

Pipetas Pasteur

Cronómetro Oregon Scientific

Columna cromatográfica Zorbax RRHT SB-Phenyl 1,8 µm, 80 Å, 2,1 x 100 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

10.4.3. METODOLOGIA

10.4.3.1. Validación del método

El método de ULC es validado según la guía ICH Q2 [135] evaluándolo con respecto a la selectividad, linealidad, precisión y exactitud. El límite de detección y cuantificación no se evalúa porque el método es desarrollado y optimizado para la cuantificación de componentes mayoritarios. La estabilidad de las soluciones ha sido demostrada en la validación del método *stability-indicating* preliminar (capítulo 10.1, apartado 10.1.4.6.VI) y del método para la determinación simultánea de los compuestos en estudio por HPLC (capítulo 10.3, apartado 10.3.4.4.VI).

Al igual que en el método de HPLC *stability-indicating* preliminar (capítulo 10.1) y el método HPLC para la determinación simultánea de HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT (capítulo 10.3), el diluyente de muestra es una mezcla (70:30) de ACN:H₂O.

La metodología analítica validada se describe en el Anexo IV.

I. Selectividad

Para demostrar la selectividad del método se evalúa la identificación de cada uno de los compuestos frente a los patrones de trabajo. También se comprueba la ausencia de interferencias con la solución placebo.

II. Linealidad

Para establecer la linealidad de cada compuesto, se preparan una serie de soluciones conjuntas entre el 50 y el 120%, de la concentración nominal de cada compuesto, por dilución a partir de un único patrón conjunto de trabajo al 200%: 50%, 60%, 80%, 90%, 100%, 110% y 120%. Cada una de las soluciones se inyecta en el sistema cromatográfico por triplicado.

Solución madre HQ: Pesar exactamente alrededor de 200 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Solución madre KA: Pesar exactamente alrededor de 100 mg de KA patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Solución madre BHA: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHA patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 40 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Solución madre BHT: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHT patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 40 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Solución madre OCT: Pesar exactamente alrededor de 375 mg de OCT patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Solución madre AVB: Pesar exactamente alrededor de 100 mg de AVB patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Solución conjunta al 200%: Diluir 5 ml de cada una de las soluciones madres preparadas anteriormente en un matraz de 50 ml. Enrasar con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

El resto de soluciones se preparan siguiendo la cascada de diluciones que se presenta en la Figura 10.4.1. Preparar un vial de cada solución filtrando por un filtro PDVF de 0,22 μ m; desechando los primeros 2 ml del filtrado.

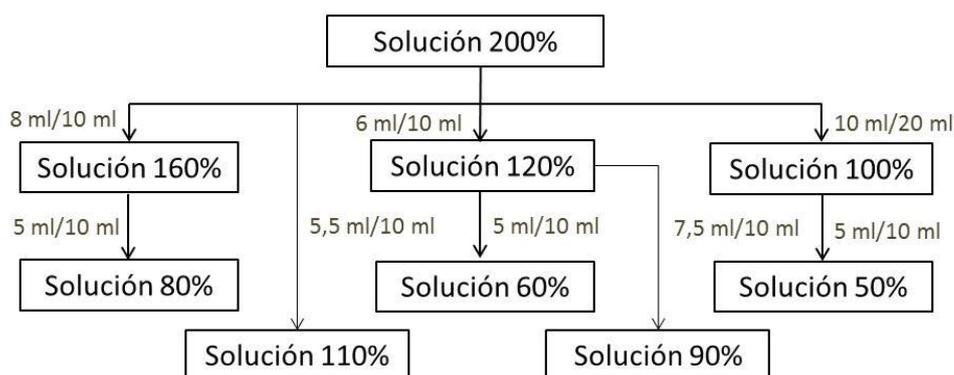


Figura 10.4.1 Esquema de diluciones para linealidad

Para cada compuesto, representar la respuesta *versus* concentración y calcular el coeficiente de correlación, la pendiente de la recta, la ordenada en el origen y el factor respuesta (respuesta/concentración).

El criterio de aceptación es:

- $R^2 > 0,9990$
- La pendiente debe ser positiva
- La recte debe pasar por el origen

III. Precisión

a. Instrumental

Para determinar la precisión instrumental se realizan 6 inyecciones consecutivas de una misma solución patrón al 100%.

Solución madre HQ: Pesar exactamente alrededor de 200 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Solución madre KA: Pesar exactamente alrededor de 100 mg de KA patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Solución madre BHA: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHA patrón de trabajo en un matraz de 100 ml. Introducir unos 80 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el

calentamiento del matraz). Enrasar a 100 ml con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Solución madre BHT: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHT patrón de trabajo en un matraz de 100 ml. Introducir unos 80 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 100 ml con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Solución madre OCT: Pesar exactamente alrededor de 187,5 mg de OCT patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Solución madre AVB: Pesar exactamente alrededor de 100 mg de AVB patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente de muestra. Homogeneizar la solución.

Solución patrón al 100%: Diluir 1 ml de cada una de las soluciones madres preparadas anteriormente en un matraz de 10 ml. Enrasar con diluyente de muestra. Homogeneizar y filtrar por un filtro PDVF de 0,22 μ m; desechando los primeros 2 ml del filtrado.

Para cada compuesto, calcular el coeficiente de variación de las áreas obtenidas. El criterio de aceptación es: $RSD \leq 1,0\%$, ya que los sistemas UPLC son más precisos que los sistemas HPLC.

b. Repetibilidad

Se estudia la repetibilidad del método mediante la realización de tres análisis independientes del mismo lote de crema. Cada uno de los análisis se preparan dos soluciones patrón y dos soluciones problemas.

Solución patrón 100%: preparar una solución patrón tal y como se indica en el Anexo IV.

Solución problema (ver apartado 10.4.4.1): Pesar exactamente alrededor de 500 mg de crema en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 10 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

calentamiento del matraz). Posteriormente, enrasar a 50 ml con diluyente de muestra y homogeneizar. Una alícuota de 10 ml de la suspensión resultante se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos. Filtrar una alícuota del líquido sobrenadante por un filtro PDVF de 0,22µm; desechando los primeros 2 ml del filtrado.

La secuencia de inyección será:

- Inyectar 2 blancos
- Inyectar cada solución patrón por triplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Para cada compuesto, calcular el contenido frente al patrón. El criterio de aceptación es: $RSD \leq 2,0\%$

c. Precisión intermedia

Se estudia la precisión intermedia mediante la realización de tres análisis independientes, de la misma forma que en la repetibilidad, en un día distinto, realizado por un analista diferente, utilizando un UPLC y columna cromatográfica distintos.

Para cada compuesto, calcular el coeficiente de variación entre los resultados obtenidos para la repetibilidad y los resultados obtenidos en este segundo análisis. El criterio de aceptación es: $RSD \leq 2 \cdot RSD_{REPETIBILIDAD}$.

IV. Exactitud

Se determina la exactitud mediante el método del placebo cargado. Para ello, se prepararan por triplicado soluciones de placebo a las que se añaden cantidades conocidas de cada uno de los compuestos a tres niveles de concentración (50, 100 y 150%). Cada solución se inyecta por triplicado.

Solución patrón 100%: preparar una solución patrón tal y como se indica en el anexo IV.

Solución problema (ver apartado 10.4.4.1): Pesar exactamente las cantidades indicadas en la Tabla 10.4.1 de placebo en matraces aforados de 50 ml. Añadir el volumen indicado en la Tabla 10.4.1 de solución patrón al 200%, preparado tal y como se indica en el apartado 10.4.3.1.// y sonicar durante 10 minutos (poner hielo en el baño de

ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar con diluyente de muestra y homogeneizar. Una alícuota de 10 ml de la suspensión resultante se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos. Filtrar una alícuota del líquido sobrenadante por un filtro PDVF de 0,22 μ m; desechando los primeros 2 ml del filtrado.

Tabla 10.4.1 Volúmenes de patrón de trabajo y cantidades de placebo para la realización de la exactitud

Número de soluciones	Nivel (%)	Peso de placebo (mg)	Volumen de patrón 200% (ml)
3	50	500	12,5
3	100	500	25,0
3	150	500	37,5

La secuencia de inyección será:

- Inyectar 2 blancos
- Inyectar cada solución patrón por triplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Para cada compuesto, calcular su contenido frente al patrón. El criterio de aceptación para la recuperación en producto terminado debe estar comprendida entre: 97,0 – 103,0%.

10.4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.4.4.1. Preparación de la muestra

En el método de HPLC desarrollado para la determinación de los seis compuestos en estudio (HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT), se realiza la extracción de los compuestos de 500 mg de crema obteniéndose una suspensión, en diluyente de muestra de muestra, por el siguiente proceso de extracción: sonicar durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos de agua-hielo, agitar durante 15 minutos en un agitador magnético a temperatura ambiente, seguido por la centrifugación de una alícuota de la suspensión a 4500 rpm durante 5 minutos. Este procedimiento, aunque se puede implementar directamente en la mayoría de los laboratorios, es largo (35 minutos) y laborioso (3 pasos).

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Se decide optimizar el proceso de extracción para reducir tanto el tiempo necesario como el número de pasos. Se estudia la reducción del tiempo de agitación desde 15 hasta 0 minutos, manteniendo constante el tiempo de sonicación (15 minutos). Los resultados obtenidos (Tabla 10.4.2) se analizan estadísticamente mediante la prueba t-Student suponiendo varianzas iguales (comprobado previamente mediante la prueba F de Snedecor-Fischer). Para todos los compuestos se cumple que t calculado es menor que el t crítico (2,7764, contraste de dos colas), por lo que la hipótesis nula se toma como cierta y las dos medias no difieren significativamente (Tabla 10.4.3). Por tanto, se decide eliminar la etapa de agitación magnética y sustituirla por una homogeneización manual de la solución.

Tabla 10.4.2 Resultados obtenidos en los experimentos de tiempo de agitación

t_A (min)		HQ	KA	OCT	AVB	BHA	BHT
15	Media	99,3	99,6	99,4	99,3	100,5	101,1
	SD	0,551	0,70	0,96	1,16	0,92	1,29
	RSD	0,55	0,7	1,0	1,2	0,9	1,3
5	Media	99,1	99,8	99,4	99,4	101,6	101,8
	SD	0,802	0,61	1,17	0,46	1,45	0,81
	RSD	0,81	0,6	1,2	0,5	1,4	0,8
0	Media	99,5	99,5	99,4	100,0	101,0	101,1
	SD	0,907	1,00	0,76	0,31	0,20	0,66
	RSD	0,91	1,0	0,8	0,3	0,2	0,6

t_A: tiempo de agitación

Tabla 10.4.3 Análisis estadístico del factor agitación: 15 y 0 minutos

<i>Tiempo de agitación</i>	HQ		KA		OCT	
	<i>15 min</i>	<i>0 min</i>	<i>15 min</i>	<i>0 min</i>	<i>15 min</i>	<i>0 min</i>
Media	99,27	99,87	99,60	99,50	99,40	99,43
Varianza	0,303	0,123	0,490	1,000	0,930	0,583
Observaciones	3	3	3	3	3	3
Varianza agrupada	0,213		0,745		0,757	
Dif. Hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	4		4		4	
Estadístico t	-1,5910		0,1419		-0,0469	
P(T<=t) dos colas	0,1868		0,8940		0,9648	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7764		2,7764		2,7764	

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.4.3 Análisis estadístico del factor agitación: 15 y 0 minutos (continuación)

Tiempo de agitación	AVB		BHA		BHT	
	15 min	0 min	15 min	0 min	15 min	0 min
Media	99,27	99,97	100,50	101,33	101,07	101,10
Varianza	1,343	0,093	0,840	0,173	1,653	0,430
Observaciones	3	3	3	3	3	3
Varianza agrupada	0,718		0,507		1,042	
Dif. Hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	4		4		4	
Estadístico t	-1,0115		-1,4338		-0,0400	
P(T<=t) dos colas	0,3690		0,2249		0,9700	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7764		2,7764		2,7764	

También se estudia la optimización de la duración de la etapa de sonicación desde 15 hasta 5 minutos. Los resultados obtenidos para tiempos de sonicación de 5 minutos muestran valores mucho más bajos y más dispares, lo que indica que el proceso de extracción no es completo (Tabla 10.4.4). Los resultados para tiempos de sonicación de 10 y 15 minutos se analizan estadísticamente mediante la prueba t-Student suponiendo varianzas iguales (comprobado previamente mediante la prueba F de Snedecor-Fischer). Para todos los compuestos se cumple que t calculado es menor que el t crítico (2,4469, contraste de dos colas), por lo que la hipótesis nula se toma como cierta y las dos medias no difieren significativamente (Tabla 10.4.5). En consecuencia, se reduce el tiempo de sonicación a 10 minutos.

Por último, la etapa de centrifugación a 4500 rpm se mantiene constante para separar el líquido de los sólidos en suspensión.

Tabla 10.4.4 Resultados obtenidos en los experimentos de tiempo de sonicación

t_s (min)		HQ	KA	OCT	AVB	BHA	BHT
15	Media	99,5	99,5	99,4	100,0	101,0	101,1
	SD	0,907	1,000	0,764	0,306	0,200	0,656
	RSD	0,91	1,01	0,77	0,31	0,20	0,65
10	Media	99,6	99,3	99,2	100,3	101,4	101,6
	SD	1,149	1,128	0,995	1,242	1,266	1,395
	RSD	1,15	1,14	1,00	1,24	1,25	1,37
5	Media	93,1	95,5	95,3	96,7	89,9	88,0
	SD	2,069	1,433	1,537	1,161	2,696	3,038
	RSD	2,22	1,50	1,61	1,20	3,00	3,45

t_s : tiempo de sonicación

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.4.5 Análisis estadístico del factor sonicación: 15 y 10 minutos

<i>Tiempo de sonicación</i>	HQ		KA		OCT	
	<i>15 min</i>	<i>10 min</i>	<i>15 min</i>	<i>10 min</i>	<i>15 min</i>	<i>10 min</i>
Media	99,53	99,62	99,50	99,28	99,43	99,15
Varianza	0,823	1,320	1,000	1,272	0,583	0,990
Observaciones	3	5	3	5	3	5
Varianza agrupada	1,154		1,181		0,854	
Dif. hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	6		6		6	
Estadístico t	-0,1105		0,2721		0,4168	
P(T<=t) una cola	0,4578		0,3973		0,3457	
Valor crítico de t (una cola)	1,9432		1,9432		1,9432	
P(T<=t) dos colas	0,9156		0,7946		0,6913	
Valor crítico de t (dos colas)	2,4469		2,4469		2,4469	

Tabla 10.4.5 Análisis estadístico del factor sonicación: 15 y 10 minutos (continuación)

<i>Tiempo de sonicación</i>	AVB		BHA		BHT	
	<i>15 min</i>	<i>10 min</i>	<i>15 min</i>	<i>10 min</i>	<i>15 min</i>	<i>10 min</i>
Media	99,97	100,27	101,00	101,44	101,10	101,57
Varianza	0,093	1,542	0,040	1,602	0,430	1,945
Observaciones	3	5	3	5	3	5
Varianza agrupada	1,059		1,081		1,440	
Dif. hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	6		6		6	
Estadístico t	-0,4089		-0,5847		-0,5363	
P(T<=t) una cola	0,3484		0,2900		0,3055	
Valor crítico de t (una cola)	1,9432		1,9432		1,9432	
P(T<=t) dos colas	0,6968		0,5801		0,6110	
Valor crítico de t (dos colas)	2,4469		2,4469		2,4469	

Sin embargo, los sistemas UPLC requieren soluciones más limpias para evitar los colapsos en sus conexiones y tubos que son capilares. Por tanto, se recomienda filtrar las soluciones por filtros adecuados de 0,22 μm antes de su introducción en el sistema UPLC. Entonces, una porción del líquido sobrenadante de la suspensión se centrifuga y se filtra a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm PVDF (Millex, Millipore, EE.UU.) desechando los primeros 2 ml y el resto se introduce en un vial de HPLC.

10.4.4.2. Estudio de compatibilidad del filtro

Para estudiar la compatibilidad del filtro (0,22 μm PVDF) en el método analítico propuesto y demostrar que los compuestos no se retienen en él, se realiza un

experimento de la recuperación del filtrado mediante la técnica de filtración de la solución muestra.

Para ello, se preparan tres soluciones problema de la siguiente forma: pesar exactamente alrededor de 500 mg de crema en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente de muestra y sonicar durante 10 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Posteriormente, enrasar a 50 ml con diluyente de muestra y homogeneizar. Una alícuota de 10 ml de la suspensión resultante se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos. Filtrar una parte de la alícuota del líquido sobrenadante por un filtro PDVF de 0,22µm; desechando los primeros 2 ml del filtrado.

Se determina el contenido de la solución problema filtrada y se compara con los resultados obtenidos en la solución problema centrifugada.

Los resultados obtenidos en la determinación de los seis compuestos en estudio en la solución problema filtrada no muestran ningún cambio significativo respecto a los resultados obtenidos en la solución problema centrifugada, tal y como se observa en la Tabla 10.4.6. La diferencia entre los resultados obtenidos en ambos tratamientos (filtración y centrifugación) no es mayor de $\pm 0,5$, lo que indica que los filtros de jeringa PVDF no retienen estos compuestos y por tanto, estos filtros tienen una buena compatibilidad con la solución problema. Adicionalmente, se analizan estadísticamente los resultados utilizando la prueba t-Student para compararlos y no se observa ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

Tabla 10.4.6 Resultados del estudio de compatibilidad del filtro

Compuestos	Solución centrifugada	Solución filtrada por 0.22 µm PDVF	Diferencia
HQ	99,6±0,69	99,6±0,38	0,0
KA	99,6±0,60	99,4±0,45	0,1
OCT	99,2±0,88	99,0±0,31	0,2
AVB	100,6±0,59	100,3±0,80	0,3
BHA	102,0±0,40	101,6±0,54	0,4
BHT	102,1±0,52	101,9±0,23	0,2

10.4.4.3. Método de referencia

Como se observa en la Figura 10.3.3 del apartado 10.3.4.1, el método de referencia (del cual se parte) separa correctamente todos los compuestos en estudio – HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT – en 14 minutos. El gradiente dual de elución y caudal de FM en

combinación con el tiempo de cromatograma relativamente largo – 14 minutos – implica un consumo considerable de disolventes.

Debido a un gran número de muestras involucradas en la fase de industrialización, es interesante optimizar el método de referencia para reducir tanto el uso de los disolventes y el tiempo de ejecución de análisis.

10.4.4.4. Transferencia de las condiciones cromatográficas

El método de HPLC para la determinación simultánea de HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT fue validado utilizando la columna Zorbax SB-Phenyl (250x4,6 mm, 5 μ m), la cual también está disponible en tamaño de partícula sub-2 μ m: Zorbax SB-Phenyl RRHT (100x2,1mm, 1,8 μ m).

Las condiciones cromatográficas del método de HPLC son transferidas a escala UPLC utilizando el software Waters UPLC Calculadora (Waters Corporation). El escalado se realiza teniendo en cuenta el tamaño de partícula de la columna para optimizar el gradiente de elución y lograr una separación satisfactoria entre los seis compuestos.

La velocidad de flujo de fase móvil se ajusta, para adaptar la presión del sistema, a 0,7 ml/min con un volumen de inyección de 3,0 μ l de volumen de inyección. La presión operativa del sistema es de 7.100 psi en las condiciones iniciales de gradiente.

La composición de la fase móvil, temperatura de la columna y la detección se mantienen exactamente igual que en el método de referencia: H₂O al 0,1% HAcO/ACN, 40 °C y 230 nm.

10.4.4.5. Estudio de comparación de la eficacia cromatográfica

Se realiza un test de idoneidad del sistema para comparar los dos métodos – método de HPLC y método de UPLC – y asegurar la competencia del rendimiento cromatográfico.

Para ello, una solución patrón al 100% se inyecta seis veces y se evalúa la idoneidad del sistema verificando RSD de las áreas de los picos, la resolución, eficiencia de la columna y la forma de pico.

El método transferido a UPLC cumple claramente todos los criterios de idoneidad del sistema [4], tal y como se observa en la Tabla 10.4.7. El tiempo de cromatograma del método de UPLC es de 3,0 minutos en comparación con los 14 minutos del método de HPLC, dando como resultado un ahorro aproximado del 80% en el tiempo de análisis y

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

del 88% en el consumo de disolvente. Los cromatogramas típicos de los métodos de HPLC y UPLC se presentan en la Figura 10.4.2.

Tabla 10.4.7 Comparación del sistema de idoneidad de los métodos de HPLC y UPLC

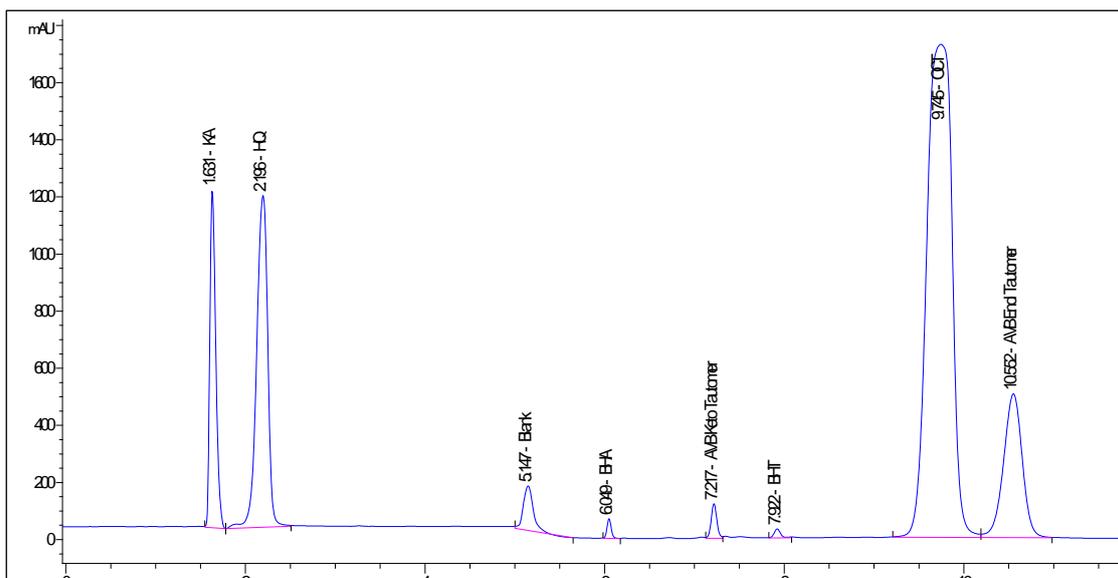
Compuestos	t_R (min)		Área RSD		Factor de simetría	
	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
KA	1,50	0,38	0,59	0,23	1,50	1,83
HQ	1,98	0,47	0,67	0,30	1,27	1,44
BHA	5,80	1,68	0,86	0,23	0,99	1,27
AVB tautómero ceto	6,79	1,95	1,03	0,35	0,88	1,45
BHT	7,39	2,06	1,06	0,33	0,97	1,16
OCT	8,18	2,24	0,78	0,21	1,00	1,08
AVB tautómero enol	8,59	2,29	0,92	0,30	0,86	1,37
Criterio USP	-		$\leq 2,0\%$		$\leq 2,0$	

Tabla 10.4.7 Comparación del sistema de idoneidad de los métodos de HPLC y UPLC (continuación)

Compuestos	Resolución		Eficiencia columna	
	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
KA	-	-	2105	3190
HQ	2,10	3,29	2315	3966
BHA	27,03	7,74	77999	103721
AVB tautómero ceto	9,43	10,57	69762	107860
BHT	3,90	5,43	75845	109238
OCT	5,20	10,56	32370	45870
AVB tautómero enol	1,53	1,60	28283	97025
Criterio USP	$> 1,5$		> 2000	

La máxima presión alcanzada por el sistema es de 7.100 psi, en las condiciones iniciales del gradiente en el que la proporción de fase acuosa es del 70%. Por lo tanto, el método funciona, como máximo, a la mitad del límite de presión de los sistemas UPLC (15.000 psi) lo que implica que el método también funciona correctamente en columnas más viejas (con un número elevado de inyecciones) que proporcionan una presión más alta.

A)



B)

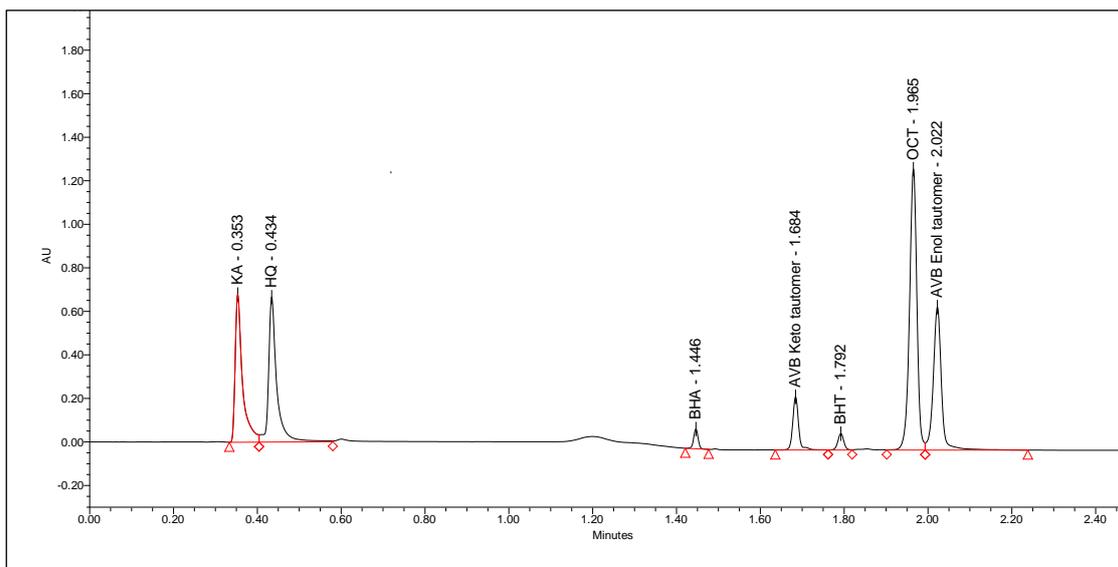


Figura 10.4.2 Cromatograma de la solución patrón de trabajo aplicando

(A) método de HPLC; (B) método de UPLC

10.4.4.6. Validación del método

El método transferido se ha validado respecto a los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, precisión y exactitud [135]. El lote de crema utilizado para la validación del método es el lote A02.

V. Selectividad

La selectividad del método fue demostrada mediante la inyección e identificación de cada uno de los compuestos, comprobando la ausencia de interferencias procedentes del blanco y del placebo.

Se identifican todos los compuestos por tiempo de retención (Tabla 10.4.8) inyectando una solución patrón individual de cada uno de ellos (Figuras 10.4.3 a 10.4.8).

Tabla 10.4.8 Tiempos de retención de todos los compuestos

Compuestos	Tiempo de retención (min)
KA	0,38
HQ	0,47
BHA	1,68
AVB tautómero Ceto	1,95
BHT	2,06
OCT	2,24
AVB tautómero Enol	2,29

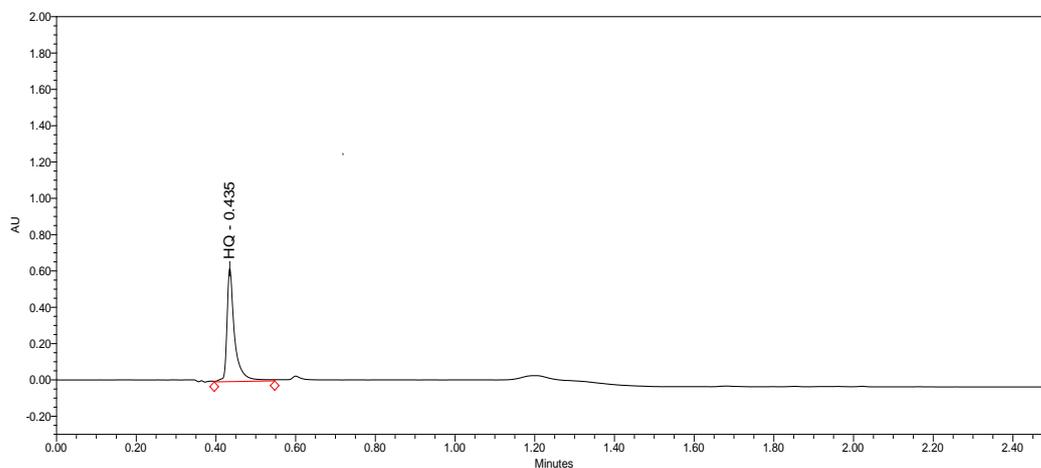


Figura 10.4.3 Cromatograma solución patrón HQ

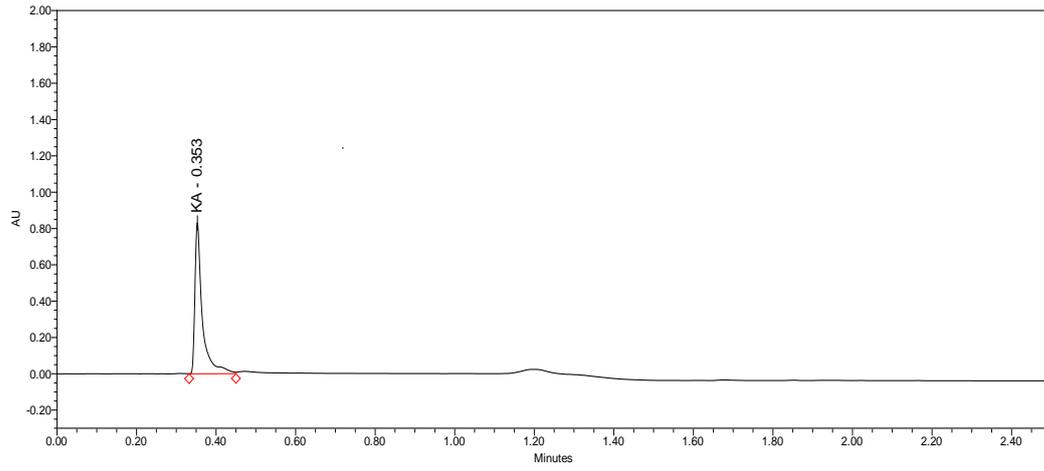


Figura 10.4.4 Cromatograma solución patrón KA

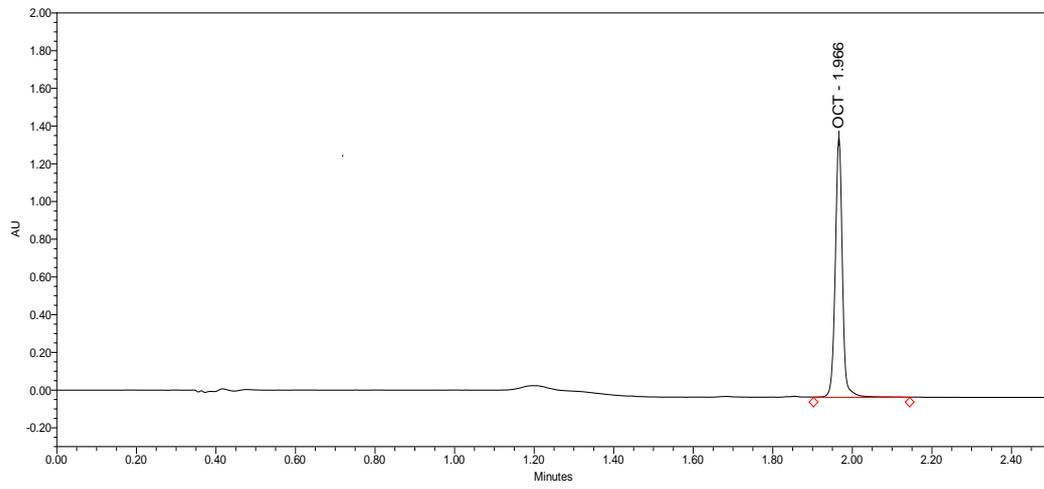


Figura 10.4.5 Cromatograma solución patrón OCT

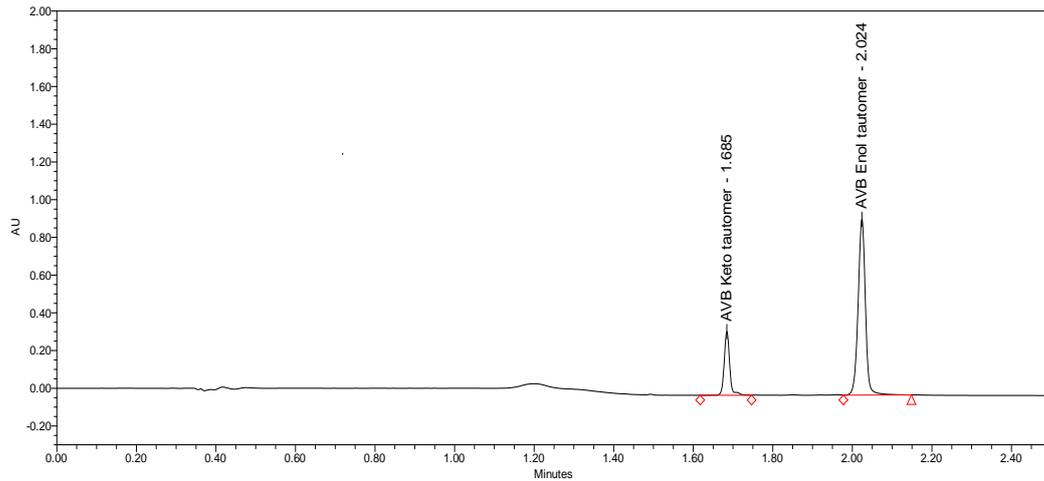


Figura 10.4.6 Cromatograma solución patrón AVB

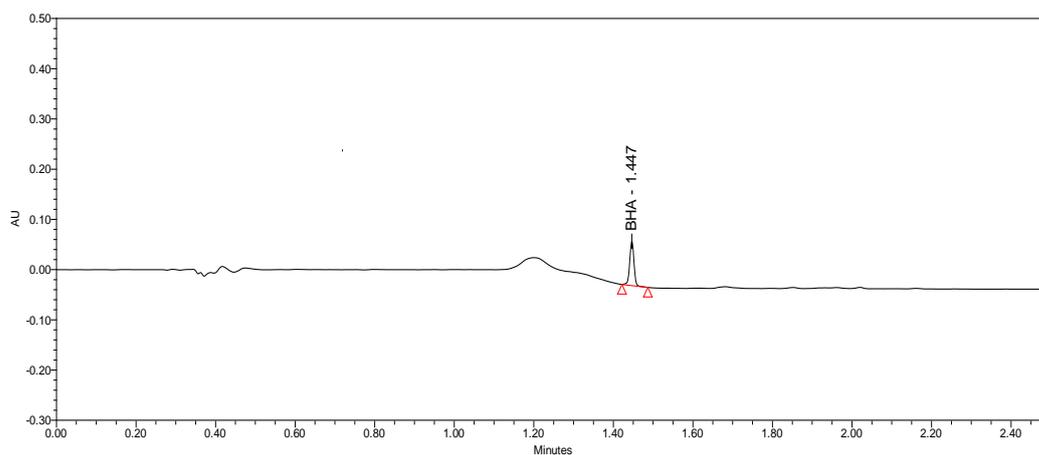


Figura 10.4.7 Cromatograma solución patrón BHA

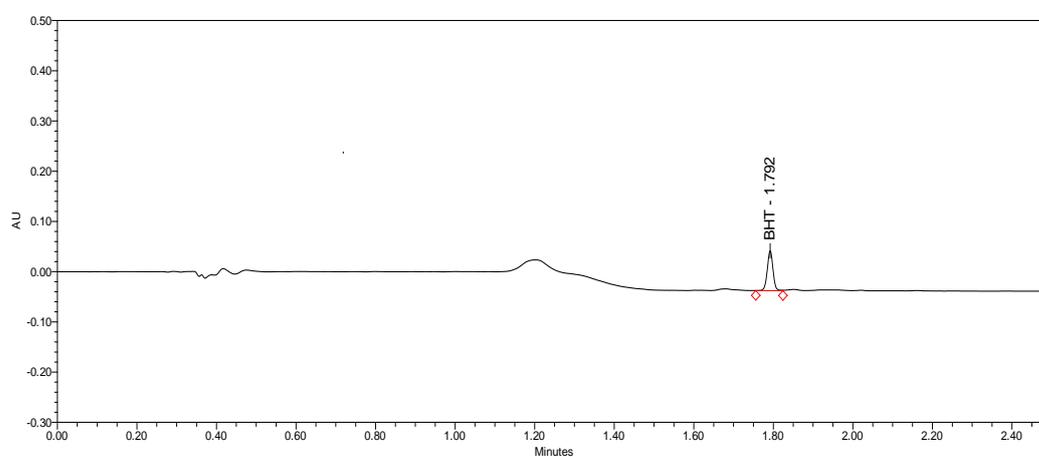


Figura 10.4.8 Cromatograma solución patrón BHT

En las Figuras 10.4.9 a 10.4.11 se demuestra la ausencia de interferencias entre los excipientes y los compuestos en estudio inyectando, por un lado, un blanco y una solución de placebo y por otro, una solución problema de crema lote A02.

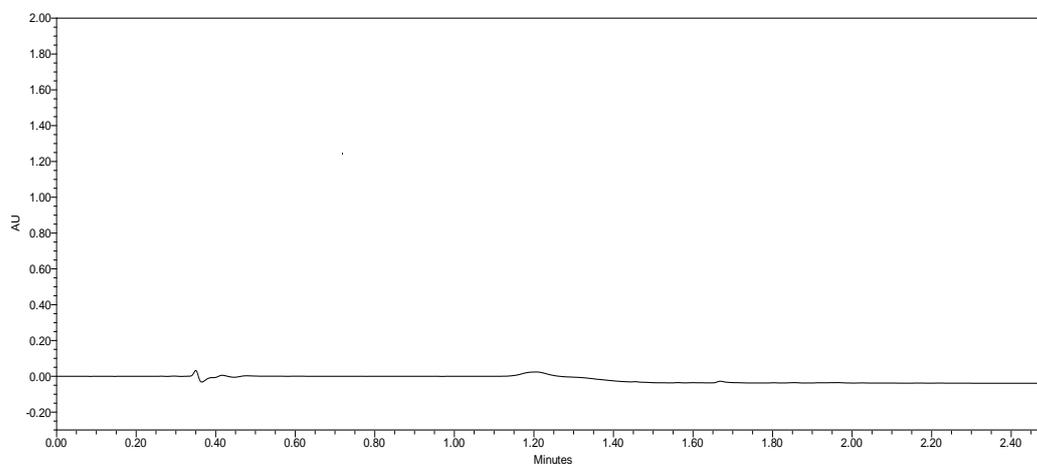


Figura 10.4.9 Cromatograma del blanco (diluyente de muestra)

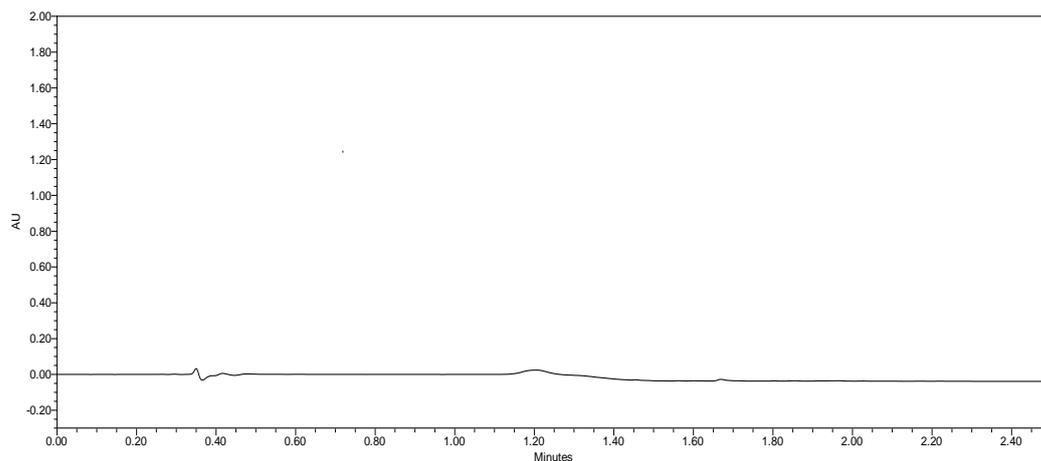


Figura 10.4.10 Cromatograma de la solución placebo

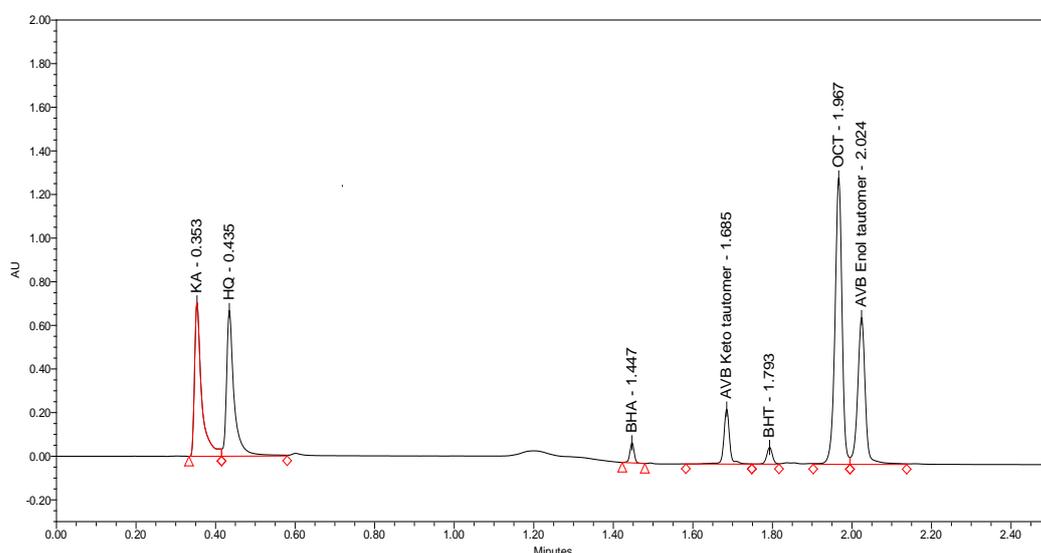


Figura 10.4.11 Cromatograma solución problema lote A02

II. Linealidad

Para demostrar que el método es lineal se prepara una linealidad conjunta para todos los compuestos en estudio en el rango de concentraciones comprendido entre 50 y 120% de la concentración nominal. Se preparan siete soluciones patrón inyectándose por triplicado: 50%, 60%, 80%, 90%, 100%, 110% y 120%.

Las áreas de los picos de cada uno de los compuestos se representan frente a la concentración realizándose una regresión lineal por mínimos cuadrados tal y como se muestra en la Tabla 10.4.9. Las representaciones gráficas de las linealidades de cada uno de los compuestos se muestran en la Figuras 10.4.12 y la Figura 10.4.13 según el contenido de cada compuesto en la formulación, es decir, en función de la concentración nominal. Se demuestra de esta forma que el método es lineal para cada uno de los compuestos en estudio.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.4.9 Resumen de los resultados de las linealidades de cada compuesto

$Area = a \cdot Concentración + b$						
	BHA	BHT	OCT	AVB	HQ	KA
a	7,06E+03	3,72E+03	1,33E+03	3,83E+06	7,20E+06	7,99E+06
b	5,34E+02	-2,46E+02	6,76E+03	-7,47E+01	-1,33E+03	-4,47E+03
r	0,9999	0,9996	0,9996	0,9996	0,9999	0,9997
r ²	0,9998	0,9991	0,9991	0,9991	0,9993	0,9993

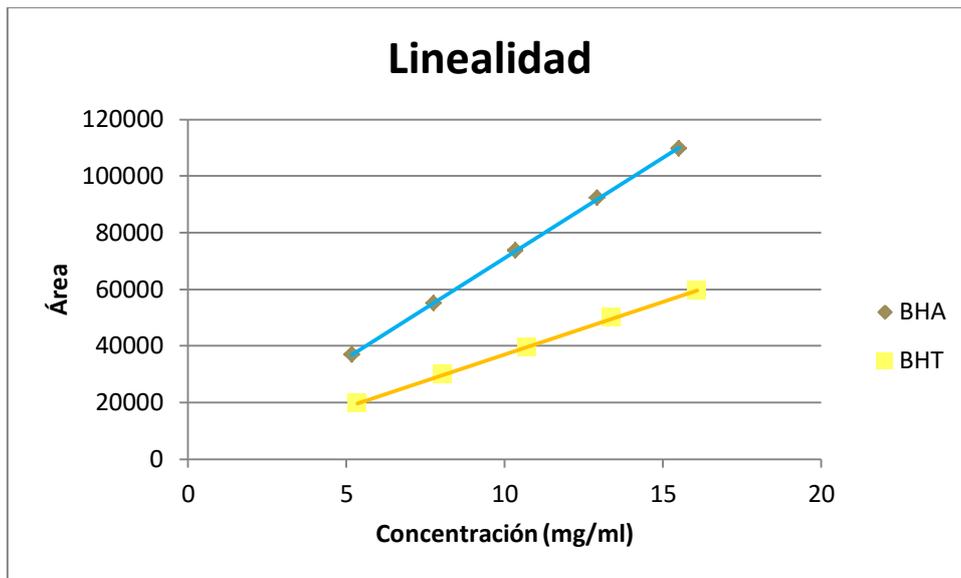


Figura 10.4.12 Representación gráfica de las linealidades de BHA y BHT

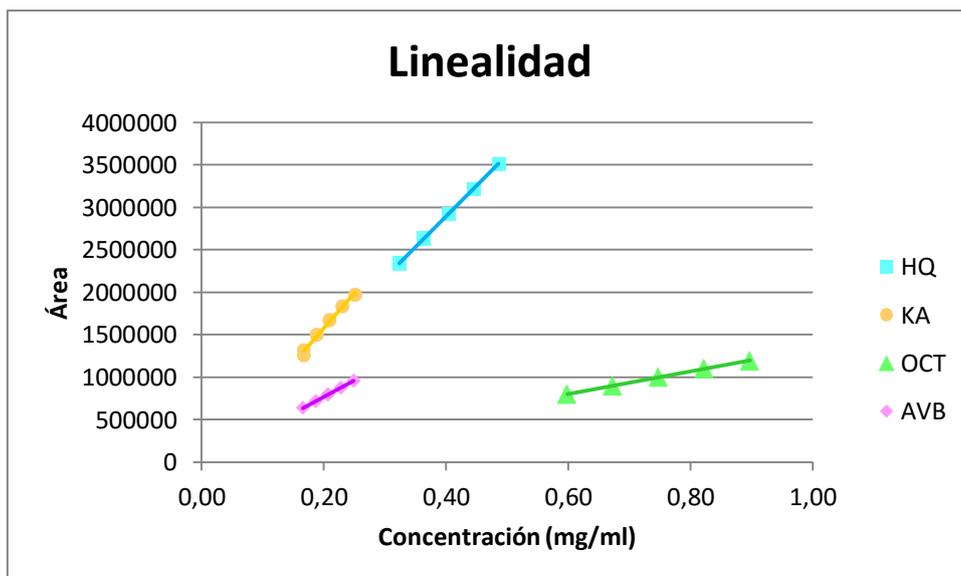


Figura 10.4.13 Representación gráfica de las linealidades de HQ, KA, OCT y AVB

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

En la Tabla 10.4.10 se muestra el resumen de los datos del factor respuesta (FR) y el rango de linealidad para cada uno de los compuestos. Todos los coeficientes de variación (RSD) de los factores respuesta son inferiores al 5,0% demostrando una relación lineal entre concentración y área.

Tabla 10.4.10 Resumen de los datos referentes al factor respuesta y el rango de linealidad para cada compuesto

	BHA	BHT	OCT	AVB	HQ	KA
Media	7,22E+06	7,93E+06	1,34E+06	3,83E+06	7,07E+03	3,70E+03
SD	8,11E+01	2,81E+01	5,26E+03	1,62E04	6,56E+03	1,74E+04
RSD	1,15	0,76	0,39	0,42	0,09	0,22
Rango*	7,5-12,0	7,5-12,0	600-900	160-240	320-480	160-240

*: expresado en µg/ml

Se comprueba que las pendientes son significativamente diferentes de cero mediante la prueba t-Student. Además, se calculan los intervalos de confianza que no deben incluir el cero (ver Tabla 10.4.11).

Por otra parte, se comprueba que las rectas pasan por el origen de coordenadas mediante la prueba t-Student, resultando que las ordenadas en el origen son estadísticamente igual a cero. También se determinan los intervalos de confianza que incluyen el cero (ver Tabla 10.4.12).

Tabla 10.4.11 Significación estadística de la desviación estándar de las pendientes de cada compuesto

Test de la pendiente						
	BHA	BHT	OCT	AVB	HQ	KA
t _a experimental	216,130	112,016	124,814	127,981	596,956	106,020
t tabulada ^a	2,160	2,160	2,160	2,160	2,160	2,160
C. aceptación ^b	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Int. confianza ^c	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

^a: valor de t-Student tabulado para $\rho:0,05$ y $(15-2=13)$ grados de libertad

^b: Criterio de aceptación: $t_{a,exp} > t_{tab}$

^c: Intervalo de confianza: no debe incluir el cero

Tabla 10.4.12 Significación estadística de la ordenada en el origen de cada compuesto

Test de proporcionalidad						
	BHA	BHT	OCT	AVB	HQ	KA
t_a experimental	1,364	-0,596	0,842	-0,012	-0,268	-0,282
t tabulada ^a	2,160	2,160	2,160	2,160	2,160	2,160
C. aceptación ^b	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Int. confianza ^c	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

^a: valor de t-Student tabulado para $\rho:0,05$ y $(15-2=13)$ grados de libertad

^b: Criterio de aceptación: $t_{a,exp} < t_{tab}$

^c: Intervalo de confianza: debe incluir el cero

III. Precisión

a. Instrumental

Se realizan 6 inyecciones consecutivas de la solución patrón de trabajo para estudiar la precisión instrumental. Los coeficientes de variación obtenidos tanto para el estudio del tiempo de retención (t_R) como para las áreas, se encuentran muy por debajo del límite establecido al inicio del estudio del 1,0%, por lo que se puede concluir que el instrumento utilizado es adecuado para el uso propuesto y que da valores repetitivos (Tabla 10.4.13).

Tabla 10.4.13 Resultados de la precisión instrumental para cada compuesto

Inyección	BHA		BHT		OCT	
	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área
1	1,447	73679	1,793	39358	1,967	1004049
2	1,447	73512	1,793	39099	1,967	1001679
3	1,447	73823	1,792	39211	1,968	997579
4	1,447	73489	1,793	39146	1,967	1002069
5	1,448	73556	1,793	39176	1,967	1001891
6	1,447	73428	1,792	39242	1,966	1001008
Media	1,447	73581	1,793	39205	1,967	1001379
SD	4,1E-04	145,208	5,2E-04	89,857	6,3E-04	2122,959
RSD	0,03	0,20	0,03	0,23	0,03	0,21

Tabla 10.4.13 Resultados de la precisión instrumental para cada compuesto (continuación)

Inyección	AVB		HQ		KA	
	t _R (min)	Área	t _R (min)	Área	t _R (min)	Área
1	2,024	798439	0,435	2925744	0,363	1671513
2	2,025	799315	0,435	2926461	0,362	1675483
3	2,024	798111	0,436	2920084	0,363	1664132
4	2,025	799023	0,436	2919983	0,363	1672364
5	2,024	799685	0,436	2912039	0,362	1673776
6	2,025	797561	0,435	2922781	0,363	1675484
Media	2,025	798689	0,436	2921182	0,363	1672125
SD	5,5E-04	795,540	5,5E-04	5243,551	5,2E-04	4233,310
RSD	0,03	0,10	0,13	0,18	0,14	0,25

b. Repetibilidad

Para estudiar la repetibilidad del método se realizan tres análisis completos e independientes entre sí –pesadas diferentes tanto de patrones como de muestras – de forma consecutiva según el procedimiento descrito en el Anexo IV de una misma alícuota homogénea del lote de crema A02. Según el procedimiento, se preparan por duplicado tanto la solución patrón como la solución problema y se sigue la secuencia de inyección descrita en el apartado 10.4.3.1.III.b.

En la Tabla 10.4.14 se presentan los resultados de la repetibilidad para cada uno de los compuestos cumpliendo con el criterio de aceptación establecido: $RSD \leq 2,0\%$.

Tabla 10.4.14 Resultados repetibilidad del método

Análisis	Problema	BHA	BHT	OCT	AVB	HQ	KA
A1	P1	98,59	98,64	97,79	98,56	100,10	101,00
	P2	99,47	99,37	101,06	99,75	98,36	98,98
A2	P3	100,71	98,53	99,86	100,13	98,49	98,03
	P4	99,41	100,77	98,25	96,88	99,42	99,29
A3	P5	101,10	99,67	101,62	97,40	99,71	98,08
	P6	100,68	101,24	99,71	98,54	101,38	99,93
Media		99,99	99,70	99,71	98,89	98,54	99,22
DS		0,98	1,11	1,50	1,28	1,27	1,14
RSD		0,98	1,11	1,51	1,29	1,29	1,15
Criterio de aceptación				RSD \leq 2,0%			

c. Precisión intermedia

Se realizan tres análisis completos e independientes entre sí, de la misma forma que en la repetibilidad, bajo distintas condiciones operacionales: un día distinto, analista distinto, UPLC distintos y diferente lote de columna cromatográfica.

Las dos columnas utilizadas son iguales pero de distinto número de lote:

- Zorbax RRHT SB-Phenyl 1,8 µm, 80 Å, 2,1 x 100 mm, nº lote USDRZ01021, código 205
- Zorbax RRHT SB-Phenyl 1,8 µm, 80 Å, 2,1 x 100 mm, nº lote USDRZ01023, código 207

Los resultados cumplen con los criterios de aceptación preestablecidos tal y como se muestra en la Tabla 10.4.15.

Tabla 10.4.15 Resultados de la precisión intermedia para cada uno de los compuestos

UPLC	Analista	Día	Columna	Análisis	Problema	BHA	BHT	OCT	
SCT01	A	1	205	A1	P1	98,59	98,64	97,79	
					P2	99,47	99,37	101,06	
				A2	P3	100,71	98,53	99,86	
					P4	99,41	100,77	98,25	
				A3	P5	101,10	99,67	101,62	
					P6	100,68	101,24	99,71	

SCT02	B	2	207	A4	P7	97,28	103,56	101,23	
					P8	99,00	102,63	101,46	
				A5	P9	97,57	101,56	99,01	
					P10	100,53	102,63	101,65	
				A6	P11	102,51	101,84	103,46	
					P12	98,42	96,78	98,00	
						Media	99,61	100,60	100,26
						SD	1,547	2,023	1,766
						RSD	1,55	2,01	1,76
Criterio de aceptación: $RSD \leq 2 \cdot RSD_{REPETIBILIDAD}$							1,96	2,22	3,02

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.4.15 Resultados de la precisión intermedia para cada uno de los compuestos (continuación)

UPLC	Analista	Día	Columna	Análisis	Problema	AVB	HQ	KA	
SCT01	A	1	205	A1	P1	98,56	100,10	101,00	
					P2	99,75	98,36	98,98	
				A2	P3	100,13	98,49	98,03	
					P4	96,88	99,42	99,29	
				A3	P5	97,40	99,71	98,08	
					P6	98,54	101,38	99,93	
SCT02	B	2	207	A4	P7	97,24	101,37	102,06	
					P8	98,59	100,76	102,78	
				A5	P9	99,47	100,97	101,98	
					P10	101,52	99,58	101,75	
				A6	P11	100,82	97,66	99,47	
					P12	97,12	96,98	97,26	
						Media	98,84	99,57	100,05
						SD	1,528	1,453	1,830
						RSD	1,55	1,46	1,83
Criterio de aceptación: $RSD \leq 2 \cdot RSD_{\text{REPETIBILIDAD}}$							2,58	2,24	2,29

IV. Exactitud

Las soluciones para evaluar la exactitud del método se preparan por triplicado, a 500 mg de placebo se añade una cantidad conocida de cada uno de los compuestos en estudio equivalente al 50%, 100% y 150% de la concentración nominal. Cada una de las soluciones se inyecta por duplicado siguiendo la secuencia descrita en el apartado 10.4.3.1.IV. Se cuantifica el contenido de cada compuesto utilizando la media del factor respuesta de las dos soluciones patrón 100%.

Las recuperaciones de todos los compuestos están incluidas en el intervalo de $100 \pm 3\%$, tanto para la recuperación en cada nivel como para la recuperación global (calculada para las nueve determinaciones) como se muestra en la Tabla 10.4.16. La independencia del factor concentración con respecto a la varianza de los resultados se comprueba mediante la aplicación del test de Cochran. Y además, se demuestra mediante la prueba t-Student que no hay diferencia significativa entre los resultados de recuperación obtenidos y el teórico 100% (Tabla 10.4.17).

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.4.16 Resultados de la recuperación para cada uno de los compuestos en estudio

Compuestos	Nivel: 50%		Nivel I: 100%		Nivel: 150%		Global	
	Rec *	RSD	Rec *	RSD	Rec *	RSD	Rec *	RSD
BHA	100,16	0,75	100,52	0,97	100,41	0,54	100,36	0,69
BHT	99,17	1,34	99,29	0,77	99,70	1,12	99,39	0,99
OCT	99,38	1,14	100,31	0,88	100,04	0,55	99,91	0,88
AVB	99,91	1,01	99,49	1,38	99,55	1,32	99,65	1,10
HQ	99,50	0,41	99,94	1,02	99,75	0,82	99,73	0,71
KA	98,60	0,46	99,90	0,55	100,31	0,63	99,60	0,91

*Rec: Recuperación (%)

Tabla 10.4.17 Análisis estadístico de la exactitud

Compuestos	Test de Cochran ^{a,b}		Test de Student ^{a,b}	
	G _{EXP}	G _{TAB}	t _{EXP}	t _{TAB}
BHA	0,527		1,577	
BHT	0,490		1,869	
OCT	0,544	0.871	0,303	2,306
AVB	0,407		0,957	
HQ	0,555		1,131	
KA	0,440		1,312	
Criterios de aceptación	G _{EXP} < G _{TAB}		t _{EXP} < t _{TAB}	

^a ρ=0,05

^b degree of freedom=8

10.4.4.7. Comparación de los métodos: HPLC versus UPLC

Se realiza el estudio de equivalencia entre los métodos de HPLC y UPLC realizando un análisis de tres muestras e inyectándolo paralelamente en los dos métodos. El lote analizado es el A02, lote procedente de la validación del proceso de fabricación.

El contenido de cada uno de los compuestos se cuantifica frente a la respuesta de los patrones preparados en el mismo análisis. Se lleva a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos en las tres soluciones.

Se comprueba que las varianzas de los dos métodos son iguales para todos los compuestos aplicando la prueba F de Snedecor-Fischer. Así, para comparar las medias obtenidas con los dos métodos se aplica una prueba t-Student que, como para todos los compuestos t calculado es menor que t crítico, establece que la hipótesis nula es cierta. Es decir, que las medias obtenidas por ambos métodos no difieren

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

significativamente y por tanto, la equivalencia entre el método de HPLC y el de UPLC queda demostrada (Tabla 10.4.18).

Tabla 10.4.18 Estudio estadístico de la equivalencia de los métodos

	HQ		KA		OCT	
	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
Media	98,89	99,61	98,80	99,43	98,74	99,01
Varianza	0,328	0,143	0,757	0,202	1,204	0,093
Observaciones	3	3	3	3	3	3
Varianza agrupada	0,236		0,479		0,648	
Dif. hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	4		4		4	
Estadístico t	-1,8168		-1,1144		-0,4147	
P(T<=t) una cola	0,0717		0,1638		0,3498	
Valor crítico de t (una cola)	2,1318		2,1318		2,1318	
P(T<=t) dos colas	0,1434		0,3275		0,6997	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7764		2,7764		2,7764	

Tabla 10.4.18 Estudio estadístico de la equivalencia de los métodos (continuación)

	AVB		BHA		BHT	
	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
Media	99,29	100,45	101,19	101,57	101,52	101,90
Varianza	1,551	0,515	0,617	0,291	0,665	0,040
Observaciones	3	3	3	3	3	3
Varianza agrupada	1,033		0,454		0,353	
Dif. hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	4		4		4	
Estadístico t	-1,3979		-0,6845		-0,7906	
P(T<=t) una cola	0,1173		0,2656		0,2367	
Valor crítico de t (una cola)	2,1318		2,1318		2,1318	
P(T<=t) dos colas	0,2347		0,5312		0,4734	
Valor crítico de t (dos colas)	2,7764		2,7764		2,7764	

Comparando los dos métodos, el método de UPLC aporta más de un 82% de ahorro en tiempo de cromatograma y un 88% de ahorro en el consumo de disolvente. Por tanto, puede ser considerado como un método respetuoso con el medio ambiente (*green HPLC method*).

Además, la preparación de la muestra se optimizó mediante la reducción de la duración en proceso de extracción (de 35 minutos en el método de HPLC a 15 minutos en el método UPLC).

10.4.5. CONCLUSIONES

- Se ha transferido y optimizado el método de HPLC para la determinación de HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT a UPLC en 3 minutos de tiempo de análisis.
- En comparación con el método de HPLC, el método de UPLC consigue una separación equivalente de los compuestos en mucho menos tiempo y consecuentemente el consumo de disolventes es mucho menor.
- En las condiciones optimizadas de UPLC, el tiempo de ejecución se ha reducido 5 veces.
- El consumo de disolventes se ha reducido aproximadamente 10 veces, lo que lo convierte en un método respetuoso del medio ambiente por su bajo consumo de disolventes.
- Incluso teniendo en cuenta que los sistemas UPLC y sus consumibles (columnas y piezas de repuesto) son más caros, la aplicación del método de UPLC es más barato que el método de HPLC debido a que se pueden realizar un mayor número de análisis por unidad de tiempo con un menor consumo de disolventes.
- La preparación de la muestra también se ha simplificado reduciendo el tiempo total en más de 2 veces.
- El método ha sido validado por completo mostrando datos satisfactorios para la selectividad, linealidad, precisión y exactitud.
- El método ha sido aplicado satisfactoriamente en los análisis involucrados en la validación del proceso durante la etapa de industrialización, en que el número requerido de muestras es especialmente alto, permitiendo al laboratorio mejoras sinérgicas que proporcionan beneficios en la reducción de costes.

10.5. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA, BHT y SUSTANCIAS RELACIONADAS POR HPLC

10.5.1. INTRODUCCIÓN

Debido a la gran diferencia de polaridad de los diferentes compuestos, en la etapa de desarrollo de la formulación se desarrollaron dos métodos cromatográficos: uno para la determinación de DPK por GPC y otro para la determinación del resto de compuestos por RP-HPLC. Posteriormente, este último método fue optimizado y transferido a UPLC para dar soporte a la fase de industrialización.

La fase de industrialización concluyó, con éxito, en la fabricación de tres lotes de crema de tamaño industrial. Con estos tres lotes (A01, A02 y A03) se planifica y ejecuta el estudio de estabilidad que avala la caducidad de la crema (capítulo 9).

Tal y como se ha explicado anteriormente en el capítulo 10.1, cualquier método analítico a utilizar durante la investigación de la estabilidad de un producto, sea el que sea, debe ser un método *stability-indicating* [136].

Se debe tener en cuenta que el método desarrollado para la determinación de DPK por GPC no es ni puede llegar a ser *stability-indicating* porque no tiene la capacidad de separar los posibles productos de degradación de una forma adecuada ya que la separación se da por tamaño de molécula. En el estudio de la selectividad del método se comprobó que el método era capaz de separar correctamente el DPK del resto de componentes. Del resto de componentes se observaba una separación parcial entre los picos correspondientes a OCT y AVB y una separación del resto de componentes (HQ, KA, BHA, BHT y el resto de excipientes contenidos en la formulación) que eluían todos bajo un mismo pico cromatográfico.

El resto de métodos desarrollados a lo largo de las diferentes fases del desarrollo del medicamento, el único capacitado para el análisis de la estabilidad de la crema es el método RP-HPLC de 14 minutos de tiempo de análisis.

El estudio de degradaciones forzadas no se llevó a cabo en el método transferido a UPLC. Por tanto, no puede ser utilizado para analizar las muestras procedentes del estudio de estabilidad.

El método desarrollado para llevar a cabo el estudio de compatibilidad con excipientes durante la fase de preformulación es *stability-indicating* para la HQ principio activo.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Por tanto, para utilizarlo para evaluar la estabilidad de la crema se debería ejecutar el estudio de degradaciones forzadas en la crema. El tiempo de análisis de este método es de 50 minutos. Considerando este hecho y el gran número de muestras involucradas en el estudio de estabilidad, el método es descartado para llevar a cabo el estudio de estabilidad del producto terminado.

Por último, el método de RP-HPLC de 14 minutos de tiempo de análisis desarrollado durante la fase de desarrollo de la formulación podría ser utilizado para estudiar la estabilidad de la crema. Sin embargo, por un lado, esto supone una duplicidad en los análisis (dos sistemas cromatográficos, dos preparaciones de muestra, dos cálculos, etc.) y por otro lado, no se conoce si los productos de degradación del DPK eluyen en dicho método.

Considerando todos los hechos expuestos, se propone desarrollar un método que separe todos los compuestos en estudio de la crema (HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA y BHT) y los posibles productos de degradación generados en el estudio de estabilidad del producto terminado.

10.5.2. MATERIALES

10.5.2.1. *Patrones*

HQ (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

KA (analytical standard $\geq 99.0\%$). Fluka (Buchs, Switzerland)

DPK (KAD-15, Min. 95%). Sino Lion (Massó, Barcelona, España)

OCT (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

AVB (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

BHA (Pharmaceutical secondary standard – traceable to Ph.Eur. and USP). Fluka (Buchs, Switzerland)

BHT (USP reference standard). Fluka (Buchs, Switzerland)

10.5.2.2. *Reactivos y soluciones*

Reactivos:

Acetonitrilo (para UV, IR, HPLC, ACS). Panreac (Barcelona, España) (ACN)

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Metanol (para UV, IR, HPLC, GPC). Panreac (Barcelona, España)	(MeOH)
Tetrahidrofurano (para UV, IR, HPLC, GPC). Panreac (Barcelona, España)	(THF)
Dihidrógeno fosfato de potasio (RFE, USP, BP, Ph.Eur) PRS Codex. Panreac (Barcelona, España)	(PO ₄ ⁻³)
Ácido orto-fosfórico 85% (USP-NF, BP, Ph. Eur.) puro, grado farma. Panreac (Barcelona, España)	(H ₃ PO ₄)
Ácido acético glacial (para HPLC). Panreac (Barcelona, España)	(HAcO)
Ácido clorhídrico 37% (RFE, BP, Ph.Eur.) PRS-CODEX. Panreac (Barcelona, España)	
Sodio Hidróxido 0,1 mol/l (0,1N) SV (solución valorada). Panreac (Barcelona, España)	
Hidrógeno Peróxido 33% p/v (110 vol.) estabilizado (USP, BP, Ph. Eur.) puro, grado farma. Panreac (Barcelona, España)	

Soluciones preparadas en el laboratorio:

- Hidróxido sódico 0,01 N: Transferir 10 ml de la solución hidróxido sódico 0,1 N SV a un matraz aforado de 100 ml. Enrasar con agua purificada y homogeneizar.
- Ácido clorhídrico 1 N: En un matraz aforado de 1 l, que contenga unos 700 ml de agua purificada, transferir 83 ml de ácido clorhídrico 37% (RFE, BP, Ph.Eur.). Enrasar a 1 l con agua purificada.
- Ácido clorhídrico 0,1 N: Transferir 10 ml de la solución de ácido clorhídrico 1 N a un matraz aforado de 100 ml. Enrasar con agua purificada y homogeneizar.
- Agua oxigenada al 3%: Transferir 50 ml de hidrógeno peróxido 33% (USP, BP, Ph.Eur.) a un matraz aforado de 500 ml. Enrasar con agua purificada y homogeneizar.

10.5.2.3. Aparatos y utillaje

Aparatos:

Balanza analítica BP211D Sartorius (Gotinga, Alemania)

pHmetro 507 Crison (Barcelona, España)

Baño de ultrasonidos Ultrasons 9 L Selecta (Barcelona, España)

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

HPLC 1200 Agilent que consiste en un horno de columna, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de red de diodos (DAD), controlado por el software Chemstation versión B04.02 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA); códigos internos: CQ51, CQ33

Utillaje:

Espátulas de acero inoxidable de diferentes dimensiones

Vasos de precipitados de distintos volúmenes (25 ml, 100 ml, 1 l)

Probetas de distintos volúmenes (10 ml, 100 ml, 1 l) Clase A graduada

Desecador de vidrio Simax con grifo en la tapa esmerilada

Pesasustancias

Matraces aforados de 10, 25, 50 y 100 ml Clase A

Tubos centrífuga de 10 ml

Pipeta doble aforo 1, 2, 5 y 10 ml Clase A

Botella 1 l Pyrex con tapón

Filtros de membrana 0,45 μm Durapore PVDF Millipore

Viales 2 ml HPLC

Pipetas Pasteur

Cronómetro Oregon Scientific

Zorbax SB-Phenyl 5 μm , 80 Å, 4,6 x 250 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Zorbax Eclipse Plus Hexyl-Phenyl 5 μm , 80 Å, 4,6 x 150 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Pursuit RXs Diphenyl 5 μm , 80 Å, 4,6 x 150 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

10.5.3. METODOLOGIA

10.5.3.1. Validación del método

El método de HPLC es validado según la guía ICH Q2 [129] evaluándolo con respecto a la selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez y estabilidad de la solución.

I. Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analitos, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra [129].

Para demostrar la selectividad del método se evalúa la identificación de cada uno de los compuestos frente a los patrones de trabajo, se comprueba la ausencia de interferencias con la solución placebo.

Se realiza un estudio de degradaciones forzadas para ver los posibles productos de degradación que se pueden generar debido a la degradación de la crema en diferentes medios y condiciones. Se comprueba que la separación de los productos de degradación formados es correcta estudiando la pureza de cada uno de los picos correspondientes a HQ, KA y DPK.

a. Hidrólisis en medio ácido

Pesar exactamente alrededor de 1,0 g de crema en un matraz aforado de 50 ml y añadir 20 ml de THF. Sonicar durante 5 minutos. Añadir 5 ml de HCl 0,1 N. Tapar el matraz con papel de aluminio. Dejar reaccionar con agitación constante durante 2 horas a 40 °C. Enrasar con THF a 50 ml y homogeneizar la solución.

b. Hidrólisis en medio básico

Pesar exactamente alrededor de 1,0 g de crema en un matraz aforado de 50 ml y añadir 20 ml de THF. Sonicar durante 5 minutos. Añadir 5 ml de NaOH 0,01 M. Tapar el matraz con papel de aluminio. Dejar reaccionar con agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Neutralizar con HCl diluidos hasta pH ~ 5. Enrasar con THF a 50 ml y homogeneizar la solución.

c. Oxidación

Pesar exactamente alrededor de 1,0 g de crema en un matraz aforado de 50 ml y añadir 20 ml de THF. Sonicar durante 5 minutos. Añadir 5 ml de H₂O₂ al 3%. Tapar el matraz con papel de aluminio. Dejar reaccionar con agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enrasar con THF a 50 ml y homogeneizar la solución.

d. Temperatura

Se introduce en un pesasustancias una porción de crema y se mantiene en las siguientes condiciones: estufa a 105 °C durante 48 horas. Una vez atemperada la muestra, pesar exactamente alrededor de 1,0 g en un matraz aforado de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos. Enrasar a 50 ml con THF y homogeneizar la solución.

II. Linealidad

Para establecer la linealidad de cada compuesto, se preparan una serie de soluciones conjuntas entre el 20 y el 150%, de la concentración nominal de cada compuesto, por dilución a partir de un único patrón conjunto de trabajo al 200%: 20%, 30%, 50%, 75%, 100%, 120% y 150%. Cada una de las soluciones se inyecta en el sistema cromatográfico por triplicado.

Solución madre HQ: Pesar exactamente alrededor de 160 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 10 ml. Introducir unos 5 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 10 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución madre KA: Pesar exactamente alrededor de 80 mg de KA patrón de trabajo en un matraz de 10 ml. Introducir unos 5 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 10 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución madre DPK: Pesar exactamente alrededor de 80 mg de DPK patrón de trabajo en un matraz de 10 ml. Introducir unos 5 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 10 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución madre BHA: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHA patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de THF y sonicar durante 5

minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución madre BHT: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHT patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución madre OCT: Pesar exactamente alrededor de 300 mg de OCT patrón de trabajo en un matraz de 10 ml. Introducir unos 5 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 10 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución madre AVB: Pesar exactamente alrededor de 100 mg de AVB patrón de trabajo en un matraz de 10 ml. Introducir unos 5 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 10 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución conjunta al 200%: Diluir 5 ml de cada una de las soluciones madres preparadas anteriormente en un matraz de 50 ml. Enrasar con THF. Homogeneizar la solución.

El resto de soluciones se preparan siguiendo la cascada de diluciones que se presenta en la Figura 10.5.1.

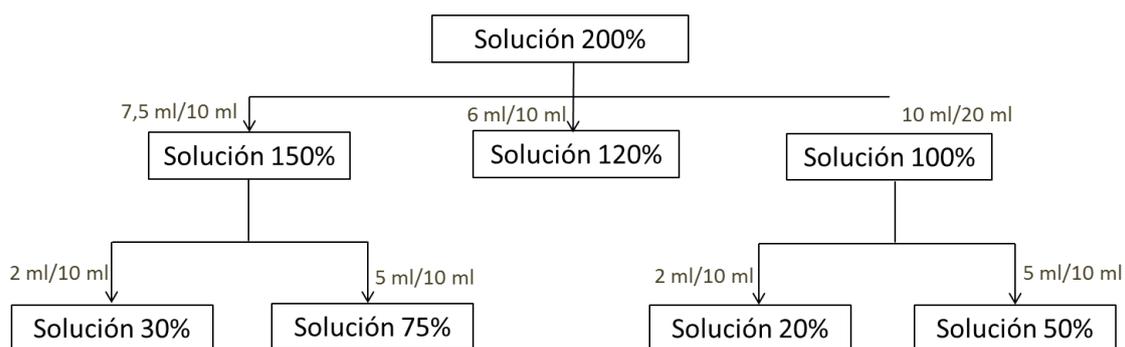


Figura 10.5.1 Esquema de diluciones para linealidad

Para cada compuesto, representar la respuesta *versus* concentración y calcular el coeficiente de correlación, la pendiente de la recta, la ordenada en el origen y el factor respuesta (respuesta/concentración).

El criterio de aceptación es:

- $R^2 > 0,9990$
- La pendiente debe ser positiva
- La recta debe pasar por el origen

III. Precisión

a. Instrumental

Para determinar la precisión instrumental se realizan 6 inyecciones consecutivas de una misma solución patrón al 100%.

Solución madre HQ: Pesar exactamente alrededor de 200 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución madre KA: Pesar exactamente alrededor de 100 mg de KA patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución madre DPK: Pesar exactamente alrededor de 100 mg de DPK patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución madre BHA: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHA patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución madre BHT: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHT patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución madre OCT: Pesar exactamente alrededor de 375 mg de OCT patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de THF y sonicar durante 5

minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución madre AVB: Pesar exactamente alrededor de 100 mg de AVB patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Solución patrón al 100%: Diluir 1 ml de cada una de las soluciones madres preparadas anteriormente en un matraz de 10 ml. Enrasar con THF. Homogeneizar la solución.

Para cada compuesto, calcular el coeficiente de variación de las áreas obtenidas. El criterio de aceptación es: $RSD \leq 1,5\%$

b. Repetibilidad

Se estudia la repetibilidad del método mediante la realización de tres análisis independientes de un mismo lote de crema. Cada uno de los análisis, se preparan dos soluciones patrón y dos soluciones problemas.

Solución patrón 100%: preparar una solución patrón tal y como se indica en el Anexo V.

Solución problema: Pesar exactamente alrededor de 1,0 g de crema en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Posteriormente, enrasar a 50 ml con THF y homogeneizar.

La secuencia de inyección será:

- Inyectar 2 blancos
- Inyectar cada solución patrón por triplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Para cada compuesto, calcular el contenido frente al patrón. El criterio de aceptación es: $RSD \leq 2,0\%$.

c. Precisión intermedia

Se estudia la precisión intermedia mediante la realización de tres análisis independientes, de la misma forma que en la repetibilidad, en condiciones distintas: en un día distinto, realizado por un analista diferente, utilizando un HPLC y columna cromatográfica distintos.

Para cada compuesto, calcular el coeficiente de variación entre los resultados obtenidos para la repetibilidad y los resultados obtenidos en este segundo análisis. El criterio de aceptación es: $CV \leq 2 \cdot CV_{\text{REPETIBILIDAD}}$

IV. Exactitud

Se determina la exactitud mediante el método del placebo cargado. Para ello, se prepararan por triplicado soluciones de placebo a las que se añaden cantidades conocidas de cada uno de los compuestos a tres niveles de concentración (50, 100 y 150%). Cada solución se inyecta por triplicado.

Solución patrón 100%: preparar una solución patrón tal y como se indica en el Anexo V.

Solución problema: Pesar exactamente las cantidades indicadas en la Tabla 10.5.1 de placebo en matraces aforados de 50 ml. Añadir el volumen indicado en la Tabla 10.5.1 de solución patrón al 200%, preparado tal y como se indica en el apartado 10.5.3.1.// y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Posteriormente, enrasar a 50 ml con THF y homogeneizar.

Tabla 10.5.1 Volúmenes de patrón de trabajo y cantidades de placebo para la realización de la exactitud

Número de soluciones	Nivel (%)	Peso de placebo (g)	Volumen de patrón 200% (ml)
3	50	1,0	12,5
3	100	1,0	25,0
3	150	1,0	37,5

La secuencia de inyección será:

- Inyectar 2 blancos
- Inyectar cada solución patrón por triplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado

- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Para cada compuesto, calcular su contenido frente al patrón. El criterio de aceptación para producto terminado es: la recuperación debe estar comprendida entre 97,0 – 103,0%.

V. Robustez

Para determinar la robustez del método, las condiciones experimentales del método cromatográfico son cambiadas deliberadamente. En este caso, se estudia la idoneidad de la columna testando diferentes lotes de la misma columna: Pursuit XRs 3 Diphenyl 5 μm . 200 Å, 4,6 x 150 mm:

- Lote 468800, código interno 270
- Lote 468802, código interno 272

Para llevar a cabo el estudio de la robustez del método se prepara un análisis que incluye dos soluciones patrón 100% y tres soluciones problema, preparadas tal y como se indica en el Anexo V.

La secuencia de inyección para cada modificación es:

- Inyectar 2 blancos
- Inyectar cada solución patrón por triplicado
- Inyectar cada solución problema por duplicado
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Calcular la concentración de cada uno de los compuestos frente al patrón y comparar los resultados obtenidos mediante un test estadístico adecuado para demostrar si existen o no diferencias estadísticamente significativas.

VI. Estabilidad de la solución

Se prepara una solución patrón y una solución problema, preparada tal y como se indica en el Anexo V. Se llenan viales de HPLC con estas soluciones y se guarda en el carro del inyector a 20 °C. Inyectar las soluciones en los intervalos de tiempo 0, 12, 24, y 48 horas después de su preparación. Para cada compuesto, calcular el RSD de las áreas del pico de las diferentes inyecciones así como la variación relativa entre la

primera y la última inyección. El criterio de aceptación es: la variación relativa entre la primera y la última inyección no debe ser superior a 2,0%.

10.5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.5.4.1. Desarrollo del método

El objetivo principal del método es separar los siete compuestos en estudio que tienen propiedades químicas muy distintas como consecuencia de su estructura molecular, tal y como se ha visto durante todo el presente trabajo, así como las posibles sustancias relacionadas generadas durante el estudio de estabilidad.

La propiedad diferencial más importante en la separación de compuestos por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) es la polaridad de dichos compuestos. Como se puede observar en la Tabla 10.5.2, los compuestos en estudio se pueden clasificar según polaridad como: HQ y KA muy polares (valores de log P cercanos a cero o negativos), BHA ligeramente polar (valor log P no mayor a 4), BHT, OCT y AVB ligeramente apolares (valores de log P cercanos a 5) y por último, DPK totalmente apolar (con un valor de log P de 14). Por tanto, el principal desafío es separar adecuadamente este conjunto de compuestos de polaridad tan diferente [144].

Tabla 10.5.2 Propiedades de los compuestos en estudio

Compuestos	Pm (g/mol)	pKa	Log P
HQ	110,11	10,33	0,62
KA	142,11	9,40	-0,66
DPK	618,93	-	14,00
BHA	180,24	10,01	3,06
BHT	220,35	12,76	5,17
OCT	290,40	-	5,66
AVB	310,39	9,74	4,91

La separación de moléculas por RP-HPLC proviene de la diferencia de afinidades relativas de los compuestos para la fase estacionaria en relación con la fase móvil. Por un lado, las fases estacionarias están diseñadas para dar la retención ya sea de compuestos polares o de compuestos apolares. Mientras que por otro lado, la fase móvil define el orden de elución del grupo de los compuestos [217].

Las fases estacionarias se pueden dividir según su capacidad para separar un tipo de compuestos u otros. Así, por un lado hay las fases típicas de RP-HPLC (C8, C18) que retienen fuertemente los compuestos apolares mientras que prácticamente no retienen los compuestos polares que eluyen cerca del volumen muerto sino junto a él. Por otro lado, las columnas diseñadas para la cromatografía de interacción hidrofóbica (HILIC) y la cromatografía de fase normal (NP) que retienen fuertemente los compuestos polares mientras que los compuestos apolares son esencialmente no retenidos [218].

La presencia del DPK, su extrema polaridad y su solubilidad, comporta una serie de condiciones a tener en cuenta:

- El diluyente de muestra debe ser THF ya que es el único disolvente capaz de solubilizar tanto el DPK como el resto de componentes de la crema (capítulo 10.2).
- El desarrollo de un método HILIC se descarta ya que su principal ventaja como técnica de separación es la fuerte retención de compuestos polares hidrofílicos que no son retenidos en condiciones normales de fase inversa (RP-HPLC), sin la necesidad de aditivos de par iónico en la fase móvil. En el presente caso, los métodos desarrollados a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo de la crema han conseguido una retención suficiente de los compuestos más polares (KA y HQ) [219].
- El desarrollo de un método en fase normal también se descarta por la misma razón, es decir, los compuestos apolares no son retenidos.

Por tanto, se considera que la mejor opción es desarrollar de un método RP-HPLC en el que las condiciones de elución varíen de un extremo a otro para intentar eluir todos los compuestos.

Tal y como se ha dicho anteriormente, con el fin de lograr una elución adecuada de esta amplia gama de compuestos, dos parámetros son críticos: la fase móvil y la columna, ya que es un proceso de adsorción dinámica. Para estudiar estos dos parámetros en profundidad y evaluar la idoneidad de cada una de las opciones de forma correcta, inicialmente se utiliza un gradiente de elución genérico (t (min) /% B: 0/0, 0/10, 45/100, 50 /100, 55/0, y 60/0). A medida que avanza el desarrollo va adaptándose para disminuir el tiempo de análisis y optimizar la resolución entre picos.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

El gradiente de elución óptimo es el siguiente: t (min) /% B: 0/10, 0/10, 30/100, 35 / 100, 40/0, y 45/0) a un flujo de 1,0 ml/min.

El principal problema a lo largo del desarrollo es la respuesta de los compuestos en estudio disueltos en THF. Inicialmente, se inyectan 25 μ l de la solución patrón observándose unos picos muy anchos, algunos con mala simetría y otros no resueltos (Figura 10.5.2).

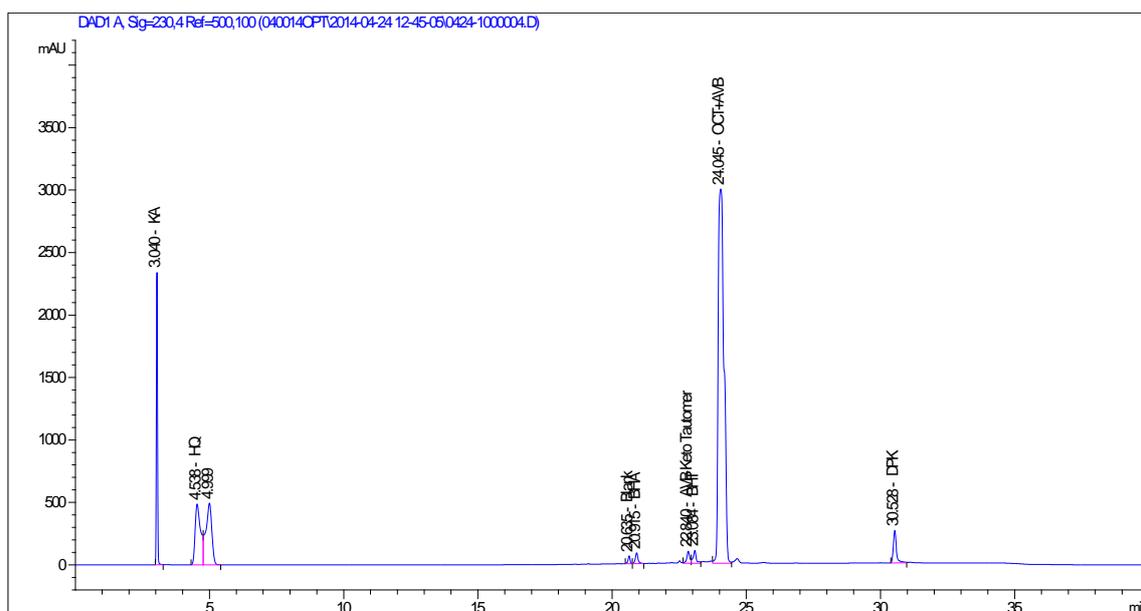


Figura 10.5.2 Cromatograma de la solución patrón obtenido con el método en desarrollo con la columna Zorbax Eclipse Plus Hexyl-Phenyl 5 μ m 150 x 4.6 mm a 230 nm

El problema radica en la inyección: las moléculas de la solución están disueltas en un disolvente que es mucho más fuerte que la fase móvil (100% fase móvil acuosa), lo que significa que las moléculas van a viajar más rápidamente por la columna en este disolvente más fuerte (THF) hasta que el volumen de inyección quede diluido en la fase móvil. Además, las moléculas de la solución en los bordes exteriores del volumen inyectado son diluidas en la fase móvil antes que las moléculas que se encuentran en el medio del volumen inyectado. Por esta razón los picos observados son más anchos y con mala forma de pico [220].

Para minimizar este fenómeno, se decide reducir el volumen de inyección a 10 μ l para que el proceso de dilución se lleve a cabo más rápidamente.

Al inyectar menos volumen, la respuesta en el detector también es menor. Para conseguir una respuesta de los compuestos adecuada, se decide aumentar la concentración de cada uno de los compuestos en la solución: el doble de la concentración utilizada en los métodos descritos anteriormente. También debe

tenerse en cuenta que tanto la polaridad como el pH de un disolvente pueden afectar a la absorción del espectro de un compuesto determinado. A esta nueva concentración utilizando THF como diluyente de muestra, la respuesta de los compuestos es ligeramente menor a la proporcionada por los otros métodos descritos pero es correcta y cuantificable en todos los casos.

Al igual que en el desarrollo del método de HPLC *stability-indicating* para HQ (capítulo 10.1), todos los compuestos ionizables deben estar en una sola forma (neutra para que su retención sea máxima) y así evitar posibles malas formas de pico. En el desarrollo de del método *stability-indicating* para HQ se comprobó que cuanto más ácida era la fase móvil, mejor simetría de pico. Por tanto, estudia la utilización de las siguientes fases móviles ácidas:

- Solución acuosa de ácido acético al 0,1% (v/v): Diluir 1 ml de ácido acético glacial en 1 l de agua Milli-Q.
- Solución tampón fosfato (PO_4^{-3}) 25 mM a pH 2,5: Pesar 3,40 g de KH_2PO_4 y disolver en 1 l de agua Milli-Q. Dejar reposar y medir pH. Ajustar el pH a 2,50 ($\pm 0,05$) con H_3PO_4 diluido 10%.

La elución de los compuestos es prácticamente idéntica en ambas fases pero se escoge la solución tampón PO_4^{-3} 25 mM a pH 2,5 ya que otorga a los picos un mejor factor simetría. En caso de requerirse un análisis por LC/MS, la solución tampón PO_4^{-3} que no es compatible con dicha técnica al no ser volátil, sería substituida por una solución acuosa de ácido acético al 0,1% (v/v), que sí es compatible con esta técnica. El acetonitrilo es seleccionado como fase móvil orgánica porque su fuerza elutrópica es mayor que la del MeOH (requerida para la elución del DPK) y además proporciona una menor presión del sistema.

El otro parámetro involucrado en la selectividad es la fase estacionaria. Las diferencias de selectividad entre dos fases estacionarias diferentes, en condiciones idénticas, surgen del mecanismo en el que los compuestos interactúan con las respectivas fases (móvil y estacionaria). En el desarrollo del método de HPLC *stability-indicating* para HQ se comprobó que la fase estacionaria que producía una mejor separación era la fase fenilo. En base a este hecho, se realiza un estudio para evaluar si alguna de las nuevas fases fenilo comercializadas proporciona una mejor selectividad en la separación de los compuestos en estudio. Se consideran las siguientes columnas:

- Zorbax SB-Phenyl 5 μm , 80 \AA , 4,6 x 150 mm
- Zorbax Eclipse Plus Hexyl-Phenyl 5 μm , 195 \AA , 4,6 x 150 mm
- Pursuit RXs Diphenyl 5 μm , 200 \AA , 4,6 x 150 mm

La columna seleccionada es la que da una elución de los compuestos en estudio y de las degradaciones más eficaz: Pursuit RXs Diphenyl 5 μm , 200 \AA , 4,6 x 150 mm. Esta eficacia es mejorada al aumentar la temperatura de columna a 50 $^{\circ}\text{C}$, manteniendo la presión del sistema bajo control.

La longitud de onda de detección se mantiene a 230 nm ya que es la longitud de onda en la que todos los compuestos tienen una respuesta correcta tal y como se observa en la Figura 10.5.3. Se observa que el pico correspondiente a AVB tautómero ceto, que eluye a un tiempo de retención de 20,5 minutos, tiene una respuesta mucho más baja que la respuesta obtenida en los otros métodos desarrollados. Esto es debido a que la proporción de éste depende de la proticidad del diluyente de muestra, cambiada en este método de (70:30) ACN:H₂O a THF.

Se intenta maximizar la respuesta del DPK cambiando la detección a 250 nm, que es donde su respuesta es máxima. Pero a 250 nm, HQ tienen una absorbancia muy baja aunque cuantificable mientras que la respuesta del BHA es prácticamente no cuantificable y el BHT no es detectado (Figura 10.5.4).

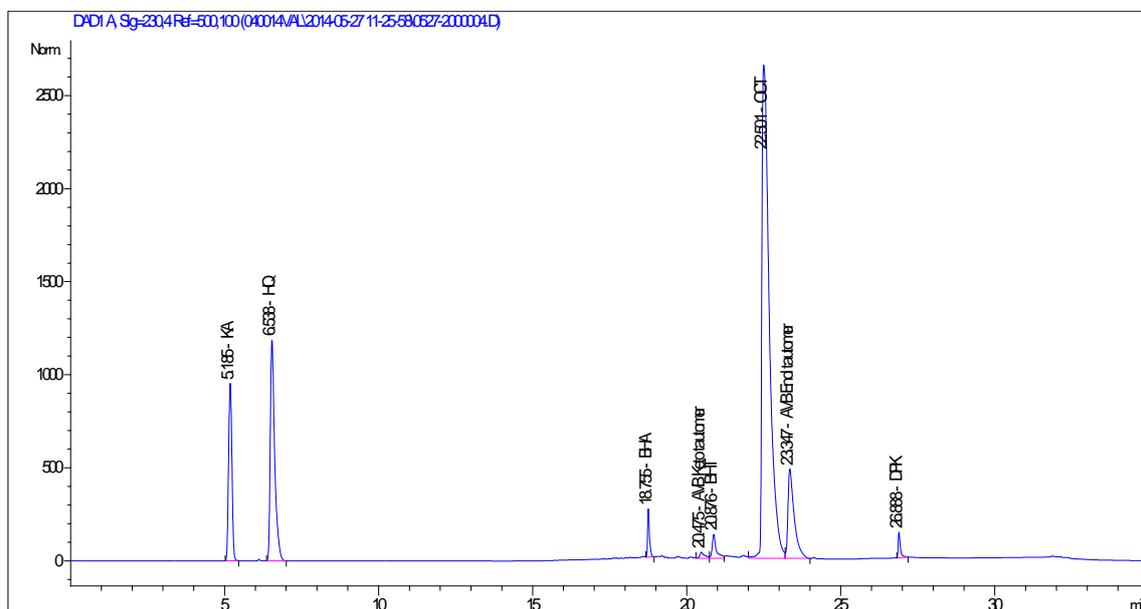


Figura 10.5.3 Cromatograma típico de la solución patrón obtenido con el método desarrollado con la columna Pursuit RXs diphenyl 5 μm 150 x 4.6 mm a 230 nm

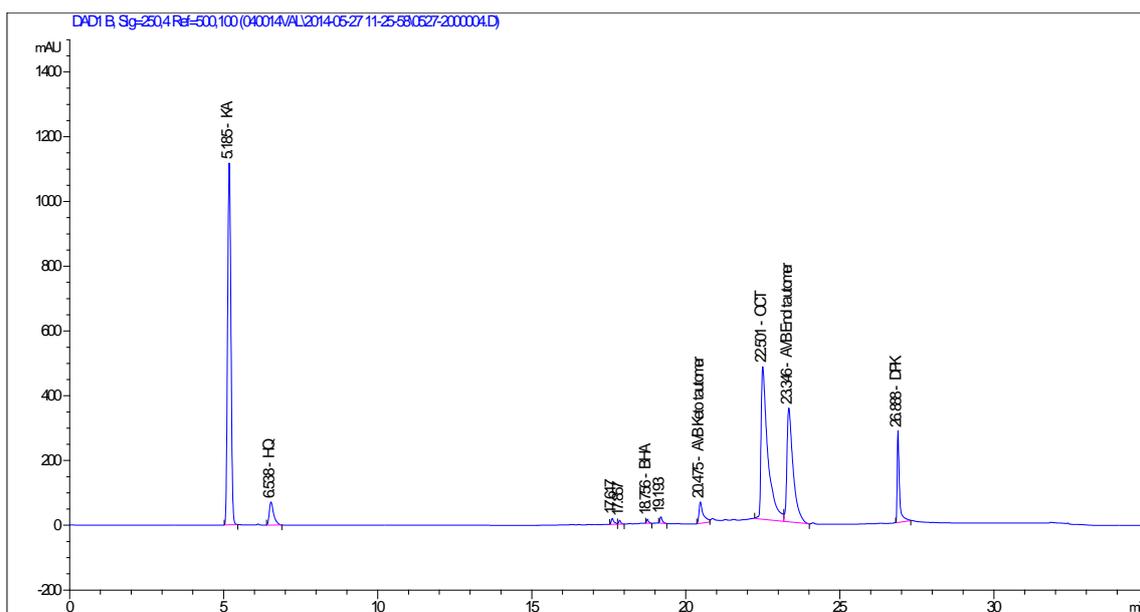


Figura 10.5.4 Cromatograma de la solución patrón obtenido con el método desarrollado con la columna Pursuit RXs diphenyl 5 µm 150 x 4,6 mm a 250 nm

10.5.4.2. Optimización de la preparación de la muestra

Tal y como se observó en el estudio de solubilidad realizado en el desarrollo del método para la determinación de DPK (ver apartado 10.2.4.1 del capítulo 10.2), el THF es el único disolvente que solubiliza todos los compuestos bajo estudio y también toda la crema. Por esta razón, se estudia la eficacia de la duración de la etapa de sonicación desde 10 hasta 5 minutos – tiempo necesario para la obtención de una solución de crema –.

Tabla 10.5.3 Resultados obtenidos en el estudio del tiempo de sonicación

t_s (min)		HQ	KA	DPK	OCT	AVB	BHA	BHT
5	Media	99,5	99,6	102,5	100,7	98,1	100,0	99,1
	SD	100,86	100,31	98,91	101,36	99,64	101,43	101,53
	RSD	98,54	102,43	100,71	98,44	100,76	102,89	102,67
10	Media	99,1	101,0	100,9	100,3	99,4	102,3	100,4
	SD	100,75	100,81	98,61	101,38	98,26	101,94	102,84
	RSD	98,83	98,76	101,37	100,93	99,11	101,09	101,54

t_s : tiempo de sonicación (min)

Los resultados obtenidos, Tabla 10.5.4, se analizan estadísticamente mediante la prueba t-Student suponiendo varianzas iguales (comprobado previamente mediante la prueba F de Snedecor-Fischer). Para todos los compuestos se cumple que t calculado es menor que el t crítico (2,776, contraste de dos colas), entonces la hipótesis nula se

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

toma como cierta y las dos medias no difieren significativamente (Tabla 10.5.4). En consecuencia, se establece el tiempo de sonicación a 10 minutos.

Tabla 10.5.4 Análisis estadístico de los resultados del tiempo de sonicación: 5 y 10 minutos

<i>Tiempo de sonicación</i>	HQ		KA		DPK	
	<i>5 min</i>	<i>10 min</i>	<i>5 min</i>	<i>10 min</i>	<i>5 min</i>	<i>10 min</i>
Media	99,64	99,57	100,77	100,20	100,71	100,31
Varianza	1,356	1,067	2,192	1,567	3,251	2,205
Observaciones	3	3	3	3	3	3
Varianza agrupada	1,211		1,880		2,728	
Dif. Hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	4		4		4	
Estadístico t	0,0776		0,5118		0,3005	
P(T<=t) dos colas	0,4709		0,3179		0,3894	
Valor crítico de t (dos colas)	2,1318		2,1318		2,1318	

Tabla 10.5.4 Análisis estadístico de los resultados del tiempo de sonicación: 5 y 10 minutos (continuación)

<i>Tiempo de sonicación</i>	OCT		AVB	
	<i>5 min</i>	<i>10 min</i>	<i>5 min</i>	<i>10 min</i>
Media	100,16	100,88	99,50	98,91
Varianza	2,346	0,272	1,798	0,337
Observaciones	3	3	3	3
Varianza agrupada	1,309		1,067	
Dif. Hipotética de las medias	0		0	
Grados de libertad	4		4	
Estadístico t	-0,7721		0,6916	
P(T<=t) dos colas	0,2416		0,2636	
Valor crítico de t (dos colas)	2,1318		2,1318	

Tabla 10.5.4 Análisis estadístico de los resultados del tiempo de sonicación: 5 y 10 minutos (continuación)

<i>Tiempo de sonicación</i>	BHA		BHT	
	<i>5 min</i>	<i>10 min</i>	<i>5 min</i>	<i>10 min</i>
Media	101,45	101,78	101,10	101,59
Varianza	2,045	0,386	3,345	1,503
Observaciones	3	3	3	3
Varianza agrupada	1,216		2,424	
Dif. Hipotética de las medias	0		0	
Grados de libertad	4		4	
Estadístico t	-0,3629		-0,3881	
P(T<=t) dos colas	0,3675		0,3589	
Valor crítico de t (dos colas)	2,1318		2,1318	

Considerando que el método desarrollado es un método HPLC y en vista a que se obtienen soluciones, tanto de los patrones como de la crema, totalmente solubilizadas – solución transparente – se decide no filtrar las soluciones previamente a su introducción en el HPLC.

10.5.4.3. Validación del método

El método desarrollado fue validado respecto a los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez y estabilidad de la solución [129].

I. Selectividad

La selectividad del método fue demostrada mediante la identificación de cada uno de los compuestos y comprobando la ausencia de interferencias procedentes del blanco y del placebo y realizando un estudio de degradaciones forzadas.

Se identifican todos los compuestos por tiempo de retención (Tabla 10.5.5) inyectando una solución patrón individual de cada uno de ellos (Figuras 10.5.5 a 10.5.11).

Tabla 10.5.5 Tiempos de retención de todos los compuestos

Compuestos	Tiempo de retención (min)
KA	5,22
HQ	6,60
BHA	18,78
AVB tautómero Ceto	19,20
BHT	20,90
OCT	22,60
AVB tautómero Enol	23,45
DPK	26,90

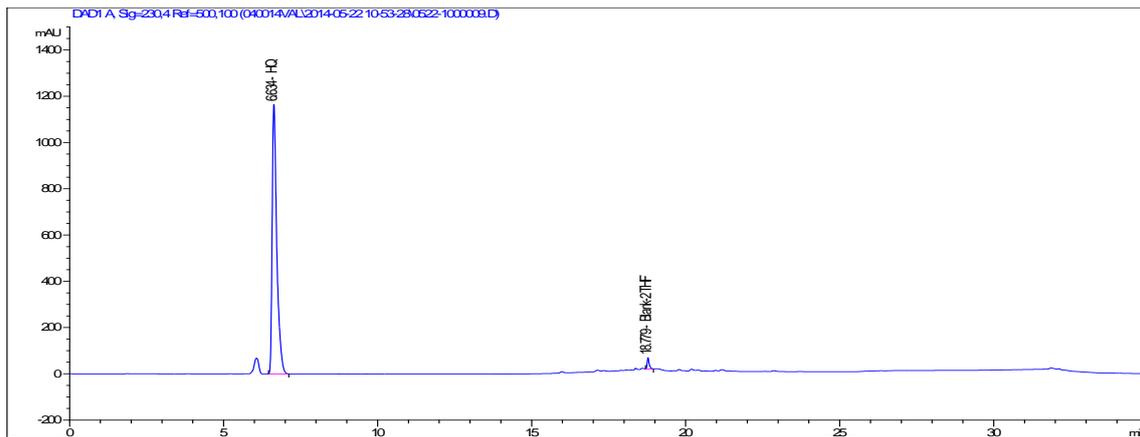


Figura 10.5.5 Cromatograma solución HQ

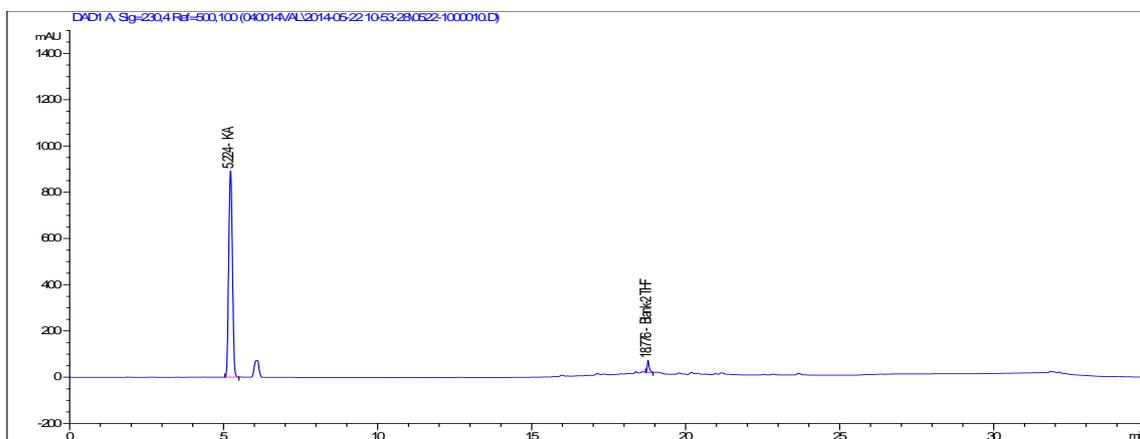


Figura 10.5.6 Cromatograma solución KA

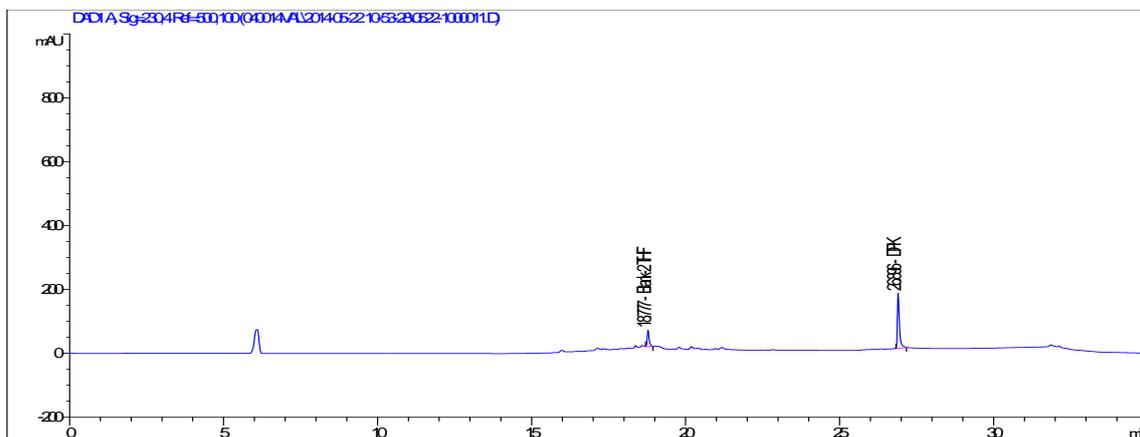


Figura 10.5.7 Cromatograma solución DPK

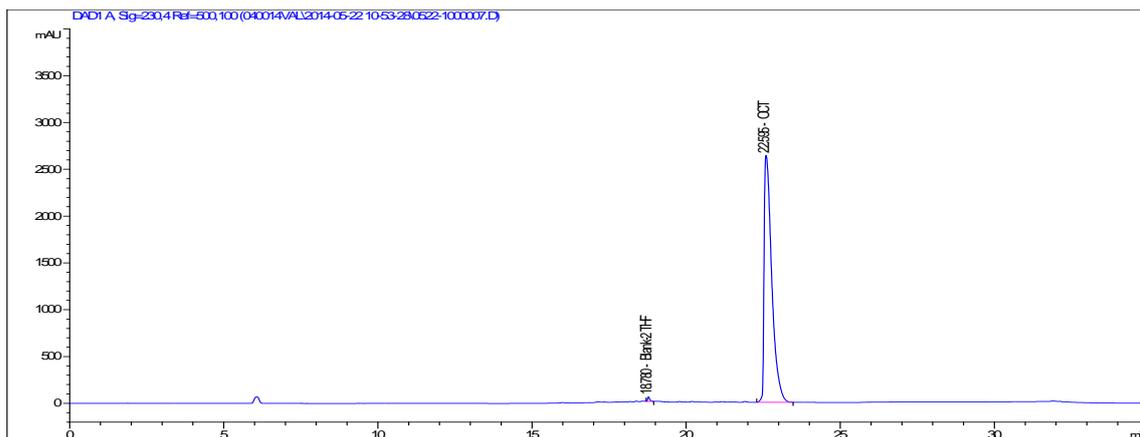


Figura 10.5.8 Cromatograma solución OCT

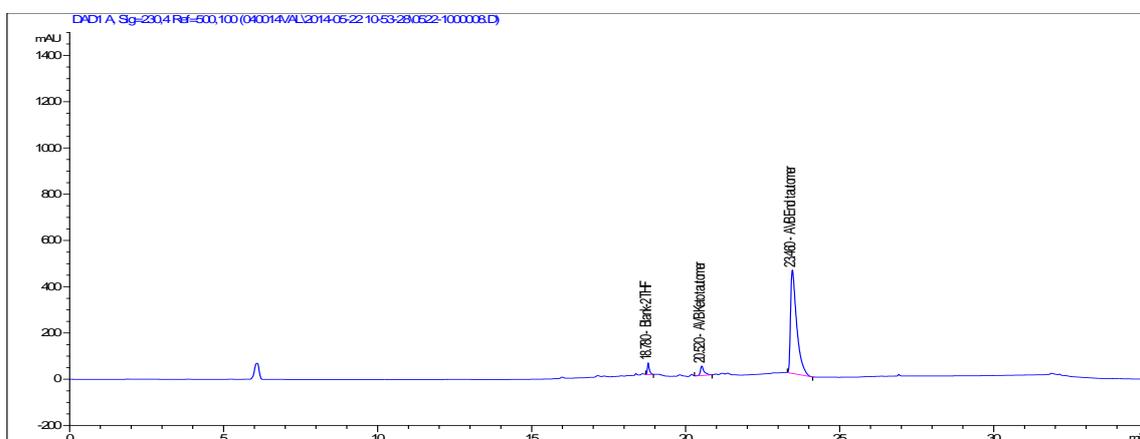


Figura 10.5.9 Cromatograma solución AVB

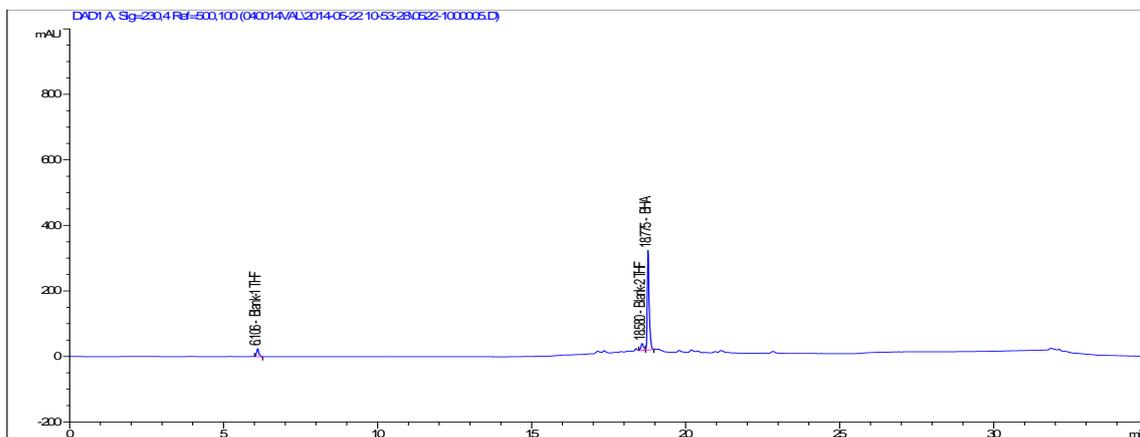


Figura 10.5.10 Cromatograma solución BHA

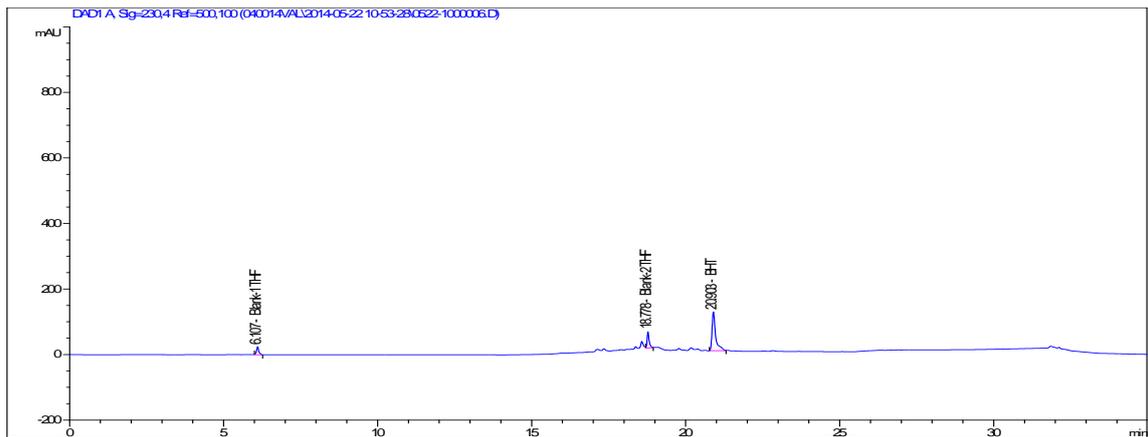


Figura 10.5.11 Cromatograma solución BHT

En las Figuras 10.5.12 a 10.5.15 se demuestra la ausencia de interferencias entre los excipientes y los compuestos en estudio inyectando por un lado, un blanco de THF, una solución de placebo, una solución patrón y una solución problema de crema lote A02.

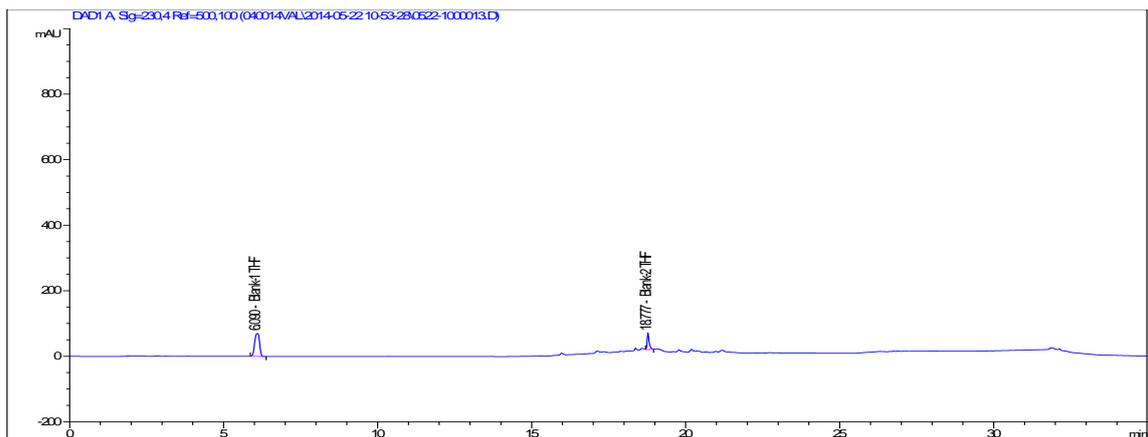


Figura 10.5.12 Cromatograma blanco

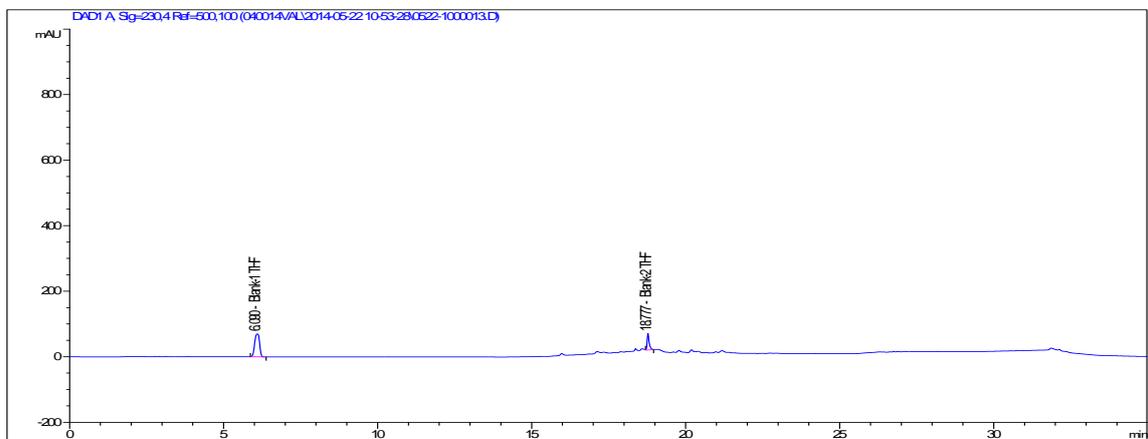


Figura 10.5.13 Cromatograma solución placebo

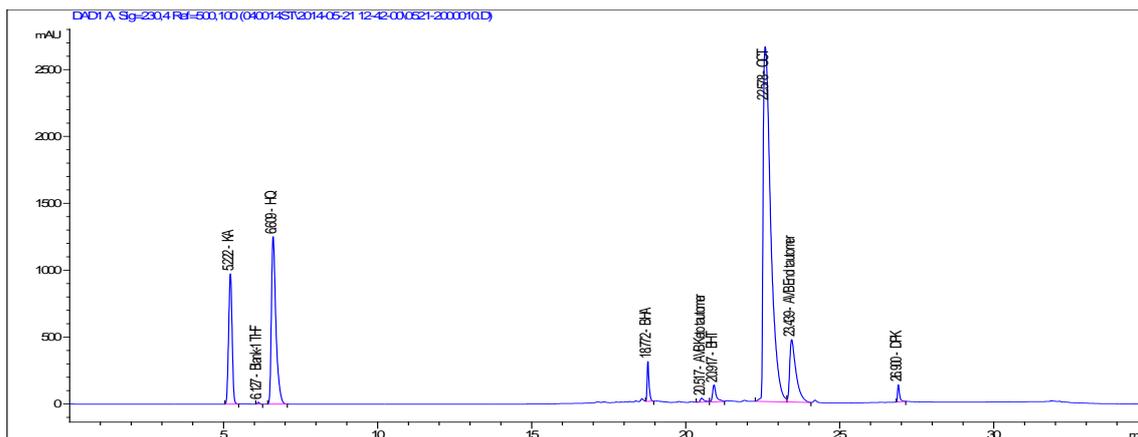


Figura 10.5.14 Cromatograma solución patrón

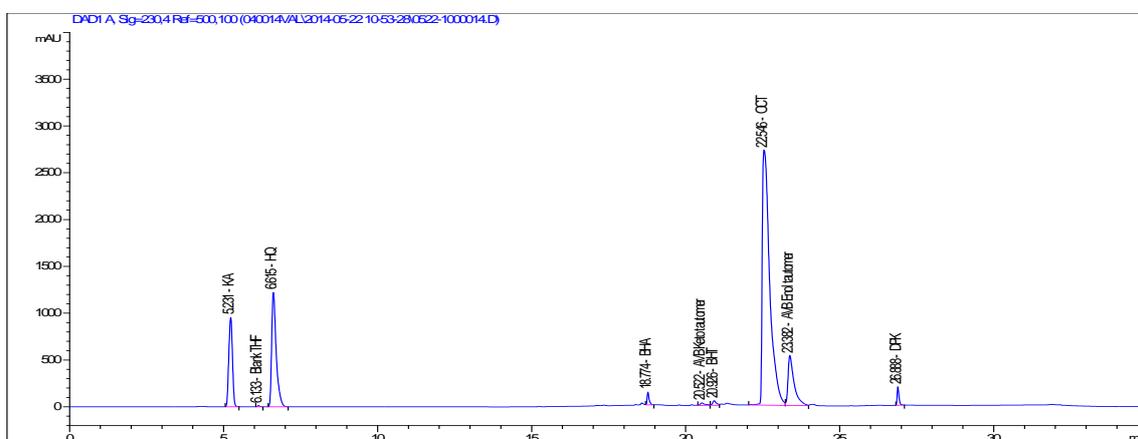


Figura 10.5.15 Cromatograma solución problema crema lote A02

Para demostrar la selectividad y especificidad del método se lleva a cabo el estudio de degradaciones forzadas para ver los posibles productos de degradación que se pueden generar cuando la crema se somete a una serie de condiciones forzadas.

Debido a todo el conocimiento adquirido a lo largo del desarrollo de la crema y aplicándolo al objetivo del presente método que es investigar la estabilidad de la crema a lo largo de los estudios de estabilidad según ICH, se otorga más importancia al estudio de las degradaciones por temperatura y humedad que en el resto de factores de degradación [150-154]. Del resto de factores, la degradación en medio ácido, básico y oxidante se investigan en condiciones relativamente suaves y en periodos de tiempo cortos para conseguir una ligera degradación de la muestra:

- Medio ácido: HCl 0,1M, 2 horas, 40 °C
- Medio básico: NaOH 0,01N, 30 minutos, temperatura ambiente
- Medio oxidante: H₂O₂ al 33%, 30 minutos, temperatura ambiente

En este caso, la fotólisis no se estudia ya que el envasado primario de la crema – tubos PEAD – se ha seleccionado considerando la fotosensibilidad de la HQ. Por tanto, se considera que la crema envasada en tubos de PEAD está protegida de la luz y no se va a degradar por un mecanismo de fotólisis.

La crema es una combinación de tres sustancias consideradas como principios activos. Para este tipo de casos, la opción más exacta para es cuantificar cada uno de los productos de degradación respecto al principio activo del que procede. Esto implica la realización del estudio de degradación forzada de cada uno de los principios activos [221].

a. Hidrólisis en medio ácido

La crema es sometida a degradación en medio ácido bajo las siguientes condiciones: HCl 0,1M, 2 horas, 40 °C. En las Figuras 10.5.16 a 10.5.18 se observa que ninguno de los tres APIs no se degradan en las condiciones testadas en medio ácido. En la solución placebo tampoco se observa degradación (Figura 10.5.19).

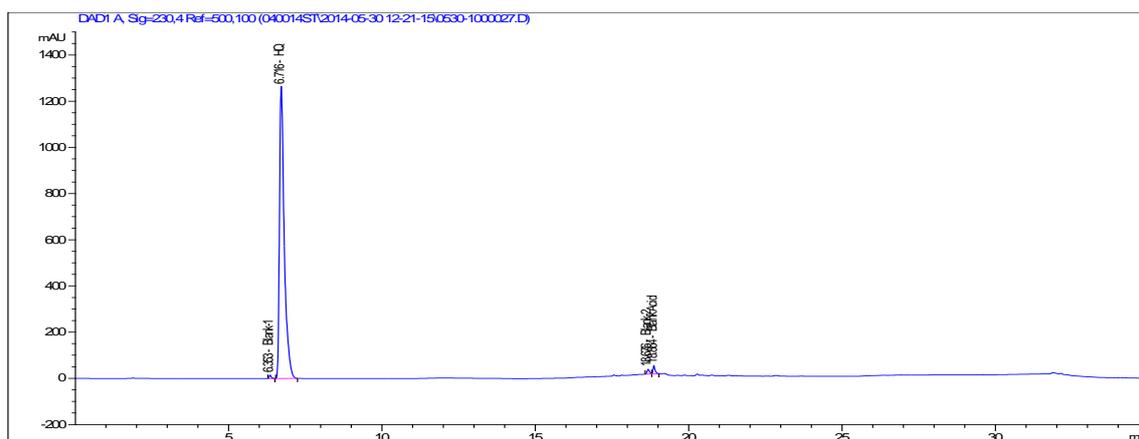


Figura 10.5.16 Cromatograma de la solución HQ estresada en medio ácido (HCl 0,1M, 2 horas, 40 °C)

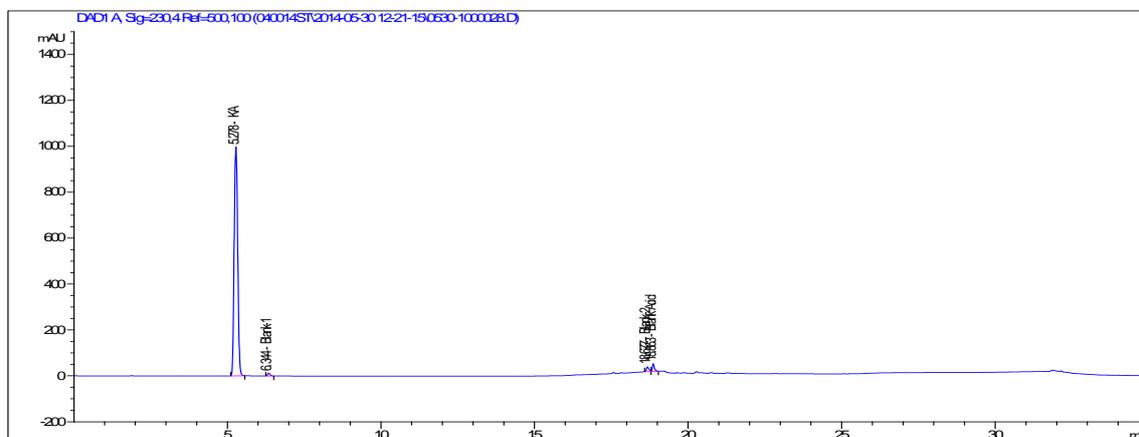


Figura 10.5.17 Cromatograma de la solución KA estresada en medio ácido (HCl 0,1M, 2 horas, 40 °C)

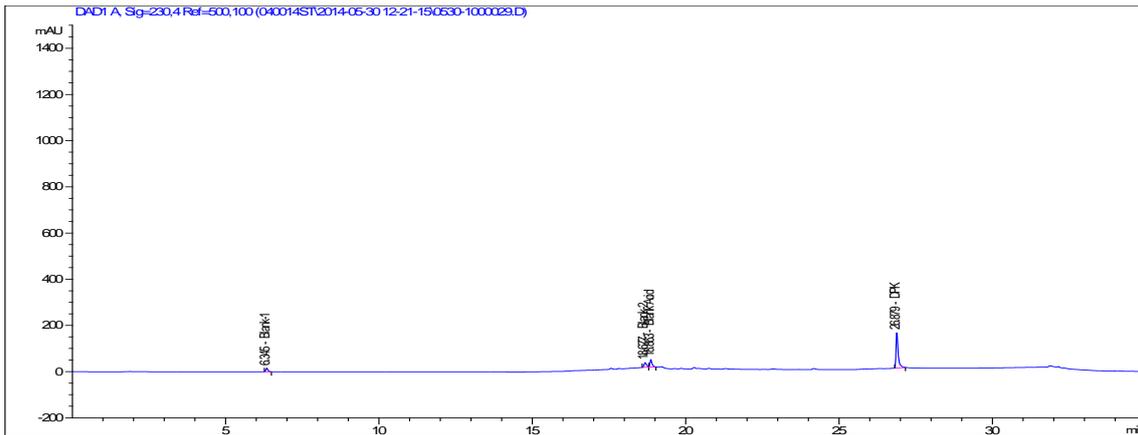


Figura 10.5.18 Cromatograma de la solución DPK estresada en medio ácido (HCl 0,1M, 2 horas, 40 °C)

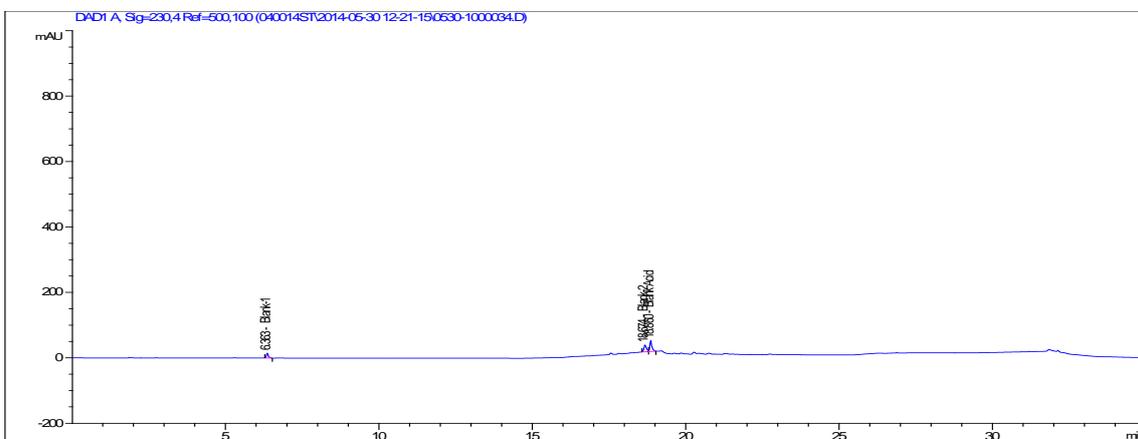
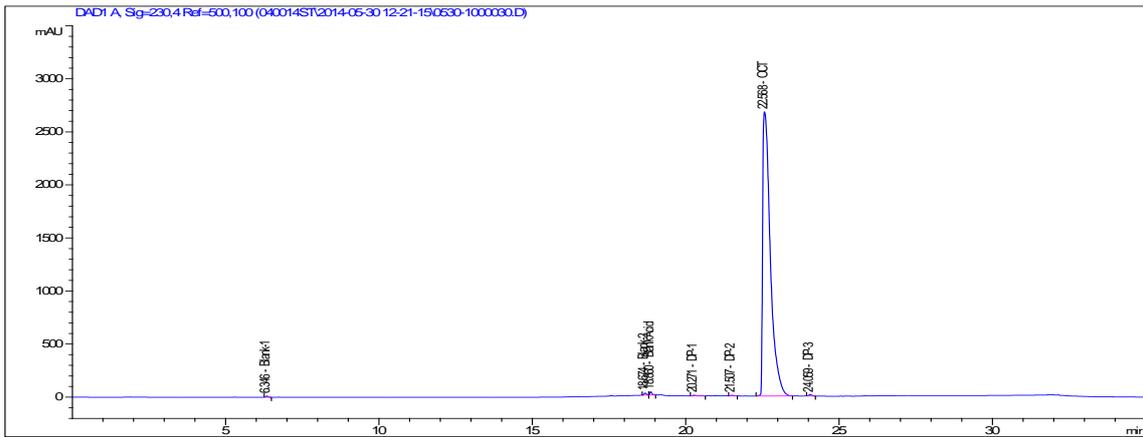


Figura 10.5.19 Cromatograma de la solución placebo estresada en medio ácido (HCl 0,1M, 2 horas, 40 °C)

En las Figuras 10.5.20 y 10.5.21 se observa la degradación sufrida en las soluciones de OCT y AVB, respectivamente, en las condiciones ácidas estudiadas. Tanto en la solución de OCT como en la solución de AVB se observa la aparición de dos productos de degradación minoritarios: DP-1 y DP-2 con tiempos de retención de 20,27 y 21,37 minutos, respectivamente. Además, en el OCT también se observa la formación de otro producto de degradación minoritario, DP-3, el cual no se forma en la solución de AVB, que eluye a 24,06 minutos. En el caso de la solución de AVB en medio ácido, además de la formación de los productos de degradación minoritarios DP-1 y DP-2, se observa la aparición de un producto de degradación importante: DP-4 de aproximadamente un 20%, a tiempo de retención 22,77 minutos. Este producto de degradación coeluye con el OCT. Sin embargo, considerando las condiciones en las que se da esta transformación (HCl 0,1 M, 2 horas, 40 °C) y que el OCT no es API, se decide mantener el mismo gradiente de elución.

a)



b)

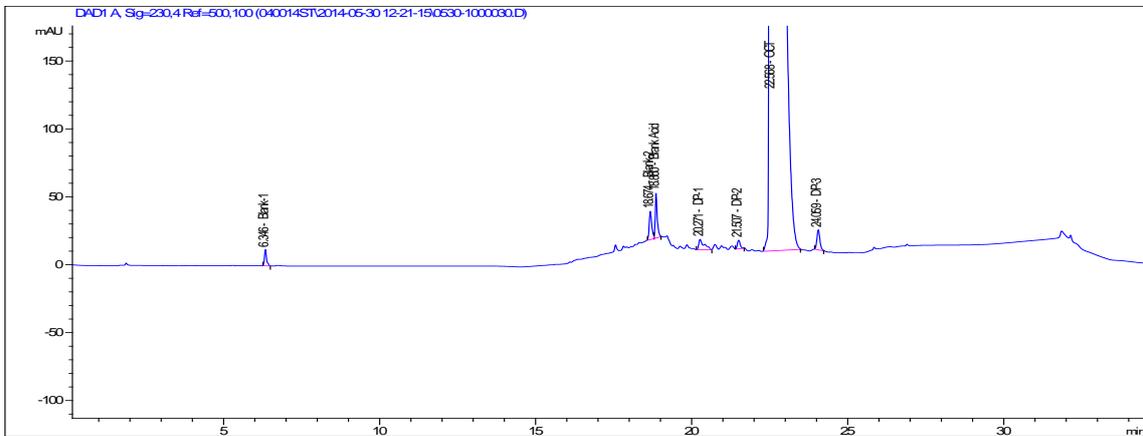
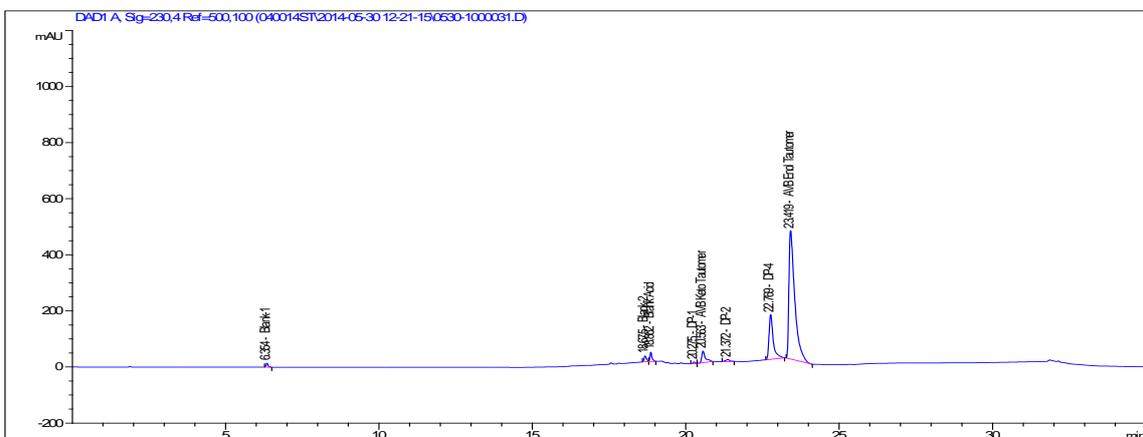


Figura 10.5.20 Cromatogramas de la solución OCT

(a) estresada en medio ácido (HCl 0,1M, 2 horas, 40 °C) y (b) ampliación del cromatograma

a)



b)

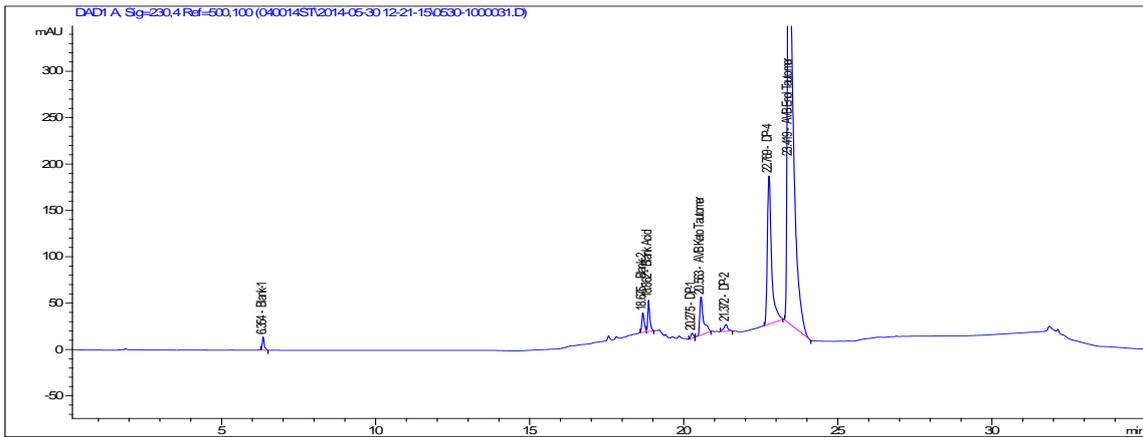
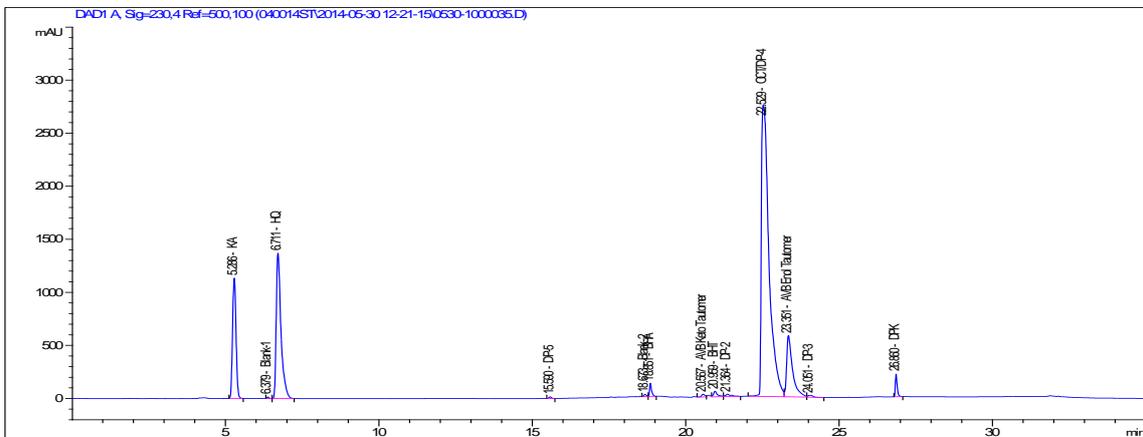


Figura 10.5.21 Cromatogramas de la solución AVB

(a) estresada en medio ácido (HCl 0,1M, 2 horas, 40 °C) y (b) ampliación del cromatograma

En la solución problema, crema estresada en medio ácido, se observa la formación de los productos de degradación DP-2 y DP-3 además de otro producto de degradación DP-5 que eluye a un tiempo de retención de 15,59 minutos (Figura 10.5.22).

a)



b)

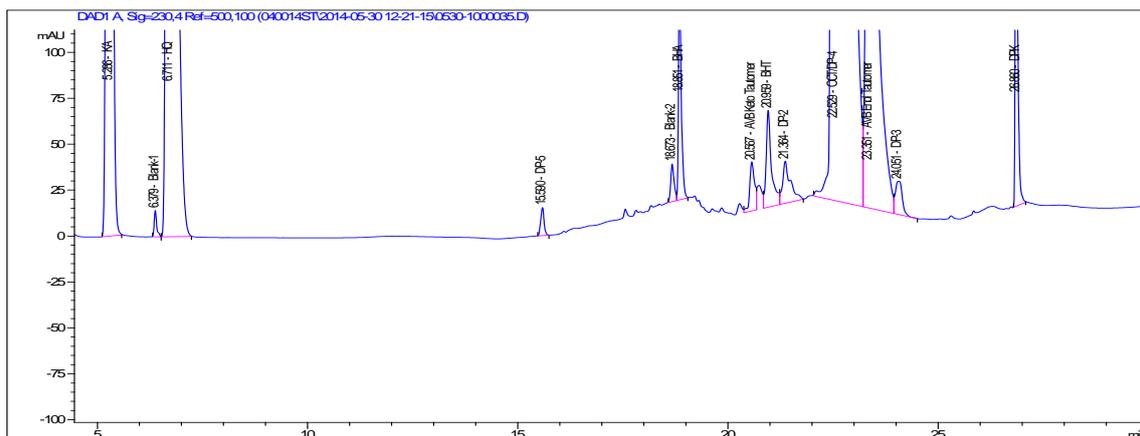


Figura 10.53.22 Cromatogramas de la solución problema

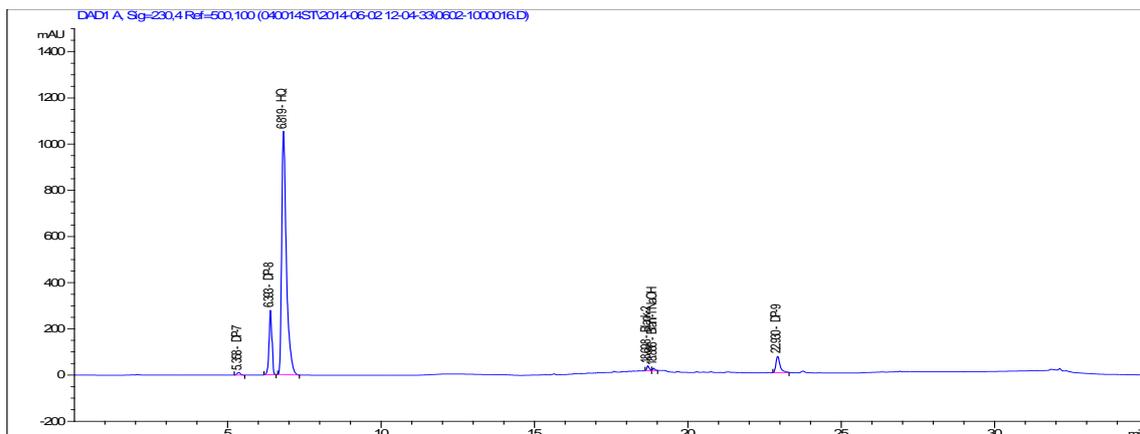
(a) estresada en medio ácido (HCl 0,1M, 2 horas, 40 °C) y (b) ampliación del cromatograma

b. Hidrólisis en medio básico

La crema es sometida a degradación en medio básico bajo las siguientes condiciones: NaOH 0,01N, 30 minutos, temperatura ambiente. En las Figuras 10.5.23 a 10.5.25 se observa las degradaciones generadas en cada uno de los APIs individualmente.

En la Figura 10.5.22 se observa que en estas condiciones la HQ se degrada aproximadamente un 20% conduciendo la formación de dos productos de degradación minoritarios – DP-7 (5,35 min) inferior a 1,0% y DP-9 (22,93 min) aproximadamente 5,0% – y un producto de degradación mayoritario – DP-8 (6,39 min) – de un 15,0%.

a)



b)

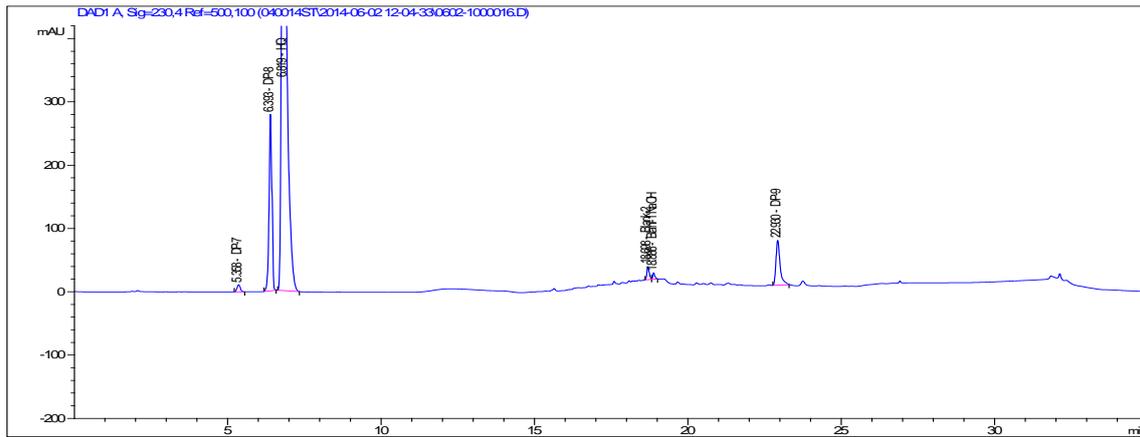


Figura 10.5.23 Cromatogramas de la solución de HQ

(a) estresada en medio básico (NaOH 0,01N, 30 minutos, Tamb) y (b) ampliación del cromatograma

El KA, en las condiciones alcalinas estudiadas, prácticamente no se degrada observándose únicamente la formación de dos productos muy minoritarios (inferior a 0,5%): DP-8 y DP-9. Productos de degradación con el mismo tiempo de retención y espectros de absorbancia se observan en la degradación de HQ. Posiblemente correspondan a los mismos compuestos consecuencia de la hidrólisis en medio básico de la HQ y el KA que tienen estructuras moleculares con grupos funcionales similares.

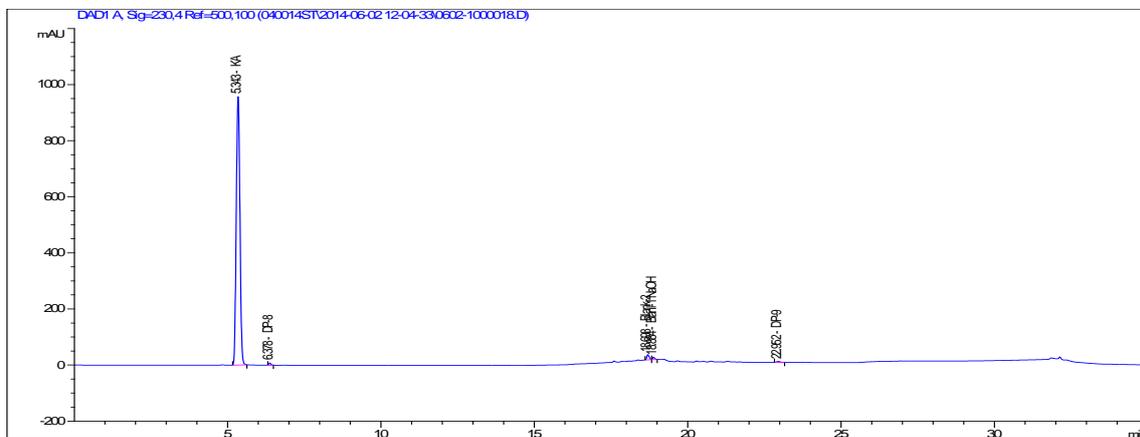


Figura 10.5.24 Cromatograma de la solución de KA estresada en medio básico (NaOH 0,01N, 30 minutos, Tamb)

Por su parte, el DPK se degrada aproximadamente un 30% en las condiciones estudiadas conduciendo a la generación de un único producto de degradación, DP-6, que eluye a un tiempo de retención de 24,13 minutos.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

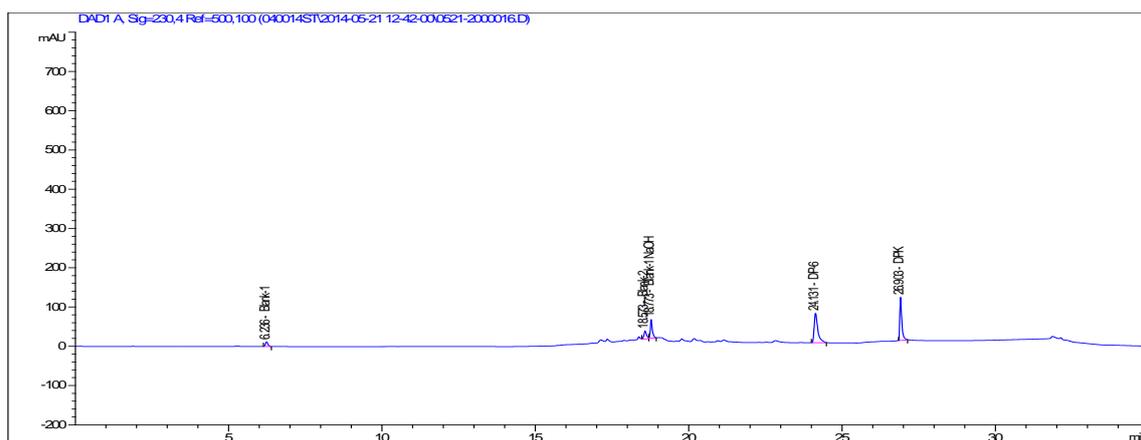


Figura 10.5.25 Cromatograma de la solución de DPK estresada en medio básico (NaOH 0,01N, 30 minutos, Tamb)

Por otra parte, OCT, AVB así como el placebo se mantienen estables en las condiciones básicas testadas (Figuras 10.5.26 a 10.5.28), únicamente observándose la formación del producto de degradación minoritario en la solución de OCT (inferior a 0,1%): DP-3, formado también por hidrólisis del OCT en medio ácido.

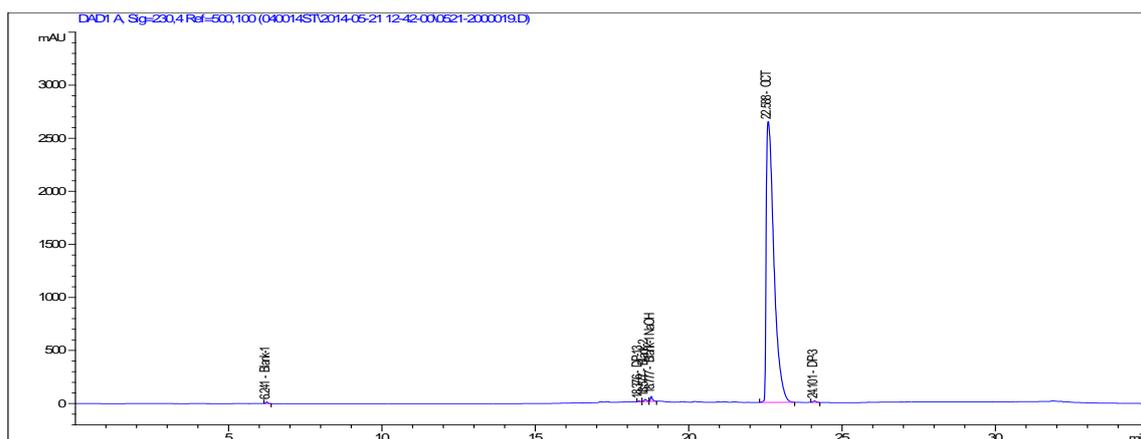


Figura 10.5.26 Cromatograma de la solución de OCT estresada en medio básico (NaOH 0,01N, 30 minutos, Tamb)

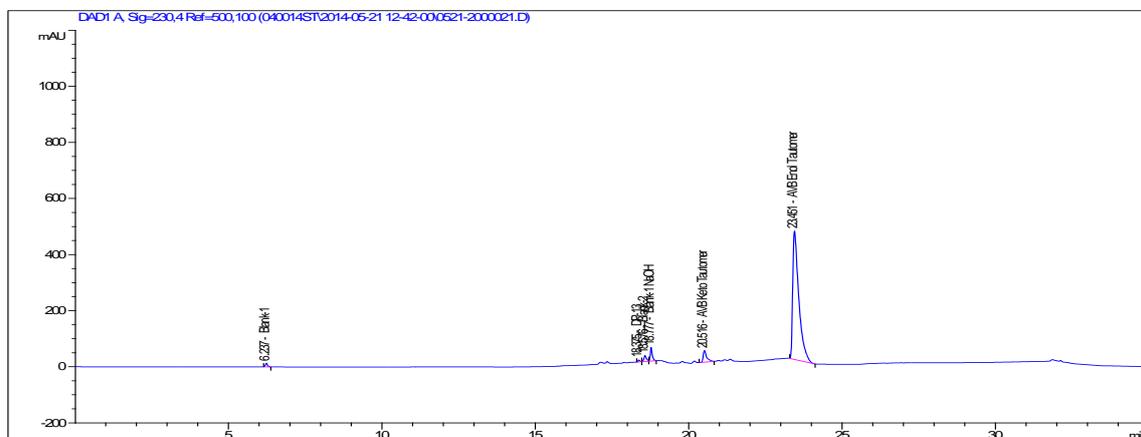


Figura 10.5.27 Cromatograma de la solución de OCT estresada en medio básico (NaOH 0,01N, 30 minutos, Tamb)

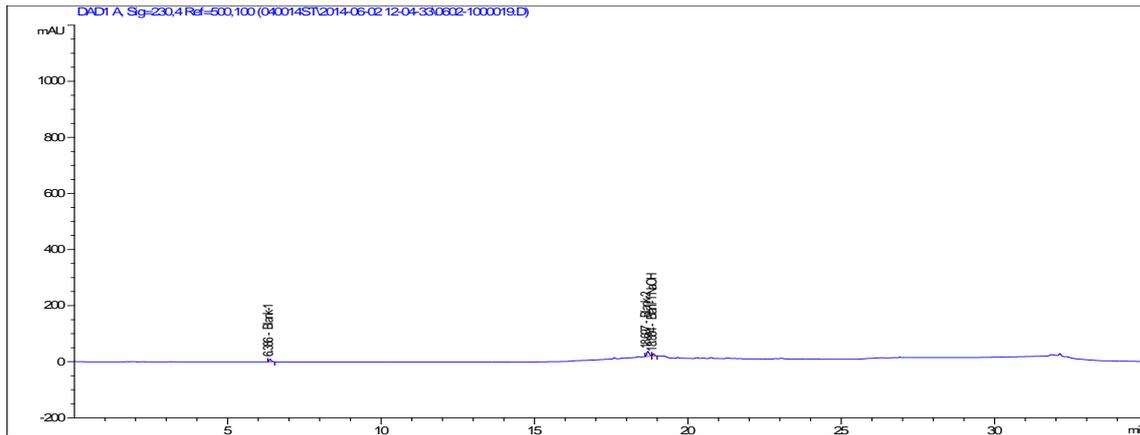
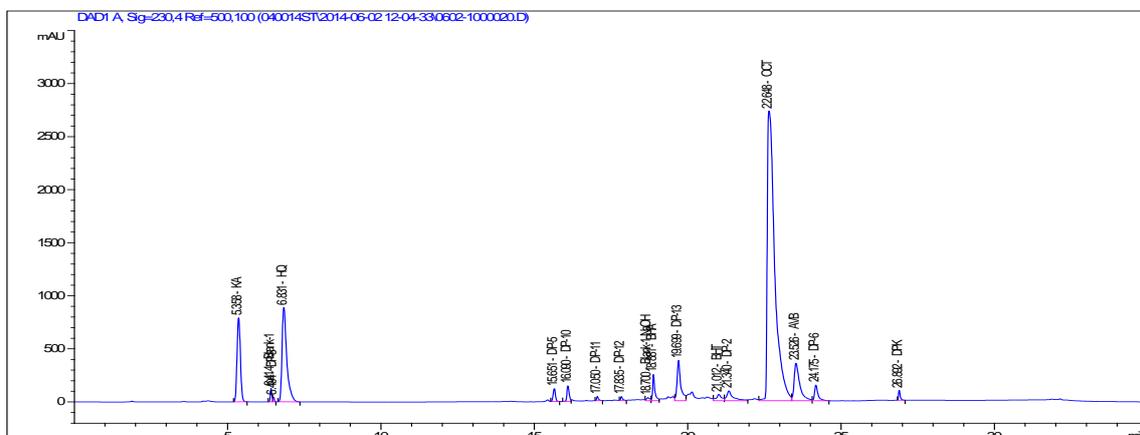


Figura 10.5.28 Cromatograma de la solución placebo estresada en medio básico (NaOH 0,01N, 30 minutos, Tamb)

Por su parte, en el cromatograma de la solución problema – crema lote A02 – se observa la aparición de una serie de productos de degradación minoritarios (inferiores al 2,0%): DP-5 (15,65 min), DP-10 (16,09 min), DP-11 (17,05 min), DP-12 (17,84 min) y DP-2 (21,34 min). Este último producto de degradación – DP-2 – procedente de la hidrólisis del OCT o AVB ya que también aparece en la hidrólisis ácida de estas dos sustancias. Además, también se observan productos de degradación mayoritarios: DP-6 y DP-13 (16,99 min) mayoritario (alrededor de un 5,0%).

Se debe tener en cuenta que el DP-6 procede de la degradación del DPK. Aunque sea un pico de aproximadamente un 1,50% en área, esto corresponde a un 120% si se calcula respecto al DPK, del cual procede. Probablemente esto sea consecuencia de que el factor respuesta de DP-6 es muy superior al factor respuesta del DPK. En el caso de que se detecte durante el estudio de estabilidad se procederá a estudiar su factor respuesta y el factor de corrección, tal y como se hizo en el caso de la BQ en el método de HPLC stability-indicating para HQ (ver capítulo 10.1, apartado 10.1.4.6.V).

a)



b)

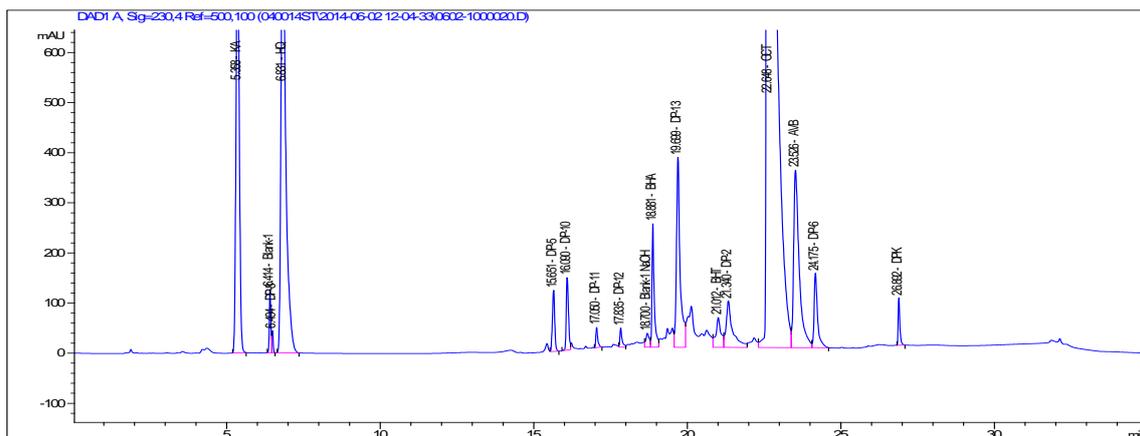


Figura 10.5.29 Cromatogramas de la solución de problema

(a) estresada en medio básico (NaOH 0,01N, 30 minutos, Tamb) y (b) ampliación del cromatograma

c. Oxidación

La degradación en medio oxidante es llevada a cabo en las siguientes condiciones: H₂O₂ 3%, 30 minutos, temperatura ambiente. En estas condiciones, tan suaves, no se observa la degradación de HQ ni de KA (Figura 10.5.30 y 10.5.31).

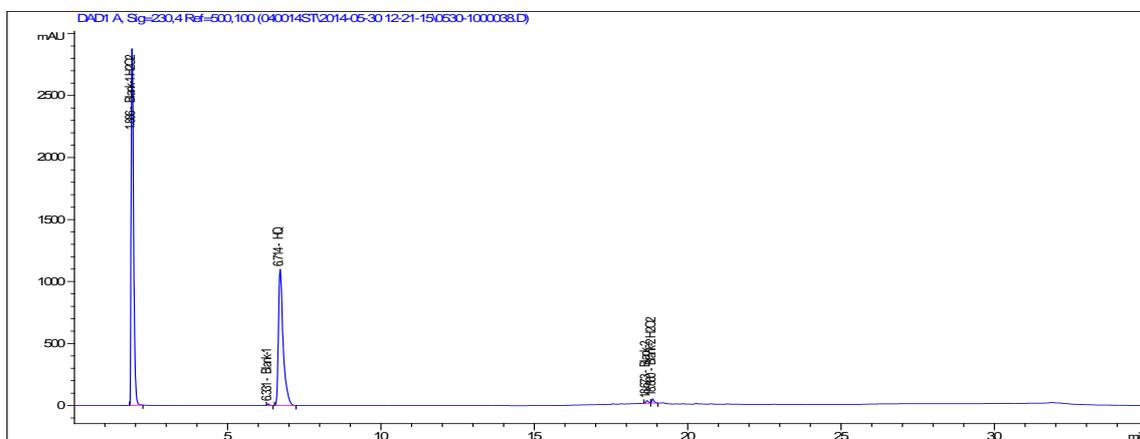


Figura 10.5.30 Cromatograma de la solución HQ estresada en medio oxidante (H₂O₂ 3%, 30 minutos, Tamb)

Sin embargo, si se observa la degradación del DPK generándose el producto de degradación DP-6 en un 16,6%. Por tanto, se observa la formación de DP-6 tanto en la condición estudiada en medio básico como en la condición estudiada en medio oxidante, probablemente debido a la hidrólisis de esta sustancia (Figura 10.5.32).

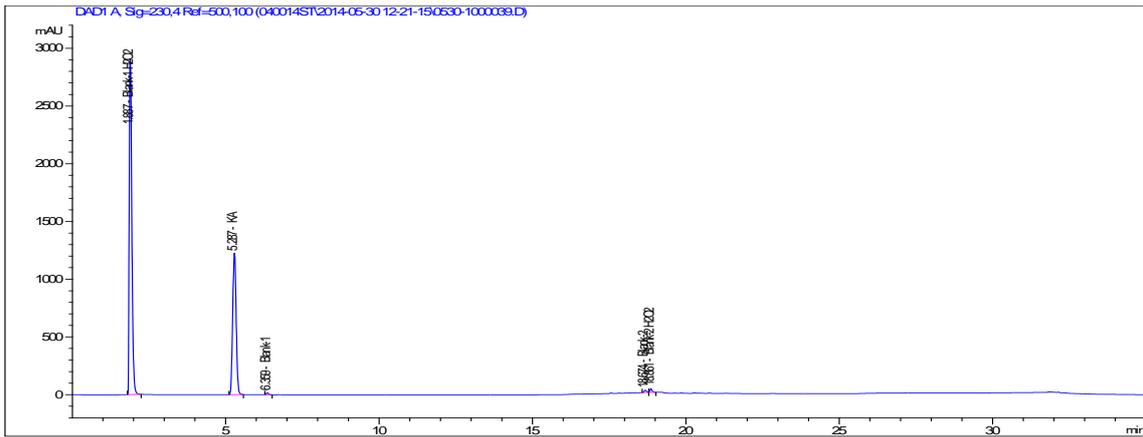


Figura 10.5.31 Cromatograma de la solución KA estresada en medio oxidante (H_2O_2 3%, 30 minutos, Tamb)

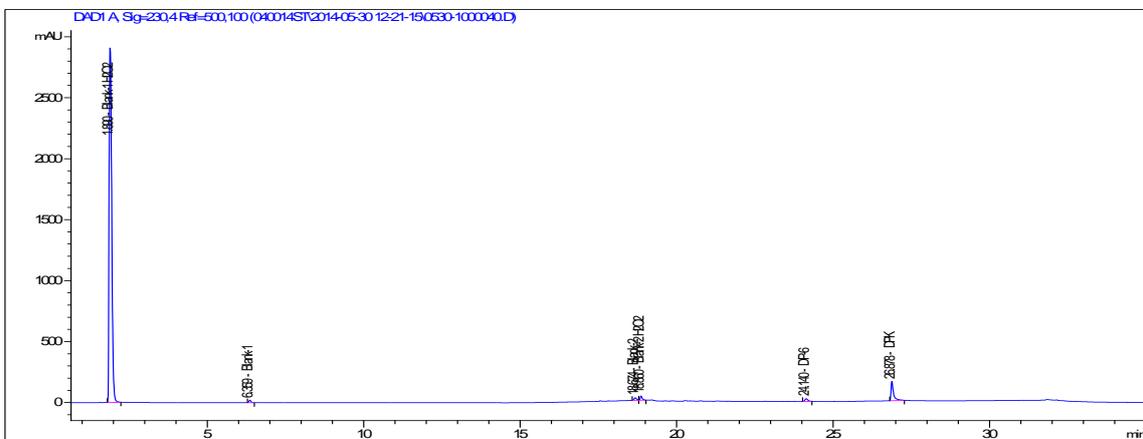


Figura 10.5.32 Cromatograma de la solución DPK estresada en medio oxidante (H_2O_2 3%, 30 minutos, Tamb)

Las soluciones de OCT y AVB se degradan ligeramente en la condición estudiada formando DP-3 y DP-2, respectivamente, inferior al 0,20% (Figuras 10.5.33 y 10.5.34).

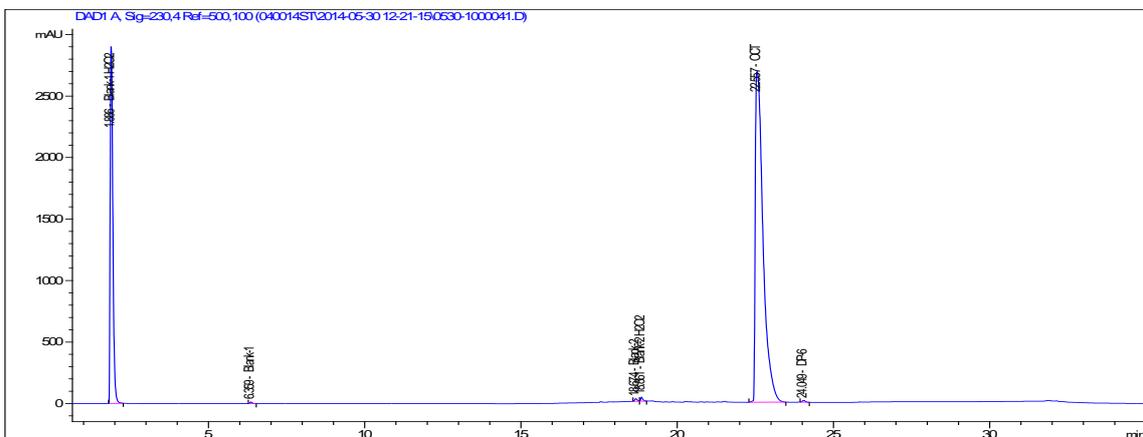


Figura 10.5.33 Cromatograma de la solución DPK estresada en medio oxidante (H_2O_2 3%, 30 minutos, Tamb)

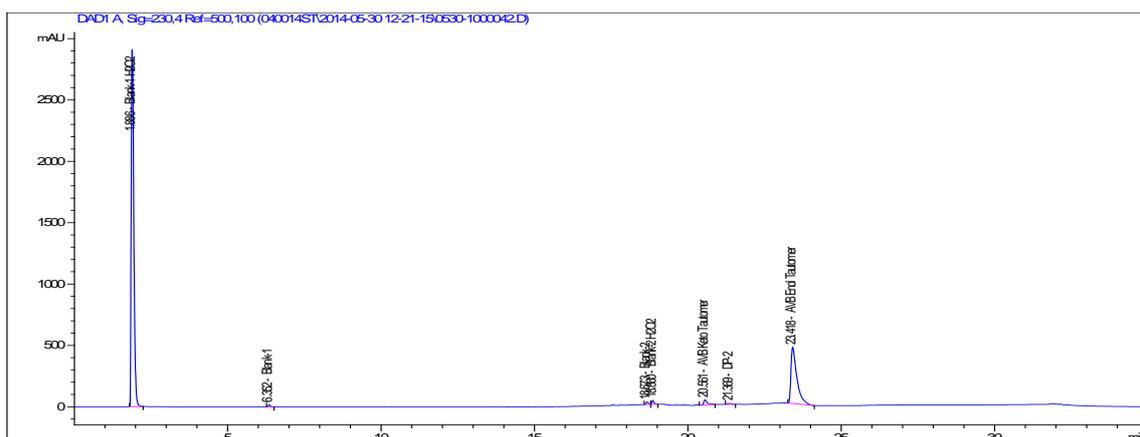


Figura 10.5.34 Cromatograma de la solución AVB estresada en medio oxidante (H_2O_2 3%, 30 minutos, Tamb)

La solución placebo ensaya en la condición oxidante permanece estable observándose únicamente los picos correspondientes a la FM y al H_2O_2 (t_R : 1,88 min).

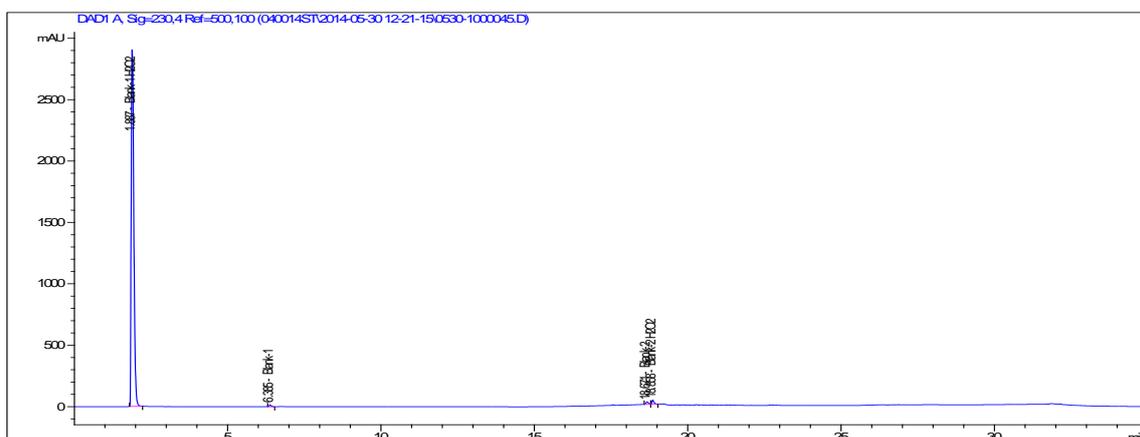


Figura 10.5.35 Cromatograma de la solución AVB estresada en medio oxidante (H_2O_2 3%, 30 minutos, Tamb)

La crema estresada en la condición estudiada muestra una ligera degradación formándose los productos de degradación siguientes: DP-5 (producto que aparece siempre en la degradación de la crema), DP-2 (procedente de la degradación del AVB) y DP-6, posiblemente este pico sea la suma del propio DP-6, procedente de DPK, y DP-3, procedente del OCT, debido a la elución tan próxima de los dos productos de degradación. Este hecho no preocupa demasiado ya que en este caso se cuantifica el DP-6 por exceso.

d. Temperatura

No se observa ningún tipo de degradación ni en HQ ni en KA después de su exposición directa en estado sólido a 105 °C durante 48 horas (Figura 10.5.36 y 10.5.37). Los resultados obtenidos no son coherentes con los resultados obtenidos en la

degradación forzada llevada a cabo en el desarrollo del método de HPLC *stability-indicating* para HQ (ver capítulo 10.1, apartado 10.1.4.3.II.f). Tampoco es coherente con la información bibliográfica encontrada para el KA que lo etiqueta como inestable a altas temperaturas a largo plazo [62, 67, 222]. La única explicación plausible es que a las 48 horas de exposición a 105 °C no se haya alcanzado la energía de activación necesaria para que una reacción empiece a transcurrir. En el caso de la HQ, a los 5 días si se ha alcanzado la energía de activación y la velocidad de reacción sea elevada según la ecuación de Arrhenius [128].

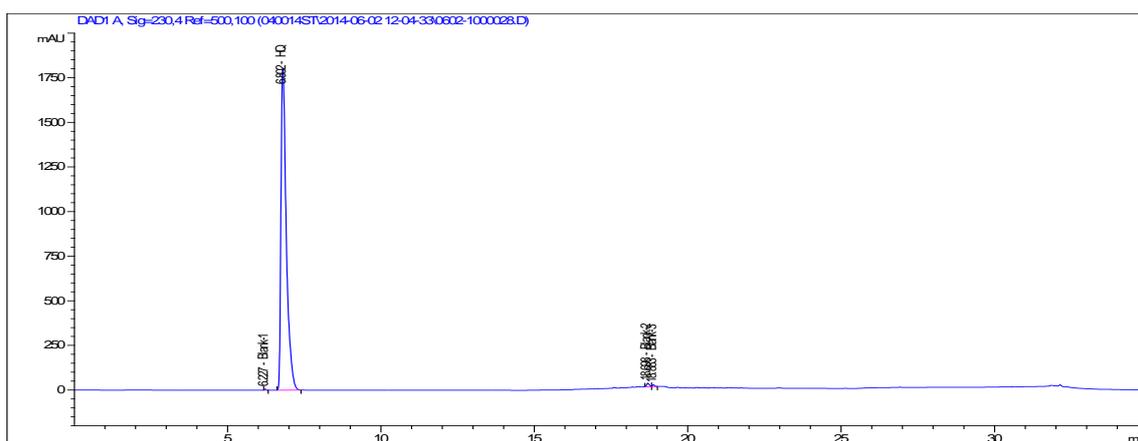


Figura 10.5.36 Cromatograma de la HQ estresada en estado sólido a 105 °C durante 48 horas

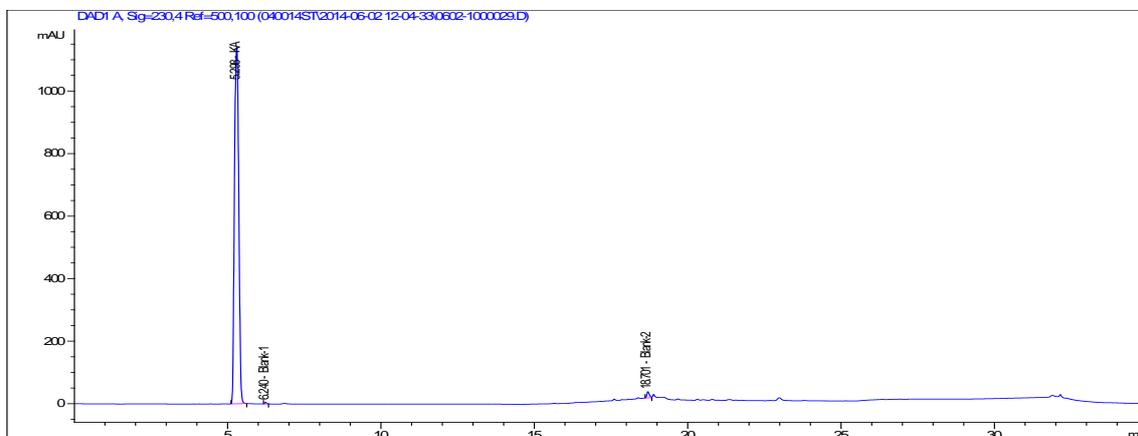


Figura 10.5.37 Cromatograma de la KA estresado en estado sólido a 105 °C durante 48 horas

En la degradación forzada realizada para el desarrollo del método de HPLC *stability-indicating* para HQ se observó que no había conciliación en el balance de masas indicando que parte de la HQ se degradaba a compuestos no-cromofóricos de bajo peso molecular ya que no se detectó ni en el detector UV-Visible ni en el MS en el rango de detección se había establecido en 90 Da. Probablemente es lo que pasa en la degradación actual.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Sin embargo, en el cromatograma correspondiente al DPK si se observa una degradación significativa formándose el producto de degradación DP-6 de forma mayoritaria (Figura 10.5.37). Este hecho tampoco es coherente con los datos bibliográficos encontrados que dotan al DPK de una mayor estabilidad que el KA frente a la temperatura [62].

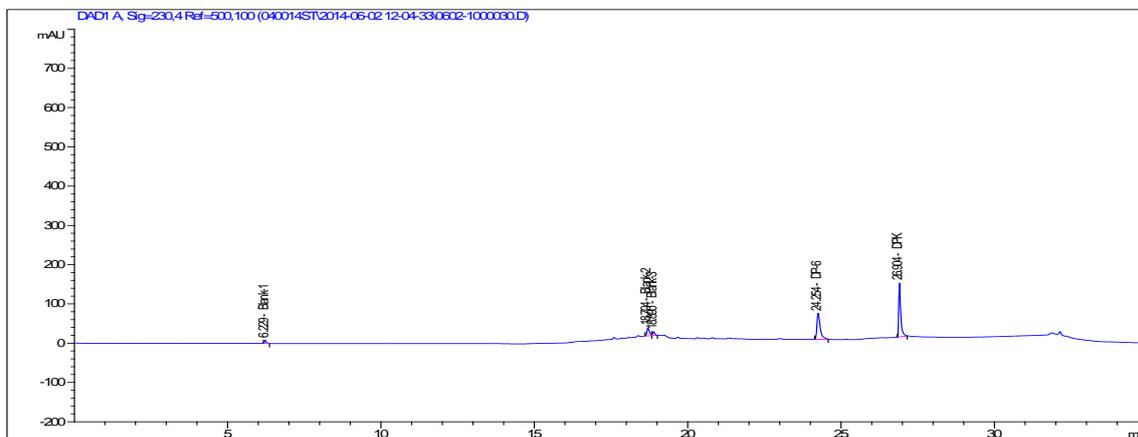


Figura 10.5.38 Cromatograma del DPK estresado en estado sólido a 105 °C durante 48 horas

Tampoco se observa ningún tipo de degradación en el placebo (Figura 10.5.39) ya que solo se detectan los picos correspondientes a la FM, mientras que si se observa la aparición de un perfil de productos de degradación significativos en el cromatograma de la crema estresada 48 horas a 105 °C (Figura 10.5.40). Se observan los productos de degradación mayoritarios DP-5 (15,65 min) y DP-6 (24,07 min). También se observan una serie de productos de degradación minoritarios, inferior al 0,5%, tales como DP-14, DP-15, DP-16, DP-2 y DP-17 que eluyen a los tiempos de retención de 14,90 min, 16,70 min, 18,33 min, 21,45 min y 27,07 min, respectivamente.

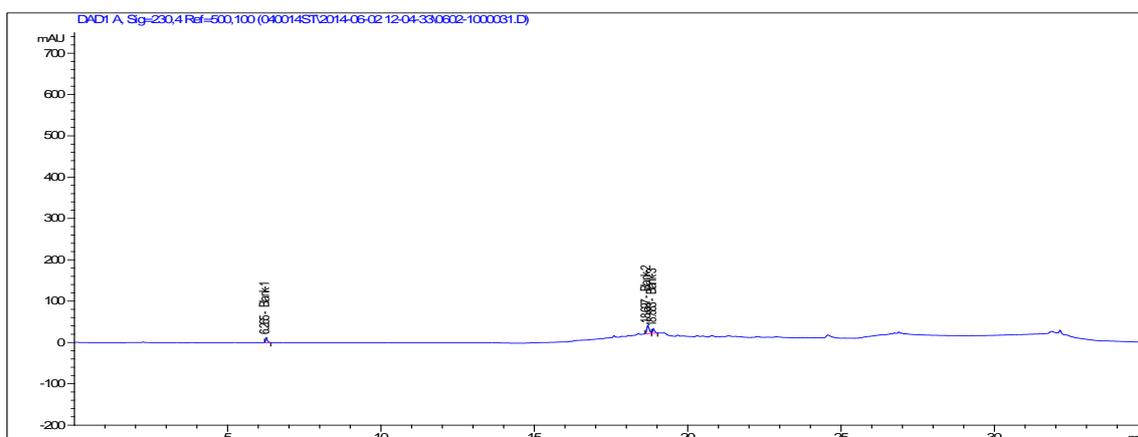
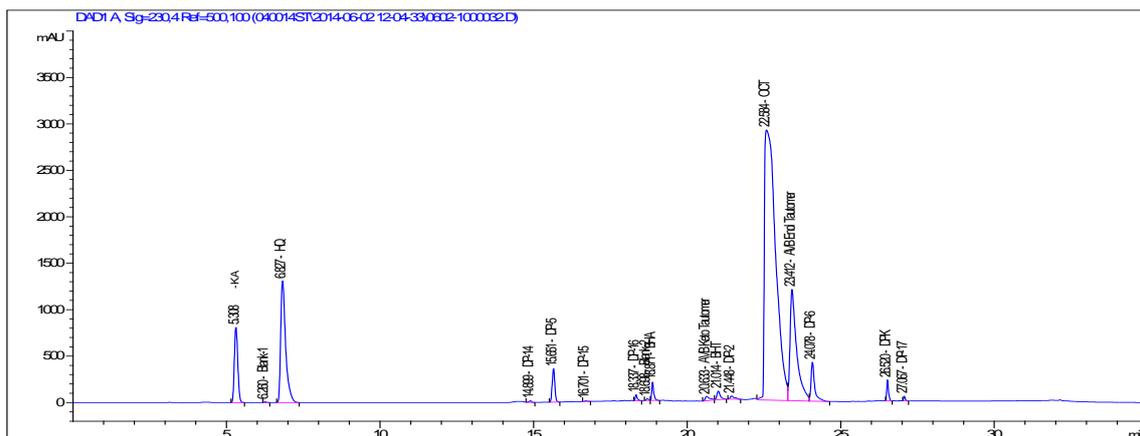


Figura 10.5.39 Cromatograma del placebo estresado en estado sólido a 105 °C durante 48 horas

a)



b)

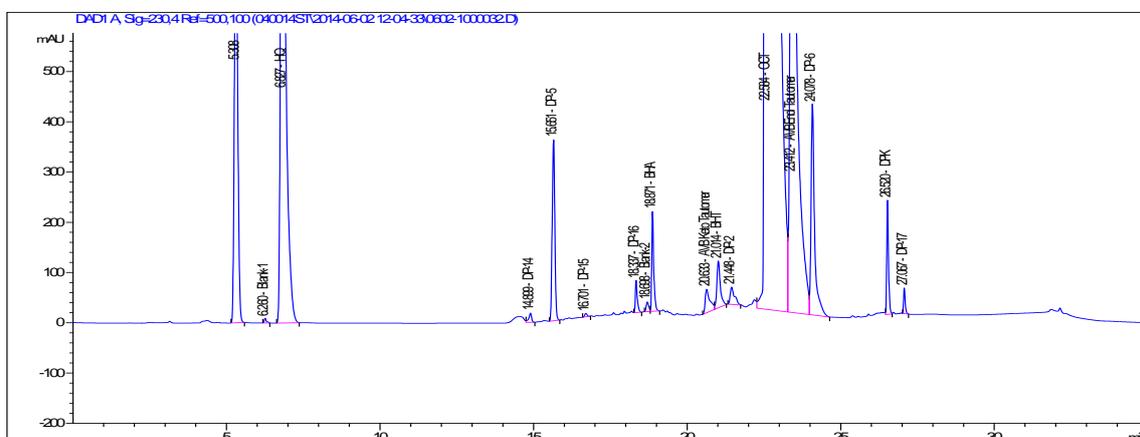


Figura 10.5.40 Cromatograma de la crema estresada

(a) en estado sólido a 105 °C durante 48 horas y (b) ampliación del cromatograma

Los productos de degradación formados a lo largo de todo el estudio de degradaciones forzadas son los que se resumen en la Tabla 10.5.6.

Como en cualquier medicamento contenga una combinación de dos o más APIs, el contenido en los productos de degradación se calcula frente al compuesto del que proceden [215,216].

En este caso, evaluando toda la información y conocimiento adquirido a lo largo las diferentes etapas del desarrollo de la crema y de los resultados generados por el estudio de degradaciones forzadas realizado se decide tratar cada uno de los productos de degradación o sustancias relacionadas como productos de degradación desconocidos y calcular su contenido frente a HQ excepto para DP-6 (producto de degradación procedente de DPK).

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

- El DPK tiene un factor respuesta mucho más bajo que el resto de APIs. Los productos de degradación procedentes del DPK – DP-6 –se cuantificarán respecto a DPK ya que si no se estaría cuantificando por defecto y se podría considerar correcto un resultado que no lo fuera.
- El resto de productos de degradación se trataran como sustancias relacionadas desconocidas y se cuantificarán frente a HQ ya que su factor respuesta es menor que el de KA. Por tanto, si se cuantifica los productos de degradación procedentes de KA de esta forma, su resultado será por exceso, nunca por defecto.

Tabla 10.5.6 Resumen de los productos de degradación generados durante el estudio de degradación forzada

Nombre	t _R (min)	Procedencia	Medio degradante	Observaciones
DP-1	20,27	AVB/OCT	AC	-
DP-2	21,37	AVB/OCT	AC	-
		Crema	OX	-
DP-3	24,06	OCT	AC, OX	-
DP-4	22,77	AVB	AC	Coeluye con el pico de OCT
DP-5	15,59	Crema	AC, OX	-
DP-6	24,14	DPK	ALC, OX, TEMP	-
		Crema	ALC, OX	-
DP-7	5,35	HQ	ALC	-
DP-8	6,39	HQ	ALC	-
DP-9	22,93	HQ	ALC	-
DP-10	16,09	Crema	ALC	-
DP-11	17,05	Crema	ALC	-
DP-12	17,83	Crema	ALC	-
DP-13	18,37	OCT	ALC	-
DP-14	14,89	Crema	TEMP	-
DP-15	16,70	Crema	TEMP	-
DP-16	18,33	Crema	TEMP	-
DP-17	27,06	Crema	TEMP	-
DP-18	25,33	Crema	TEMP	-
DP-19	25,86	Crema	TEMP	-
DP-20	26,52	Crema	TEMP	-
DP-21	27,06	Crema	TEMP	-

II. Linealidad

Para demostrar que el método es lineal se prepara una linealidad conjunta para todos los compuestos en estudio en el rango de concentraciones comprendido entre 20 y 150% de la concentración nominal. Se preparan 7 soluciones patrón inyectándose por triplicado: 20%, 30%, 50%, 75%, 100%, 120% y 150%.

Las áreas de los picos de cada uno de los compuestos se representan frente a la concentración estableciéndose, de esta forma, los intervalos en que son lineales. Se realiza una regresión lineal por mínimos cuadrados tal y como se muestra en la Tabla 10.5.7. Las representaciones gráficas de las linealidades de cada uno de los compuestos se muestran en la Figuras 10.5.41 a 10.5.43 según el contenido de cada compuesto en la formulación, es decir, en función de la concentración nominal. Se demuestra de esta forma que el método es lineal para cada uno de los compuestos en estudio.

Tabla 10.5.7 Resumen de los resultados de las linealidades de cada compuesto

<i>Area = a · Concentración + b</i>							
	HQ	KA	DPK	OCT	AVB	BHA	BHT
a	14908,80	17087,75	1512,81	30176,83	16603,51	12,82E+04	57037,45
b	-17,71	-8,98	4,28	-163,15	-0,35	0,76	-7,95
r	0,9997	0,9996	0,9998	0,9997	0,9999	0,9998	0,9997
r ²	0,9994	0,9992	0,9995	0,9995	0,9997	0,9995	0,9994

a: pendiente

b: ordenada en el origen

r: coeficiente de correlación

r²: coeficiente de determinación

En la Tabla 10.5.8 se muestra el resumen de los datos del factor respuesta (FR) y el rango de linealidad para cada uno de los compuestos. Todos los coeficientes de variación (RSD) de los factores respuesta son inferiores al 5,0% demostrando una relación lineal entre concentración y área.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.5.8 Resumen de los datos referentes al factor respuesta y el rango de linealidad para cada compuesto

	HQ	KA	DPK	OCT	AVB	BHA	BHT
Media	14928,48	17050,84	1542,23	30055,46	16615,65	1,28E+05	57270,48
SD	248,736	304,699	37,478	419,829	219,785	1712,132	1931,311
RSD	1,67	1,79	2,43	1,40	1,32	1,34	3,37
Rango*	20-150	20-150	20-150	20-150	20-150	20-150	30-150

*: expresado en % respecto a la concentración nominal

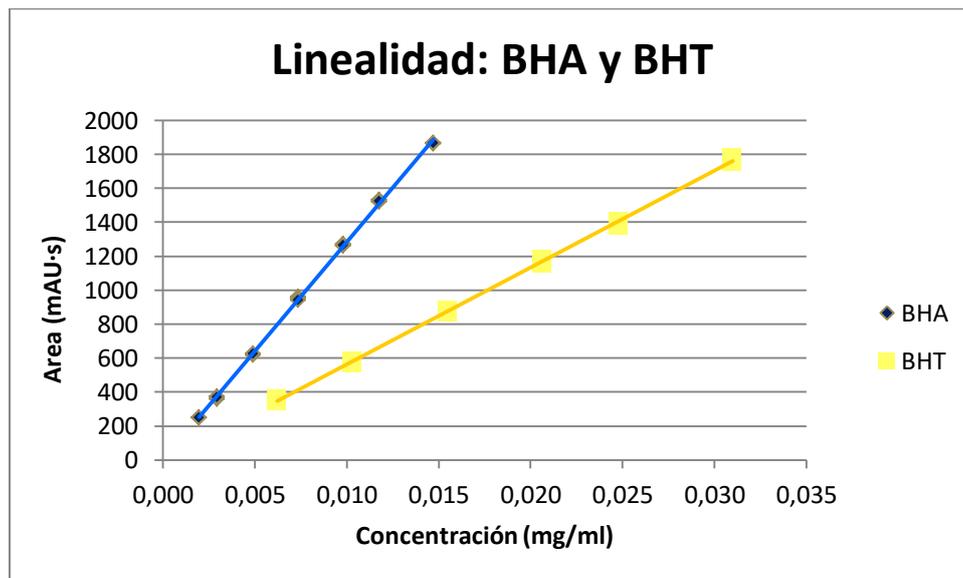


Figura 10.5.41 Representación gráfica de las linealidades de BHA y BHT

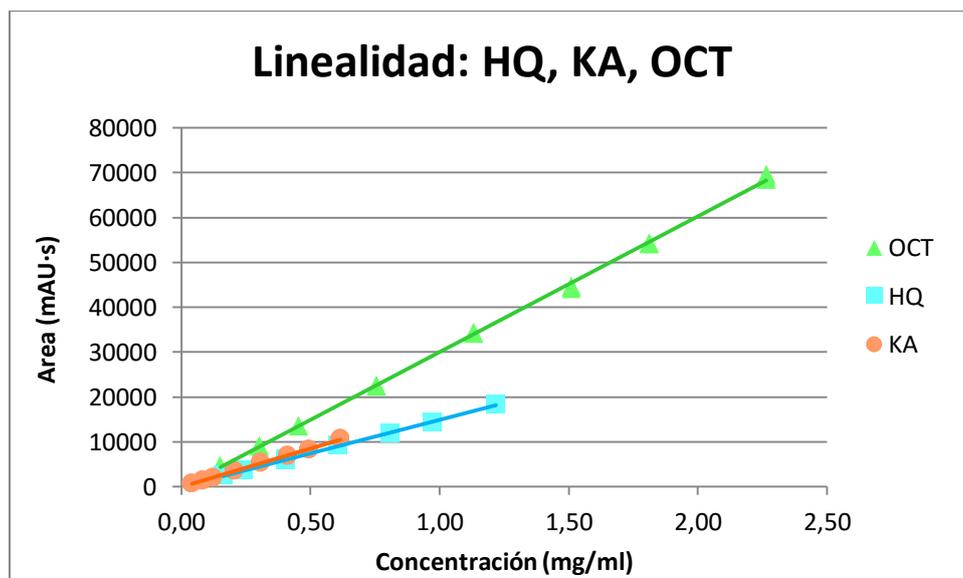


Figura 10.5.42 Representación gráfica de las linealidades de HQ, KA y OCT

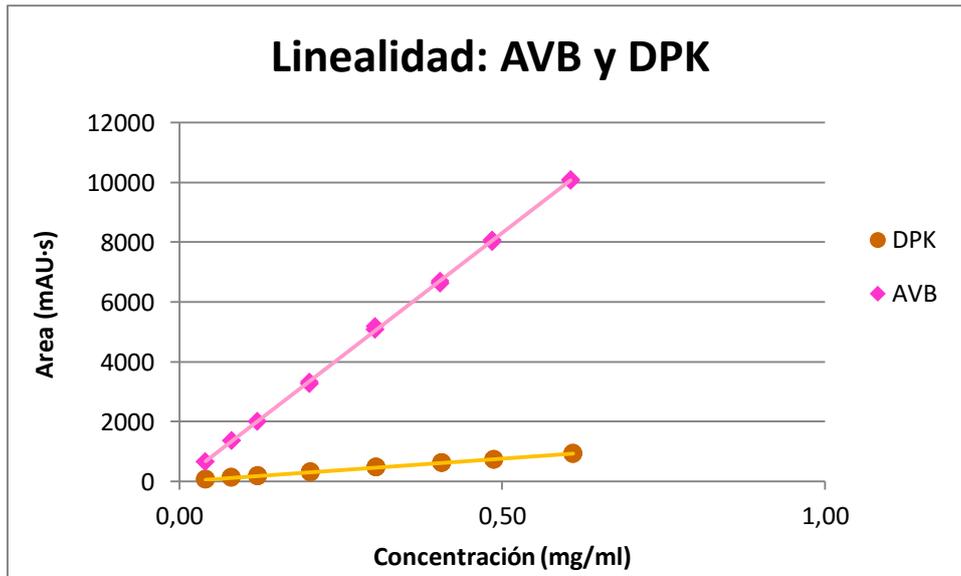


Figura 10.5.43 Representación gráfica de las linealidades de AVB y DPK

Se comprueba que las pendientes son significativamente diferentes de cero mediante la prueba t-Student. Además, se calculan los intervalos de confianza que no deben incluir el cero. (ver Tabla 10.5.9.)

Tabla 10.5.9 Significación estadística de la desviación estándar de las pendientes de cada compuesto

Test de la pendiente							
	HQ	KA	DPK	OCT	AVB	BHA	BHT
$t_a \text{ exp}^a$	186,044	173,410	221,736	205,060	285,406	200,952	163,323
$t \text{ tab}^b$	2,093	2,093	2,093	2,093	2,093	2,093	2,093
CA ^c	Cumple						
IC ^d	Cumple						

^a: valor de t-Student calculada experimentalmente

^b: valor de t-Student tabulado para $\rho:0,05$ y $(21-2=19)$ grados de libertad

^c: CA: Criterio de aceptación: $t_{a\text{-exp}} > t_{\text{tab}}$

^d: IC: Intervalo de confianza: no debe incluir el cero

Por otra parte, se comprueba que las rectas pasan por el origen de coordenadas mediante la prueba t-Student resultando que las ordenadas en el origen son estadísticamente igual a cero. También se determinan los intervalos de confianza que incluyen el cero (ver Tabla 10.5.10).

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.5.10 Significación estadística de la ordenada en el origen de cada compuesto

Test de proporcionalidad							
	HQ	KA	DPK	OCT	AVB	BHA	BHT
$t_a \text{ exp}^a$	-0,304	-0,264	1,834	-0,874	-0,018	0,136	-1,141
$t \text{ tab}^b$	2,093	2,093	2,093	2,093	2,093	2,093	2,093
CA ^c	Cumple						
IC ^d	Cumple						

^a: valor de t-Student calculada experimentalmente

^b: valor de t-Student tabulado para $\rho:0,05$ y $(21-2=19)$ grados de libertad

^c: CA: Criterio de aceptación: $t_a \cdot \text{exp} < t_{\text{tab}}$

^d: IC: Intervalo de confianza: debe incluir el cero

III. Precisión

a. Instrumental

Se realizan 6 inyecciones consecutivas de la solución patrón de trabajo para estudiar la precisión instrumental. Los coeficientes de variación obtenidos tanto para el estudio del tiempo de retención (t_R) como para las áreas se encuentran muy por debajo del límite establecido al inicio del estudio del 1,0%, por lo que se puede concluir que el instrumento utilizado es adecuado para el uso propuesto y que da valores repetitivos (Tabla 10.5.11).

Tabla 10.5.11 Resultados de la precisión instrumental para cada compuesto

Inyección	HQ		KA		DPK	
	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área
1	6,595	12645,70000	5,208	7686,46973	26,899	662,64014
2	6,593	12663,60000	5,206	7684,54688	26,901	662,81525
3	6,591	12700,90000	5,207	7694,94434	26,895	669,67224
4	6,602	12712,80000	5,218	7688,20557	26,898	669,16382
5	6,607	12745,60000	5,222	7690,01807	26,896	660,46400
6	6,609	12715,90000	5,222	7665,22900	26,901	669,55444
Media	6,600	12697,41667	5,214	7684,90227	26,898	665,71832
SD	0,008	36,688	0,008	10,272	0,003	4,189
RSD	0,11	0,29	0,15	0,13	0,01	0,63

Tabla 10.5.11 Resultados de la precisión instrumental para cada compuesto (continuación)

Inyección	OCT		AVB	
	t _R (min)	Área	t _R (min)	Área
1	22,554	45434,1	23,411	6848,85596
2	22,562	45364,0	23,421	6848,45459
3	22,554	45710,7	23,412	6889,69580
4	22,553	45869,0	23,412	6905,25830
5	22,573	46022,5	23,434	6895,31641
6	22,578	46299,8	23,439	6936,18213
Media	22,562	45783,35000	23,422	6887,29387
SD	0,011	356,190	0,012	33,967
RSD	0,05	0,78	0,05	0,49

Tabla 10.5.11 Resultados de la precisión instrumental para cada compuesto (continuación)

Inyección	BHA		BHT	
	t _R (min)	Área	t _R (min)	Área
1	18,767	1332,83191	20,903	1193,74219
2	18,771	1330,33057	20,912	1198,20532
3	18,769	1333,85107	20,905	1203,04236
4	18,772	1319,07080	20,907	1205,16833
5	18,773	1338,69885	20,916	1209,24536
6	18,773	1341,83411	20,917	1216,30798
Media	18,771	1332,76955	20,910	1204,28526
SD	0,002	7,901	0,006	7,995
RSD	0,01	0,59	0,03	0,66

b. Repetibilidad

Para estudiar la repetibilidad del método se realizan tres análisis completos e independientes entre sí –pesadas diferentes tanto de patrones como de muestras – de forma consecutiva según el procedimiento descrito en el Anexo V de una misma alícuota homogénea del lote de crema A02. Según el procedimiento, se preparan por duplicado tanto la solución patrón como la solución problema y se sigue la secuencia de inyección descrita en el apartado 10.5.3.1.III.b.

En la Tabla 10.5.12 se presentan los resultados de la repetibilidad para cada uno de los compuestos cumpliendo con el criterio de aceptación establecido: $RSD \leq 2,0\%$.

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.5.12 Resultados repetibilidad del método

Análisis	Problema	HQ	KA	DPK	OCT	AVB	BHA	BHT
A1	P1	98,22	99,56	102,52	99,51	99,39	100,54	100,77
	P2	100,32	99,22	100,76	99,99	98,88	100,57	101,49
A2	P3	100,86	99,94	100,79	100,08	98,09	101,28	99,75
	P4	101,00	99,88	100,53	100,48	99,57	101,02	97,67
A3	P5	99,33	100,31	100,96	100,36	100,16	101,53	101,14
	P6	102,67	103,51	101,04	98,44	101,17	103,56	102,62
Media		100,4	100,4	101,1	99,8	99,5	101,4	100,6
DS		1,52	1,57	0,72	0,75	1,06	1,12	1,70
RSD		1,52	1,56	0,71	0,75	1,06	1,10	1,69
Criterio de aceptación				RSD ≤ 2,0%				

c. Precisión intermedia

Se realizan tres análisis completos e independientes entre sí, de la misma forma que en la repetibilidad, bajo distintas condiciones operacionales: un día distinto, analista distinto, HPLC distintos y diferente lote de columna cromatográfica.

Los resultados cumplen con los criterios de aceptación preestablecidos tal y como se muestra en la Tabla 10.5.13.

Tabla 10.5.13 Resultados de la precisión intermedia para cada uno de los compuestos

HPLC	Analista	Día	Columna	Análisis	Problema	HQ	KA	DPK
CQ51	A	Día 1	270	A1	P1	98,22	99,56	102,52
					P2	100,32	99,22	100,76
				A2	P3	100,86	99,94	100,79
					P4	101,00	99,88	100,53
				A3	P5	99,33	100,31	100,96
					P6	102,67	103,51	101,04
CQ33	B	Día 2	272	A4	P7	100,07	101,19	102,29
					P8	99,46	98,83	100,61
				A5	P9	98,88	99,67	100,39
					P10	101,93	100,38	101,57
				A6	P11	100,59	97,52	99,23
					P12	97,16	99,93	99,46
Media						100,04	99,99	100,85
SD						1,545	1,429	0,970
RSD						1,54	1,43	0,96
2·RSD						3,04	3,12	1,42

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.5.13 Resultados de la precisión intermedia para cada uno de los compuestos (continuación)

HPLC	Analista	Día	Columna	Análisis	Problema	OCT	AVB	BHA	BHT	
CQ51	A	Día 1	270	A1	P1	99,51	99,39	100,54	100,77	
					P2	99,99	98,88	100,57	101,49	
				A2	P3	100,08	98,09	101,28	99,75	
					P4	100,48	99,57	101,02	97,67	
				A3	P5	100,36	100,16	101,53	101,14	
					P6	98,44	101,17	103,56	102,62	
CQ33	B	Día 2	272	A4	P7	99,73	100,25	102,22	100,39	
					P8	99,94	99,63	101,62	102,06	
				A5	P9	100,36	97,54	101,03	102,47	
					P10	98,44	98,13	100,64	101,63	
				A6	P11	98,38	99,85	99,28	99,89	
					P12	97,50	98,43	99,61	100,28	
						Media	99,43	99,26	101,08	100,85
						SD	0,987	1,065	1,132	1,386
						RSD	0,99	1,07	1,12	1,37
						2·RSD	1,51	2,13	2,20	3,39

IV. Exactitud

Las soluciones para evaluar la exactitud del método se preparan por triplicado, a 500 mg de placebo se añade una cantidad conocida de cada uno de los compuestos en estudio equivalente al 50%, 100% y 150% de la concentración nominal. Cada una de las soluciones se inyecta por duplicado siguiendo la secuencia descrita en el *apartado 10.5.3.1.IV*. Se cuantifica el contenido de cada compuesto utilizando la media del factor respuesta de las dos soluciones patrón de trabajo.

Las recuperaciones de todos los compuestos están incluidas en el intervalo de 100 ± 3%, tanto para la recuperación en cada nivel como para la recuperación global (calculada para las nueve determinaciones) como se muestra en la Tabla 10.5.14. La independencia del factor concentración con respecto a la varianza de los resultados se comprueba mediante la aplicación del test de Cochran. Y además, se demuestra mediante la prueba t-Student que no hay diferencia significativa entre los resultados de recuperación obtenidos y el teórico 100% (Tabla 10.5.15).

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.5.14 Resultados de la recuperación para cada uno de los compuestos en estudio

Compuestos	Nivel: 50%		Nivel I: 100%		Nivel: 150%		Global	
	Rec *	RSD	Rec *	RSD	Rec *	RSD	Rec *	RSD
HQ	100,34	0,43	100,12	0,97	100,16	1,34	100,21	0,86
KA	100,76	1,87	100,97	1,88	100,51	1,77	100,75	1,61
DPK	98,57	1,60	99,74	0,25	100,39	1,13	99,57	1,29
OCT	100,25	1,37	99,05	1,58	100,86	1,00	100,05	1,40
AVB	99,86	1,67	103,37	1,79	100,12	1,51	101,12	2,21
BHA	101,50	1,45	99,92	1,71	99,85	1,62	100,42	1,60
BHT	99,81	1,26	100,80	1,00	100,04	0,45	100,21	0,95

*Rec: Recuperación (%)

Tabla 10.5.15 Análisis estadístico de la exactitud

Compuestos	Test de Cochran ^{a,b}		Test de Student ^{a,b}	
	G _{EXP}	G _{TAB}	t _{EXP}	t _{TAB}
HQ	0,614		-0,717	
KA	0,350		-1,392	
DPK	0,618		1,007	
OCT	0,458	0,871	-0,110	2,306
AVB	0,403		-1,517	
BHA	0,378		-0,792	
BHT	0,567		-0,680	
Criterios de aceptación	G _{EXP} < G _{TAB}		t _{EXP} < t _{TAB}	

^a $\rho=0,05$

^b degree of freedom=8

V. Robustez

La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros cromatográficos, proporcionando idea de su fiabilidad durante su empleo en rutina [129].

Se estudia la robustez del tipo de columna, inyectándose en el HPLC en las siguientes dos columnas, iguales pero de distinto número de lote:

- Pursuit XRs 3 Diphenyl 5 μm . 200 Å, 4,6 x 150 mm, n° lote 468800, código 270
- Pursuit XRs 3 Diphenyl 5 μm . 200 Å, 4,6 x 150 mm, n° lote 468802, código 272

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Los resultados obtenidos con las dos columnas se sometieron a análisis estadístico mediante la prueba t-Student suponiendo varianzas iguales (comprobado previamente mediante la prueba F de Snedecor-Fischer para varianzas). Para todos los compuestos se cumple que el t calculado es menor que el t crítico (2,776. contraste de dos colas), entonces la hipótesis nula se toma como cierta y las dos medias muestrales no difieren significativamente (Tabla 10.5.16). Se usa un contraste de dos colas ya que no interesa el sentido en que difieren las medias (es decir si la diferencia es positiva o negativa).

Tabla 10.5.16 Análisis estadístico de la robustez de la columna

	HQ		KA		DPK	
	C-270	C-272	C-270	C-272	C-270	C-272
Media	99,47	99,48	99,94	100,27	101,42	101,51
Varianza	1,76	0,99	0,14	0,54	0,90	0,17
Observaciones	3	3	3	3	3	3
Varianza agrupada	1,375		0,338		0,537	
Dif. hipotética de las medias	0		0		0	
Grados de libertad	4		4		4	
Estadístico t	-0,008		-0,712		-0,146	
P(T<=t) una cola	0,497		0,258		0,445	
Valor crítico de t (una cola)	2,132		2,132		2,132	
P(T<=t) dos colas	0,994		0,516		0,891	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776		2,776		2,776	

CAPÍTULO 10: DESARROLLO y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tabla 10.5.16 Análisis estadístico de la robustez de la columna (continuación)

	OCT		AVB		BHA		BHT	
	C-270	C-272	C-270	C-272	C-270	C-272	C-270	C-272
Media	99,98	99,65	99,21	99,46	99,98	99,23	100,55	100,86
Varianza	0,19	0,98	1,09	0,34	0,19	0,58	0,52	0,30
Observaciones	3	3	3	3	3	3	3	3
Varianza agrupada	0,582		0,717		0,383		0,411	
Dif. hipotética de las medias	0		0		0		0	
Grados de libertad	4		4		4		4	
Estadístico t	0,531		-0,359		1,499		-0,585	0,531
P(T<=t) una cola	0,312		0,369		0,104		0,295	0,312
Valor crítico de t (una cola)	2,132		2,132		2,132		2,132	2,132
P(T<=t) dos colas	0,624		0,738		0,208		0,590	0,624
Valor crítico de t (dos colas)	2,776		2,776		2,776		2,776	2,776

VI. Estabilidad de la solución

Los valores de RSD para el ensayo de estabilidad de la solución cumplen el criterio de aceptación de $RSD \leq 1,5\%$ y la variación relativa entre la primera y la última inyección, en ningún caso, es superior al 2,0% (Tabla 10.5.17 y 11.5.18). Por tanto, no se observan cambios significativos en el área de los compuestos bajo estudio. Todos los datos obtenidos en el estudio de estabilidad tanto de la solución patrón como de la solución problema sugieren que dichas soluciones pueden ser guardadas sin ninguna degradación durante 48 horas a 20 °C.

Tabla 10.5.17 Variaciones de la solución patrón durante el estudio de estabilidad

	HQ	KA	DPK	OCT	AVB	BHA	BHT
RSD	0,61	0,28	0,88	0,40	1,03	0,81	0,79
Varianza relativa	0,63	0,62	1,78	0,83	1,05	1,85	1,57

Tabla 10.5.18 Variaciones de la solución problema durante el estudio de estabilidad

	HQ	KA	DPK	OCT	AVB	BHA	BHT
RSD	0,38	0,42	0,95	0,31	0,60	0,67	1,24
Varianza relativa	0,84	0,64	1,82	0,73	1,36	1,51	1,28

10.5.5. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado y optimizado un método de RP-HPLC para la determinación simultánea de los siete compuestos en estudio (HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA y BHT) y sustancias relacionadas en 35 minutos.
- Se ha llevado a cabo el estudio de degradaciones forzadas con el método de RP-HPLC desarrollado, obteniéndose un listado de productos de degradación a tener en cuenta durante el estudio de estabilidad.
- El proceso de extracción es simple obteniéndose unos buenos resultados en la recuperación de todos los compuestos.
- El método ha sido validado mostrando unos datos satisfactorios en cuanto a selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez y estabilidad de la solución.
- El método ha sido aplicado satisfactoriamente para llevar a cabo el estudio de estabilidad según ICH.

DISCUSIÓN GLOBAL

DISCUSIÓN GLOBAL

Durante las últimas décadas, uno de los temas más importantes de I+D en cosmética y dermatología es el centrado en los trastornos de hiperpigmentación. Uno de estos trastornos de la piel, se conoce como melasma y, se presenta como una erupción oscura y con bordes irregulares de la piel de la cara. La terapia consiste en la gestión de varios procesos que deben ser controlados y minimizados: protección frente a la radiación solar, inhibición de la actividad de los melanocitos y la síntesis de melanina. Hay varias opciones de tratamiento disponibles tópica; el más común de los cuales es un amplio espectro (UVA + UVB) protector solar se usa en combinación con compuestos inhibidores de la tirosinasa [20,37]. Así, el objetivo de la tesis es desarrollar un nuevo medicamento de forma farmacéutica semisólida para el tratamiento del melasma.

En la primera etapa, la fase de preformulación, se inicia con la caracterización físico-química del principio activo seleccionado para la formulación del nuevo medicamento: HQ. Se analiza completamente según la monografía vigente descrita en USP-NF [45], cumpliendo todas las especificaciones establecidas. Adicionalmente, para determinar su idoneidad para ser introducido en el proceso de elaboración de una forma farmacéutica semisólida, se determina la distribución de tamaño de partícula demostrando que se trata de un lote de tamaño de partícula medio de 190,0 μm con una distribución centrada y homogénea. Por tanto, se verifica la idoneidad para ser introducido en el proceso de elaboración.

La fase de preformulación continúa con la realización del estudio de compatibilidad con excipientes que además también valora la compatibilidad con otras dos sustancias coadyuvantes del principio activo (HQ): KA y DPK.

Ninguno de los excipientes estudiados en el estudio de compatibilidad muestra una clara incompatibilidad química con la HQ. Algunas de las mezclas muestran interacciones de tipo físico debido a las diferencias físicas y de solubilidad entre los dos componentes de la mezcla. En el caso de la mezcla HQ:AVB, que muestra una ligera interacción química (alrededor del 5%) se estudian otras alternativas que son descartadas por falta de idoneidad en otros aspectos. Una degradación de HQ de alrededor de un 5% no es muy crítica si tiene en cuenta la proporción final de AVB en la formulación: 2,0%.

DISCUSIÓN GLOBAL

Los resultados obtenidos para las mezclas HQ:KA y HQ:DPK no muestran ningún tipo de interacción química, aunque la mezcla HQ:KA muestra una interacción física tal y como se observa en los DSC . Por tanto, la existencia de una interacción en estado sólido entre HQ y KA se debe tener en cuenta en la incorporación de éstos en la formulación. Por este motivo, aunque los dos APIs son introducidos en la misma fase de la emulsión (fase acuosa), su incorporación se realiza de forma individual e independiente.

En vista de los resultados de este estudio se decide desarrollar un medicamento con la triple combinación de sustancias despigmentantes: HQ, KA y DPK. La incorporación de DPK en la formulación implica que la forma farmacéutica seleccionada no puede ser un gel debido a la insolubilidad de DPK en agua. Además, debe ser cosméticamente aceptable y por tanto, la forma farmacéutica seleccionada es la crema (O/W).

Una vez concluida la primera fase de preformulación, el desarrollo del medicamento continúa con la fase de desarrollo de la formulación, la cual se inicia planteando una base estable según la práctica galénica habitual. La formulación preparada se coloca en condiciones de estabilidad y al cabo de un mes se observa que la crema adquiere un color que va desde el ligeramente amarillo al beige claro. Se plantea la hipótesis de que puede ser debido a la oxidación de algún componente de la fase oleosa, por lo que se plantea la incorporación de antioxidantes adecuados a la formulación. El desarrollo experimental demuestra que la incorporación de dicho antioxidantes es necesaria ya que se soluciona el problema planteado.

Por otra parte, se observó una ligera coloración amarilla alrededor del tapón del envase de la crema, tanto en la muestra conservada a 30 °C/65% HR como en la conservada a 55 °C, así como una ligera separación de fases a 55 °C. El hecho de que la coloración se forme alrededor del tapón hace pensar en que el factor desencadenante sea la presencia de oxígeno. Esto juntamente con las altas temperaturas tanto en la elaboración de la emulsión como de la conservación de las muestras, podrían dar lugar a la termo-oxidación del PLX [105,106]. Este hecho corrobora la importancia de añadir dos antioxidantes a la formulación, uno con características físico-químicas más polares (BHA) y otro con características físico-químicas más apolares (BHT).

A lo largo de la investigación desarrollada se observa que las muestras almacenadas a la condición de 55 °C presentan una ligera separación de fases. Para evitar la separación de fases, se decidió substituir el cosolvente inicial de la fase D, propilenglicol (PEG), por alcohol isopropílico (IA). Igualmente se decide aumentar la

cantidad de CA y de SLS para aumentar la viscosidad y disminuir la tensión superficial respectivamente. También se comprueba la importancia de la temperatura y tiempo de agitación en el proceso de emulsificación y la velocidad de enfriamiento de la emulsión para evitar la separación de fases.

Paralelamente se realiza un estudio bibliográfico sobre posibles incompatibilidades de alguno de los componentes de crema (PLE, EDTA, SMB, HQ y KA), ya que éstas pueden influir en el fenómeno de separación de fases. Por ejemplo, se ha descrito en la bibliografía la incompatibilidad de PLE con fenoles [109-111].

Los tensioactivos son moléculas anfifílicas que consisten en una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. Una de sus principales características en solución, es la formación de clústeres organizados de tamaño coloidal conocidos como micelas y que se forman por encima de una concentración denominada la concentración micelar crítica (CMC) siendo el resultado de un delicado equilibrio de fuerzas intermoleculares.

Un caso especial son los tensioactivos no iónicos, los cuales no contienen grupos funcionales ionizables, formados por grupos alcohol o éter (cabeza hidrofílica) y cadenas alifáticas (cola hidrofóbica). Su característica más importante en solución es que cuando se calienta exhibe un fenómeno de enturbiamiento perdiendo su solubilidad a determinada temperatura. Esta temperatura se conoce como punto de turbidez (CP) y las soluciones micelares se separan en dos fases: una fase rica y una fase pobre en tensioactivo. La separación es probablemente debido al fuerte aumento en el número total de micelas y la disminución de las repulsiones intermicelares. Esta disminución es consecuencia de la disminución de la solubilidad del tensioactivo. Así, el equilibrio entre las interacciones hidrófilas e hidrófobas es un factor importante que determina el punto de turbidez que depende de su estructura molecular así como de los aditivos, sustancias con las que están mezclados. Los aditivos modifican las interacciones entre tensioactivo y disolvente, en consecuencia modifican también la CMC, el tamaño de las micelas y el comportamiento de las fases de las soluciones.

En este caso el tensioactivo es el PLE – Brij 35: polioxietileno lauril éter-. La solubilidad acuosa de la cadena de polióxido de etileno se debe a la formación de enlaces puente de hidrógeno entre el solvente y el átomo de oxígeno del éter. Estos enlaces son sensibles a la temperatura haciendo que exista una temperatura a la que el grado de hidratación de la parte hidrofílica sea insuficiente para solubilizar la cadena alifática restante.

DISCUSIÓN GLOBAL

El punto de turbidez del PLE (118 °C [110]) es reducido por algunos de los componentes presentes en la fórmula, los compuestos fenólicos: HQ y KA, dos de los APIs. Esta reducción de la temperatura del punto de turbidez es debida a los enlaces de puente de hidrógeno entre los átomos de O del grupo éter y grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos. En este caso, este mecanismo se pone de manifiesto inestabilizando la crema, probablemente debido a la cantidad de PLE empleada y a la presencia de aire en la crema, ya que se encuentra suficientemente descrito que la presencia de aire en una emulsión es un factor que ayuda a su inestabilización y a la separación de fases, incluso en ausencia de otros factores de inestabilidad.

En consecuencia, para evitar la separación de fases se procede a cambiar de sistema emulgente, ya que parece ser uno de los factores que influyen en la inestabilización de la crema. En la fase oleosa se sustituye el CCT y el CA por un alcohol graso polioxietileno (Emulcire 61 WL 2659, EM) y monoestearato de glicerol (Estol 1474, GMS), respectivamente. En la fase acuosa, se sustituye el PLE por polisorbato 80 (Tween 80, T80) y monoestearato de polietilenglicol (Myrj 52, PGM). En consecuencia, se debe reducir la cantidad de WP y de LP. Y finalmente, el BHA se incorpora a la fase oleosa para aumentar el poder antioxidante. Adicionalmente, se decide incorporar el T20 que ha proporcionado una mayor robustez a todas las formulaciones debido al aumento de poder emulgente en la fase acuosa.

Finalmente se llega a un prototipo de formulación que cumple con los objetivos previstos (reología adecuada, estable, etc.) y su elaboración se escala a equipos semi-industriales disponibles en planta piloto elaborando un lote de 4 kg en el que se lleva a cabo un estudio preliminar de la estabilidad durante 6 meses. Los resultados de este estudio indican que la crema deberá conservarse por debajo de 25 °C, ya que los parámetros estudiados cambian a lo largo del tiempo en las muestras conservadas a 30 °C/65% HR y 40 °C/75% HR. Las muestras conservadas a 25 °C/60%HR mantienen sus características de calidad intactas durante 6 meses demostrando que se trata de la formulación suficientemente estable y por tanto, apta para ser llevada a escala industrial.

En la elaboración a escala industrial se observó la crema adquiría una coloración rosada no esperada. Ello supuso la revisión exhaustiva de todo el material de fabricación y se comprueba que el agitador de ancla del reactor RUC 200 es parcialmente de hierro. El hierro metálico tiene tendencia a oxidarse debido a su configuración electrónica ($1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^6$), la cual no tiene la capa de valencia llena. El potencial estándar de reducción del par Fe(II)/Fe es bajo, -0,44V; lo

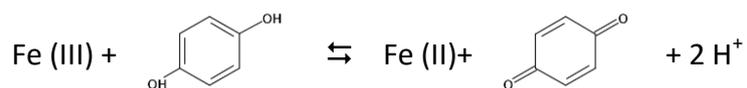
que indica que, en contacto con elementos que tengan un potencial estándar de reducción superior a éste, se oxidará. Por tanto, debe considerarse que en las palas del agitador hay cantidades considerables de Fe (II) y Fe (III).

Estas cantidades son demasiado grandes para ser acomplejadas por el EDTA, presente en la formulación con el objetivo de secuestrar posibles trazas metálicas, que se ve superado por tal concentración.

Por otro lado, el ácido kójico (5-Hidroxi-2-(hidroximetil)-4H-piran-4-ona) contiene una estructura específica de sideróforo la cual es capaz de secuestrar cationes de Fe(III) mediante la coordinación a través de los átomos de oxígeno del grupo carbonilo y del grupo fenol, formando el complejo Fe(III)- ácido kójico [114-117].

La formación de dicho complejo está favorecida debido a que su formación es pH-dependiente estando favorecida a pH ~ 5 (pH de la crema 5.5). Cuanto menor es el pH, menor es el grado de desprotonación del ácido kójico y por tanto, el proceso de complejación se da en menor grado [118]. Estos complejos son de color rojo, la variación del matiz del color depende tanto del pH como de la relación entre el ácido kójico y Fe (III) [119].

Además, debe tenerse en cuenta que otro de los componentes principales de la crema es la HQ, agente reductor, por el cual se reduce el Fe (III) a Fe (II) mediante la siguiente reacción:



Puesto que los iones Fe (III) se unen a estos ligandos de forma más fuerte que los aniones Fe (II). La reducción de estos aniones por parte de la HQ da como resultado una relativa pérdida de color e intensidad, motivo por el cual la crema fabricada es de color ligeramente rosa.

Para evitar toda la reactividad ocasionada por la presencia de Fe (III) y Fe (II), se procede a cambiar las palas del reactor por unas palas nuevas de acero inoxidable de calidad farmacéutica. Con ello se soluciona el problema observado, obteniéndose una crema de aspecto y color adecuados según especificación preestablecida. Así, la formulación obtenida en la producción industrial de la crema ha demostrado cumplir con los atributos de calidad establecidos a partir de la investigación galénica llevada a cabo.

DISCUSIÓN GLOBAL

Una vez realizado el escalado industrial con éxito, se procede a la fabricación de tres lotes industriales para realizar la validación del proceso de elaboración de la crema, estudiándose los parámetros siguientes: aspecto, viscosidad y valoración de los APIs.

Para cada uno de los parámetros estudiados se realiza el análisis estadístico y se presenta el gráfico de recorrido para evaluar si el proceso está bajo control estadístico. Es decir, que es un proceso estable y reproducible y que por tanto, generará una crema que cumplirá con las especificaciones.

Los gráficos de recorrido de las valoraciones de los 3 APIs muestran un proceso bajo control ya que sólo alguno de los resultados es cercano al límite de aviso ($\pm 2\sigma$) y ninguno sobrepasa el límite de alerta ($\pm 3\sigma$). Consecuentemente, los datos muestran unas cremas altamente homogéneas que cumplen con las especificaciones.

Se estudia también la denominada capacidad del proceso que verifica la aptitud que tiene éste para producir lotes de crema dentro de especificaciones. Para realizar este tipo de estudio el proceso de estar bajo control estadístico, los datos deben seguir una distribución normal y la muestra debe ser representativa. Anteriormente, se ha comprobado que el proceso está bajo control estadístico mediante los gráficos de control y se puede afirmar que la muestra es representativa.

En el estudio de capacidad se calcula el *índice de capacidad estándar*, C_p , que relaciona la diferencia entre los límites de la especificación y un múltiplo de la desviación estándar del parámetro estudiado asociado a la variabilidad del proceso. Si la media del parámetro estudiado no está centrado, C_p sobreestima la capacidad del proceso. Por este motivo también se calcula el *índice de capacidad unilateral*, C_{pk} , que se calcula cuando la media no está centrada y dará resultados negativos cuando la media se sitúe fuera de especificaciones. Los valores obtenidos para estos índices indican que el proceso de fabricación de la crema tiene una buena capacidad según el criterio general " *$C_{pk} < 1$ proceso pobre, $C_{pk} > 1.33$ proceso bueno y $C_{pk} > 2$ proceso excelente*" [119-120].

Igualmente se valida el proceso de envasado de la crema en tubos de HDPE de 30 g para lo cual se muestrea 20 tubos (6 inicio, 8 mitad y 6 final) para estudiar los parámetros siguientes: contenido efectivo del envase y control de la estanqueidad. El análisis estadístico efectuado (ANOVA de una vía), demuestra que no hay diferencias significativas entre los contenidos de los tubos de los diferentes lotes.

En resumen, todos los datos obtenidos en la validación han sido sometidos a tratamiento estadístico demostrando que el proceso está bajo control estadístico y los índices de capacidad del proceso calculados definen el proceso como bueno (no necesita mejora).

Los tres lotes industriales elaborados han sido sometidos al correspondiente estudio de control de calidad sobre producto terminado obteniendo en todos los casos, resultados experimentales dentro de las especificaciones establecidas. En consecuencia, los tres lotes son aptos y existe una correcta concordancia con la calidad de diseño.

Se ha efectuado la investigación de la estabilidad de la crema desarrollada aplicando las normativas ICH al respecto, ICHQ1A [136], para zona climática II. Para ello se ha almacenado una cantidad suficiente cantidad de tubos de crema de los tres lotes industriales elaborados en las siguientes condiciones de estabilidad: 25 °C/65% HR, 30 °C/65% HR y 40 °C/75% HR. El muestreo se realiza según ICH ICHQ1A [136]: 0, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses.

Los parámetros que son considerados críticos y que por tanto, son analizados durante el estudio de estabilidad son los siguientes: el aspecto de la crema, pH, viscosidad, extensibilidad, valoración del contenido de los APIs: HQ, KA y DPK, valoración del contenido en filtros solares: OCT y AVB, valoración de los antioxidantes: BHA y BHT, valoración del contenido en sustancias relacionadas y control microbiológico.

Los tres lotes estudiados (A01, A02 y A03) cumplen con todas las especificaciones propuestas para la liberación del lote a lo largo de 24 meses en la condición climática de 25 °C/60% HR, con excepción del contenido en BHA y BHT en que a partir de los 6 meses disminuyen cuantitativamente lo que obliga a establecer para ellos una nuevas especificaciones al tiempo de caducidad.

A 25 °C/60% HR se observa una disminución a lo largo de tiempo en la viscosidad que está relacionado con un aumento de la extensibilidad, mientras el aspecto de la crema se mantiene constante a lo largo de 24 meses.

Se observa una ligera disminución en el contenido de HQ y KA a lo largo del tiempo cumpliendo las especificaciones propuestas a lo largo del estudio.

Se observa una tendencia positiva en la sustancia relacionada individual y también en las sustancias relacionadas totales, aunque a los 24 meses se observan unos valores muy inferiores a los límites de las especificaciones propuestas.

DISCUSIÓN GLOBAL

En el resto de condiciones estudiadas, 30 °C/65% HR y 40 °C/75% HR, a lo largo del estudio se observa un cambio significativo en el aspecto: se da la separación de fases adquiriendo un color amarillento. Esto hace imposible la realización de los ensayos de viscosidad y extensibilidad en algunos puntos del estudio. Sin embargo, el contenido en los APIs, filtros solares y sustancias relacionadas cumplen con las especificaciones propuestas.

En vista de los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad se propone un periodo de validez de 2 años conservado a temperatura inferior a 25 °C y se propone establecer una nueva especificación de BHA y BHT al tiempo de caducidad: $\geq 50,0\%$ para BHA y $\geq 60,0\%$ para BHT.

Para poder llevar a cabo la investigación y desarrollo de un nuevo medicamento, muchas veces es necesario poner a punto nuevas metodías analíticas en función de los principios activos considerados, de la formulación desarrollada (excipientes) y de la forma farmacéutica finalmente establecida. El objetivo principal del análisis farmacéutico es asegurar y confirmar la calidad del producto terminado, que debe ser incorporada al mismo mediante un conocimiento profundo del producto desarrollado y de su proceso de elaboración, conociendo y minimizando los riesgos involucrados [223].

Así, se han desarrollado cinco nuevos métodos de análisis diferentes para la cuantificación de los principios activos, otros compuestos a controlar (antioxidantes y filtros solares) y sustancias relacionadas (impurezas y productos de degradación), cada uno de ellos adecuados a los objetivos de cada una de las fases de desarrollo farmacéutico de la crema despigmentante.

El objetivo principal del desarrollo de métodos en la etapa de preformulación, es obtener el conocimiento químico fundamental del API para facilitar la formulación del producto farmacéutico [121]. HQ es un compuesto fenólico cuya estructura se compone de un anillo de benceno con dos grupos alcohol en posición para. Es un ácido débil con un pKa: 10,33 y un compuesto muy polar con un log P: -0,62 [43]. Por otro lado, los excipientes considerados para formulaciones tópicas y que participan en el estudio de compatibilidad con excipientes tienen muy diferentes naturalezas. Entonces, el método desarrollado debe ser capaz de separar un gran número de compuestos que abarcan una amplia gama de polaridad: HQ, productos de degradación y excipientes. Así, se considera más apropiado desarrollar un método de fase reversa para lograr una adecuada retención de compuestos polares sin una

excesiva retención de los compuestos menos polares [140,144]. Con el fin de lograr una elución adecuada de esta amplia gama de compuestos, dos parámetros son críticos: la fase móvil y la columna, ya que es un proceso de adsorción dinámica. Para estudiar estos dos parámetros en profundidad y evaluar la idoneidad de cada una de las opciones de forma correcta, se utiliza un gradiente de elución genérico (t (min) /% B: 0/10, 10/10, 30/90, 35 / 90, 40/10, y 45/10) a un flujo de 1,0 ml/min.

De las diferentes fases móviles estudiadas, se escoge la solución acuosa de ácido acético al 0,1% (v/v) como fase móvil acuosa porque proporciona mejor simetría de pico y además, es compatible con LC/MS. Como fase móvil orgánica se selecciona acetonitrilo porque la presión del sistema es menor. Por otra parte, se selecciona la columna Zorbax SB-phenyl porque proporciona una selectividad complementaria debido a las interacciones π - π producida entre los electrones π de la funcionalidad aromática de la fase estacionaria y los electrones π del anillo bencénico de la HQ [146,147].

Para obtener el conocimiento necesario acerca tanto del API como de su compatibilidad con excipientes, el método de HPLC desarrollado debe ser *stability-indicating*, es decir, se debe dar una separación cromatográfica adecuada de los productos de degradación generados y el pico correspondiente a HQ. Para ello se llevan a cabo los estudios de degradación forzada para HQ identificando cada uno de los productos de degradación formados por LC/MS.

La elección de las condiciones de degradación debe ser coherente con la descomposición de HQ. Los factores de degradación recomendados dependerán del tipo de API y/o del tipo de producto acabado incluyendo la hidrólisis a pH alto (medio básico) y pH bajo (medio ácido), oxidación, temperatura elevada y fotólisis [148-150]. HQ fue degradada a uno o dos productos de degradación en todas las condiciones de degradación estudiadas: DP-1 y DP-2.

La hidrólisis de fármacos en solución acuosa está gobernada por un comportamiento típico de una cinética de primer orden o, más bien, de pseudo-primer orden, ya que la concentración de medio básico está en gran exceso y se considera constante aunque participe en la reacción. Debido a la labilidad de la HQ en medio básico, se analiza la solución a diferentes intervalos de tiempo y se lleva a cabo el estudio cinético de la hidrólisis en medio básico a temperatura ambiente y a 40 °C. Los resultados mostraron que en la hidrólisis básica se forma un sólo producto de degradación principal: DP-1 y

DISCUSIÓN GLOBAL

se calculó su energía de activación, que fue de 7,59 kcal/mol, mediante una ecuación derivada de la ecuación de Arrhenius [157].

Para identificar los productos de degradación generados en las soluciones de degradación forzada se llevó a cabo el análisis de estas soluciones con la modificación del método para su extensión a los estudios de LC-MS/TOF.

Una vez seleccionada la forma de ionización, APCI negativo, los parámetros de MS fueron optimizados de forma adecuada para obtener información clara sobre el pico del ion molecular de HQ. En el espectro de masas correspondiente al pico de HQ se observa una señal principal con m/z : 108,0297, si bien al ampliar la zona también, se observa otra señal, de menor intensidad, de m/z : 109,0358.

HQ formalmente es un enol, compuesto que tiene un grupo hidroxilo unido a un carbono que a su vez está unido a otro carbono mediante un doble enlace. En general, los enoles son especies poco estables, por lo que el protón del grupo hidroxilo del alcohol migra al carbono vecino y el doble enlace pasa de ser $C=C$ a $C=O$. Este proceso es un equilibrio entre las dos formas, ceto y enol, con predominio de la forma ceto – forma más estable –, llamado equilibrio ceto-enólico. La cantidad de cada tautómero depende de su estabilidad relativa que viene afectada por la capacidad de formación de puentes de hidrógeno por parte del disolvente, una posible conjugación de los dobles enlaces o la formación de un puente de hidrógeno intramolecular [158]. En este caso, la HQ es disuelta en diluyente de muestras – mezcla (70:30) ACN:H₂O –, de carácter ligeramente ácido. En estas condiciones, el equilibrio está desplazado a una relación de 9 a 1 hacia la forma ceto, señal m/z 108,0297.

DP-1 es un producto de degradación primario formado en la hidrólisis en medio básico (Na₂CO₃ 0,02M) de forma mayoritaria y en la hidrólisis en medio ácido (HCl 1M y HCl 0,1M) de forma minoritaria. En el espectro de masas correspondiente al pico de DP-1 no se observa una única señal principal sino una serie de señales de m/z : 141,0014, 223,0274, 305,0403, 387,0521 y 469,0657, de distintas intensidades. La diferencia de m/z entre dos señales consecutivas se mantiene constante en toda la serie, siendo esta diferencia de $82,0161 \pm 0,0067$. Por tanto, las diferentes señales del espectro de masas corresponden a aductos entre la molécula de m/z 141,0014 y uno o varias moléculas de m/z 82,016.

Se identifica la molécula de m/z $82,0161 \pm 0,0067$, por comparación con los resultados obtenidos en la búsqueda en bases de datos, como (2Z)-1,4-dioxobut-2-en-2,3-diilo de fórmula empírica C₄H₂O₂. Y también se identifican las moléculas detectadas en el

espectro de masas del pico DP-1, de forma similar, buscando las fórmulas a las que puede corresponder cada una de las m/z . Para ello, se tiene en cuenta que la adquisición se realizó en APCI-negativo y, por tanto, a la m/z se le debe sumar 1,073 Da del protón perdido.

Del estudio del espectro de masas correspondiente a pico cromatográfico DP-1 se puede concluir que al detector de masas le llega este conjunto de moléculas, pero no puede conocerse su origen. Es decir, no se puede saber si este conjunto de moléculas existen en la solución de degradación forzada en medio básico o si se forman en la fuente de ionización a partir de la ruptura de la molécula de m/z 387,0521.

Para establecer su origen, se deberían realizar más experimentos tales como infundir la misma solución directamente al MS y comparar. Posteriormente analizar la solución por LC-MS/TOF con diferentes gradientes de elución o diferentes tipos de cromatografía y así, con el conjunto de datos obtenidos intentar deducir si estas moléculas provienen directamente de la solución o son fragmentos de una molécula más grande. La polimerización oxidativa de compuestos fenólicos en condiciones alcalinas ha sido reportada durante los últimos 80 años. Las condiciones alcalinas utilizadas en estos estudios fueron KOH o NaOH diluido que reacciona rápidamente con los fenoles dando como producto los aniones fenolato que en unas condiciones determinadas polimerizan [159-165]. Por este motivo, para realizar las degradaciones forzadas en medio básico se escogió Na_2CO_3 0,02M (pH \sim 11), solución básica más suave ya que los hidróxidos, además de ser soluciones básicas, son oxidantes potentes que junto con la HQ, compuesto reductor, reaccionan rápidamente.

Por otra parte, los fenoles, y en particular los fenoles polihidroxilados, en determinadas condiciones alcalinas, reaccionan formando productos con más grupos hidroxilo unidos al fenol inicial [155,165-166]. Este hecho podría explicar la formación del compuesto de m/z 141,0014 – 1,2,3,4-bencenotetrol –.

El producto de degradación DP-2 se forma, en mayor o menor proporción, en la mayoría de las soluciones de degradación forzada: medio ácido, neutro y oxidante, fotólisis, temperatura y humedad. Se analizan todas las señales del espectro de masas correspondiente al pico de DP-2, siendo la única que posee identidad cromatográfica la señal m/z : 108,0322. Ésta corresponde a la fórmula empírica de $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$, cumpliendo con la distribución isotópica.

Se analiza toda la información disponible tanto del espectro de MS como del espectro UV-Visible y se elucida que el compuesto DP-2 es *p*-benzoquinona de masa molecular

DISCUSIÓN GLOBAL

media de 108,095 Da. Por tanto, el valor de la masa molecular media coincide con el valor de m/z . En consecuencia, esta fórmula molecular corresponde a un ion radicalario molecular M^{\bullet} . La fuente de ionización APCI sirvió como fuente de electrones térmicos, de baja energía, generados cuando los electrones creados en la aguja de descarga de la corona interactúan con el gas nebulizador [167]. Los iones radicalarios moleculares se producen por un mecanismo de captura de electrones atribuido al bajo potencial redox de las quinonas y la estabilización del electrón desapareado por resonancia [168]. La formación de iones radicalarios negativos ($M^{\bullet-}$) de quinonas ha sido reportado tanto en ESI [168] como en APCI [169] así como su correlación con los potenciales redox [170].

El método desarrollado fue validado, con éxito, según la guía ICH Q2 [129] evaluándolo con respecto a la selectividad, linealidad, precisión, exactitud y estabilidad de la solución.

En la etapa de desarrollo de la formulación es necesario disponer de métodos analíticos adecuados para evaluar la idoneidad de los prototipos de formulación que se realizan y así, tener una información clara sobre qué cambios realizar para conseguir un prototipo con las características adecuadas. Las prestaciones del método analítico deben ser adecuadas a las características de esta fase: rapidez. Debido a la cantidad de prototipos a analizar, el método debe ser corto [176]. Por tanto, el método desarrollado para llevar a cabo la fase de preformulación, de 50 minutos de tiempo de análisis (*runtime*), debería optimizarse.

Debido a la naturaleza extremadamente distinta del DPK, compuesto altamente apolar y de peso molecular elevado, y a la diferencia de contenidos de cada uno de los componentes de la crema a controlar (APIs: HQ, KA y DPK; antioxidantes: BHA y BHT y filtros solares: OCT y AVB), se evaluaron todas las opciones cromatográficas disponibles para determinar si alguno de los tipos de cromatografía era adecuado para determinar los 7 compuestos simultáneamente en un tiempo de ejecución medio o corto. La elución del conjunto de compuestos de polaridad tan diversa en un tiempo de cromatograma relativamente corto fue valorado como muy difícil. Por tanto, se decidió desarrollar dos métodos cromatográficos distintos: uno para la determinación de DPK y otro para el control del resto de compuestos a controlar (HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT).

Con el objetivo de seleccionar un disolvente adecuado para extraer y disolver el DPK de la crema y evaluar el tipo de cromatografía a utilizar para su análisis, se realiza un

estudio de solubilidad en el que se incluyeron los siguientes disolventes: tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo (ACN), hexano (HEX), dimetilsulfóxido (DMSO), ciclohexano (CHX), diclorometano (DCM), metanol (MeOH), alcohol bencílico (ABC) y 2-metil-1-propanol (MPR). Mezclas acuosas de estos disolventes se descartan debido a la naturaleza apolar del DPK – log P: 14,0 –. De todos los disolventes estudiados, los únicos capaces de disolver el DPK son el THF y el DCM. De estos, el THF también solubiliza toda la matriz de la crema mientras que con el DCM se obtiene una suspensión. Por tanto, se escoge como disolvente de la muestra el THF ya que se evita la introducción de una etapa de centrifugación necesaria en el caso del DCM para separar el disolvente de las partículas en suspensión.

Se realiza una búsqueda bibliográfica en la que se encuentra una patente china de un método de RP-HPLC isocrático que utiliza una columna μ Bondpack C18 (10 μ m) 3,9 x 300 mm a 35 °C con una fase móvil 25/75 THF/MeOH [177]. También se encuentra una tesis doctoral en la que se describe un método de RP-HPLC isocrático en una columna Luna C 18 (5 μ m) 150 x 4,6 mm con una fase móvil compuesta por (35:30:29:5:1) THF:ACN:MeOH:H₂O:HAcO de duración aproximada de unos 15 minutos [178]. Aunque los métodos hallados podrían ser válidos para la determinación de DPK presente en los prototipos, se decide desarrollar un método distinto, más corto, aprovechando el hecho de su elevado peso molecular (Pm: 618,93 g/mol).

El DPK es el éster dipalmítico del ácido kójico siendo las dos cadenas palmitato (C₁₆) las que confieren a la molécula su carácter apolar, log P: 14,0. Esto le confiere un carácter liposoluble y en consecuencia, prácticamente insoluble en medios acuosos. Para moléculas pequeñas y solubles en disolventes orgánicos, especialmente en THF, una opción cromatográfica a contemplar es el análisis por cromatografía de permeación en gel (PGC). En GPC, las moléculas pequeñas penetran en los poros de las partículas de gel, por lo que necesitan más tiempo para salir al final de la columna. Las moléculas grandes, en cambio, al no penetrar en las partículas de gel se mueven con el disolvente a una velocidad mayor de elución y salen antes de la columna [180-181].

Dado que el DPK presenta un peso molecular y un volumen hidrodinámico – volumen efectivo ocupado por las cadenas de la molécula en disolución – mucho más alto que el resto de componentes de la crema, se desarrolla un método de GPC [182].

Existen dos factores que son críticos en el desarrollo de un método de separación GPC: columna y fase móvil. Se buscó una columna adecuada para separaciones de moléculas pequeñas y que fuese compatible con THF y se escogió la columna Phenogel™ 5 μ m 50

DISCUSIÓN GLOBAL

Å, 4,6 x 300 mm. La fase estacionaria de la columna es un copolímero de estireno-divinilbenceno en THF. Como fase móvil se elige el THF ya que, por un lado, es el único disolvente capaz de la solubilizar la totalidad de la crema y, por otro lado, es el disolvente en que se encuentra empaquetada la fase estacionaria de la columna. De esta forma, utilizando como fase móvil y como diluyente de muestra el mismo disolvente se evitan posibles precipitaciones. Se estudia el flujo de fase móvil en el rango de 0,5 a 1,5 ml/min, no observándose disminución en la resolución entre el pico del DPK y el pico del resto de componentes. Por tanto, el caudal seleccionado fue 1,5 ml/min debido a que, consecuentemente, el tiempo de retención del DPK es menor – tR: 2,17 min –. Las condiciones del método se optimizan utilizando una solución de DPK de concentración de 200 µg/ml. El volumen de inyección es estudiado en el rango de 10-100 µl, seleccionando 25 µl. La temperatura de columna también es estudiada desde 30 °C hasta 50 °C y se decide mantenerla a 40 °C para mantener bajo control la presión del sistema. La detección se realiza a 250 nm debido a que el DPK presenta su máximo de absorción.

El método desarrollado también fue validado, con éxito, según la guía ICH Q2 [129] evaluándolo con respecto a la selectividad, linealidad, precisión, exactitud y estabilidad de la solución.

Para desarrollar un segundo método para la determinación del resto de compuestos a controlar en los prototipos desarrollados durante la fase de desarrollo de la formulación (HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT), se realiza una búsqueda bibliográfica sobre los compuestos en estudio y no se encuentra ningún método para la determinación simultánea de todos ellos. Aunque se han encontrado varios métodos para la determinación de cada uno de los compuestos solos o en combinación con otros compuestos. Se han publicado varios métodos analíticos para la determinación de la HQ y sus combinaciones en formulaciones farmacéuticas, cosméticas o en fluidos biológicos utilizando diferentes técnicas tales como volumetría redox [45], electroforesis capilar [183-184], espectrofotometría UV-Visible [141,185-186], voltametría [187] y HPLC [188-191]. También se han encontrado varios métodos analíticos para la determinación de KA sólo o en combinación con otras sustancias por HPLC [190-195]. Para la determinación de OCT y AVB, por separado, la USP recomienda el análisis por GC [196,197] aunque también hay artículos publicados en los que se analizan mediante HPLC [198,199] y HPLC/SBWC [200]. Para el caso de los antioxidantes, la USP describe en cada una de sus monografías la valoración por HPLC [201,202]. Por otra parte, se han encontrado publicaciones en las que se describen

métodos analíticos para su determinación de forma simultánea mediante distintas técnicas como GC [203], voltametría [204] y varios métodos por HPLC [205,206].

El objetivo principal del método es separar los seis compuestos en estudio que tienen propiedades químicas muy distintas como consecuencia de su estructura molecular. Todos los compuestos son aromáticos pero mientras el OCT es una molécula neutra, el resto tienen un carácter ligeramente ácido, con $pK_a > 9$. Por otra parte, clasificándolos según polaridad ($\log P$) se concluye que mientras HQ y KA son muy polares, BHA es ligeramente polar y BHT, OCT y AVB son ligeramente apolares.

Durante el estudio de compatibilidad con excipientes ejecutado con el método preliminar stability-indicating ya se observó que los seis compuestos eluían en el mismo cromatograma sin superposición entre ellos aunque la resolución entre los picos de OCT y AVB era inferior a la deseada y requerida para métodos robustos: $R_s: 1,55 < 2,0$. Por tanto, se desarrolla un método para los seis compuestos en estudio, optimizando los parámetros cromatográficos para que su tiempo de ejecución sea lo más corto posible y la resolución entre todos los compuestos sea la adecuada.

Para mejorar la resolución entre OCT y AVB y reducir el tiempo de análisis, se combina el ajuste de las proporciones de fase acuosa y fase orgánica – agua al 0,1% ácido acético y acetonitrilo respectivamente – con un gradiente del caudal de FM, también conocido como *dual mode gradient*. La temperatura de la columna se mantiene igual que el método preliminar stability-indicating a 40 °C para reducir la viscosidad de la FM y la presión del sistema. Se comprueba que la longitud de onda establecida en el método preliminar, 230 nm, es adecuada para el presente método después de evaluar los espectros de cada uno de los compuestos observándose una respuesta aceptable para todos ellos.

Se intenta reducir el tiempo de cromatograma, adaptando el gradiente desarrollado a una columna más corta: Zorbax SB-Phenyl 5 μm 150 x 4,6 mm. En esta columna no se da la correcta separación entre los picos de OCT y AVB ni tampoco entre los picos de KA e HQ. Por tanto, la columna a utilizar es la utilizada hasta ahora: Zorbax SB-Phenyl 5 μm 250 x 4,6 mm.

La preparación de la muestra es una parte difícil y esencial del desarrollo de un método analítico debido a que la extracción de los diferentes compuestos puede verse afectada especialmente en las cremas que contienen bastantes excipientes. En general, la preparación de la muestra de una crema es un proceso complejo que implica procedimientos de pre-tratamiento, como la SPE [208] o extracción en fluidos

DISCUSIÓN GLOBAL

supercríticos [209]. En este caso, se desarrolla un proceso de extracción rápido y fácil para obtener una suspensión de la crema en el diluyente de la muestra (70:30 ACN:H₂O) en tres pasos: tratamiento de sonicación durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos de agua-hielo, agitación magnética durante 15 minutos seguido de la centrifugación de una alícuota homogénea de la suspensión resultante a 4500 rpm durante 5 minutos.

Para confirmar la idoneidad del proceso de extracción para todos los compuestos, el proceso de extracción se estudia a través de un diseño de experimentos (DoE) en combinación con la evaluación estadística de los datos obtenidos. De todos los factores que podrían afectar a la extracción de los compuestos de la crema, se investigan sólo tres: tiempo de sonicación, el tiempo de agitación y la fuerza del diluyente de muestra (% ACN).

Para ello, se genera un diseño factorial completo con tres variables a tres niveles que incluyen dos repeticiones en el punto central utilizando el software JMP. Los resultados indican que ni el tiempo de sonicación, ni el tiempo de agitación, son parámetros significativos para la extracción de los compuestos y que el diluyente de muestra no puede considerarse un factor primario en el proceso de extracción. Las interacciones entre los factores estudiados para la extracción de cada compuesto también se estudian, encontrándose que son estadísticamente no significativas.

En todas las inyecciones realizadas, tanto de solución patrón como de solución problema, por el método optimizado se observa la elución de un pico adicional desconocido a un tiempo de retención de 7,22 min. Para aclarar su procedencia, se inyectan todas las soluciones madre y se descubre que el pico procede de la solución de AVB preparada extemporáneamente. Para investigar con mayor profundidad este pico adicional desconocido se lleva a cabo el análisis de las soluciones con la modificación del método para su extensión a los estudios de LC-MS/TOF.

En el espectro de masas correspondiente al pico de AVB en el cromatograma de la solución patrón madre de AVB, se observa una señal principal con m/z 109,1506 que corresponde al ion molecular desprotonado ($[M-H]^-$). Mediante el análisis de las distribuciones isotópicas y los datos espectrales se concluye que corresponde a la fórmula molecular $C_{20}H_{21}O_3^-$, es decir, $C_{20}H_{22}O_3$ en forma neutra.

En el mismo cromatograma también se observa el pico adicional desconocido el cual presenta una señal principal a m/z 109,1506 en su espectro de masas que corresponde a ion molecular desprotonado ($[M-H]^-$). Igual que en el espectro de MS del pico

correspondiente a AVB, se analizan todas las posibles fórmulas de iones moleculares desprotonados y se concluye que la única fórmula molecular desprotonada que cumple con su distribución isotópica es $C_{20}H_{21}O_3^-$ o $C_{20}H_{22}O_3$ en forma neutra. Es decir, la misma fórmula que AVB. En consecuencia, se puede concluir que el pico adicional desconocido tiene la misma fórmula molecular que el AVB. Se realiza una búsqueda bibliográfica y se comprueba que esto es debido al hecho de que AVB en solución existe en dos formas tautoméricas: la forma enólica y la forma ceto [210].

El pico que eluye a 9,81 minutos es el tautómero enol que absorbe alrededor de 355 nm, mientras que el tautómero ceto que absorbe alrededor de 260 nm corresponde a un pico adicional desconocido que eluye a los 7,08 minutos.

Las concentraciones relativas de cada tautómero dependen de la polaridad y de la proticidad del solvente en el que se encuentran disueltos [211]. En este caso, en que el diluyente de la muestra era una mezcla de ACN/H₂O (70:30, v/v), la concentración relativa de ceto tautómero es de aproximadamente un 20%.

Se determina la estabilidad del equilibrio entre las dos formas tautoméricas preparando una solución patrón de AVB y una solución problema y analizándolas a diferentes intervalos de tiempo de hasta 48 h, manteniendo la temperatura del carro de muestras del HPLC a 20 °C. Los resultados de estos estudios indican que la proporción entre los 2 tautómeros es estable durante un período de 48 horas. Por lo tanto, la cuantificación se basa en el pico más intenso, el pico AVB tautómero enol.

El método desarrollado fue validado con respecto a los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez y estabilidad de la solución [129].

Para afrontar adecuadamente la fase de industrialización, se decide optimizar el método desarrollado para dar soporte a la fase de desarrollo de la formulación. Para ello se realiza la transferencia del método a UPLC.

Se decide optimizar también el proceso de extracción para reducir tanto el tiempo necesario como el número de pasos. Se estudia la reducción del tiempo de agitación desde 15 hasta 0 minutos, manteniendo constante el tiempo de sonicación (15 minutos). El análisis estadístico de los resultados obtenidos indica que las dos medias no difieren significativamente decidiendo eliminar la etapa de agitación magnética y sustituirla por una homogeneización manual de la solución.

DISCUSIÓN GLOBAL

De la misma forma, se estudia la optimización de la duración de la etapa de sonicación desde 15 hasta 5 minutos. Los resultados obtenidos para tiempos de sonicación de 5 minutos muestran valores mucho más bajos y más dispares, lo que indica que el proceso de extracción no es completo. El análisis estadístico realizado sobre los resultados para tiempos de sonicación de 10 y 15 minutos indica que las dos medias no difieren significativamente pudiendo, de esta forma, reducir el tiempo de sonicación a 10 minutos. La etapa de centrifugación a 4500 rpm se mantiene constante para separar el líquido de los sólidos en suspensión.

Sin embargo, los sistemas UPLC requieren soluciones más limpias para evitar los colapsos en sus conexiones y tubos que son capilares. Por tanto, se recomienda filtrar las soluciones por filtros adecuados de 0,22 μm antes de su introducción en el sistema UPLC. Entonces, una porción del líquido sobrenadante de la suspensión se centrifuga y se filtra a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm PVDF desechando los primeros 2 ml y el resto se introduce en un vial de HPLC.

Se estudia la compatibilidad del filtro (0,22 μm PVDF) en el método analítico propuesto y se demuestra que los compuestos no se retienen en él realizándose un experimento de la recuperación del filtrado mediante la técnica de filtración de la solución muestra.

Los resultados obtenidos en la determinación de los seis compuestos en estudio en la solución problema filtrada no muestran ningún cambio significativo respecto a los resultados obtenidos en la solución problema centrifugada. El estudio estadístico aplicado demuestra que los filtros de jeringa PVDF no retienen estos compuestos y por tanto, estos filtros tienen una buena compatibilidad con la solución problema.

Las condiciones cromatográficas del método de HPLC son transferidas a escala UPLC utilizando el software Waters UPLC Calculadora (Waters Corporation). El escalado se realiza teniendo en cuenta el tamaño de partícula de la columna para optimizar el gradiente de elución y lograr una separación satisfactoria entre los seis compuestos. La velocidad de flujo de fase móvil se ajusta, para adaptar la presión del sistema, a 0,7 ml/min con un volumen de inyección de 3,0 μl de volumen de inyección. La presión operativa del sistema es de 7.100 psi en las condiciones iniciales de gradiente.

La composición de la fase móvil, temperatura de la columna y la detección se mantienen exactamente igual que en el método de referencia: H₂O al 0,1% HAcO/ACN, 40 °C y 230 nm. Y la columna seleccionada es la misma utilizada en el método de HPLC en tamaño de partícula sub-2 μm : Zorbax SB-Phenyl RRHT (100x2,1mm, 1,8 μm).

Se realiza un test de idoneidad del sistema para comparar los dos métodos – método de HPLC y método de UPLC – para asegurar la competencia del rendimiento cromatográfico. El método transferido a UPLC cumple claramente todos los criterios de idoneidad del sistema. El tiempo de cromatograma del método de UPLC es de 3,0 minutos en comparación con los 14 minutos del método de HPLC, dando como resultado un ahorro aproximado del 80% en el tiempo de análisis y del 88% en el consumo de disolvente.

El método transferido se ha validado con respecto a los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, precisión y exactitud [129].

Finalmente, considerando las características de todos los métodos desarrollados durante las diferentes etapas del desarrollo farmacéutico de la crema y evitar la duplicidad de análisis con su consiguiente coste, se propone desarrollar un método que separe todos los compuestos en estudio de la crema (HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA y BHT) y todas las sustancias relacionadas (impurezas y productos de degradación) para afrontar el estudio de estabilidad del producto terminado.

La propiedad diferencial más importante en la separación de compuestos por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) es la polaridad de dichos compuestos. Tal y como se ha dicho anteriormente, los compuestos en estudio se pueden clasificar según polaridad como: HQ y KA muy polares (valores de log P cercanos a cero o negativos), BHA ligeramente polar (valor log P no mayor a 4), BHT, OCT y AVB ligeramente apolares (valores de log P cercanos a 5) y por último, DPK totalmente apolar (con un valor de log P de 14). Debido a la presencia del DPK, su extrema polaridad y su solubilidad, se debe tener en cuenta que el diluyente de muestra debe ser THF ya que es el único disolvente capaz de solubilizar tanto el DPK como el resto de componentes de la crema.

El principal inconveniente a lo largo del desarrollo es la respuesta de los compuestos en estudio disueltos en THF. El problema radica en la inyección: las moléculas de la solución están disueltas en un disolvente que es mucho más fuerte que la fase móvil (100% fase móvil acuosa), lo que significa que las moléculas van a viajar más rápidamente por la columna en este disolvente más fuerte (THF) hasta que el volumen de inyección quede diluido en la fase móvil. Además, las moléculas de la solución en los bordes exteriores del volumen inyectado son diluidas en la fase móvil antes que las moléculas que se encuentran en el medio del volumen inyectado. Por esta razón los picos observados son más anchos y con mala forma de pico. Para minimizar este

DISCUSIÓN GLOBAL

fenómeno, se decide reducir el volumen de inyección a 10 µl para que el proceso de dilución se lleve a cabo más rápidamente.

Al inyectar menos volumen, la respuesta en el detector también es menor. Para conseguir una respuesta de los compuestos adecuada, se aumenta la concentración de cada uno de los compuestos en la solución: el doble de la concentración utilizada en los métodos descritos anteriormente.

Se estudia la utilización de las siguientes fases móviles ácidas: solución acuosa de ácido acético al 0.1% (v/v) y solución tampón fosfato (PO_4^{-3}) 25 mM a pH 2,5. La elución de los compuestos es prácticamente idéntica en ambas fases pero se escoge la solución tampón PO_4^{-3} 25 mM a pH 2,5 ya que otorga a los picos un mejor factor simetría.

Se evalúa si alguna de las nuevas fases fenilo comercializadas proporciona una mejor selectividad en la separación de los compuestos en estudio seleccionando la columna Pursuit RXs Diphenyl 5µm, 200 Å, 4,6 x 150 mm ya que es la que proporciona una elución de los compuestos en estudio y de las degradaciones más eficaz. La longitud de onda de detección se mantiene a 230 nm ya que es la longitud de onda en la que todos los compuestos tienen una respuesta correcta. El pico correspondiente a AVB tautómero ceto tiene una respuesta mucho más baja que la respuesta obtenida en los otros métodos desarrollados debido a que la proporción de éste depende de la proticidad del diluyente de muestra, cambiada en este método de (70:30) ACN:H₂O a THF.

El estudio de degradaciones forzadas es realizado para ver los posibles productos de degradación que se pueden generar cuando la crema se somete a una serie de condiciones forzadas. Los productos de degradación formados a lo largo de todo el estudio de degradaciones forzadas son 21 y se ha estudiado su procedencia.

Como en cualquier medicamento que contenga una combinación de dos o más APIs, el contenido en los productos de degradación se calcula frente al compuesto del que proceden [215,216]. En este caso, evaluando toda la información y conocimiento adquirido a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo de la crema y de los resultados generados por el estudio de degradaciones forzadas realizado, se decide tratar cada uno de los productos de degradación o sustancias relacionadas como productos de degradación desconocidos y calcular su contenido frente a HQ excepto para DP-6 (producto de degradación procedente de DPK). El DPK tiene un factor respuesta mucho más bajo que el resto de APIs. Los productos de degradación procedentes del DPK – DP-6 –se cuantifican respecto a DPK ya que si no se estaría

cuantificando por defecto y se podría considerar correcto un resultado que no lo fuera. El resto de productos de degradación se tratan como sustancias relacionadas desconocidas y se cuantifican frente a HQ ya que su factor respuesta es menor que el de KA. Por tanto, si se cuantifica los productos de degradación procedentes de KA de esta forma, su resultado será por exceso, nunca por defecto.

El método desarrollado fue validado con respecto a los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, límite de detección y cuantificación, precisión, exactitud, robustez y estabilidad de la solución [129].

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se ha realizado el desarrollo de un nuevo medicamento, de forma farmacéutica crema, para el tratamiento del melasma. De acuerdo con los objetivos de esta tesis, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. La investigación realizada ha hecho posible obtener un nuevo medicamento de administración por vía tópica para el tratamiento del melasma.
2. Se ha seleccionado como principio activo HQ, y KA y DPK como coadyuvantes. Las tres sustancias despigmentantes se consideran principio activo y se han caracterizado según métodos generales de USP-NF y/o Ph.Eur, cumpliendo las especificaciones del proveedor (en el caso de KA y DPK) y las especificaciones de la monografía de USP-NF en el caso de HQ.
3. Los resultados del estudio de compatibilidad con excipientes realizado no muestra incompatibilidades químicas importantes. Sólo en algunos casos, se observa interacciones físicas que pueden ser evitadas mediante el proceso de elaboración de la crema.
4. Se propone la siguiente fórmula de una crema despigmentante para el tratamiento del melasma y de administración por vía tópica:

Emulcire 61 WL 2659.....	12,00%
Estol 1474.....	3,00%
Vaselina Filante Blanca.....	6,00%
Vaselina Líquida.....	2,00%
Butilhidroxianisol.....	0,10%
Butilhidroxitolueno.....	0,10%
Dipalmitato Kójico.....	2,00%
Eusolex 2292 (Octinoxato).....	7,50%
Eusolex 9020 (Avobenzona).....	2,00%
Edetato de Disodio.....	0,05%
Myrj 52 S Pharma.....	5,00%
Polisorbato 80.....	2,00%
Metabisulfito de Sodio.....	0,10%
Hidroquinona.....	4,00%

CONCLUSIONES

Ácido kójico.....	2,00%
Polisorbato 20.....	8,00%
Agua desionizada.....	44,15%

5. Se propone un proceso de fabricación de la crema que ha demostrado ser industrializable y que proporciona un medicamento con los atributos de calidad adecuados para este tipo de medicamentos.
6. Se establecen las especificaciones de calidad para la fórmula propuesta que deben cumplirse a la liberación de cada lote.
7. El proceso de fabricación propuesto ha sido validado a escala industrial, concluyéndose que el proceso es fiable, repetitivo y reproducible.
8. Se han desarrollado cinco nuevos métodos de análisis diferentes para la cuantificación de los principios activos, otros compuestos a controlar y sustancias relacionadas (impurezas y productos de degradación), cada uno de ellos adecuados a los objetivos de cada una de las fases de desarrollo farmacéutico de la crema despigmentante.
9. Se han identificado los dos productos de degradación, inicialmente desconocidos, de HQ mediante LC/MS, resultando ser p-benzoquinona y 1,2,3,4-bencenotetrol.
10. Todos los métodos de análisis propuestos han sido validados concluyéndose que son selectivos, lineales, precisos, exactos y robustos según ICH.
11. Los resultados obtenidos de la crema en los estudios de estabilidad a largo plazo (24 meses a 25 °C/60% HR), envasada en su envase primario definitivo (tubo flexible HDPE), permiten concluir que la crema es estable durante 24 meses, estableciéndose de esta forma su periodo de caducidad de 24 meses y la condición de conservación inferior a 25 °C.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. Martini MC. Anatomía y fisiología de la piel. En Martini MC. Introducción a la Dermofarmacología y a la Cosmetología. 1ª ed. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, 2005: 9-28.
2. Netter F.H. Atlas de Anatomía Humana. 5ª ed. Elsevier Masson. Barcelona, 2011.
3. Plan nacional de formación continuada. Dermofarmacología, módulo I. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Barcelona, 2004.
4. Ross MH, Pawlina W. Histología. 5ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 2008.
5. Goldsmith W, Gilchrist K, Leffel P. Fitzpatrick Dermatología en Medicina General. 7ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 2009 (tomo I).
6. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 12th ed. McGraw-Hill Education. New York, 2009.
7. Quevedo WC, Fitzpatrick TB, Jimbow K. Human skin color: Origin, variation and significance. *J Hum Evol*, 1985; 14(1): 43–56.
8. Montaudié H, Bertolotto C, Ballotti R, Passeron T. Fisiología del sistema pigmentario. *Melanogénesis*. EMC – Dermatología, 2014; 48(1): 1–11.
9. Solari JA. Genética Humana: fundamentos y Aplicaciones en Medicina. 3ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 2004.
10. Melanina y melanogénesis [Internet]. [Consulta: último acceso 18 setiembre 2015]. Disponible en: http://www.elmodernoprometeo.es/Sitio_web/Anatomia_files/melanogenesi.pdf.
11. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*, 2004; 84: 1155–1228.

BIBLIOGRAFÍA

12. Marks MS, Seabra MC. The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001; 2: 738–748.
13. Riley PA. Melanin. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997; 29(11): 1235–1239.
14. Christian PA, Vanover JC, Scott TL, Tullo G, D'Orazio JA. Epidermal pigmentation, nucleotide excision repair and risk of skin cancer. *J Carcinog Mutagen*, 2011; S4(001): 1-11.
15. Oren M, Bartek J. The sunny side of p53. *Cell*, 2007; 128(5): 826–8.
16. Bahadoran P, Lipsker D. Leucodermias. *EMC – Dermatología*, 2005; 39(3): 1–18.
17. Nicolaidou E, Katsambas AD. Pigmentation disorders: Hyperpigmentation and hypopigmentation. *Clin Dermatol*, 2014; 1: 66–72.
18. Lipsker D, Boeckler P. Hiperpigmentaciones. *EMC – Dermatología*, 2006; 40(4): 1–16.
19. Victor FC, Gelber J, Rao B. Melasma: a review. *J Cutan Med Surg*, 2004; 8(2): 97–102.
20. Sheth VM, Pandya AG. Melasma: a comprehensive update: part I. *J Am Acad Dermatol*, 2011; 65(4): 689–697.
21. Grimes PE. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol*, 1995; 131(12): 1453–1457.
22. How to treat melasma on the face [Internet]. [Consulta: último acceso 18 setiembre 2015]. Disponible en: <http://themeladermreview.org/how-to-treat-melasma-on-the-face/>
23. Escutia Muñoz B, Quecedo Estébanez E, Botella Estrada R. Tratamiento del melasma. *Piel*, 2010; 25(7): 405–410.
24. Rathi S, Achar A. Melasma: A clinico-epidemiological study of 312 cases. *Indian J Dermatol*, 2011; 56(4): 380-382.
25. Handel AC, Miot LDB, Miot HA. Melasma: a clinical and epidemiological review. *An Bras Dermatol*, 2014; 89(5): 771–782.

26. Miot LDB, Miot HA, Silva MG, Marques MEA. Physiopathology of melasma. *An Bras Dermatol*, 2009; 84(6): 623-635.
27. Grimes P, Nordlund JJ, Pandya AG, Taylor S, Rendon M, Ortonne J-P. Increasing our understanding of pigmentary disorders. *J Am Acad Dermatol*, 2006; 54(5 Suppl 2): S255–61.
28. Lee A-Y. An updated review of melasma pathogenesis. *Dermatol Sin*, 2014; 32(4): 233-239.
29. Moin A, Jabery Z, Fallah N. Prevalence and awareness of melasma during pregnancy. *Int J Dermatol*, 2006; 45(3): 285–288.
30. Sanchez NP, Pathak MA, Sato S, Fitzpatrick TB, Sanchez JL, Mihm MC. Melasma: A clinical, light microscopic, ultrastructural, and immunofluorescence study. *J Am Acad Dermatol*, 1981; 4(6): 698–710.
31. Costin G-E, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*, 2007; 21: 976–994.
32. Rouzaud F, Kadokaro AL, Abdel-Malek ZA, Hearing VJ. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat Res-Fund Mol M*, 2005; 571: 133–152.
33. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 2007; 445(7130): 843–850.
34. Goh CL, Dlova CN. A retrospective study on the clinical presentation and treatment outcome of melasma in a tertiary dermatological referral center in Singapore. *Singapore Med J*, 1999; 40: 455-458.
35. Sialy R, Hassan I, Kaur I, Dash RJ. Melasma in men: a hormonal profile. *J Dermatol*, 2000; 27: 64-65.
36. Rendon M, Berneburg M, Arellano I, Picardo M. Treatment of melasma. *J Am Acad Dermatol*, 2006; 54(5 Suppl 2): S272–81.
37. Sheth VM, Pandya AG. Melasma: a comprehensive update: part II. *J Am Acad Dermatol*, 2011; 65(4): 699–714.
38. Briganti S, Camera E, Picardo M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res*, 2003; 16(2): 101–110.

BIBLIOGRAFÍA

39. Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci*, 2009; 10: 4066–4087.
40. Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci*, 2009; 10: 2440–2475.
41. Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res*, 2006; 19(6): 550–571.
42. Kim H, Choi HR, Kim DS, Park KC. Topical hypopigmenting agents for pigmentary disorders and their mechanisms of action. *Ann Dermatol*, 2012; 24: 1–6.
43. Hydroquinone|C6H6O2| Chemspider [Internet]. [Consulta: último acceso 18 setiembre 2015]. Disponible en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.764.html>.
44. SciFinder – Chemical Abstracts Services. Hydroquinone: 123-31-9. [Internet]. [Consulta: último acceso 18 setiembre 2015]. Disponible en: <https://scifinder-cas.org.sire.ub.edu/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>.
45. The United States Pharmacopeia, USP38-NF33. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville (MD), 2015: 3804 (Official Monographs: Hydroquinone)
46. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B (Eds.). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 3rd ed. Pharmaceutical Press. London, 2004; 2: 1115
47. Medicamentos con Hidroquinona – Vademecum.es [Internet]. [Consulta: último acceso 23 setiembre del 2015]. Disponible en: http://www.vademecum.es/medicamentos-principio-activo-hidroquinona_4475_1
48. Formulario Nacional de Medicamentos. Cuba. Hidroquinona 2% [Internet]. [Consulta: último acceso 23 setiembre 2015]. Disponible en: <http://fnmedicamentos.sld.cu/index.php?P=FullRecord&ID=837>
49. EU. Commission directive 2000/6/EC relating to cosmetic products. *Official Journal of the European Union*, 2000; L5642-L5646.

50. Grimes PE, Watson J. Treatment of melasma in darker skin with a 4% hydroquinone skin care system plus 0.025% tretinoin cream. *J Am Acad Dermatol*, 2012; 66(4): AB180.
51. Grimes PE, Bhawan J, Guevara IL, Colón LE, Johnson LA, Gottschalk RW, et al. Continuous therapy followed by a maintenance therapy regimen with a triple combination cream for melasma. *J Am Acad Dermatol*, 2010; 62(6): 962–967.
52. Monheit GD. Comparison of novel skin lightening cream targeting melanogenesis on multiple levels to triple combination cream: A preliminary melasma study. *J Am Acad Dermatol*, 2011; 64(2): AB143.
53. Godse KV. Triple combination of hydroquinone, tretinoin and mometasone furoate with glycolic acid peels in melasma. *Indian J Dermatol*, 2009; 54(1): 92–93.
54. Mendoza IA, Paliargues F, Hassun K, Kerrouche N. Comparison of novel skin lightening cream targeting melanogenesis on multiple levels to triple combination cream: A preliminary melasma study. *J Am Acad Dermatol*, 2011; 64(2): AB143.
55. Baumann L. Efficacy and safety of triple combination cream (0.01% fluocinolone acetonide+4% hydroquinone+0.05% tretinoin) and hydroquinone 4% cream in the treatment of moderate to severe melasma. *J Am Acad Dermatol*, 2005; 52(3): P168.
56. Westerhof W, Kooyers TJ. Hydroquinone and its analogues in dermatology - a potential health risk. *J Cosmet Dermatol*, 2005; 4(2): 55–59.
57. Eastmond DA, Mondrala ST, Hasegawa L. Topoisomerase II inhibition by myeloperoxidase-activated hydroquinone: A potential mechanism underlying the genotoxic and carcinogenic effects of benzene. *Chem Biol Interact*, 2005; 153-154: 207–216.
58. Nordlund JJ, Grimes PE, Ortonne JP. The safety of hydroquinone. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2006; 20(7): 781–787.
59. O'Donoghue JL. Hydroquinone and its analogues in dermatology - A risk-benefit viewpoint. *J Cosmet Dermatol*, 2006; 5(3): 196–203.

BIBLIOGRAFÍA

60. Is Hydroquinone Safe [Internet]. [Consulta: último acceso 23 de setiembre 2015]. Disponible en: <http://www.hydroquinone.com/safety/is-hydroquinone-safe>
61. U.S. Food & Drug Administration. National Toxicology Program: Nomination Profile: Hydroquinone. U.S. Department of Health and Human Services. [Internet] [Consulta: último acceso 23 de setiembre 2015]. Disponible en: http://ntp.niehs.nih.gov/NTP/Noms/Support_Docs/Hydroquinone_may2009.pdf.
62. Jones K, Hughes J, Hong M, Jia Q, Orndorff S. Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Res*, 2002; 15(5): 335–340.
63. Garcia A, Fulton JE. The combination of glycolic acid and hydroquinone or kojic acid for the treatment of melasma and related conditions. *Dermatologic Surgery*, 1996; 22: 443–447.
64. Lim JT. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. *Dermatol Surg*, 1999; 25(4): 282–4.
65. Draelos ZD, Yatskayer M, Bhushan P, Pillai S, Oresajo C. Evaluation of a kojic acid, emblica extract, and glycolic acid formulation compared with hydroquinone 4% for skin lightening. *Cutis*, 2010; 86(3): 153–158.
66. Rendon MI, Gaviria JI. Agentes hipopigmentantes. En: Draelos ZD. *Cosmecéuticos*. 2ª ed. Elsevier Saunders. Barcelona, 2006: 103-109.
67. Gallarate M, Carlotti ME, Trotta M, Grande AE, Talarico C. Photostability of naturally occurring whitening agents in cosmetic microemulsions. *J Cosmet Sci*, 2004; 55: 139-148.
68. SciFinder– Chemical Abstracts Services –. Kojic acid: 501-30-4 [Internet]. [Consulta: último acceso 18 setiembre 2015]. Disponible en: <https://scifinder-cas-org.sire.ub.edu/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>.
69. SciFinder– Chemical Abstracts Services –. Kojic acid dipalmitate: 79725-98-7 [Internet]. [Consulta: último acceso 18 setiembre 2015]. Disponible en: <https://scifinder-cas-org.sire.ub.edu/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>.

70. Aytemir MD, Karakaya G, İkinci D. Kojic acid derivatives. En: Deniz Ekinci, editor. *Medicinal Chemistry and Drug Design*. 2012:1–26 [Internet]. [Consulta: último acceso 24 setiembre 2015]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/medicinal-chemistry-and-drug-design/kojic-acid-derivatives>
71. Parvez S, Kang M, Chung H-S, Cho C, Hong M-C, Shin M-K, et al. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother Res*, 2006; 20(11): 921–934.
72. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J Pharm Pharmacol*, 1994; 46(12): 982–985.
73. Aparecida-Nicoletti M, Almeida-Orsine EM, Nogueira-Duarte AC, Arbex-Buono G. Hiper Cromias: aspectos gerais e uso de despigmentantes cutâneos. *Cosmet Toilet (Ed. Portuguese)*, 2002: 14; 46-51.
74. Svensson CK. Biotransformation of drugs in human skin. *Drug Metab Dispos*, 2009; 37(2): 247–253.
75. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). Opinion on kojic acid, 26-27 June 2012. [Internet]. [Consulta: último acceso 2 octubre 2015]. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/scs_o_098.pdf
76. Al-Edresi, S., Baie, S. In-vitro and in-vivo evaluation of a photo-protective kojic dipalmitato loaded into nano-creams. *Asian J Pharm Sci*, 2010; 5: 251– 265.
77. Balaguer A, Salvador A, Chisvert A. A rapid and reliable size-exclusion chromatographic method for determination of kojic dipalmitate in skin-whitening cosmetic products. *Talanta*, 2008; 75: 407–11.
78. *Vademecum 2008 Dermatología Cosmética*. Elsevier Doyma. Barcelona, 2007: 543-544.
79. Elorza Barroeta B, Elorza Barroeta MA. Formas de administración cutánea. En Lozano MC, Córdoba D, Córdoba M. *Manual de Tecnología Farmacéutica*. Elsevier España SL. Barcelona, 2012: 411-424.

BIBLIOGRAFÍA

80. Martini MC. Formas galénicas. En Martini MC. Introducción a la Dermofarmacia y a la Cosmetología. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, 2005: 321-341.
81. Del Pozo Carrascosa A. Pomadas, lipogeles, cremas y pastas. En Faulí Trillo C. Tratado de Farmacia Galénico. Luzán 5 SA de Ediciones. Madrid, 1993: 625-633.
82. The United States Pharmacopeia. USP38-NF33. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville (MD), 2015: 1278-1301 (General Chapters <1151> Pharmaceutical Dosage Forms).
83. European Pharmacopeia. 8th edition. Council of Europe. Strasbourg, 2015: 807-809 (General monographs 04/2010:0132).
84. Block LH. Pharmaceutical emulsions and microemulsions. En Lieberman HA, Reiger MM, Banker GS. Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems. 2^o ed. Marcel Dekker, INC. New York, 1996; 2: 47-109.
85. Swarbrick J, Rubino JT, Rubino CP. Dispersion de partículas gruesas. En Remington. Farmacia. 20^a ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 2003; 1: 365-385.
86. Bustamante Martínez P. Emulsiones. En Faulí Trillo C. Tratado de Farmacia Galénico. Luzán 5 SA de Ediciones. Madrid, 1993: 423-246.
87. De Castro Vítors M, Lozano Estevan MC. Sistemas dispersos heterogéneos: emulsiones. En Lozano MC, Córdoba D, Córdoba M. Manual de Tecnología Farmacéutica. Elsevier España SL. Barcelona, 2012: 155-162.
88. Attwood D. Sistemas dispersos. En Aulton ME. Farmacia: La Ciencia del Diseño de las Formas Farmacéuticas. 2^a ed. Elsevier España SL. Madrid, 2004: 70-100.
89. Tipos de emulsiones by Gerardo González on Prezi [Internet]. [Consulta: último acceso 15 octubre 2015]. Disponible en: <https://prezi.com/pd0jysvckvro/tipos-de-emulsiones/>
90. Nairn JG. Soluciones, emulsiones, suspensiones y extractos. En Remington. Farmacia. 20^a ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 2003; 1: 838-874.

91. Del Pozo A, Juvé J, Viscasillas A. Emulsiones en dermofarmacia: conceptos generales y elementos para su formulación. Aula de la farmacia. Barcelona, 2007; 3(41): 50-60.
92. Cumbreño Barquero S, Pérez Higuero FL. Elaboración de emulsiones. Offarm Elsevier. 2004; 23(5): 157–160 [Internet]. [Consulta: último acceso 28 setiembre 2015]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-elaboracion-emulsiones-13062391>
93. Emulsiones – SlideShare. Seminario sobre emulsiones. Ricardo C Pascual. Cátedra de farmacotecnia I. Universidad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires [Internet]. [Consulta: último acceso 8 octubre 2015]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/zinzita/emulsiones>
94. Max-Planck Institut für Kolloid und Grenzflächenforschung. Emulsions – Part 1 Definition Preparation methods (some) Properties [Internet]. [Consulta: último acceso 15 octubre 2015]. Disponible en: http://www.mpikg.mpg.de/886807/Emulsions_-1.pdf
95. Block LH. Pharmaceutical emulsions and microemulsions. En Lieberman HA, Reiger MM, Banker GS. Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems. 2nd ed. Marcel Dekker, INC. New York; 1996; (1): 225-232.
96. Derkach SR. Rheology of emulsions. Adv Colloid Interface Sci. 2009; 151(1-2): 1–23.
97. Salager JL. Formulación, composición y fabricación de Emulsiones para obtener las propiedades deseadas. Estado del Arte. Parte B. Cuaderno FIRP 747-B. Propiedades de las Emulsiones y su Medición. Laboratorio de Formulación, Interfases, Reología y Procesos. Universidad de los Andes. Mérida (Venezuela), 1999.
98. Max-Planck Institut für Kolloid und Grenzflächenforschung. Emulsions – Part 2 A little (theory): emulsion stability [Internet]. [Consulta: último acceso 15 octubre 2015]. Disponible en: http://www.mpikg.mpg.de/886743/Emulsions_-2.pdf
99. Punam T, Shubhangi W, Rahul S, Sargar A, Bhujbal A, Shinde A. Stability study of dosage form: an innovative step. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science. 2013; 3(2): 1031-1050.

BIBLIOGRAFÍA

100. Emulsion Science In The Food Industry - Barnard Health Care [Internet]. [Consulta: último acceso 15 octubre 2015]. Disponible en: <http://www.barnardhealth.us/food-emulsions/emulsion-science-in-the-food-industry.html>
101. Mecanismos de desestabilización de una emulsión by Gerardo González on Prezi [Internet]. [Consulta: último acceso 15 octubre 2015]. Disponible en: https://prezi.com/57rgbtfyg0w_/mecanismos-de-desestabilizacion-de-una-emulsion/
102. Wells J. Preformulación farmacéutica: propiedades fisicoquímicas de las sustancias farmacológicas. En Aulton ME. Farmacia: La Ciencia del Diseño de las Formas Farmacéuticas. 2ª ed. Elsevier España SL. Madrid, 2004: 114-140.
103. Steele G. Preformulation as an aid to product desing in early drug development. En Gibson M. Pharmaceutical preformulation and formulation. 2nd ed. Informa Healthcare USA, Inc. New York, 2009: 188-245.
104. The Merck Index. 14th ed. Merck & Co, Inc. Whitehouse Station (NI), 2006: Hydroquinone.
105. Gallet G, Carroccio S, Rizzarelli P, Karlsson S. Thermal degradation of poly(ethylene oxide–propylene oxide–ethylene oxide) triblock copolymer: comparative study by SEC/NMR, SEC/MALDI-TOF-MS and SPME/GC-MS. *Polymer*, 2002; 43(4): 1081–1094.
106. Gallet G, Erlandsson B, Albertsson A-C, Karlsson S. Thermal oxidation of poly(ethylene oxide–propylene oxide–ethylene oxide) triblock copolymer: focus on low molecular weight degradation products. *Polym Degrad Stab*, 2002; 77(1): 55–66.
107. SciFinder– Chemical Abstracts Services –. Octinoxate: 5466-77-3 [Internet]. [Consulta: último acceso 18 setiembre 2015]. Disponible en: <https://scifinder-cas-org.sire.ub.edu/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>
108. SciFinder– Chemical Abstracts Services –. Avobenzone: 70356-09-1 [Internet]. [Consulta: último acceso 18 setiembre 2015]. Disponible en: <https://scifinder-cas-org.sire.ub.edu/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>
109. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5th Ed. Pharmaceutical Press. London, 2006.

110. Batıgöç Ç, Akbaş H. Spectrophotometric determination of cloud point of Brij 35 nonionic surfactant. *Fluid Phase Equilib*, 2011; 303(1): 91–95.
111. Mukherjee P, Padhan SK, Dash S, Patel S, Mishra BK. Clouding behaviour in surfactant systems. *Adv Colloid Interface Sci*, 2011; 162(1-2): 59–79.
112. Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos. Medicamentos de uso humano y medicamentos veterinarios. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid 2010.
113. FDA Guidance for Industry, Process Validation: General Principles and Practices, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, 2001, website: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
114. Singh S, Singh J, Gulia S, Kakkar R. Metal Ion Selectivity of Kojate Complexes: A Theoretical Study. *J Theor Chem*, 2013, Article ID 342783, 9 pages.
115. Nurchi VM, Lachowicz JI, Crisponi G, Murgia S, Arca M, Pintus A, et al. Kojic acid derivatives as powerful chelators for iron(III) and aluminium(III). *Dalt Trans*, 2011; 40(22): 5984–5998.
116. Nurchi VM, Crisponi G, Lachowicz JI, Murgia S, Pivetta T, Remelli M, et al. Iron(III) and aluminum(III) complexes with hydroxypyronone ligands aimed to design kojic acid derivatives with new perspectives. *J Inorg Biochem*, 2010; 104(5): 560–569.
117. Hussain Z, Nisar S, Kazmi SA. Kinetics and mechanism of reduction iron (III) kojic acid complex by ascorbic acid. *J Chem Soc Pak*, 2013; 35(3): 769-774.
118. Sunday Johnson A, Hussain Z, Perviaz M, Kazmi SA. Kinetics and mechanism of reduction of iron(III) kojic acid complex by hydroquinone and L-cysteine. *J Chem Soc Pak*, 2014; 36(4): 576-581.
119. Scarpellino RJ, inventor; General Foods Corporation, assignee. Coloring food with iron-complexes. United States patent US 4,018,907. 1977 Apr 19.
120. Cholayudth P. Establishing acceptance limits for probability of passing multiple stage tests in process validation through a process capability approach. *J Valid Tech*, 2009; 15: 77-90.

BIBLIOGRAFÍA

121. Ahuja S. Overview of modern pharmaceutical analysis. En Ahuja S, Scypinsky S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. 2nd ed. Academic Press. Amsterdam, 2011; 10: 1-9.
122. ICH Q6A. Specifications: Test procedures and Acceptance Criteria for New Drugs and New Drug Products: Chemical Substances. International Conference on Harmonization. October 1999. Revisión 4.
123. European Pharmacopeia. 8th edition (2015) [Internet]. [Consulta: último acceso 10 mayo 2016]. Disponible en: <http://online6.edqm.eu.sire.edu/ep807/>.
124. USP-NF online. USP39-NF34 (2016) [Internet]. [Consulta: último acceso 10 mayo 2016]. Disponible en: <http://www.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=39&nf=34&s=0&officialOn=May%201,%202016>
125. Singh S, Bakshi M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. Pharm Technology, 2000; 4: 1–14.
126. Kommanaboyina B, Rhodes CT. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. Drug Dev Ind Pharm, 1999; 25(7): 857–868.
127. S. Bajaj, D. Singla, N. Sakhuja, Stability testing of pharmaceutical products. J Appl Pharm Sci, 2012; 02: 129–138.
128. Carstensen JT. Drug Stability, Principles and Practices. 3th ed. Marcel Dekker. New York, 2000.
129. ICH Q1A(R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonization. February 2003. Revision 4.
130. Cha J, Gilmore T, Lane P, Ranweiler JS. Stability studies. En Ahuja S, Scypinsky S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. 2nd ed. Academic Press. Amsterdam, 2011; 10: 459-505.
131. Jimidar MI, De Smet M. HPLC method development in late phase pharmaceutical development. En: Ahuja S, Rasmussen H. HPLC Method Development for Pharmaceuticals. 1st ed. Elsevier Academic Press. London, 2007; 8: 373-405.

132. Bretnall AE, Clarke GS. Validation of analytical test methods. En: Ahuja S, Scypinsky S. Handbook of modern pharmaceutical analysis. 2nd ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam, 2011; 10: 459-505.
133. Validación de métodos analíticos. Monografías AEFI. Asociación Española de Farmaceuticos de la Industria. La Bisbal (Girona), 2001.
134. United States Pharmacopeia. USP38-NF33. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville (MD), 2015: 1640-1646 (General Information/<1225> Validation of compendial procedures).
135. ICH Q2(R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization (ICH). November 2005.
136. ICH Q1A(R2). Stability Testing of new drug substances and products. International Conference on Harmonization (ICH). February 2003.
137. ICH Q1B. Photostability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonization (ICH). November 1996.
138. Sehwat R, Maithani M, Singh R. Regulatory aspects in development of stability-indicating methods: a review. Chromatographia, 2010; 72(1): 1–6.
139. USFDA, Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Products. Rockville (USA), 2015.
140. Rasmussen H, Swinney KA, Gaiki S, HPLC method development in early phase pharmaceutical development. En: Ahuja S, Rasmussen H. HPLC Method Development for Pharmaceuticals. 1st ed. Elsevier Academic Press. London, 2007; 8: 353-371.
141. The United States Pharmacopeia, USP38-NF33. United States Pharmacopeial Convention, INC. Rockville (MD), 2015: 3805 (Official Monographs: Hydroquinone Cream)
142. The United States Pharmacopeia, USP38-NF33. United States Pharmacopeial Convention, INC. Rockville (MD), 2015: 3804 (Official Monographs: Hydroquinone Topical Solution)
143. Hydroquinone|C6H4(OH)2 - PubChem [Internet]. [Consulta: último acceso 15 marzo 2015]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hydroquinone>

BIBLIOGRAFÍA

144. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. Practical HPLC Method Development. 2nd ed. John Wiley & Sons. New York, 1997; 21-58, 233-291.
145. Slack GC, Snow NH. HPLC sample preparation. En: Ahuja S, Rasmussen H, HPLC Method Development for Pharmaceuticals. 1st ed. Elsevier Academic Press. London, 2007; 8: 237-268.
146. Croes K, Steffens A, Marchand DH, Snyder LR. Relevance of pi-pi and dipole-dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography. J Chromatogr A, 2005; 1098(1-2): 123–130.
147. Yang M, Fazio S, Munch D, Drumm P. Impact of methanol and acetonitrile on separations based on pi-pi interactions with a reversed-phase phenyl column. J Chromatogr A, 2005; 1097(1-2): 124–129.
148. Reynolds DW, Facchine KL, Mullaney JF, Alsante KM, Hatajik TD, Motto MG. Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies. Pharm Technol, 2002; 26(2): 48–56.
149. Singh S, Junwal M, Modhe G, Tiwari H, Kurmi M, Parashar N, et al. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. TrAC – Trend Anal Chem, 2013; 49: 71–88.
150. Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. J Pharm Biomed Anal, 2014; 4(3): 159–165.
151. Maggio RM, Vignaduzzo SE, Kaufman TS. Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. TrAC – Trend Anal Chem, 2013; 49: 57–70.
152. Bakshi M, Singh S. Development of validated stability-indicating assay methods - Critical review. J Pharm Biomed Anal, 2002; 28: 1011–1040.
153. Singh S, Bakshi M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. Pharm Technology, 2000; 4: 1–14.
154. Ngwa G. Forced degradation as an integral part of HPLC stability-indicating method development. Drug Deliv Technol, 2010; 10(5): 56–59.
155. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization. IPCS/WHO, Environmental Health Criteria HYDROQUINONE, (EHC 157), 1994

- [Internet]. [Consulta: último acceso 2 febrero 2016]. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc157.htm>
156. Pugh J. Cinética y estabilidad del producto. En: Aulton ME. Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2ª ed. Elsevier España SA. Madrid, 2004: 101-113.
157. Connors KA, Amidon GR, Stella VJ. Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists. 2nd ed. John Wiley & Sons. New York, 1986.
158. Phenols. En: Mukherjee SM, Singh SP, Kapaar RP, Dass R, Organic Chemistry, 2 ed. New Age International Publishers. New Delhi, 2012 (2) [Internet]. [Consulta: último acceso 5 marzo 2016]. Disponible en: <http://www.newagepublishers.com/samplechapter/000569.pdf>
159. Ragimov AV, Ragimov II, Mamedov BA, Guseinov SA, Liogonkii BI. On features of the oligomerization of hydroquinone under auto-oxidation. Polym Sci USSR, 1982; 24(10): 2434–2440 [Internet]. [Consulta: último acceso 14 abril 2016]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0032395082901162>
160. Ragimov A., Mamedov B., Liogonkii B. The alkali initiated polymerization of p-benzoquinone. Polym Sci USSR, 1977; 19(11): 2922–2928 [Internet]. [Consulta: último acceso 14 abril 2016]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0032395077903124>
161. Sadykh-Zade SI, Ragimov AV, Suleimanova SS, Liogon'kii VI. The polymerization of quinones in an alkaline medium and the structure of the resulting polymers. Polym Sci USSR, 1972; 14(6): 1395–1403 [Internet]. [Consulta: último acceso 14 abril 2016]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0032395072901153>
162. Erdtman HGH. Studies on the formation of complex oxidation and condensation products of phenols. Part II. Coupling of simple phenols and quinones to diphenyl derivatives. Proc R Soc A, 1933; 143(848): 191-222
163. Furlani A, Russo MV, Cataldo F. Oxidative polymerization of p-benzoquinone and hydroquinone. Conductivity of doped and undoped polymerization products. Synth Met, 1989; 29(1): 507–510 [Internet]. [Consulta: último

BIBLIOGRAFÍA

- acceso 14 abril 2016]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037967798990341X>
164. Sabaa MW, Madkour TM, Yassin AA. Polymerization products of p-Benzoquinone as bound antioxidants for styrene-butadiene rubber: Part I—Preparation of quinone polymers. *Polym Degrad Stab*, 1988; 22(3): 195–203 [Internet]. [Consulta: último acceso 11 abril 2016]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141391088900109>
165. Cataldo F. On the structure of macromolecules obtained by oxidative polymerization of polyhydroxyphenols and quinones. *Polym Int*, 1998; 46(4): 263–268 [Internet]. [Consulta: último acceso 11 abril 2016]. Disponible en: [http://doi.wiley.com/10.1002/\(SICI\)1097-0126\(199808\)46:4<263::AID-PI983>3.0.CO;2-0](http://doi.wiley.com/10.1002/(SICI)1097-0126(199808)46:4<263::AID-PI983>3.0.CO;2-0)
166. Spyroudis S. Hydroxyquinones: synthesis and reactivity. *Molecules*, 2000; 5: 1291–330.
167. Hansen G, Christensen P, Tüchsen E, Lund T. Sensitive and selective analysis of coenzyme Q10 in human serum by negative APCI LC-MS. *Analyst*, 2004; 129(1): 45–50.
168. Vessecchi R, Crotti AEM, Guaratini T, Colepicolo P, Galembeck SE, Lopes NP. Radical ion generation processes of organic compounds in electrospray ionization mass spectrometry. *Mini-Rev Org Chem*, 2007; 4:75–87.
169. Bataineh M, Lübcke-von Varel U, Hayen H, Brack W. HPLC/APCI-FTICR-MS as a tool for identification of partial polar mutagenic compounds in effect-directed analysis. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010; 21(6): 1016–1027.
170. Kertesz V, Van Berkel GJ. Monitoring ionic adducts to elucidate reaction mechanisms: reduction of tetracyanoquinodimethane (TCNQ) and oxidation of triphenylamine (TPA) investigated using on-line electrochemistry/electrospray mass spectrometry. *J Sol State Electrochem*, 2005; 9(5): 390-397.
171. Meng X-G, Guo Y, Hu C-W, Zeng X-C. Mimic models of peroxidase--kinetic studies of the catalytic oxidation of hydroquinone by H₂O₂. *J Inorg Biochem*, 2004; 98(12): 2107–13 [Internet]. [Consulta: último acceso 27 abril 2016]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541500>

172. Ye W, Shi X, Zhang Y, Hong C, Wang C, Budzianowski WM, et al. Catalytic Oxidation of Hydroquinone in Aqueous Solution over Bimetallic PdCo Catalyst Supported on Carbon: Effect of Interferents and Electrochemical Measurement. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016; 8(5): 2994–3002 [Internet]. [Consulta: último acceso 27 abril 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.5b09663>
173. Radel RJ, Sullivan JM, Hatfield JD. Catalytic oxidation of hydroquinone to quinone using molecular oxygen. *Ind Eng Chem Prod Res Dev*, 1982; 21(4): 566–570 [Internet]. [Consulta: último acceso 27 abril 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/i300008a010>
174. Hydroquinone and benzoquinone. Health-based recommended occupational exposure limit. Health Council of the Netherlands [Internet]. [Consulta: último acceso 27 abril 2016]. Disponible en: <https://www.gezondheidsraad.nl/sites/default/files/201227HydroBenzoquinone2.pdf>
175. Specifications and Control Tests on the Finished Product (3AQ11a). EMA Eur Med Agency. London, 1992.
176. Alasandro M, Little T, Fleitman J. Method Validation by Design to Support Formulation Development. *Pharm Technol*, 2013; 37(4): 84–92.
177. 蔡惠民, 周莉, inventors; 上海家化联合股份有限公司, assignee. Patente China CN 1472530 A. Method for quantitatively analyzing kojic dipalmitate and use thereof. 04 Febrero 2004 [Internet]. [Consulta: último acceso 30 abril 2016]. Disponible en: <http://www.google.com/patents/CN1472530A?cl=en>
178. Ganz M. Formulation and evaluation of hydrous and anhydrous skin whitening products containing sodium ascorbyl phosphate and kojic acid dipalmitate. Tesis doctoral. North-West University, Potchefstroom Campus; 2006 [Internet]. [Consulta: último acceso 30 abril 2016]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/26988837_Formulation_and_evaluation_of_hydrous_and_anhydrous_skin_whitening_products_containing_sodium_ascorbyl_phosphate_and_kojic_acid_dipalmitate_Marika_Ganz
179. Agilent|Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics. HPLC Literature. Agilent HPLC Column Selection guide: Solutions for small molecule

BIBLIOGRAFÍA

- separations [Internet]. [Consulta: último acceso 30 abril 2016]. Disponible en: <http://www.agilent.com/cs/library/selectionguide/public/5991-0165EN.pdf>
180. Agilent|Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics. GPC/SEC Literature. An introduction to gel permeation chromatography and size exclusion chromatography [Internet]. [Consulta: último acceso 30 abril 2016]. Disponible en: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-6969EN%20GPC%20SEC%20Chrom%20Guide.pdf>
181. GPC - Gel Permeation Chromatography Beginner's Guide: Waters [Internet]. [Consulta: último acceso 30 abril 2016]. Disponible en: http://www.waters.com/waters/es_ES/GPC---Gel-Permeation-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=10167568&locale=es_ES
182. Seymour RB, Carreher CE. Introducción a la Química de los Polímeros. 3ª ed. Editorial Reverté, SA. Barcelona, 1995: 91-120.
183. Glöckl I, Blaschke G, Veit M. Validated methods for direct determination of hydroquinone glucuronide and sulfate in human urine after oral intake of bearberry leaf extract by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001; 761(2): 261–266.
184. Lin Y-H, Yang Y-H, Wu S-M. Experimental design and capillary electrophoresis for simultaneous analysis of arbutin, kojic acid and hydroquinone in cosmetics. *J Pharm Biomed Anal*, 2007; 44(1): 279–282.
185. López García P, Rocha Miritello Santoro MI, Kedor-Hackmann ERM, Kedor-Hackman ERM, Kumar Singh A. Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel and cream preparations. *J Pharm Biomed Anal*, 2005; 39(3-4):764–768.
186. Elzanfaly ES, Saad AS, Abd-Elaleem AEB. Simultaneous determination of retinoic acid and hydroquinone in skin ointment using spectrophotometric technique (ratio difference method). *Saudi Pharm J*, 2012; 20: 249–253.
187. Ghanem MA. Electrocatalytic activity and simultaneous determination of catechol and hydroquinone at mesoporous platinum electrode. *Electrochem commun*, 2007; 9: 2501–2506.

188. Wittig J, Wittemer SM, Veit M. Validated method for the determination of six metabolites derived from artichoke leaf extract in human plasma by high-performance liquid chromatography-coulometric-array detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2003; 793(2): 367–375.
189. Lin CH, Sheu JY, Wu HL, Huang YL. Determination of hydroquinone in cosmetic emulsion using microdialysis sampling coupled with high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 2005; 38(3): 414–419.
190. Gao W, Legido-Quigley C. Fast and sensitive high performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams for hydroquinone, phenol and six preservatives. *J Chromatogr A*, 2011; 1218(28): 4307–4311.
191. Desmedt B, Rogiers V, Courselle P, De Beer JO, De Paepe K, Deconinck E. Development and validation of a fast chromatographic method for screening and quantification of legal and illegal skin whitening agents. *J Pharm Biomed Anal*, 2013; 83: 82–88.
192. Lin CH, Wu HL, Huang YL. Combining high-performance liquid chromatography with on-line microdialysis sampling for the simultaneous determination of ascorbyl glucoside, kojic acid, and niacinamide in bleaching cosmetics. *Anal Chim Acta*, 2007; 581: 102–107.
193. Masse MO, Duvallet V, Borremans M, Goeyens L. Identification and quantitative analysis of kojic acid and arbutine in skin-whitening cosmetics. *Int J Cosmet Sci*, 2001; 23(4): 219–232.
194. Higashi Y, Fujii Y. Determination of kojic acid in a skin-whitening cosmetic by high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection after pre-column derivatization with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *J Cosmet Sci*, 2012; 63(3): 205-212.
195. Huang J, Liu Y, Ding T, Zhang X, Chen H, Shen C, Wu C, Wu B, Niu W. Determination of kojic acid in foods using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Se Pu*, 2012; 30(6):578-583.
196. The United States Pharmacopeia, USP38-NF33. United States Pharmacopeial Convention, INC. Rockville (MD), 2015: 4609 (Official Monographs: Octinoxate).

BIBLIOGRAFÍA

197. The United States Pharmacopeia, USP38-NF33. United States Pharmacopeial Convention, INC. Rockville (MD), 2015: 2331 (Official Monographs: Avobenzone)
198. Kim D, Kim S, Kim S-A, Choi M, Kwon K-J, Kim M, et al. Simultaneous analysis and monitoring of 16 UV filters in cosmetics by high-performance liquid chromatography. *J Cosmet Sci*, 2012; 63: 103–17.
199. Kedor-Hackmann ERM, De Lourdes Pérez González ML, Singh AK, Santoro MIRM. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of five sunscreens in lotion preparation. *Int J Cosmet Sci*, 2006; 28: 219–224.
200. Kapalavavi B, Marple R, Gamsky C, Yang Y. Separation of sunscreens in skincare creams using greener high-temperature liquid chromatography and subcritical water chromatography. *Int J Cosmet Sci*, 2012; 34: 169–175.
201. The United States Pharmacopeia, USP38-NF33. United States Pharmacopeial Convention, INC. Rockville (MD), 2015: 6554 (Official Monographs: Butylated Hydroxyanisole).
202. The United States Pharmacopeia, USP38-NF33. United States Pharmacopeial Convention, INC. Rockville (MD), 2015: 6555 (Official Monographs: Butylated Hydroxytoluene).
203. Yang M-H, Lin H-J, Choong Y-M. A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats. *Food Res Int*, 2002; 35: 627–633.
204. Tomášková M, Chýlková J, Jehlička V, Navrátil T, Švancara I, Šelešovská R. Simultaneous determination of BHT and BHA in mineral and synthetic oils using linear scan voltammetry with a gold disc electrode. *Fuel*, 2014; 123: 107–112.
205. Perrin C, Meyer L. Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection. *Food Chem*, 2002; 77(1): 93–100.
206. Saad B, Sing Y, Nawi M, Hashim N, Mohamedali A, Saleh M, et al. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food Chem*, 2007; 105(1): 389–394.

207. Galimany-Rovira F, Pérez-Lozano P, Suñé-Negre JM, García-Montoya E, Miñarro M, Ticó JR. Development and validation of a new RP-HPLC method for the simultaneous determination of hydroquinone, kojic acid, octinoxate, avobenzene, BHA and BHT in skin-whitening cream. *Anal Methods*, 2016; 8(5): 1170–1180.
208. Cantrell A, McGarvey DJ. Photochemical studies of 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (BM-DBM). *J Photochem Photobiol B Biol*, 2001; 64(2-3): 117–122.
209. Mturi GJ, Martincigh BS. Photostability of the sunscreens agent 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (avobenzene) in solvents of different polarity and proticity. *J Photochem Photobiol A Chem*, 2008; 200(2-3): 410–420.
210. Swartz M. UPLC™: an introduction and review. *J Liq Chromatogr Relat*, 2005;28(7-8): 253–263.
211. Estella-Hermoso de Mendoza A, Campanero MA, Mollinedo F & Blanco-Prieto M. Comparative study of a HPLC-MS assay versus an UHPLC-MS/MS for anti-tumoral alkyl lysophospholipid edelfosine determination in both biological samples and in lipid nanoparticulate systems. *Chromatogr B*, 2009; 877(31): 4035–4041.
212. Gumustas M, Uslu B, Ozkan SA, Aboul-Enein HY. Validated stability-indicating HPLC and UPLC assay methods for the determination of entacapone in pharmaceutical dosage forms. *Chromatographia*, 2014; 77(23-24): 1721-1726.
213. Wu T, Wang C, Wang X, Xiao H, Ma Q, Zhang Q. Comparison of UPLC and HPLC for analysis of 12 phthalates. *Chromatographia*, 2008; 68: 803-806.
214. Ok HE, Choi SW, Kim M, Chun HS. HPLC and UPLC methods for the determination of zearalenone in noodles, cereal snacks and infant formula. *Food Chem*, 2014; 163: 252-257.
215. Alsante KM, Baertschi SW, Coutant M, Marquez BL, Sharp TR, Zelesky TC. Degradation and impurity analysis for pharmaceutical drug candidates. En Ahuja S, Scypinsky S. *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*. 2nd ed. Academic Press. Amsterdam, 2011; 10: 60-170.
216. Baertschi SW. *Pharmaceutical stress testing*. 1st ed. Informa healthcare USA, Inc. New York, 2007.

BIBLIOGRAFÍA

217. HPLC Separation Modes : Waters [Internet]. [Consulta: ultimo acceso 2 de mayo 2016]. Disponible en: http://www.waters.com/waters/es_ES/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=es_ES
218. Matyska MT, Peseljk JJ. How to retain polar and nonpolar compounds on the same HPLC stationary phase with an isocratic mobile phase. LC/GC, 2006; 24: 296–303.
219. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. Anal Bioanal Chem, 2012; 402(1): 231–247.
220. Sample Diluent Effects in HPLC - Crawford Scientific [Internet]. [Consulta: último acceso 2 mayo 2016]. Disponible en: <http://www.crawfordscientific.com/Chromatography-Technical-Tips-Sample-Diluent-Effects-in-HPLC.html>
221. ICH Q3B R2). Impurities in new drug products. International Conference on Harmonization. June 2006.
222. Lajis AFB, Hamid M, Ariff AB. Depigmenting effect of kojic acid esters in hyperpigmented B16F1 melanoma cells. J Biomed Biotechnol, 2012;2012: 952452.

ANEXO I

DETERMINACIÓN de HQ y PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN por HPLC

Condiciones cromatográficas

Columna	Zorbax SB-Phenyl 5 μm 80 Å, 4,6x 250 mm																					
Pre-columna	Zorbax SB-Phenyl 5 μm , 2,1 x 12.5 mm																					
Temperatura de columna	40 °C																					
Volumen de inyección	10,0 μl																					
Temperatura de carro muestras	25 °C																					
Fase móvil	A: ACN B: H ₂ O al 0,1% HAcO																					
Elución	<table border="1"><thead><tr><th>Tiempo</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0,0</td><td>10,0</td><td>90,0</td></tr><tr><td>10,0</td><td>10,0</td><td>90,0</td></tr><tr><td>30,0</td><td>90,0</td><td>10,0</td></tr><tr><td>35,0</td><td>90,0</td><td>10,0</td></tr><tr><td>45,0</td><td>10,0</td><td>90,0</td></tr><tr><td>50,0</td><td>10,0</td><td>90,0</td></tr></tbody></table>	Tiempo	A (%)	B (%)	0,0	10,0	90,0	10,0	10,0	90,0	30,0	90,0	10,0	35,0	90,0	10,0	45,0	10,0	90,0	50,0	10,0	90,0
Tiempo	A (%)	B (%)																				
0,0	10,0	90,0																				
10,0	10,0	90,0																				
30,0	90,0	10,0																				
35,0	90,0	10,0																				
45,0	10,0	90,0																				
50,0	10,0	90,0																				
Flujo	1,0 ml/min																					
Detección	UV a 230 nm																					
Tiempo de cromatograma	50 minutos																					
Tiempo de retención	HBQ: 0,35 min HQ: 5,27 min BQ: 8,46 min																					

Fase móvil H₂O al 0,1% HAcO

Diluir 1 ml de ácido acético glacial en 1l de agua Milli-Q. Homogeneizar.

Diluyente (70:30) ACN:Agua

Mezcla 700 ml de acetonitrilo y 300 ml de agua Milli-Q. Homogeneizar.

Idoneidad del sistema

El cromatograma de la solución patrón final debe cumplir con los siguientes criterios de idoneidad:

- El CV del área corregida (Área/Peso) de las 6 inyecciones de patrón debe ser inferior o igual a 2.0%.
- El número de platos teóricos (N) debe ser superior a 2000.
- El factor de simetría del pico debe ser inferior o igual a 2.0 .

Solución patrón HQ

Pesar exactamente alrededor de 20 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 400 µg/ml HQ

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución problema

Pesar exactamente alrededor de 20 mg de HQ principio activo o el equivalente en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 400 µg/ml HQ

PREPARAR POR DUPLICADO

Procedimiento

- Inyectar un blanco de diluyente.
- Inyectar 3 veces cada una de las soluciones patrón. El CV del área corregida (Área/Peso) debe ser inferior o igual a 2,0%.
- Inyectar 2 veces cada una de la soluciones problema.
- Inyectar 1 vez la solución patrón. La desviación respecto a los patrones de inicio de secuencia debe ser inferior al 2%.

Cálculos

El contenido de HQ se determina por comparación de los factores respuesta obtenidos con las soluciones problema y con las soluciones patrón.

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}}\right)}{2} \times 20 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$	Media de las áreas de HQ en las soluciones patrón 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de HQ en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de HQ en la solución patrón
20	Peso teórico de HQ patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg
R	Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}}\right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$	Media de las áreas de HQ en las soluciones problemas 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de HQ en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de HQ en la solución problema

Cálculo del contenido en HQ:

$$\text{Contenido en HQ (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$	Factor respuesta de las soluciones problema
$F_R(\text{ST})$	Factor respuesta de las soluciones patrón

El contenido de los productos de degradación se determina por comparación de los factores respuesta obtenidos con las soluciones problema y con las soluciones patrón.

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}}\right)}{2} \times 20 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$	Media de las áreas de HQ en las soluciones patrón 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de HQ en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de HQ en la solución patrón
20	Peso teórico de HQ patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg
R	Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{pd1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{pd2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{pd1}}, \overline{A_{pd2}}$	Media de las áreas del producto de degradación en las soluciones problemas 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de HQ en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de HQ en la solución problema

Cálculo del contenido en el producto de degradación:

$$\text{Contenido en Producto de Degradación (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times fcor \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$	Factor respuesta de las soluciones problema
$F_R(\text{ST})$	Factor respuesta de las soluciones patrón
$fcor$	Factor de corrección

BQ: 0.41

ANEXO II

DETERMINACIÓN de DPK por GPC

Condiciones cromatográficas

Columna	Phenogel 5 μm , 50 Å, 4,6 x 300 mm
Pre-columna	Phenogel 5 μm , 50 Å, 4,6 mm x 30 mm
Temperatura de columna	40 °C
Volumen de inyección	25,0 μl
Temperatura de carro muestras	25 °C
Fase móvil	Tetrahidrofurano
Flujo	1,5 ml/min
Detección	UV a 250 nm
Tiempo de cromatograma	5 minutos
Tiempo de retención	DPK: 2,2 minutos

Fase móvil Tetrahidrofurano

Diluyente Tetrahidrofurano

Idoneidad del sistema

El cromatograma de la solución patrón final debe cumplir con los siguientes criterios de idoneidad:

- El CV del área corregida (Área/Peso) de las 6 inyecciones de patrón debe ser inferior o igual a 2,0%.
- El número de platos teóricos (N) debe ser superior a 2000.
- El factor de simetría del pico debe ser inferior o igual a 2,0.

Solución patrón DPK

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de DPK patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF. Homogeneizar la solución. Filtrar a través de un filtro PVDF de 0,45 µm desechando los primeros 3 ml del filtrado.

Concentración: 200 µg/ml DPK

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución problema

Pesar exactamente 500 mg de crema en un matraz aforado de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF y homogeneizar la solución. Filtrar a través de un filtro PVDF de 0,45 µm desechando los primeros 3 ml del filtrado.

Concentración: 200 µg/ml DPK

PREPARAR POR DUPLICADO

Procedimiento

- Inyectar un blanco de diluyente.
- Inyectar 3 veces cada una de las soluciones patrón. El CV del área corregida (Área/Peso) debe ser inferior o igual a 2,0%.
- Inyectar 2 veces cada una de la soluciones problema.
- Inyectar 1 vez la solución patrón. La desviación respecto a los patrones de inicio de secuencia debe ser inferior al 2%.

Cálculos

El contenido de DPK se determina por comparación de los factores respuesta obtenidos con las soluciones problema y con las soluciones patrón.

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{\overline{P_{ST1}}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{\overline{P_{ST2}}} \right)}{2} \times 10 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$ Media de las áreas de DPK en las soluciones patrón 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de DPK en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de DPK en la solución patrón
10	Peso teórico de DPK patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg
R	Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$	Media de las áreas de DPK en las soluciones problemas 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de DPK en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de DPK en la solución problema

Cálculo del contenido en DPK:

$$\text{Contenido en DPK (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$	Factor respuesta de las soluciones problema
$F_R(\text{ST})$	Factor respuesta de las soluciones patrón

ANEXO III

DETERMINACIÓN de HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT por HPLC

Condiciones cromatográficas

Columna	Zorbax SB-Phenyl 5.0 µm 80 Å, 4,6x 250 mm
Pre-columna	Zorbax SB-Phenyl 5 µm 80 Å, 4,6 x 12,5 mm
Temperatura de columna	40 °C
Volumen de inyección	25,0 µl
Temperatura de carro muestras	25 °C
Fase móvil	A: ACN B: H ₂ O al 0,1% HAcO
Elución y Flujo	Ver Gradiente
Detección	UV a 230 nm
Tiempo de cromatograma	14 minutos
Tiempo de retención	KA: 1,6 min HQ: 2,2 min BHA: 6,1 min AVB keto tautomer: 7,2 min BHT: 7,9 min OCT: 9,7 min AVB enol tautomer: 10,5 min

Gradiente:

Tiempo	Flujo (ml/min)	A (%)	B (%)
0,0	1,2	30,0	70,0
3,0	1,2	30,0	70,0
3,5	2,0	70,0	30,0
8,0	2,0	70,0	30,0
8,5	0,8	70,0	30,0
12,0	0,8	70,0	30,0
13,0	1,2	30,0	70,0
14,0	1,2	30,0	70,0

Fase móvil H₂O al 0,1% HAcO

Diluir 1 ml de ácido acético glacial en 1l de agua Milli-Q. Homogeneizar.

Diluyente (70:30) ACN:Agua

Mezcla 700 ml de acetonitrilo y 300 ml de agua Milli-Q. Homogeneizar.

Idoneidad del sistema

El cromatograma de la solución patrón final debe cumplir con los siguientes criterios de idoneidad:

- El CV del área corregida (Area/Peso) de las 6 inyecciones debe ser inferior o igual a 2,0% para todos los compuestos.
- El número de platos teóricos (N) debe ser superior a 2000 para todos los compuestos.
- La resolución entre dos picos adyacentes debe ser superior a 1,5 para todos los compuestos.
- El factor de simetría del pico debe ser inferior o igual a 2,0 para todos los compuestos.

Solución madre HQ

Pesar exactamente alrededor de 200 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 4,00 mg/ml HQ

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre KA

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de KA patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 2,00 mg/ml KA

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre BHA

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHA patrón de trabajo en un matraz de 100 ml. Introducir unos 80 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 100 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 0,10 mg/ml BHA

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre BHT

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHT patrón de trabajo en un matraz de 100 ml. Introducir unos 80 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 100 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 0,10 mg/ml BHT

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre OCT

Pesar exactamente alrededor de 187,5 mg de OCT patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 7,50 mg/ml OCT

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre AVB

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de AVB patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 2,00 mg/ml OCT

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución patrón final

Diluir 1 ml de cada una de las soluciones madres preparadas anteriormente en un matraz de 10 ml. Enrasar con diluyente. Homogeneizar la solución.

*Concentración: 400 µg/ml HQ, 200 µg/ml KA, 10 µg/ml BHA,
10 µg/ml BHT, 750 µg/ml OCT, and 200 µg/ml AVB*

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución problema

Pesar exactamente alrededor de 500 mg de crema en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 15 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Posteriormente, enrasar a 50 ml con diluyente y agitar durante 15 minutos. Una alícuota de 10 ml de la suspensión resultante se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos.

*Concentración: 400 µg/ml HQ, 200 µg/ml KA, 10 µg/ml BHA,
10 µg/ml BHT, 750 µg/ml OCT, and 200 µg/ml AVB*

PREPARAR POR DUPLICADO

Procedimiento

- Inyectar un blanco de diluyente.
- Inyectar 3 veces cada una de las soluciones patrón final. El CV del área corregida (Área/Peso) debe ser inferior o igual a 2.0%.
- Inyectar 2 veces cada una de la soluciones problema.
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Cálculos

El contenido de cada uno de los compuestos se determina por comparación de los factores respuesta obtenidos con las soluciones problema y con las soluciones patrón.

HQ

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{\overline{P_{ST1}}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{\overline{P_{ST2}}} \right)}{2} \times 200 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$ Media de las áreas de HQ en las soluciones patrón 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de HQ en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de HQ en la solución patrón
200	Peso teórico de HQ patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg
R	Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$	Media de las áreas de HQ en las soluciones problemas 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de HQ en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de HQ en la solución problema

Cálculo del contenido en HQ:

$$\text{Contenido en HQ (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$	Factor respuesta de las soluciones problema
$F_R(\text{ST})$	Factor respuesta de las soluciones patrón

KA

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}} \right)}{2} \times 100 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$	Media de las áreas de KA en las soluciones patrón 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de KA en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de KA en la solución patrón
100	Peso teórico de KA patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg
R	Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}}\right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$

Media de las áreas de KA en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}

Peso de la muestra de KA en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg

P_T

Peso teórico de KA en la solución problema

Cálculo del contenido en KA:

$$\text{Contenido en KA (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$

Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$

Factor respuesta de las soluciones patrón

OCT

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}}\right)}{2} \times 187.5 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$

Media de las áreas de OCT en las soluciones patrón 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}

Peso de la muestra de OCT en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg

P_T

Peso teórico de OCT en la solución patrón

187.5

Peso teórico de OCT patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg

R

Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}}\right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$

Media de las áreas de OCT en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de OCT en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de OCT en la solución problema

Cálculo del contenido en OCT:

$$\text{Contenido en OCT (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$ Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$ Factor respuesta de las soluciones patrón

AVB

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}} \right)}{2} \times 100 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$ Media de las áreas de AVB tautómero enol en las soluciones patrón 1 y 2

P_{P1}, P_{P2} Peso de la muestra de AVB en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg

P_T Peso teórico de AVB en la solución patrón

100 Peso teórico de AVB patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg

R Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$ Media de las áreas de AVB tautómero enol en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2} Peso de la muestra de AVB en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg

P_T Peso teórico de AVB en la solución problema

Cálculo del contenido en AVB:

$$\text{Contenido en AVB (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$ Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$ Factor respuesta de las soluciones patrón

BHA

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}} \right)}{2} \times 100 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$ Media de las áreas de BHA en las soluciones patrón 1 y 2

P_{P1}, P_{P2} Peso de la muestra de BHA en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg

P_T Peso teórico de BHA en la solución patrón

100 Peso teórico de BHA patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg

R Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$ Media de las áreas de BHA en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2} Peso de la muestra de BHA en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg

P_T Peso teórico de BHA en la solución problema

Cálculo del contenido en BHA:

$$\text{Contenido en BHA (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$ Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$ Factor respuesta de las soluciones patrón

BHT

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}} \right)}{2} \times 100 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$

Media de las áreas de BHT en las soluciones patrón 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}

Peso de la muestra de BHT en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg

P_T

Peso teórico de BHT en la solución patrón

100

Peso teórico de BHT patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg

R

Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$

Media de las áreas de BHT en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}

Peso de la muestra de BHT en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg

P_T

Peso teórico de BHT en la solución problema

Cálculo del contenido en BHT:

$$\text{Contenido en BHT (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$

Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$

Factor respuesta de las soluciones patrón

ANEXO IV

DETERMINACIÓN de HQ, KA, OCT, AVB, BHA y BHT por UHPLC

Condiciones cromatográficas

Columna	Zorbax RRHT SB-Phenyl 1,8 µm 80 Å, 2,1x 100 mm
Temperatura de columna	40 °C
Volumen de inyección	3,0 µl
Temperatura de carro muestras	25 °C
Fase móvil	A: ACN B: H ₂ O al 0,1% HAcO
Elución	Ver Gradiente
Flujo	0,7 ml/min
Detección	UV a 230 nm
Tiempo de cromatograma	3 minutos
Tiempo de retención	KA: 0,35 min HQ: 0,43 min BHA: 1,45 min AVB keto tautomer: 1,68 min BHT: 1,79 min OCT: 1,97 min AVB enol tautomer: 2,02 min

Gradiente:

Tiempo	A (%)	B (%)
0,0	30,0	70,0
0,7	30,0	70,0
1,0	70,0	30,0
2,5	70,0	30,0
2,7	30,0	70,0
3,0	30,0	70,0

Fase móvil H₂O al 0,1% HAcO

Diluir 1 ml de ácido acético glacial en 1l de agua Milli-Q. Homogeneizar.

Diluyente (70:30) ACN:Agua

Mezcla 700 ml de acetonitrilo y 300 ml de agua Milli-Q. Homogeneizar.

Idoneidad del sistema

El cromatograma de la solución patrón final debe cumplir con los siguientes criterios de idoneidad:

- El CV del área corregida (Area/Peso) de las 6 inyecciones debe ser inferior o igual a 2,0% para todos los compuestos.
- El número de platos teóricos (N) debe ser superior a 2000 para todos los compuestos.
- La resolución entre dos picos adyacentes debe ser superior a 1,5 para todos los compuestos.
- El factor de simetría del pico debe ser inferior o igual a 2,0 para todos los compuestos.

Solución madre HQ

Pesar exactamente alrededor de 200 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 4,00 mg/ml HQ

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre KA

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de KA patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 2,00 mg/ml KA

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre OCT

Pesar exactamente alrededor de 187,5 mg de OCT patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 7,50 mg/ml OCT

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre AVB

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de AVB patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 2,00 mg/ml OCT

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre BHA

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHA patrón de trabajo en un matraz de 100 ml. Introducir unos 80 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 100 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 0,10 mg/ml BHA

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre BHT

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHT patrón de trabajo en un matraz de 100 ml. Introducir unos 80 ml de diluyente y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 100 ml con diluyente. Homogeneizar la solución.

Concentración: 0,10 mg/ml BHT

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución patrón final

Diluir 1 ml de cada una de las soluciones madres preparadas anteriormente en un matraz de 10 ml. Enrasar con diluyente. Homogeneizar y filtrar por un filtro PDVF de 0,22µm; desechando los primeros 2 ml del filtrado.

*Concentración: 400 µg/ml HQ, 200 µg/ml KA, 10 µg/ml BHA,
10 µg/ml BHT, 750 µg/ml OCT, and 200 µg/ml AVB*

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución problema

Pesar exactamente alrededor de 500 mg de crema en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de diluyente y sonicar durante 10 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Posteriormente, enrasar a 50 ml con diluyente y homogeneizar. Una alícuota de 10 ml de la suspensión resultante se centrifuga a 4500 rpm durante 5 minutos. Filtrar una alícuota del líquido sobrenadante por un filtro PDVF de 0,22µm; desechando los primeros 2 ml del filtrado.

*Concentración: 400 µg/ml HQ, 200 µg/ml KA, 10 µg/ml BHA,
10 µg/ml BHT, 750 µg/ml OCT, and 200 µg/ml AVB*

PREPARAR POR DUPLICADO

Procedimiento

- Inyectar un blanco de diluyente.
- Inyectar 3 veces cada una de las soluciones patrón final. El CV del área corregida (Área/Peso) debe ser inferior o igual a 2,0%.
- Inyectar 2 veces cada una de la soluciones problema.
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Cálculos

El contenido de cada uno de los compuestos se determina por comparación de los factores respuesta obtenidos con las soluciones problema y con las soluciones patrón.

HQ

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{\overline{P_{ST1}}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{\overline{P_{ST2}}} \right)}{2} \times 200 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$	Media de las áreas de HQ en las soluciones patrón 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de HQ en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de HQ en la solución patrón
200	Peso teórico de HQ patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg
R	Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$	Media de las áreas de HQ en las soluciones problemas 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de HQ en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de HQ en la solución problema

Cálculo del contenido en HQ:

$$\text{Contenido en HQ (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$	Factor respuesta de las soluciones problema
$F_R(\text{ST})$	Factor respuesta de las soluciones patrón

KA

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}} \right)}{2} \times 100 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$	Media de las áreas de KA en las soluciones patrón 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de KA en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de KA en la solución patrón
100	Peso teórico de KA patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg

R Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}}\right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$

Media de las áreas de KA en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}

Peso de la muestra de KA en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg

P_T

Peso teórico de KA en la solución problema

Cálculo del contenido en KA:

$$\text{Contenido en KA (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$

Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$

Factor respuesta de las soluciones patrón

OCT

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}}\right)}{2} \times 187.5 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$

Media de las áreas de OCT en las soluciones patrón 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}

Peso de la muestra de OCT en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg

P_T

Peso teórico de OCT en la solución patrón

187.5

Peso teórico de OCT patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg

R

Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}}\right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$

Media de las áreas de OCT en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de OCT en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de OCT en la solución problema

Cálculo del contenido en OCT:

$$\text{Contenido en OCT (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$ Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$ Factor respuesta de las soluciones patrón

AVB

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}} \right)}{2} \times 100 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$ Media de las áreas de AVB tautómero enol en las soluciones patrón 1 y 2

P_{P1}, P_{P2} Peso de la muestra de AVB en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg

P_T Peso teórico de AVB en la solución patrón

100 Peso teórico de AVB patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg

R Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$ Media de las áreas de AVB tautómero enol en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2} Peso de la muestra de AVB en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg

P_T Peso teórico de AVB en la solución problema

Cálculo del contenido en AVB:

$$\text{Contenido en AVB (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$ Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$ Factor respuesta de las soluciones patrón

BHA

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}} \right)}{2} \times 100 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$ Media de las áreas de BHA en las soluciones patrón 1 y 2

P_{P1}, P_{P2} Peso de la muestra de BHA en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg

P_T Peso teórico de BHA en la solución patrón

100 Peso teórico de BHA patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg

R Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$ Media de las áreas de BHA en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2} Peso de la muestra de BHA en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg

P_T Peso teórico de BHA en la solución problema

Cálculo del contenido en BHA:

$$\text{Contenido en BHA (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$ Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$ Factor respuesta de las soluciones patrón

BHT

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}} \right)}{2} \times 100 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$

Media de las áreas de BHT en las soluciones patrón 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}

Peso de la muestra de BHT en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg

P_T

Peso teórico de BHT en la solución patrón

100

Peso teórico de BHT patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg

R

Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$

Media de las áreas de BHT en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}

Peso de la muestra de BHT en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg

P_T

Peso teórico de BHT en la solución problema

Cálculo del contenido en BHT:

$$\text{Contenido en BHT (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$

Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$

Factor respuesta de las soluciones patrón

ANEXO V

DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA de HQ, KA, DPK, OCT, AVB, BHA, BHT y sustancias relacionadas por HPLC

Condiciones cromatográficas

Columna	Pursuit RXs Diphenyl 5 μm 80 Å, 4,6x 150 mm
Temperatura de columna	50 °C
Volumen de inyección	10,0 μl
Temperatura de carro muestras	25 °C
Fase móvil	A: ACN B: Solución reguladora KH_2PO_4 25 mM a pH 2,5
Elución	Ver Gradiente
Flujo	1,0 ml/min
Detección	UV a 230 nm
Tiempo de cromatograma	35 minutos
Tiempo de retención	KA: 5,22min HQ: 6,60 min BHA: 18,78 min AVB keto tautomer: 19,20 min BHT: 20,90min OCT: 22,60 min AVB enol tautomer: 23,45 min DPK: 26,90 min

Gradiente:

Tiempo	A (%)	B (%)
0,0	0,0	100,0
3,0	0,0	100,0
10,0	10,0	90,0
10,5	10,0	90,0
16,0	85,0	15,0
23,0	85,0	15,0
25,0	100,0	0,0
30,0	100,0	0,0
34,0	0,0	100,0
35,0	0,0	100,0

Fase móvil Solución reguladora KH_2PO_4 25 mM a pH 2,5

Pesar 3,40 g de KH_2PO_4 y disolver en 1 l de agua Milli-Q. Dejar reposar y medir pH. Ajustar el pH a 2,50 ($\pm 0,05$) con H_3PO_4 diluido 10%.

CADUCIDAD: 48 HORAS

Diluyente THF

Idoneidad del sistema

El cromatograma de la solución patrón final debe cumplir con los siguientes criterios de idoneidad:

- El CV del área corregida (Area/Peso) de las 6 inyecciones debe ser inferior o igual a 2,0% para todos los compuestos.
- El número de platos teóricos (N) debe ser superior a 2000 para todos los compuestos.
- La resolución entre dos picos adyacentes debe ser superior a 1,5 para todos los compuestos.
- El factor de simetría del pico debe ser inferior o igual a 2,0 para todos los compuestos.

Solución madre HQ

Pesar exactamente alrededor de 200 mg de HQ patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Concentración: 8,00 mg/ml HQ

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre KA

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de KA patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Concentración: 4,00 mg/ml KA

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre DPK

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de DPK patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Concentración: 4,00 mg/ml DPK

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre OCT

Pesar exactamente alrededor de 375 mg de OCT patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Concentración: 15,00 mg/ml OCT

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre AVB

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de AVB patrón de trabajo en un matraz de 25 ml. Introducir unos 15 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 25 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Concentración: 4,00 mg/ml OCT

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre BHA

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHA patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Concentración: 0,20 mg/ml BHA

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución madre BHT

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de BHT patrón de trabajo en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Enrasar a 50 ml con THF. Homogeneizar la solución.

Concentración: 0,20 mg/ml BHT

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución patrón final

Diluir 1 ml de cada una de las soluciones madres preparadas anteriormente en un matraz de 10 ml. Enrasar con THF y homogeneizar.

Concentración: 800 µg/ml HQ, 400 µg/ml KA, 400 µg/ml DPK

,20 µg/ml BHA, 20 µg/ml BHT, 1500 µg/ml OCT, and 400

µg/ml AVB

PREPARAR POR DUPLICADO

Solución problema

Pesar exactamente alrededor de 1,0 g de crema en un matraz de 50 ml. Introducir unos 30 ml de THF y sonicar durante 5 minutos (poner hielo en el baño de ultrasonidos para evitar el calentamiento del matraz). Posteriormente, enrasar a 50 ml con THF y homogeneizar.

Concentración: 800 µg/ml HQ, 400 µg/ml KA, 400 µg/ml DPK

,20 µg/ml BHA, 20 µg/ml BHT, 1500 µg/ml OCT, and 400

µg/ml AVB

PREPARAR POR DUPLICADO

Procedimiento

- Inyectar un blanco de diluyente.
- Inyectar 3 veces cada una de las soluciones patrón final. El CV del área corregida (Área/Peso) debe ser inferior o igual a 2,0%.
- Inyectar 2 veces cada una de la soluciones problema.
- Inyectar la primera solución patrón una única vez

Cálculos

El contenido de cada uno de los compuestos se determina por comparación de los factores respuesta obtenidos con las soluciones problema y con las soluciones patrón.

HQ

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}} \right)}{2} \times 200 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$	Media de las áreas de HQ en las soluciones patrón 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de HQ en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de HQ en la solución patrón
200	Peso teórico de HQ patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg
R	Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$	Media de las áreas de HQ en las soluciones problemas 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de HQ en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de HQ en la solución problema

Cálculo del contenido en HQ:

$$\text{Contenido en HQ (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$ Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$ Factor respuesta de las soluciones patrón

KA

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}} \right)}{2} \times 100 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$ Media de las áreas de KA en las soluciones patrón 1 y 2

P_{P1}, P_{P2} Peso de la muestra de KA en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg

P_T Peso teórico de KA en la solución patrón

100 Peso teórico de KA patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg

R Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$ Media de las áreas de KA en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2} Peso de la muestra de KA en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg

P_T Peso teórico de KA en la solución problema

Cálculo del contenido en KA:

$$\text{Contenido en KA (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$ Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$ Factor respuesta de las soluciones patrón

DPK

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}}\right)}{2} \times 100 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$	Media de las áreas de DPK en las soluciones patrón 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de DPK en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de DPK en la solución patrón
100	Peso teórico de DPK patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg
R	Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}}\right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$	Media de las áreas de DPK en las soluciones problemas 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de DPK en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de DPK en la solución problema

Cálculo del contenido en KA:

$$\text{Contenido en DPK (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$	Factor respuesta de las soluciones problema
$F_R(\text{ST})$	Factor respuesta de las soluciones patrón

OCT

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}}\right)}{2} \times 375 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$	Media de las áreas de OCT en las soluciones patrón 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de OCT en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de OCT en la solución patrón
375	Peso teórico de OCT patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg
R	Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$	Media de las áreas de OCT en las soluciones problemas 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de OCT en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de OCT en la solución problema

Cálculo del contenido en OCT:

$$\text{Contenido en OCT (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$	Factor respuesta de las soluciones problema
$F_R(\text{ST})$	Factor respuesta de las soluciones patrón

AVB

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}} \right)}{2} \times 100 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$	Media de las áreas de AVB tautómero enol en las soluciones patrón 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de AVB en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de AVB en la solución patrón

100	Peso teórico de AVB patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg
R	Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}} \right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$	Media de las áreas de AVB tautómero enol en las soluciones problemas 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de AVB en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de AVB en la solución problema

Cálculo del contenido en AVB:

$$\text{Contenido en AVB (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$	Factor respuesta de las soluciones problema
$F_R(\text{ST})$	Factor respuesta de las soluciones patrón

BHA

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}} \right)}{2} \times 50 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$	Media de las áreas de BHA en las soluciones patrón 1 y 2
P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de BHA en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de BHA en la solución patrón
50	Peso teórico de BHA patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg
R	Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}}\right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$

Media de las áreas de BHA en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}

Peso de la muestra de BHA en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg

P_T

Peso teórico de BHA en la solución problema

Cálculo del contenido en BHA:

$$\text{Contenido en BHA (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$

Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$

Factor respuesta de las soluciones patrón

BHT

El factor respuesta de las soluciones patrón:

$$F_R(\text{ST}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{ST1}}}{P_{ST1}} + \frac{\overline{A_{ST2}}}{P_{ST2}}\right)}{2} \times 50 \times \frac{100}{R}$$

Donde,

$\overline{A_{ST1}}, \overline{A_{ST2}}$

Media de las áreas de BHT en las soluciones patrón 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}

Peso de la muestra de BHT en las soluciones patrón 1 y 2 expresado en mg

P_T

Peso teórico de BHT en la solución patrón

50

Peso teórico de BHT patrón de trabajo en la solución patrón expresado en mg

R

Riqueza del patrón de trabajo expresado en %

El factor respuesta de las soluciones problema:

$$F_R(\text{Pr}) = \frac{\left(\frac{\overline{A_{P1}}}{P_{P1}} + \frac{\overline{A_{P2}}}{P_{P2}}\right)}{2} \times P_T$$

Donde,

$\overline{A_{P1}}, \overline{A_{P2}}$

Media de las áreas de BHT en las soluciones problemas 1 y 2

P_{P1}, P_{P2}	Peso de la muestra de BHT en las soluciones problemas 1 y 2 expresado en mg
P_T	Peso teórico de BHT en la solución problema

Cálculo del contenido en BHT:

$$\text{Contenido en BHT (\%)} = \frac{F_R(\text{Pr})}{F_R(\text{ST})} \times 100$$

Donde,

$F_R(\text{Pr})$ Factor respuesta de las soluciones problema

$F_R(\text{ST})$ Factor respuesta de las soluciones patrón

ANEXO VI



Cite this: DOI: 10.1039/c5ay02207j

Development and validation of a new RP-HPLC method for the simultaneous determination of hydroquinone, kojic acid, octinoxate, avobenzone, BHA and BHT in skin-whitening cream

Fanny Galimany-Rovira,* Pilar Pérez-Lozano, Josep M^a Suñé-Negre, Encarna García-Montoya, Montserrat Miñarro and Josep R. Ticó

A new and simple reverse phase high performance liquid chromatography method was developed for the simultaneous determination of the major compounds of skin-whitening pharmaceutical cream, *i.e.*, two active pharmaceutical ingredients: hydroquinone and kojic acid, two sunscreens: octinoxate and avobenzone and two antioxidants: butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. Separation was achieved on a Zorbax SB-Phenyl (250 × 4.6 mm; 5 μm) column, using a mobile phase consisting of water with 0.1% acetic acid and acetonitrile, in a dual-mode gradient for 14 minutes. The column was maintained at 40 °C and detection was carried out at 230 nm by using a diode-array detector. The extraction procedure was studied by a design of experiments demonstrating its suitability. The structure of an additional unknown peak eluting in all chromatograms in the same proportion was identified by HPLC/MS as the keto tautomer of avobenzone. The method developed was successfully validated in accordance with ICH guidelines with regard to selectivity, linearity, accuracy, precision and robustness. Selectivity was found to be satisfactory. The linear regression analysis data for all compounds showed a good linear relationship with $r^2 > 0.999$ in the concentration range from 50% to 120% of the label claimed for each compound. The percentage RSD for precision and accuracy of the method was found to be less than 2% for all compounds. The proposed method was applied for the determination of six major compounds in skin-whitening cream prototypes developed during the formulation development stage.

Received 21st August 2015
Accepted 5th January 2016

DOI: 10.1039/c5ay02207j

www.rsc.org/methods

Introduction

In recent decades, one of the most important topics in dermatologic and cosmetic R&D has been the study of hyperpigmentation disorders. One of these skin disorders is known as melasma and it presents as a dark facial skin rash with irregular borders. Melasma is the result of excess melanin produced by hyperactive melanocytes, melanin-producing cells. Melanin synthesis is stimulated by a complex process partially controlled by an enzyme called tyrosinase. Most treatments help to inhibit this enzyme, decreasing or blocking the production of melanin.^{1,2}

Therapy consists of managing several processes that must be controlled and minimized: UV light protection, inhibition of melanocyte activity and melanin synthesis. Several topical treatment options are available, the most common of which is a combination of a broad-spectrum (UVA + UVB) sunscreen with different tyrosinase inhibitors such as hydroquinone (HQ),

mequinol, arbutin, azelaic acid, retinoids, glycolic acid and kojic acid (KA) among others.^{3–5}

The cornerstone of topical treatments remains HQ because it is considered one of the most effective inhibitors of melanogenesis. HQ is a phenolic compound that blocks the conversion of dihydroxyphenylalanine (DOPA) to melanin by inhibiting tyrosinase.^{4,5}

Based on the data obtained from preliminary studies, a new skin-whitening cream consisting of a combination of two active pharmaceutical ingredients (API), HQ and KA, was developed. Furthermore octinoxate (OCT) and avobenzone (AVB) as sunscreens and butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) as antioxidants were introduced in the base cream. The amount at which each of them is present in the cream is as follows: 4.00% HQ, 2.00% KA, 7.50% OCT, 2.00% AVB, 0.1% BHA and 0.1% BHT. All of them must be controlled and quantified in quality control according to the current guidelines⁶ and, therefore, must be monitored from the formulation development stage. Both the content and the nature of the compounds are highly variable leading to a difficult analytical process. To date, no single HPLC method has been reported dealing with the simultaneous quantitative analysis of these compounds.

Pharmaceutical Technology Unit, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda Joan XXIII s/n 08028, Barcelona, Spain. E-mail: fgalimro7@alumnes.ub.edu

The literature reveals several methods reported for the determination of each of the compounds of the cream alone or in combination with other substances. Several analytical methods have been published for the determination of HQ and its combinations in pharmaceuticals or in biological fluids using redox titrimetry,⁷ capillary zone electrophoresis,⁸ UV-spectrophotometry,^{9,11} voltammetry,¹² and HPLC.^{13–16} HPLC methods for KA alone or in combination with other substances have been reported.^{16–20} The United States Pharmacopeia (USP) recommends gas chromatography (GC) as the official method for the determination of both OCT²¹ and AVB,²² separately. OCT has been analyzed in combination with AVB and some other sunfilters by HPLC^{23,24} and HTLC/SBWC.²⁵ According to the USP, the bulk material assay of BHA and BHT is performed by HPLC.^{26,27} The simultaneous determination of BHA and BHT in combination with other phenolic antioxidants has been addressed in several analytical reports. These reports proposed GC,²⁸ voltammetry²⁹ and several HPLC^{30,31} methods. To the best of our knowledge, the methods described in the literature do not cover the analysis of six compounds HQ, KA, OCT, AVB, BHA and BHT in a pharmaceutical mixture.

Therefore, the goal of the present work is to develop and validate a new, simple and reliable RP-HPLC method for the simultaneous determination of two APIs (HQ and KA), two sunscreens (OCT and AVB) and two antioxidants (BHA and BHT) contained in the developed cream prototypes with an easy and robust extraction procedure. The developed method was successfully validated according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines and applied for the determination of six major compounds in the cream prototypes developed during the formulation development stage.

Experimental

Chemicals and reagents

Cream formulation prototypes and placebos were provided by SDM (Barcelona, Spain). Standards of HQ (USP reference standard), KA (analytical standard $\geq 99.0\%$), OCT (USP reference standard), AVB (USP reference standard), BHA (Pharmaceutical secondary standard – traceable to Ph.Eur. and USP) and BHT (USP reference standard) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Acetonitrile (ACN) HPLC grade and acetic acid glacial Ph.Eur. grade were purchased from Panreac Quimica (Barcelona, Spain). Water HPLC grade was obtained from a Milli-Q® system (Millipore, Bedford, MA, USA). The HPLC columns used in this study include a Zorbax SB-Phenyl column (250 × 4.6 mm, 5 μm ; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), a Luna C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA) and Symmetry C8 (250 × 4.6 mm, 5 μm ; Waters, Milford, MA, USA).

Instrumentation

The HPLC system used was an Agilent 1200 RRCL (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) which consists of a column oven, a quaternary pump, an automatic injector and a diode-array detector (DAD). The system was controlled by

Chemstation version B04.02 software (all from Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

For the LC-MS experiments, an Agilent 1200 RRCL (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) coupled to a hybrid quadrupole time-of-flight QSTAR Elite (ABSciex, Concord, Ontario, Canada) equipped with an ESI source was used. Acquisition and analysis of data were performed with Analyst QS 2.0 software (ABSciex, Concord, Ontario, Canada).

The samples were stored under accelerated conditions in a climatic test chamber (KBF7201, Binder, Tuttlingen, Germany) set at 40 °C/75% RH. Other instruments used were a centrifuge (Meditronic, Selecta, Abrera, Spain), an analytical balance (AX205, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland), an ultrasonic bath (8550-MT, Branson Ultra-sonic Corporation, Danbury, CT, USA) and a magnetic stirrer (Multimatic 9-N, Selecta, Barcelona, Spain).

Chromatographic conditions

The chromatographic analyses were performed on a Zorbax SB-Phenyl (250 × 4.6 mm i.d., 10 μm particle size), which was kept at 40 °C. A dual-mode gradient was developed in 14 minutes as shown in Table 1. The injection volume was 25 μl . UV detection was performed at 230 nm.

For LC-MS studies, the developed method was used. The eluate flow coming from the HPLC system was split 1 : 3 before introduction into the ESI source. MS acquisition was performed in negative ionization and full-scan (70–800 m/z) mode. MS parameters in negative ionization: ion spray voltage, –3500 V; declustering potential, –80 V; focusing potential, –380 V; declustering potential 2, –10 V; ion release delay, 6 V; ion release width, 5 V; temperature, 400 °C with N₂ as curtain gas, 30 a.u. (arbitrary units); auxiliary gas, 20 a.u. and nebulizer gas, 50 a.u. The Q-TOF was calibrated as recommended by the manufacturer.

Standard solution preparation

The stock standard solutions of each compound (HQ, KA, OCT, AVB, BHA and BHT) were prepared individually by dissolving adequate accurately weighed amounts of standard compounds in the sample diluent (mixture of ACN/H₂O (70 : 30, v/v)).

Working standard solution was produced by diluting the stock solutions containing standard compounds. The concentration of each compound in working standard solution was 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of HQ, 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of KA, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of BHA, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of BHT, 750 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of OCT and 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of AVB.

Table 1 Dual-mode gradient of the developed method

Time	Flow rate (ml min ⁻¹)	A (%)	B (%)
0.0	1.2	30.0	70.0
3.0	1.2	30.0	70.0
3.5	2.0	70.0	30.0
8.0	2.0	70.0	30.0
8.5	0.8	70.0	30.0
12.0	0.8	70.0	30.0
13.0	1.2	30.0	70.0
14.0	1.2	30.0	70.0

Sample solution preparation

Samples were prepared by weighing approximately 500 mg of cream into a 50 ml volumetric flask, adding 30 ml of sample diluent followed by 15 minutes of sonication in a water-ice ultrasonic bath and then made up to volume with sample diluent. The resulting suspension was stirred for 15 minutes in a magnetic stirrer and then a portion was centrifuged at 4500 rpm for 5 minutes. A volume of 25 μL of supernatant was analyzed by HPLC (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ HQ, 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ KA, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ BHA, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ BHT, 750 $\mu\text{g ml}^{-1}$ OCT, and 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ AVB).

Method validation

The developed method was validated according to ICH guidelines³² considering the following parameters: selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness. The detection limit and quantification limit were not assessed because the developed method is for the quantification of major compounds in pharmaceutical products.

The selectivity of the method was studied by comparing working standard solution, placebo solution and sample solution and it was confirmed by the complete separation of all compounds as well as by the peak purity test. To establish the linearity and range, adequate volumes of stock standard solution of each compound were diluted to yield a standard mixture of all compounds. Five concentrations were chosen ranging from 50% to 120% of the target compound concentration in cream prototypes. Each concentration of standard mixture solutions was injected in triplicate and the mean peak area value was taken for the calibration curve. The precision of the method was evaluated both in terms of repeatability and intermediate precision. For repeatability, six independent sample solutions were prepared on the same day and triplicate measurements were performed. Intermediate precision was studied using two independent sample solutions. These solutions were prepared and analyzed by two different analysts, on two different days and processed in a different HPLC system. The results were evaluated in terms of RSD. Accuracy studies were conducted through the standard addition method. The addition of adequate volume of stock standard solutions of each compound was done in a placebo solution at different levels: 50, 100 and 150% each of the labelled claim and injected in triplicate. Robustness of the method was verified by introducing small variations in the HPLC parameters, including column temperature ($\pm 5^\circ\text{C}$), injection volume ($\pm 2\ \mu\text{l}$), wavelength ($\pm 2\ \text{nm}$) and different batches of the same analytical column were studied. To demonstrate the stability of working standard and sample solutions during a period of time considered usual in routine analysis, both solutions were injected over a period of 48 hours stored at room temperature.

Results and discussion

Method development

The main objective of the chromatographic method was to separate the six compounds of different natures due to differences in their molecular structures. The chemical structures of the six compounds under study are depicted in Fig. 1. As can be

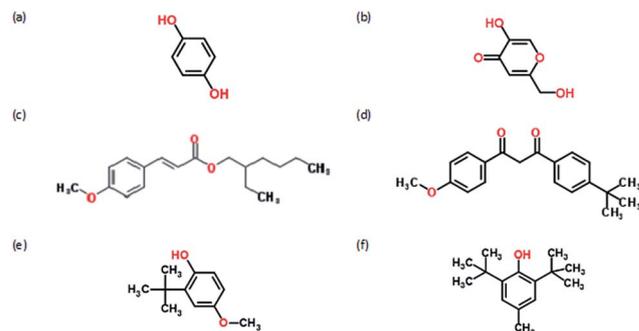


Fig. 1 Compounds under study: (a) hydroquinone (HQ); (b) kojic acid (KA); (c) octinoxate (OCT); (d) avobenzone (AVB); (e) butylated hydroxyanisole (BHA); (f) butylated hydroxytoluene (BHT).

Table 2 Compound properties

Compounds	MW (g mol^{-1})	pK_a	$\log P$
HQ	110.11	10.33	0.62
KA	142.11	9.40	-0.66
BHA	180.24	10.01	3.06
BHT	220.35	12.76	5.17
OCT	290.40	—	5.66
AVB	310.39	9.74	4.91

observed in their structure, all compounds are aromatic but whereas OCT is neutral, the rest have an acidic character with pK_a above 9. Classifying them according to polarity: KA and HQ are very polar, BHA slightly polar, BHT, OCT and AVB are slightly nonpolar (Table 2).

In order to achieve the simultaneous separation of these compounds, whose physicochemical characteristics are so different, with a suitable resolution and peak symmetry, several tests were carried out to optimize both the stationary phase and mobile phase.

In extensive preliminary experiments, a series of aqueous mobile phases with different pH values in combination with different organic modifiers were tested using a generic elution gradient (T (min)/%B: 0/10, 10/10, 30/90, 35/90, 40/10, and 45/10) at a flow rate of $1.0\ \text{ml min}^{-1}$. The best results were obtained using a low pH mobile phase, (A) 0.1% acetic acid in water ($\sim\text{pH } 3.0$) and (B) ACN, because under these conditions all compounds were in the undissociated form and retention was maximum and constant. This trial, however, resulted in a peak overlap between OCT and AVB.

To optimize the chromatographic conditions, column screening studies were conducted using C8, C18 and phenyl stationary phases. The phenyl column was selected because it provided a complementary selectivity due to π - π interactions produced between the π electrons of the aromatic functionality of the stationary phase and π electrons of the compounds. Two different lengths, 150 mm and 250 mm, of analytical phenyl columns were tested. However, a complete separation of OCT/AVB was not achieved.

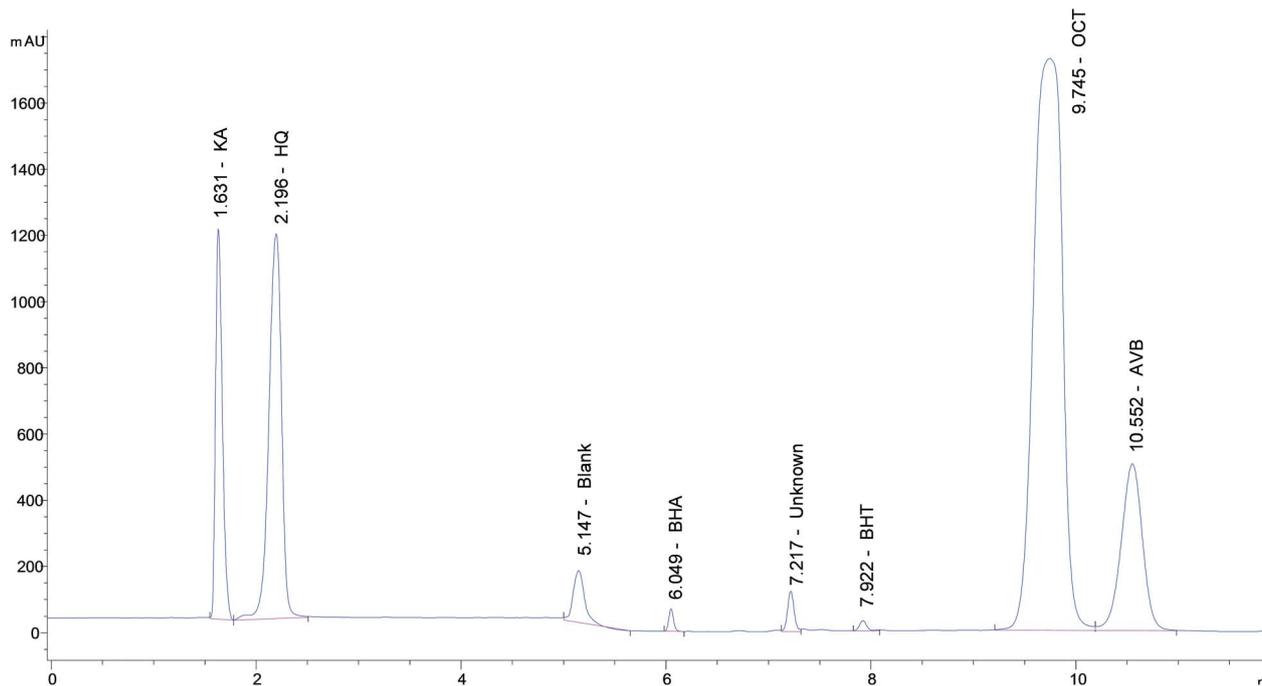


Fig. 2 Representative chromatogram of working standard solution using a Zorbax SB-Phenyl column (250 × 4.6 mm; 5 μm) with the developed dual-mode gradient.

To improve the resolution between OCT/AVB and reduce runtime analysis, fine-tuning of the proportions of aqueous and organic phases was combined with a flow-rate gradient (dual-mode gradient). It was preferred to a new selectivity study of columns as HILIC, polar-embedded phases, and mixed mode phases. In the literature, there are a number of reports regarding dual-mode gradient elution where the mobile phase composition and flow vary simultaneously over time.^{33–37} At the beginning, an isocratic step at 30% of ACN at a constant flow rate of 1.2 ml min⁻¹ until 3 minutes provided a correct resolution between KA and HQ. In the following step, the ACN proportion and the flow rate were increased simultaneously to 70% of ACN and 2.0 ml min⁻¹, respectively, in 0.5 minutes (3.5 min). Then, the ACN proportion and flow rate were kept constant for 4.5 minutes (8 min) in order to separate BHA, an unknown peak, and BHT suitably. After this time, the ACN proportion was kept constant while the flow rate decreased to 0.8 ml min⁻¹ in 0.5 minutes (8.5 min) and then, to separate OCT and AVB properly the flow rate was kept constant for 3.5 minutes (12 min). Finally, a 2 minutes final step was scheduled to return and stabilize to the initial chromatographic conditions.

To improve the repeatability of injections and separation of compounds, to reduce viscosity and column back-pressure, to improve efficiency and to minimize drift due to temperature change, the column oven temperature was maintained at 40 °C. The selected wavelength was 230 nm after studying the spectra and detector response for all compounds. In this optimized method, the separation of the six compounds is shown in Fig. 2.

Sample preparation

Sample preparation is a difficult and essential part of method development because the recovery of different compounds may be affected especially in creams that contain multiple excipients. In general, sample preparation for creams is a complex process involving pre-treatment procedures such as SPE or supercritical extraction fluid.^{38,39} In this case, a quick and easy extraction process was developed to obtain a suspension of cream in sample diluent in three steps: sonication for 15 minutes in a water-ice ultrasonic bath, agitation for 15 minutes in a magnetic stirrer at room temperature followed by centrifugation of an aliquot at 4500 rpm for 5 minutes. To confirm the suitability of the extraction process for all compounds, the extraction process was studied through a design of experiments (DoE) in combination with statistical evaluation of the obtained data. Only three of the factors that could affect the extraction of the compounds from cream were investigated: sonication time, stirring time and sample solvent strength. A full factorial design with three variables at three levels including two replicates at the centre point was generated using JMP® software (Table 3). The extraction process was studied by preparing ten solutions in which the sonication time, stirring time and solvent strength were varied according to the design. All the solutions were analyzed by the proposed method. The obtained recoveries of all compounds were entered in JMP® software and analyzed using the analysis of variance (ANOVA) method by least-square fit (Table 4). The results indicated that neither sonication time nor stirring time was a significant parameter for the extraction of all compounds because Prob > |t| values were greater than 0.05 in all cases, which means that no significant differences

Table 3 DoE of the extraction study

Experiment	Pattern	ACN (%)	Sonication time (minutes)	Stirring time (minutes)
E01	−++	80	10	20
E02	+−−	60	20	10
E03	−−−	60	10	10
E04	000	70	15	15
E05	++−	60	20	20
E06	−−+	80	20	10
E07	000	70	15	15
E08	+−+	80	20	10
E09	+++	80	20	20
E10	−+−	60	10	20

occur when these two parameters were changed. The extraction of all compounds, except BHT, was statistically significantly affected by sample solvent strength as evidenced by $\text{Prob} > |t|$ less than 0.05. The parameter estimation for sample solvent strength factor was in all cases between 1.4 and 2.2, which was much lower than the mean values comprised of 97.0–99.0. Hence, sample solvent strength could not be considered a primary factor in changing the extraction process. The interactions for the extraction of each compound were also studied and were found to be statistically non-significant.

Detection and identification of an unknown additional peak by the newly developed RP-HPLC method

Working standard and sample solution were injected by the developed RP-HPLC method as described above. Both chromatograms revealed the presence of an unknown additional peak at a retention time of 7.22 min. All stock solutions were injected and the unknown additional peak was discovered to be related to AVB.

To further investigate the unknown additional peak, the LC-MS method described above was used to identify it. Mass spectral data of AVB stock standard solution showed a deprotonated molecular ion peak ($[M - H]^-$) at m/z 109.1506 with the corresponding molecular formula $C_{20}H_{21}O_3^-$. Meanwhile the mass spectrum of the unknown additional peak showed a deprotonated molecular ion peak ($[M - H]^-$) at m/z 109.1506 with the corresponding molecular formula $C_{20}H_{21}O_3^-$ as observed in Fig. 3a–c. Consequently, the unknown additional peak had the same molecular formula as AVB. This is due to the fact that AVB in solution exists in two tautomeric forms: the enol form and the keto form (Fig. 3d).⁴⁰ The AVB peak which elutes at 10.55 minutes is the enol tautomer which absorbs around 355 nm whilst the keto tautomer which absorbs around 260 nm corresponds to an unknown additional peak eluting at 7.22 minutes.

Table 4 Parameter estimation for extraction study results

BHA				BHT				
Mean of response	97.0	Observations	10	98.3	Observations	10		
Parameter estimates								
Term	Estimate	Std error	<i>t</i> ratio	$\text{Prob} > t ^a$	Estimate	Std error	<i>t</i> ratio	$\text{Prob} > t ^a$
Solvent strength	2.12	0.5642	3.76	0.033	1.54	0.6683	2.30	0.105
Sonication time	0.38	0.5642	0.68	0.548	0.77	0.6683	1.15	0.335
Stirring time	0.20	0.5642	0.36	0.742	−0.01	0.6683	−0.01	0.105
OCT				AVB				
Mean of response	98.1	Observations	10	98.2	Observations	10		
Parameter estimates								
Term	Estimate	Std error	<i>t</i> ratio	$\text{Prob} > t ^a$	Estimate	Std error	<i>t</i> ratio	$\text{Prob} > t ^a$
Solvent strength	1.79	0.5544	3.23	0.048	2.21	0.3810	5.81	0.010
Sonication time	0.59	0.5544	1.07	0.364	0.31	0.3810	0.80	0.480
Stirring time	0.08	0.5544	0.15	0.889	0.05	0.3810	0.13	0.902
HQ				KA				
Mean of response	99.0	Observations	10	98.4	Observations	10		
Parameter estimates								
Term	Estimate	Std error	<i>t</i> ratio	$\text{Prob} > t ^a$	Estimate	Std error	<i>t</i> ratio	$\text{Prob} > t ^a$
Solvent strength	1.45	0.3484	4.17	0.025	1.64	0.4220	3.87	0.030
Sonication time	0.37	0.3484	1.05	0.372	0.45	0.4220	1.07	0.362
Stirring time	0.18	0.3484	0.52	0.641	0.24	0.4220	0.57	0.609

^a $\text{Prob} > |t|$ stands for the probability of observing the $|t|$ value which is greater than ratio. It is obtained from the t distribution table. $\text{Prob} > 0.05$ is usually the cut-off point to define statistical significance.

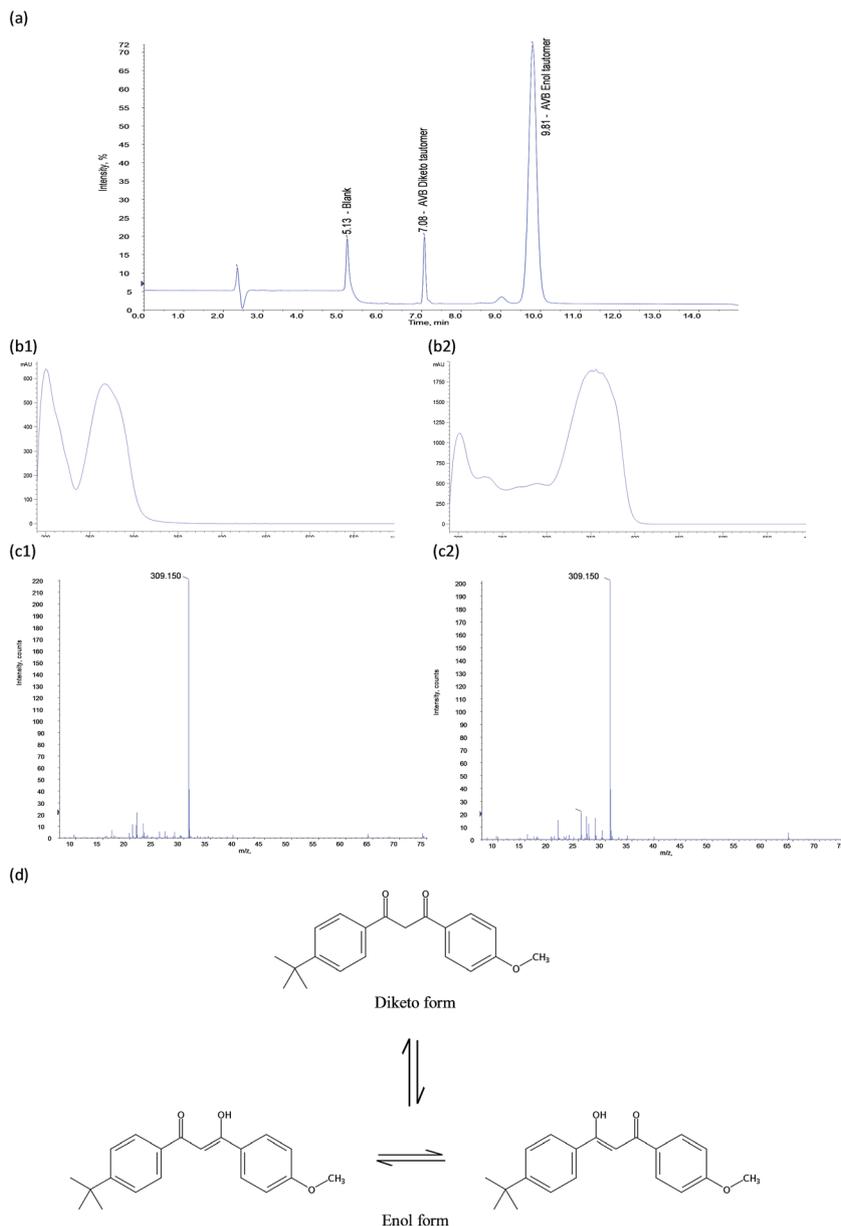


Fig. 3 The AVB keto–enol tautomerism: (a) AVB working standard chromatogram; (b1) UV spectra of the AVB keto tautomer peak; (b2) UV spectra of the AVB enol tautomer peak; (c1) MS spectra of the AVB keto tautomer peak; (c2) MS spectra of the AVB enol tautomer peak; (d) mechanism of AVB keto–enol tautomerism.

The tautomer's relative concentrations depend on the polarity and proticity of the solvent.⁴¹ In the case that the sample diluent was a mixture of ACN/H₂O (70 : 30, v/v), the relative concentration of keto tautomer was around 20%.

To determine the stability of the equilibrium between the two tautomeric forms, a standard solution of AVB and a sample solution were prepared and analyzed immediately after preparation and after different time intervals up to 48 h, while the sample cooler temperature was maintained at about 25 °C. The results from these studies indicated that the proportion between 2 tautomers was stable during the period of 48 hours. Therefore, quantification was based on the single most intense peak, the enol tautomer peak.

Method validation

A system suitability test was carried out before each validation run. Six injections of working standard solution were performed and the requirements for each compound were RSD of peak areas and retention times less than 1.0%, peak resolution (*R*) greater than 1.5 between two adjacent peaks, theoretical plate numbers (*N*) at least 2000 for each peak, and USP tailing factor (*T*) less than 1.5. The results obtained for all system suitability injections fulfilled the requirements, demonstrating that the chromatographic system is adequate and reliable.

Representative chromatograms of the blank solvent, placebo solution, working standard solution, and cream solution are

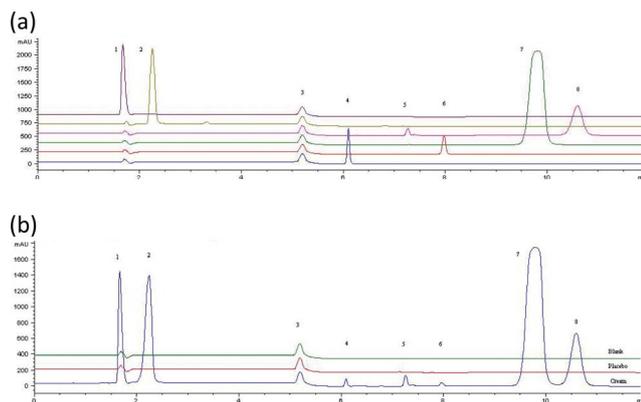


Fig. 4 Method selectivity (a) overlaid individual standard chromatograms; (b) overlaid chromatograms of blank, placebo and cream sample solutions. 1: KA; 2: HQ; 3: blank; 4: BHA; 5: AVB keto tautomer; 6: BHT; 7: OCT; 8: AVB enol tautomer.

shown in Fig. 4. No interfering peaks were observed in the placebo solution. When the working standard chromatogram was compared with the cream solution chromatogram, no significant interference with compound detection was observed and the peak purity test was performed using a DAD. Each of the chromatographic peaks could only be attributed to one compound as the purity factor within the threshold limit, suggesting the high specificity of this method. Good linearity was achieved for all compounds within the range from 50% to 120% of the expected concentrations of each compound in the cream prototypes. The regression lines were calculated and constructed by least square regression. The square of the correlation coefficient ($r^2 > 0.999$) demonstrated a good correlation between the compound concentration and peak area. In

order to compare the computed intercepts with the zero value, the confidence intervals were determined (Table 5). Moreover, a t -test was used to compare both the slope and the intercept of regression lines and no significant difference was observed. The ANOVA for linearities is also presented in Table 5. System precision was found to be less than 1%, the limit percentage set for the precision study of the instrumental system. The developed method was found to be precise as the RSD values for both repeatability and intermediate precision were less than 2.0% for all compounds including BHA and BHT, whose concentration in cream was 0.1%. The recoveries of all compounds were included in the $100 \pm 2\%$ interval, both recovery at each level and global recovery (calculated for the nine determinations) as shown in Table 6. The independence of the concentration factor with respect to the variance of the results was ascertained by Cochran's test. Furthermore, no significant difference between recovery results and 100% was demonstrated by the student's t test. To study the robustness of the method only one parameter was changed while the others were kept unaltered. The obtained data of the content of each compound in sample solutions were analyzed by one-way ANOVA ($p < 0.05$) for each parameter. Since all $F_{\text{CALCULATED}}$ values were less than the critical value (F_{CRITICAL}), it was concluded that there was no evidence to show that the results were affected by the studied parameters during robustness assays. Therefore, the proposed method can be considered reliable and robust. The results of the solution stability study showed that the RSD between assay values for each compound were unaltered, at 1.72% for BHT (the smallest peak), suggesting that both working standard and sample solution can be stored without any degradation over 48 hours. These results indicate that the method is acceptable for the accurate and precise determination of the compounds.

Table 5 Statistical analysis for linearities

Statistical parameters	BHA	BHT	OCT	AVB	HQ	KA
Regression equation						
Slope	21.999 ± 0.034	14.524 ± 0.337	10.143 ± 0.091	36.534 ± 0.045	20.292 ± 0.169	17.828 ± 0.040
Intercept	-0.668 ± 0.389	1.886 ± 3.573	4.115 ± 68.099	-18.346 ± 9.689	-82.846 ± 55.359	-10.007 ± 6.396
Correlation coefficient	0.9999	0.9965	0.9993	0.9999	0.9996	0.9999
$S(x, y)$	0.901	4.729	124.015	27.262	101.519	10.205
F	428 004.9	1857.8	12 331.9	657 346.9	14 440.89	197 536.9
Confidence interval	(0.139; -1.475)	(9.606; -5.834)	(147.790; -139.561)	(1.608; -38.301)	(36.750; -202.442)	(3.552; -23.565)
t student	-1.716	0.528	0.060	-1.894	-1.497	-1.565
calculated intercept						
t student	654.221	43.102	111.049	810.769	120.170	444.451
calculated slope						
t student tabulated ^a	2.093	2.093	2.093	2.093	2.093	2.093
Response factor						
Mean	21.91	14.76	10.14	36.26	19.87	17.74
SD	0.12	0.50	0.19	0.43	0.36	0.11
RSD (%)	0.53	3.40	1.84	1.19	1.82	0.64

^a t student tabulated values correspond to critical values at $p = 0.05$ and the $n(18) - 2 = 16$ degrees of freedom.

Table 6 Summary of recovery results

Compounds	Level: 50%		Level: 100%		Level: 150%		Global		Cochran's test ^{b,c}		Student's <i>t</i> test ^{b,c}	
	<i>R</i> ^a	RSD	<i>G</i> _{EXP}	<i>G</i> _{TAB}	<i>t</i> _{EXP}	<i>t</i> _{TAB}						
BHA	97.8	1.17	99.9	0.26	99.6	0.63	99.1	1.22	0.741	0.871	2.237	2.306
BHT	100.3	1.77	100.1	1.89	99.1	1.74	99.8	1.64	0.367		0.300	
OCT	100.6	0.21	100.2	0.33	99.5	0.05	100.1	0.51	0.700		-0.348	
AVB	100.7	1.17	100.6	1.59	101.0	0.97	100.7	1.11	0.523		1.965	
HQ	100.0	0.28	99.5	0.87	98.1	1.09	99.2	1.14	0.577		2.072	
KA	100.4	0.70	100.5	0.38	97.6	0.31	99.5	1.51	0.675		1.002	
									<i>G</i> _{EXP} < <i>G</i> _{TAB}		<i>t</i> _{EXP} < <i>t</i> _{TAB}	

^a *R*: recovery (%). ^b $\rho = 0.05$. ^c Degree of freedom = 8.

Comparison with reported methods

In the bibliographical research, several analytical methods were found for the determination of each of the compounds contained in the cream alone or in combination with other substances.

A titrimetric method has been used for the determination of HQ according to USP.⁷ These methods are used in quality control to verify the fulfillment of the established requirements of the purity of raw materials (active ingredients and excipients) because they have a set of advantages such as short analysis time, high precision, and no reference standards are required.⁴²

GC methods were described for the determination of OCT²¹ and AVB²² according to USP and for a mixture of BHA/BHT²⁸ with MS detection. For GC analysis, the analytes must be volatile and thermally stable enough. Then, GC analysis of low-volatility polar compounds such as KA and HQ results in poor sensitivity and peak tailing and therefore, a derivatization process should be introduced to convert them into more volatile derivatives *via* methylation or silylation. The derivatization process should be carefully considered, such as yield of derivatization, derivative recovery, stability of a derivative, identification and confirmation.^{43–45}

HQ has been determined in pharmaceutical creams and gels^{9,10} and its combination with retinoic acid using UV-visible spectrophotometry in ointments.¹¹ For the simultaneous determination of binary or ternary mixtures without a separation step, ratio-spectra derivative methods are used.⁴⁶

Electrochemical analysis of binary mixtures of HQ/catechol¹² and BHA/BHT²⁹ was also found in the literature. Electrochemical techniques can be interesting alternatives because of their simplicity, low cost and relatively short analysis time compared to other techniques. Among electrochemical techniques, voltammetric methods can be an interesting alternative for the determination of the drug in pharmaceutical formulations and the simultaneous determination of binary and ternary mixtures of pharmaceuticals.^{47,48}

Capillary electrophoresis (CE) has attracted great interest in pharmaceutical analysis as a possible alternative to HPLC but its contribution to the pharmacopeia monographs is still negligible due to limitations regarding its general applicability.⁴² Glöckl *et al.*¹⁵ analyzed HQ metabolites in human urine after oral intake of bearberry leaves by means of capillary zone

electrophoresis. The two metabolites are hydroquinone glucuronide and hydroquinone sulfate potassium salt, both ionic compounds. In our case, the cream contains four ionizable compounds (with *pK*_a between 9.4 and 10.3) that can be fully deprotonated in the pH > 11 buffer, one ionizable compound with *pK*_a = 12.7 behaving as a neutral compound because a pH > 14 buffer is needed for it to be fully deprotonated, and one neutral compound. Taking into account the nature of all compounds, the best option would be a new and complete development by means of micellar electrokinetic chromatography (MEKC).

High-performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most commonly employed analytical methods for drug analysis in the pharmaceutical industry during drug lifecycle and it is one of the most widely used analytical techniques in the USP and Ph.Eur.^{42,46} HPLC is used to separate complex mixtures of molecules encountered in chemical and biological systems. However, the limitations of HPLC include the price of columns, solvents and sample preparation. Even so, during the literature research HPLC was observed to have been the most widely used system.^{13–20,23,24,26,27,30,31}

Cream analyses are generally complex, mainly due to the complexity of the base cream or the matrix in which the analytes of interest are immersed. This in conjunction with the diverse natures of the analytes makes HPLC the most appropriate analytical technique to determine the analytes of interest.

The method was developed in order to support the formulation development stage of a skin whitening pharmaceutical cream. There are many analyses which may present unknown peak detection during the different phases of the development of a pharmaceutical drug. If the method is not LC/MS-compatible, it should be modified to make it compatible with LC/MS. The peaks of interest will probably have different retention times than in the original HPLC method, and may have a different elution order. Peak tracking between the original method and the adapted LC/MS method usually requires double detection – DAD in parallel with MS – to provide peak identifying spectra for comparison between both methods. For this reason, several of the reported methods that used non-volatile buffers such as phosphate and borate were discarded^{13,14,16–18,24,30}.

Table 7 Comparison of chromatographic characteristics between the proposed and reported HPLC methods^a

Mixture	Ref.	Mobile phase	Elution	Flow (ml min ⁻¹)	T _{COL} (°C)	Runtime (min)	Detection (nm)	Other
HQ (other)	13	A: 0.02 M sodium dihydrogen phosphate buffer (pH 3.4) B: (4 : 1) methanol – 0.1 M sodium dihydrogen phosphate aqueous solution (pH 1.4)	Isocratic (85 : 15)	0.8	25	17	—	Coulometric array detector
HQ	14	A: 0.02 M sodium dihydrogen phosphate buffer (pH 5.5) B: methanol	Isocratic (60 : 40)	1.5	NC	20	290	Microdialysis sampling
HQ (other)	15	A: 0.05 M ammonium formate buffer (pH 3.0) B: methanol	Gradient, 0/45, 2/45, 5/70, 20/70	0.2	NC	20	280	UHPLC
HQ/KA (other)	16	A: 25 mM ammonium borate buffer (pH 10.0) B: acetonitrile	Gradient, 0/1, 3/1, 4/30, 10/70, 12/1	0.4	40	12	230/240	UHPLC
KA (other)	17	A: 0.02 M sodium dihydrogen phosphate buffer (pH 5.5) B: methanol	Isocratic (60 : 40)	1.0	NC	25	254	Microdialysis sampling
KA (other)	18	A: 0.05 M potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 2.5) B: acetonitrile	Isocratic (30 : 70)	1.0	NC	5	270/286	
KA	19	A: Milli-Q water containing trifluoroacetic acid (0.1 v/v) B: acetonitrile	Isocratic (45 : 55)	0.35	NC	12.5	380	Pre-column derivatization
KA	20	5 mM ammonium acetate/formic acid solution	Isocratic	0.6	35	10	—	MS/MS
OCT (other)	23	A: acetonitrile: water (10 : 90 v/v) B: acetonitrile: water (90: 10 v/v)	Gradient, 0/10, 17/100	1.0	40	17	310	—
OCT/AVB (other)	24	A: 0.01 M potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 4.0) B: methanol	Dual-mode gradient, 0/30/1, 40/100/1, 40.1/100/1.2, 70/100/1.2		40	70	320/360	—
BHA	26	A: Milli-Q water containing acetic acid (5 v/v) B: acetonitrile	Isocratic (55 : 45)	1.2	30	10	290	—
BHT	27	A: Milli-Q water containing acetic acid (5 v/v) B: acetonitrile	Isocratic (35 : 65)	0.75	40	15	275	—
BHA (other)	30	A: Milli-Q water containing orthophosphoric acid (1 v/v), pH 3.0 B: acetonitrile	Gradient, 0/28, 1/28, 6/40, 26/90, 32/90	1.5	30	30	280	—
BHA/BHT (other)	31	A: Milli-Q water containing acetic acid (1 v/v) B: acetonitrile	Gradient, 0/30, 5/95, 9/100, 11/30	1.5	NC	11	280	—
Proposed HQ/KA/OCT/AVB/BHA/BHT		A: Milli-Q water containing acetic acid (0.1 v/v) B: acetonitrile	Dual-mode gradient, 0/30/1.2, 3/30/1.2, 3.5/70/2, 8/70/2, 8.5/70/0.8, 12/70/0.8, 14/30/1.2		40	14	230	—

^a NC: not controlled.

Gao *et al.*¹⁵ have reported a method for the quantification of HQ and other compounds in cosmetic creams by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) in a runtime of 20 minutes. In the absence of a UHPLC system, the method should be transferred to a HPLC system with a much longer runtime.

The rest of the gradient methods^{23,31} were developed to separate sets of some compounds. Therefore, the methods

should be adapted and redeveloped for the separation of our analytes of interest.

A comparison between the suggested and reported HPLC methods is presented in Table 7. It is obvious that the suggested method has a quick enough runtime to apply it to the development stage of formulation in which many samples of formulation prototype must be analyzed. Moreover, it is a HPLC method compatible with both DAD and MS dual detection. As

Table 8 Results of the preliminary stability study under accelerated (40 °C/75% RH) conditions over 3 months

Parameter	Prototype no. 1		Prototype no. 2	
	Initial	Ending	Initial	Ending
Aspect	No PS ^a	No PS ^a	No PS ^a	PS ^a
Assay				
HQ	99.6	98.2	97.9	97.6
KA	99.3	97.8	100.8	99.7
BHA	95.2	94.5	98.5	79.2
BHT	103.2	99.9	102.3	92.2
OCT	100.3	99.3	101.3	98.7
AVB	99.6	96.9	101.1	96.7

^a PS: phase separation.

a rule, the detection method should be DAD because it is cheaper and easier to operate and maintain than MS detection. But if necessary, MS detection can be used.

Simultaneous analysis with a single HPLC run allows for a much more cost-effective and less time-consuming analysis of cream prototypes. On the other hand, the sample preparation described in the present report, though long (35 minutes) and laborious (three steps: sonication, stirring and centrifugation), is simple and can be implemented in most laboratories. In addition, it does not require expensive equipment or materials such as SPE cartridges or supercritical extraction fluid.^{38,39}

Analysis of cream prototypes

During the formulation development stage, over 25 formulation prototypes of topical cream were analyzed using the validated RP-HPLC method. Many of the prototypes were highly unstable and others did not have suitable rheological properties. The two best prototypes were placed in a stability chamber under accelerated conditions (40 °C/75% RH) for 3 months. The results of prototype no. 1, with respect to the label claimed for each compound, were within the specifications of 90.0–110.0%. However, the results of prototype no. 2 did not meet the specifications. On the one hand, phase separation was observed in the cream and moreover the BHA content was less than 90.0%, as shown in Table 8. The decrease of antioxidants is usual and is not considered critical if it is proved that the content at the end of shelf-life is enough to prevent the oxidation of cream compounds. Evaluating all the data allowed choosing prototype no. 1 as the most suitable.

Conclusions

A new dual-mode gradient RP-HPLC method was developed and optimized, compatible with LC/MS, in 14 minutes of runtime for routine analysis of six major compounds in pharmaceutical skin whitening cream prototypes during the formulation development stage. The additional unknown peak was identified as the keto tautomer of AVB whose proportion in the chromatogram is kept constant depending only on solvent proticity. The extraction procedure is simple and produces good

compound recoveries. The method has been validated showing satisfactory data for selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness. The analytical procedure has been successfully applied to the determination of six major compounds during a preliminary stability study of three cream prototypes developed during the formulation development stage.

Conflict of interest

No conflict of interest exists.

Acknowledgements

The authors acknowledge the technical assistance provided by CCI TUB (Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona).

References

- 1 V. M. Sheth and A. G. Pandya, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2011, **65**(4), 689–697.
- 2 A. Pérez-Bernal, M. A. Muñoz-Pérez and F. Camacho, *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2000, **15**, 261–268.
- 3 B. Escutia Muñoz, E. Quecedo Estébanez and R. Botella Estrada, *Piel: Formación continuada en dermatología*, 2010, **25**(7), 405–410.
- 4 V. M. Sheth and A. G. Pandya, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2011, **65**(4), 699–714.
- 5 M. Rendon, M. Berneburg, I. Arellano and M. Picardo, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2006, **54**, 272–281.
- 6 European Commission, *3AQ11a*, EMEA Eur Med Agency, London, 1992.
- 7 The United States Pharmacopeia Convention Inc., *USP38-NF33*, Rockville, MD, 2015, pp. 3804–3805, (hydroquinone monograph).
- 8 G. Glöckl, G. Blaschke and M. Veit, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 2001, **761**, 261–266.
- 9 The United States Pharmacopeia Convention Inc., *USP38-NF33*, Rockville, MD, 2015, p. 3805, (hydroquinone cream monograph).
- 10 P. López García, M. I. Rocha Miritello Santoro, E. R. M. Kedor-Hackman and A. Kumar Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, **39**, 764–768.
- 11 E. S. Elzanfaly, A. S. Saad and A. E. Abd-Elaleem, *Saudi Pharm. J.*, 2012, **20**, 249–253.
- 12 M. A. Ghanem, *Electrochem. Commun.*, 2007, **9**, 2501–2506.
- 13 J. Wittig, S. Wittemer and M. Veit, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 2001, **761**, 125–132.
- 14 C. Lin, J. Sheu, H. Wu and Y. Huang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, **38**(3), 414–419.
- 15 W. Gao and C. Legido-Quigley, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 4307–4311.
- 16 B. Desmedt, V. Rogiers, P. Courselle, J. O. de Beer, K. de Paepe and E. Deconinck, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2013, **83**, 82–88.
- 17 C. H. Lin, H. L. Wu and Y. L. Huang, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **581**, 102–107.

- 18 M. O. Masse, V. Duvallet, M. Borremans and L. Goeyens, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2001, **23**, 219–232.
- 19 Y. Higashi and Y. Fujii, *J. Cosmet. Sci.*, 2012, **63**(3), 205–212.
- 20 J. Huang, Y. Liu, T. Ding, X. Zhang, H. Chen, C. Shen, B. Wu and W. Niu, *Sepu*, 2012, **30**(6), 578–583.
- 21 The United States Pharmacopeia Convention Inc., *USP38-NF33*, Rockville, MD, 2015, p. 4609, (octinoxate monograph).
- 22 The United States Pharmacopeia Convention Inc., *USP38-NF33*, Rockville, MD, 2015, p. 2331, (avobenzone monograph).
- 23 E. R. M. Kedor-Hackmann, M. L. de Lourdes Pérez González, A. K. Singh and M. I. R. M. Santoro, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2006, **28**, 219–224.
- 24 D. Kim, S. Kim, S. A. Kim, M. Choi, K. J. Kwon, M. Kim, *et al.*, *J. Cosmet. Sci.*, 2012, **63**, 103–117.
- 25 B. Kapalavavi, R. Marple, C. Gamsky and Y. Yang, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2012, **34**, 169–175.
- 26 The United States Pharmacopeia Convention Inc., *USP38-NF33*, Rockville, MD, 2015, p. 65514, (butylated hydroxyanisole monograph).
- 27 The United States Pharmacopeia Convention Inc., *USP38-NF33*, Rockville, MD, 2015, p. 6555, (butylated hydroxytoluene monograph).
- 28 M.-H. Yang, H.-J. Lin and Y.-M. Choong, *Food Res. Int.*, 2002, **35**(7), 627–633.
- 29 M. Tomášková, J. Chýlková, V. Jehlička, T. Navrátil, I. Švancara and R. Šelešovská, *Fuel*, 2014, **123**, 107–112.
- 30 C. Perrin and L. Meyer, *Food Chem.*, 2002, **77**(1), 93–100.
- 31 B. Saad, Y. Sing, M. Nawi, N. Hashim, A. Mohamedali, M. Saleh, *et al.*, *Food Chem.*, 2007, **105**(1), 389–394.
- 32 ICH, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 2005.
- 33 Y. Yokoyama, R. Kanazawa and H. Ukishima, *Chromatographia*, 2014, **77**(1), 51–57.
- 34 N. Özaltın and E. Uçaktürk, *Chromatographia*, 2007, **66**(1), 87–91.
- 35 J. Z. Song, C. F. Qiao, S. L. Li, Y. Zhou, M. T. Hsieh and H. X. Xu, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**(42), 7007–7012.
- 36 H. Ibrahim, A. Boyer, J. Bouajila, F. Couderc and F. Nepve, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2007, **857**(1), 59–66.
- 37 M. Mabrouk, H. El-Fataty, I. Hewala and E. Emam, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2013, **83**, 249–259.
- 38 E. Mikami, T. Goto, T. Ohno, H. Matsumoto and M. Nishida, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **28**, 261–267.
- 39 S. Scalia, *J. Chromatogr. A*, 2000, **870**, 199–205.
- 40 A. Cantrell and D. J. McGarvey, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2001, **64**(2–3), 117–122.
- 41 G. J. Mturi and B. S. Martincigh, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2008, **200**(2–3), 410–420.
- 42 S. Görög, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2007, **26**(1), 12–17.
- 43 K. Bielička-Daszkiwicz, M. Hadzicka and A. Voelkel, *ISRN Chromatogr.*, 2012, 680929, DOI: 10.5402/2012/680929.
- 44 A. Chisvert, J. Sisternes, A. Balaguer and A. Salvador, *Talanta*, 2010, **81**(1–2), 530–536.
- 45 K. Szyrwińska, A. Kołodziejczak, I. Rykowska, W. Wasiak and J. Lulek, *Acta Chromatogr.*, 2007, **18**, 49–58.
- 46 M. R. Siddiqui, Z. A. AlOthman and N. Rahman, *Arabian J. Chem.*, 2013, DOI: 10.1016/arabjc.2013.04.016, in press.
- 47 V. K. Gupta, R. Jain, K. Radhapyari, N. Jadon and S. Agarwal, *Anal. Biochem.*, 2011, **408**(2), 179–196.
- 48 A. Doménech-Carbó, L. M. de Carvalho, M. Martini and G. Cebrián-Torrejón, *Rev. Anal. Chem.*, 2014, **33**, 173–199.