



# Desarrollo de un nuevo medicamento con acetato de hidrocortisona para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

Magda Ascaso Anglés

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE MEDICAMENTS

DESARROLLO DE UN NUEVO MEDICAMENTO CON ACETATO DE  
HIDROCORTISONA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD  
INFLAMATORIA INTESTINAL (EII)

Memòria presentada per Magda Ascaso Anglés per optar al títol de doctor per la  
universitat de Barcelona

Director de Tesis

Director de Tesis

Prof. Dr. Josep Ma Suñe i Negre

Prof. Dra. Pilar Perez Lozano

Doctorando

Magda Ascaso Anglés

MAGDA ASCASO ANGLÉS 2015



# **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a las siguientes personas, el apoyo, ayuda y empuje recibido para poder finalizar este trabajo.

En primer lugar a mis padres, por orientarme y guiarme en la vida, por darme ánimos en los momentos más débiles, por creer siempre en mí y ayudarme en todo y por todo.

A mi marido, Albert, por su paciencia demostrada, por sus palabras de apoyo incondicional, por creer en mi.

A mi hermana, Begoña, por ser un ejemplo vivo de tesón, empuje y empeño para conseguir las cosas con optimismo y alegría.

A mis hijos, por darme, sin todavía ser conscientes, la fuerza para trabajar y concluir otro de mis retos en la vida.

A mis directores de tesis, por orientarme y guiarme, por su esfuerzo dedicado, por su apoyo y estímulo recibido.

Gracias a todos.



Esta tesis doctoral contiene un artículo científico de investigación presentado y aprobado para su publicación con las siguientes características (Anexo I):

**Título:** “DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A STABILITY-INDICATING RP-HPLC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF HYDROCORTISONE ACETATE, PROPYL PARAHYDROXYBENZOATE, METHYL PARAHYDROXYBENZOATE, BUTYLHYDROXYANISOLE AND THEIR DEGRADATION PRODUCTS IN A RECTAL GEL HUMAN FORMULATION” (Gaithersburg, MD 20877, USA).

**Autores:** Ascaso, Magda; Perez-Lozano, Pilar; García-Montoya, Encarna; Miñarro, Montse; Ticó, Josep; Fabregas, Anna; Carrillo, Carolina; Sarrate, Rocio; Suñé-Negre, Josep.

**Revista:** Journal of AOAC INTERNATIONAL

**Indice de impacto:** 1,385

**Número ID:** 13-0411.R3

**Fecha de aprobación:** 18 de mayo de 2014

A continuación se adjunta el **correo electrónico** recibido informando sobre la aprobación del artículo:



De: [onbehalfof+szw+usp.org@manuscriptcentral.com](mailto:onbehalfof+szw+usp.org@manuscriptcentral.com)

[mailto:[onbehalfof+szw+usp.org@manuscriptcentral.com](mailto:onbehalfof+szw+usp.org@manuscriptcentral.com)] En nombre de [szw@usp.org](mailto:szw@usp.org)

Enviado el: *diumenge, 18 / maig / 2014 20:52*

Para: *MARIA PILAR PEREZ LOZANO*

CC: [cwattenberg@aoac.org](mailto:cwattenberg@aoac.org)

Asunto: *Journal of AOAC INTERNATIONAL - Decision on Manuscript ID 13-0411.R3*

*18-May-2014*

*Dear Dr. Perez-Lozano:*

*It is a pleasure to accept your manuscript entitled "DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A STABILITY-INDICATING RP-HPLC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF HYDROCORTISONE ACETATE, PROPYL PARAHYDROXYBENZOATE, METHYL PARAHYDROXYBENZOATE, BUTYLHYDROXYANISOLE AND THEIR DEGRADATION PRODUCTS IN A RECTAL GEL HUMAN FORMULATION." in its current form for publication in the Journal of AOAC INTERNATIONAL.*

*The Journal now offers a Fee-Based Open Access option for accepted manuscripts. Please contact the AOAC Publications Office for more information at [Pubs@aoac.org](mailto:Pubs@aoac.org)*

*Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Journal of AOAC INTERNATIONAL, we look forward to your continued contributions to the Journal.*

*Sincerely,*

*Dr. Samir Wahab*

*Section Editor, Journal of AOAC INTERNATIONAL [szw@usp.org](mailto:szw@usp.org)*

Asimismo, esta tesis contiene un póster presentado en el XII congreso del SEFIG en Barcelona llevado a cabo del 26 al 28 de Enero de 2015 (Anexo II).



# INDICE

<b>OBJETIVO</b> .....	15
<b>PARTE BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
<b>1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII) Y TRATAMIENTO</b> .....	21
1.1. <b>Introducción</b> .....	21
1.2. <b>Epidemiología</b> .....	22
1.3. <b>Diagnóstico</b> .....	23
1.4. <b>Manifestaciones extraintestinales</b> .....	23
1.5. <b>Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal</b> .....	24
1.5.1. Agentes antiinflamatorios: Ácido 5 - aminosalicílico (5-ASA, mesalacina)	25
1.5.2. Corticoesteroides .....	26
1.5.3. Medicamentos inmunomoduladores .....	27
1.5.4. Medicamentos anticitoquina .....	27
1.5.5. Antibióticos y probióticos .....	28
<b>2. TRATAMIENTO CON CORTICOESTEROIDES: HIDROCORTISONA</b> .....	31
2.1. <b>Introducción</b> .....	31
2.2. <b>Características farmacológicas</b> .....	36
2.2.1. Acción glucocorticoide .....	37
2.2.2. Acción mineralocorticoide .....	38
2.3. <b>Características farmacocinéticas</b> .....	39
2.3.1. Absorción .....	39
2.3.2. Distribución .....	39
2.3.3. Metabolismo .....	39
2.3.4. Excreción .....	39
2.4. <b>Uso terapéutico, vías de administración y dosis</b> .....	40
2.5. <b>Efectos secundarios o adversos</b> .....	43
2.6. <b>Interacciones</b> .....	45
2.7. <b>Características químicas y fisico-químicas</b> .....	45
2.7.1. Acetato de hidrocortisona .....	46
2.7.2. Hidrocortisona base .....	57
<b>3. FORMAS FARMACEUTICAS SEMISOLIDAS</b> .....	71
3.1. <b>Introducción</b> .....	71
3.2. <b>Formas farmacéuticas semisólidas</b> .....	72
3.2.1. Crema .....	72
3.2.1.1. <i>Definición</i> .....	72
3.2.1.2. <i>Proceso para preparar una crema</i> .....	73
3.2.1.3. <i>Propiedades de las cremas</i> .....	77
3.2.1.4. <i>Estabilidad de las cremas</i> .....	80

3.2.2. Espuma .....	82
3.2.2.1. Definición .....	82
3.2.2.2. Proceso para preparar una espuma .....	84
3.2.2.3. Ensayos a realizar en las espumas .....	84
3.2.2.4. Estabilidad de las espumas .....	89
3.2.3. Geles .....	89
3.2.3.1. Definición .....	89
3.2.3.2. Excipientes para preparar un gel .....	90
3.2.3.3. Proceso para preparar un gel .....	91
3.2.3.4. Características de los geles .....	92
3.2.3.5. Estabilidad de un gel .....	96

## **PARTE EXPERIMENTAL .....**

### **4. ESTUDIO DE LA FORMULACIÓN Y TÉCNICA DE ELABORACIÓN .103**

<b>4.1. Emulsión .....</b>	<b>103</b>
4.1.1. Diseño de la formulación .....	104
4.1.2. Materias primas .....	110
4.1.2.1. Principio activo .....	110
4.1.2.2. Excipientes .....	110
4.1.3. Equipos .....	112
4.1.4. Metodología .....	112
4.1.4.1. Formulación 1 .....	113
4.1.4.2. Formulación 2 .....	113
4.1.5. Resultados experimentales y discusión de la Formulación 1 .....	114
4.1.6. Resultados experimentales y discusión de la Formulación 2 .....	120
4.1.7. Diagrama del proceso de fabricación del producto acabado y controles en proceso (IPC) .....	125
4.1.8. Control de puntos críticos .....	130
<b>4.2. Espuma .....</b>	<b>130</b>
4.2.1. Diseño de la formulación .....	131
4.2.2. Materias primas .....	131
4.2.2.1. Principio activo .....	131
4.2.2.2. Excipientes .....	131
4.2.3. Equipos .....	132
4.2.4. Metodología .....	133
4.2.5. Resultados experimentales y discusión .....	134
4.2.6. Diagrama del proceso de fabricación del producto acabado y controles en proceso (IPC) .....	144
4.2.7. Control de puntos críticos .....	147

<b>4.3. Gel</b> .....	147
4.3.1. Diseño de la formulación .....	147
4.3.2. Materias primas .....	151
4.3.2.1. <i>Principio activo</i> .....	151
4.3.2.2. <i>Excipientes</i> .....	151
4.3.3. Equipos .....	152
4.3.4. Metodología .....	153
4.3.5. Resultados experimentales y discusión .....	154
4.3.6. Diagrama del proceso de fabricación del producto acabado y controles en proceso (IPC) .....	157
4.3.7. Control de puntos críticos .....	159
<b>4.4. Estudios de estabilidad preliminar</b> .....	160
4.4.1. Diseño del estudio .....	160
4.4.1.1. <i>Estudio de estabilidad con el objetivo de elegir la sal de Hidrocortisona más estable</i> .....	161
4.4.1.2. <i>Estudio de estabilidad con el objetivo de elegir el pH de la formulación más estable</i> .....	162
4.4.1.3. <i>Estudio de estabilidad para elegir el envase primario en la que la formulación es más estable</i> .....	164
4.4.2. Material y métodos .....	166
4.4.2.1. <i>Material</i> .....	166
4.4.2.2. <i>Métodos</i> .....	166
4.4.3. Especificaciones .....	167
4.4.4. Evaluación de los métodos de estudio .....	167
4.4.4.1. <i>Aspecto</i> .....	167
4.4.4.2. <i>Ensayo de riqueza</i> .....	167
4.4.4.3. <i>Control del pH</i> .....	168
4.4.5. Resultados experimentales .....	168
4.4.6. Discusión .....	191
4.4.6.1. <i>Aspecto</i> .....	191
4.4.6.2. <i>pH</i> .....	192
4.4.6.3. <i>Estudio de la riqueza / valoración de hidrocortisona</i> .....	192
<b>5. TECNOLOGÍA DE FABRICACIÓN INDUSTRIAL</b> .....	195
<b>5.1. Guía de fabricación de la emulsión de acetato de hidrocortisona</b> .....	195
<b>5.2. Guía de fabricación del gel de acetato de hidrocortisona</b> .....	203
<b>6. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO HPLC FASE REVERSA INDICADOR DE ESTABILIDAD PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ACETATO DE HIDROCORTISONA, PROPILPARAHIDROXIBENZOICO, METILPARAHIDROXIBENZOICO, BUTILHIDROXIANISOL (BHA) Y SUS PRODUCTOS DE DEGRACIÓN EN UNA FORMULACIÓN EN GEL PARA APLICACIÓN RECTAL</b> .....	213
<b>6.1. Introducción</b> .....	213
<b>6.2. Metodología</b> .....	220
6.2.1. Desarrollo del método analítico .....	220
6.2.2. Definición de los parámetros de validación .....	225

6.2.3. Validación de la metodología analítica para la determinación de acetato de hidrocortisona, propilparahidroxibenzoico (4-hidroxybenzoic acid propyl ester, nipasol®), metilparahidroxibenzoico (4-hidroxybenzoic acid methyl ester, nipagin®) y butilhidroxianisol (BHA) .....	228
6.2.3.1. <i>Idoneidad del sistema</i> .....	228
6.2.3.2. <i>Selectividad</i> .....	229
6.2.3.3. <i>Linealidad</i> .....	230
6.2.3.4. <i>Precisión</i> .....	231
6.2.3.5. <i>Exactitud</i> .....	231
6.2.3.6. <i>Robustez</i> .....	232
6.2.4. Validación de la metodología analítica para la determinación de los productos de degradación del acetato de hidrocortisona .....	232
6.2.4.1. <i>Idoneidad del sistema</i> .....	232
6.2.4.2. <i>Estabilidad de la solución</i> .....	232
6.2.4.3. <i>Selectividad</i> .....	233
6.2.4.4. <i>Límite de detección y cuantificación</i> .....	239
6.2.4.5. <i>Linealidad</i> .....	240
6.2.4.6. <i>Precisión</i> .....	240
6.2.4.7. <i>Exactitud</i> .....	241
6.2.4.8. <i>Robustez</i> .....	241
<b>6.3. Resultados experimentales y discusión</b> .....	242
6.3.1. Resultados experimentales del estudio de validación para la determinación de acetato de hidrocortisona, propilparahidroxibenzoico (4-hidroxybenzoic acid propyl ester, nipasol®), metilparahidroxibenzoico (4-hidroxybenzoic acid methyl ester, nipagin®) y butilhidroxianisol (BHA) .....	243
6.3.1.1. <i>Idoneidad del sistema</i> .....	243
6.3.1.2. <i>Selectividad</i> .....	244
6.3.1.3. <i>Linealidad</i> .....	258
6.3.1.4. <i>Precisión</i> .....	283
6.3.1.5. <i>Exactitud</i> .....	291
6.3.1.6. <i>Robustez</i> .....	294
6.3.2. Resultados experimentales del estudio de validación para la determinación de los productos de degradación del acetato de hidrocortisona .....	319
6.3.2.1. <i>Idoneidad del sistema</i> .....	319
6.3.2.2. <i>Estabilidad de la solución</i> .....	319
6.3.2.3. <i>Selectividad</i> .....	322
6.3.2.4. <i>Límite de detección y cuantificación</i> .....	331
6.3.2.5. <i>Linealidad</i> .....	334
6.3.2.6. <i>Precisión</i> .....	340
6.3.2.7. <i>Exactitud</i> .....	345
6.3.2.8. <i>Robustez</i> .....	345
6.3.2.9. <i>Calculo del Factor de Corrección</i> .....	351

<b>7.</b>	<b>CONTROL DEL PRODUCTO ACABADO</b>	353
<b>7.1.</b>	<b>Introducción</b>	353
<b>7.2.</b>	<b>Metodología</b>	356
7.2.1.	Características organolépticas: aspecto	356
7.2.2.	pH	356
7.2.3.	Identificación del principio activo y productos de degradación	357
7.2.4.	Valoración del principio activo	357
7.2.5.	Valoración de los productos de degradación	358
7.2.6.	Valoración del metilparahidroxibenzoico	358
7.2.7.	Valoración del propilparahidroxibenzoico	358
7.2.8.	Valoración del butilhidroxianisol	358
7.2.9.	Control microbiológico	359
7.2.10.	Determinación de la viscosidad	359
7.2.11.	Determinación de la extensibilidad	359
<b>7.3.</b>	<b>Resultados experimentales</b>	360
<b>8.</b>	<b>ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO ACABADO</b>	363
<b>8.1.</b>	<b>Introducción</b>	363
<b>8.2.</b>	<b>Diseño del estudio</b>	366
<b>8.3.</b>	<b>Material y métodos</b>	367
8.4.1.	Material	367
8.4.2.	Métodos	368
<b>8.4.</b>	<b>Especificaciones</b>	368
<b>8.5.</b>	<b>Evaluación de los métodos de estudio</b>	370
8.5.1.	Aspecto	370
8.5.2.	Control del pH del gel	370
8.5.3.	Control de la viscosidad del gel	371
8.5.4.	Control de la extensibilidad del gel	371
8.5.5.	Valoración del principio activo y productos de degradación	371
8.5.6.	Control microbiológico	371
<b>8.6.</b>	<b>Resultados experimentales</b>	371
<b>8.7.</b>	<b>Discusión</b>	378
8.7.1.	Aspecto	378
8.7.2.	pH del gel	378
8.7.3.	Viscosidad del gel	379
8.7.4.	Extensibilidad del gel	379
8.7.5.	Estudio de la riqueza / valoración del acetato de hidrocortisona	380
8.7.6.	Estudio de la valoración del metilhidroxibenzoico (Nipagin)	381
8.7.7.	Estudio de la valoración del propilhidroxibenzoico (Nipasol)	383
8.7.8.	Estudio de la valoración de butilhidroxianisol (BHA)	384
8.7.9.	Estudio de los productos de degradación (hidrocortisona, cortisona, acetato de prednisolona, acetato de cortisona, productos de degradación individuales y productos de degradación totales)	385
8.7.10.	Estudio de la calidad microbiológica (aerobios (bacterias, hongos y levaduras), enterobacterias, Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa)	386

<b>9. EVALUACIÓN BIBLIOGRAFICA DE LA TOXICOLOGÍA DEL ACETATO DE HIDROCORTISONA EN APLICACIÓN DE LA DIRECTIVA 2004/27/EC (ARTICULO 10ª ANEXO I)</b> .....	387
<b>9.1. Características generales farmacológicas</b> .....	387
<b>9.2. Experiencia en el uso medicinal del acetato de hidrocortisona</b> .....	389
<b>9.3. Evaluación de la seguridad</b> .....	391
9.3.1. Toxicidad general .....	391
9.3.2. Reacciones locales adversas del uso tópico .....	392
9.3.3. Reacciones adversas sistémicas .....	395
9.3.4. Genotoxicidad y carcinogénesis .....	399
9.3.5. Embriotoxicidad y teratogénesis .....	400
9.3.5.1. <i>Datos en animales</i> .....	400
9.3.5.2. <i>Datos en humanos</i> .....	402
9.3.6. Efectos en el comportamiento .....	405
<b>10. DISCUSIÓN GLOBAL</b> .....	407
<b>CONCLUSIONES</b> .....	415
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	419
<b>ANEXOS</b> .....	431

## **OBJETIVO**



El objetivo principal de este estudio consiste en la investigación y desarrollo de la formulación de un nuevo medicamento semisólido con acetato de hidrocortisona en forma farmacéutica de enema rectal. Esta nueva formulación, novedosa e innovadora, pretende cubrir un vacío terapéutico en el tratamiento de la Enfermedad inflamatoria intestinal, en concreto la colitis ulcerosa.

Para ello es necesario tener en cuenta las especificaciones indicadas en la modificación de la Ley del Medicamento (1) y posteriores circulares del Ministerio de Sanidad y Consumo, donde se establecen los requisitos técnico-sanitarios que deben cumplir estos medicamentos para garantizar su calidad, seguridad y eficacia, así como las Recomendaciones internacionales “Note for Guidance on Pharmaceutical development (ICH Q8)” (2), en donde se establecen asimismo 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, es decir, para obtener un nuevo medicamento en forma semisólida con acetato de hidrocortisona, hace falta realizar una investigación galénica que haga del mismo un auténtico medicamento seguro, eficaz, estable y de calidad. En este caso, es necesario tener en cuenta el concepto más amplio de la galénica, que comprende una parte tecnológica y una parte de estabilidad que no pueden separarse, ya que la primera condiciona la segunda: la investigación para encontrar la formulación en la forma farmacéutica semisólida más adecuada, qué excipientes hace falta utilizar, qué tecnología de fabricación puede usarse, dará lugar a un medicamento con unas características de estabilidad adecuadas que condicionará su calidad. La importancia de alcanzar una formulación correcta que vehicule la sustancia medicamentosa para hacer posible su administración en una dosis determinada y por la vía de administración deseada, que en este caso es la vía rectal, consiguiendo la óptima estabilidad, se muestra trascendente en cualquier medicamento.

En el desarrollo de la investigación planteada para la obtención del nuevo medicamento, es necesaria la consecución de una serie de objetivos parciales sin los cuales no sería posible dicha obtención del nuevo medicamento. Estos objetivos son los siguientes:

- Investigación de las características químicas, físicas y tecnológicas de la materia prima motivo de estudio (hidrocortisona), con el fin de establecer su calidad y su

cumplimiento con los criterios de aceptación, tanto de Farmacopea como propios, que aseguren la obtención de un medicamento de calidad, seguro y eficaz.

- Diseño de una formulación robusta y adecuada en concordancia con el principio activo y su forma farmacéutica, lo que implica la realización del correspondiente estudio de preformulación en donde se incluya la investigación experimental de la compatibilidad de excipientes con el principio activo.
- Establecimiento de la técnica de elaboración más adecuada, lo que implica establecer las condiciones idóneas de elaboración y la validación de la técnica establecida. Ello implica también el correspondiente estudio de transposición a escala industrial, con el fin de obtener lotes industriales que den lugar a unidades de dosificación que cumplan con las especificaciones establecidas en el diseño y desarrollo de la formulación.
- Investigación y desarrollo de una nueva metodología analítica indicativa de la estabilidad, adaptada a la nueva formulación, como control de calidad y para los estudios de estabilidad del nuevo medicamento. Por tanto, uno de los objetivos en este trabajo es también el desarrollo de metodologías analíticas propias junto con el estudio de validación correspondiente, metodologías que tratarán de ser lo más sencillas posibles para aplicar posteriormente en el trabajo de rutina.
- Dado que uno de los objetivos de la tesis es el desarrollo de un medicamento estable, es necesario realizar la correspondiente investigación de la estabilidad de la fórmula definitiva, tanto en condiciones forzadas como a tiempo real, siguiendo los criterios establecidos en la norma ICH. Así se podrá garantizar que el medicamento desarrollado mantiene las características de eficacia y seguridad durante su período de validez.

## **PARTE BIBLIOGRÁFICA**



# **CAPÍTULO 1: ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII) Y TRATAMIENTO**

## **1.1.- INTRODUCCIÓN**

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CU), es un trastorno recidivante y remitente caracterizado por la inflamación crónica en diversos sitios en el tracto gastrointestinal, lo que resulta en diarrea y dolor abdominal. La inflamación resulta de una respuesta inmune mediada por células en la mucosa GI. La etiología exacta es desconocida, pero la evidencia sugiere que la flora intestinal normal desencadena una reacción inmune anormal en pacientes con una predisposición genética multifactorial (tal vez con barreras epiteliales anormales y las defensas inmunitarias de las mucosas). No se han identificado causas ambientales, de la dieta o infecciosas como causa de esta enfermedad. La reacción inmune implica la liberación de mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas, interleucinas, y TNF.

Aunque la enfermedad de Crohn y la CU son similares, se pueden distinguir en la mayoría de los casos. En el Cuadro 1.1. se muestran las características diferenciales entre los dos tipos de enfermedad (3).

Alrededor del 10% de los casos de colitis ulcerosa se consideran indeterminados. El término colitis se aplica sólo a la enfermedad inflamatoria del colon (por ejemplo, ulcerosa, granulomatosa, isquémica, inducida por radiación, infecciosa). Colitis espástica (mucosa) es un término equivocado que a veces se aplica a un trastorno funcional, denominado síndrome del intestino irritable.

<b>Diferencias entre la enfermedad del Crohn y la colitis ulcerosas</b>		
	<b>Enfermedad de Crohn</b>	<b>Colitis ulcerosa</b>
<b>Clínicas</b>	El sangrado rectal abundante es raro que ocurra	El sangrado rectal abundante siempre está presente.
	Las lesiones perianales son significativas en el 25-35% de los casos.	Las lesiones perianales significativas nunca ocurren.
<b>Endoscópicas y radiológicas</b>	Es común que aparezcan fistulas y desarrollo de abscesos.	No suelen aparecer fistulas.
	La enfermedad suele atacar la parte derecha del colon.	La enfermedad suele atacar la parte izquierda del colon.
	El Intestino Delgado es el afectado en el 80% de los casos	La enfermedad suele aparecer en el intestino grueso (colon).
<b>Histopatológicas</b>	En la radiografía, la pared intestinal se ve afectado asimétrica y segmentariamente.	La pared intestinal se ve afectada simétricamente y de forma ininterrumpida desde el recto proximal.
	La inflamación es microscópica y las fisuras se extienden más allá de la mucosa.	La inflamación es confinada a la mucosa excepto en casos severos.
	En la pared del intestino y de los ganglios linfáticos se detectan granulomas epiteloideos en el 25-50% de los casos.	No se producen granulomas epiteloideos típicos.

Cuadro 1.1.: Características diferenciales entre la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa

## **1.2.- EPIDEMIOLOGÍA**

La EII afecta a personas de todas las edades, pero por lo general comienza antes de los 30 años, con una incidencia máxima de los 14 a los 24 años. La EII puede tener un segundo pico más pequeño entre las edades de 50 y 70, sin embargo, este pico posterior puede incluir algunos casos de colitis isquémica.

Ambos sexos se ven igualmente afectados. Los familiares de primer grado de pacientes con EII tienen de 4 a 20 veces mayor riesgo de tener EII. La tendencia familiar es mucho más alta en la enfermedad de Crohn que en la Colitis ulcerosa. Se han identificado varias mutaciones en los genes que confieren un mayor riesgo de enfermedad de Crohn (y algunos posiblemente relacionados con la CU). El tabaquismo parece contribuir al desarrollo o exacerbación de la enfermedad de Crohn, pero disminuye el riesgo de CU. La Apendicectomía que se suele realizar para tratar una apendicitis también parece disminuir el riesgo de CU. Los AINE pueden exacerbar la EII. Los anticonceptivos orales pueden aumentar el riesgo de enfermedad de Crohn. Algunos datos sugieren que la enfermedad perinatal y el uso de antibióticos en la infancia pueden estar asociados con un mayor riesgo de EII.

### **1.3.- DIAGNÓSTICO**

Los pasos a seguir para diagnosticar la enfermedad dependerán de la valoración que realice el médico familiar, de los síntomas que se consulten, de los hallazgos que se observen en la exploración física, así como de los resultados que se obtengan de los análisis de sangre y de las heces.

En los análisis de sangre se puede encontrar anemia, elevación de la velocidad de sedimentación y de la Proteína C reactiva. La elevación de estos dos últimos parámetros se produce cuando la enfermedad está en un brote de actividad.

La prueba más importante, porque suele proporcionar el diagnóstico definitivo de la enfermedad, es la colonoscopia. Permite observar las paredes del intestino y se pueden obtener las muestras necesarias (biopsias) que se analizarán para tener la confirmación del diagnóstico. Esta prueba también es muy importante en el seguimiento de la enfermedad porque puede detectar las posibles lesiones cancerígenas.

### **1.4.- MANIFESTACIONES EXTRAINTESTINALES**

La enfermedad de Crohn y la CU pueden afectar a otros órganos además del intestino. La mayoría de las manifestaciones extraintestinales son más comunes en la CU que en

la enfermedad de Crohn limitada al intestino delgado. Las manifestaciones extraintestinales se clasifican en 3 formas:

1. Trastornos que generalmente aumentan y disminuyen con los brotes de la EII: Estos trastornos son la artritis periférica, epiescleritis, estomatitis aftosa, eritema nodoso y pioderma gangrenoso. La artritis tiende a involucrar las articulaciones grandes y ser migratorias y transitorias. Uno o más de estos trastornos paralelo se desarrolla en más de un tercio de los pacientes hospitalizados con EII.

2. Los trastornos que están claramente asociadas a la EII, pero aparecen de forma independiente de la actividad de la EII: espondilitis anquilosante, sacroileítis, uveítis y colangitis esclerosante primaria. La enfermedad hepática (por ejemplo, hígado graso, hepatitis autoinmune, pericolangitis, cirrosis) se produce de 3 a 5% de los pacientes, a pesar de anormalidades menores en las pruebas de función del hígado son más comunes. Algunas de estas afecciones (por ejemplo, la colangitis esclerosante primaria) pueden preceder a la EII por muchos años y, cuando se diagnostica, se debería realizar una evaluación de la EII.

3. Los trastornos que son consecuencia de la fisiología intestinal alterado: Estos trastornos se producen principalmente en la enfermedad de Crohn grave del intestino delgado. La malabsorción puede ser consecuencia de una amplia resección ileal y causar deficiencias de vitaminas solubles en grasa, la vitamina B12, o minerales, dando lugar a anemia, hipocalcemia, hipomagnesemia, trastornos de coagulación, y la desmineralización ósea. En los niños, la mala absorción retrasa el crecimiento y desarrollo.

La enfermedad tromboembólica puede ocurrir como un resultado de múltiples factores en las tres categorías.

### **1.5.- TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

Además de la atención y apoyo que las EII requieren, también hay varios tipos de medicamentos que son útiles para dicha enfermedad:

- Agentes antiinflamatorios: Ácido 5 – aminosalicílico
- Corticosteroides
- Medicamentos inmunomoduladores
- Medicamentos anticitoquina
- Antibióticos y probióticos

### **1.5.1.- Agentes antiinflamatorios: Ácido 5 - aminosalicílico (5 - ASA, mesalacina)**

El ácido-5-aminosalicílico es activo sólo intraluminalmente y se absorbe rápidamente por el intestino delgado proximal. Es por ello que debe formularse para la absorción retardada cuando se administra por vía oral.

Entre los medicamentos que contienen este medicamento se encuentra el Asacol, 5-ASA recubierto con un polímero acrílico que provoca que el medicamento se libere en función del pH. En concreto el principio activo, en este caso, no se libera hasta la entrada en el íleon distal y el colon (dosis típica de 800 a 1200 mg por vía oral tres veces al día). Pentasa (1 g cuatro veces al día) es 5 - ASA encapsulada en microgránulos de etilcelulosa que liberan 35% del medicamento en el intestino delgado.

5 -ASA también está disponible en supositorios (500 o 1000 mg al acostarse) o enema (4 g al acostarse) para indicación de proctitis y la enfermedad de colon del lado izquierdo. Estas preparaciones rectales son eficaces para el tratamiento agudo y de mantenimiento a largo plazo en la proctitis y la enfermedad de colon del lado izquierdo y tienen beneficio adicional en combinación con 5-ASA oral (4).

Se ha evaluado la eficacia y tolerancia de supositorios de mesalacina versus enemas de hidrocortisona en el tratamiento de la proctitis. Ambos son igual de bien tolerados a pesar de que los supositorios de mesalacina son más efectivos en según qué parámetros que el enema de hidrocortisona (5).

Se han desarrollado nuevos medicamentos derivados de las 5-ASAs igual de efectivos pero con menos efectos adversos. Entre ellos están las olsalazine, balsalizide y sulfasalacina.

### **1.5.2.- Corticosteroides**

Los corticosteroides son útiles para los brotes agudos de la mayoría de las formas de EII cuando los compuestos 5 -ASA son inadecuados, ya que producen una supresión importante de la inflamación y un rápido alivio de los síntomas. Sin embargo, los corticosteroides no son apropiados para el mantenimiento (6).

Los efectos adversos de los corticosteroides a corto plazo en dosis altas incluyen hiperglucemia, hipertensión, insomnio, hiperactividad y episodios psicóticos agudos.

Hidrocortisona 300 mg/día o metilprednisolona 60 a 80 mg/día por goteo continuo (o en dosis divididas, por ejemplo, 30 a 40 mg) se utiliza para la enfermedad severa; prednisona o prednisolona 40 a 60 mg una vez/día se puede utilizar para la enfermedad moderada.

La hidrocortisona en su aplicación rectal se absorbe parcialmente (menos del 50%), por lo tanto tiene efecto tópico y en baja magnitud sistémico. Cuando se administra por aplicación tópica, particularmente con vendaje oclusivo o cuando la piel está lesionada, se puede absorber lo suficiente como para producir efectos sistémicos (7).

Los enemas o espumas de hidrocortisona están indicados como terapia adjunta en el tratamiento de colitis ulcerosa, especialmente en la forma distal incluyendo proctitis ulcerosa y proctosigmoiditis ulcerosa (8). Se ha probado también en algunos casos asociados a colon transversal y ascendente; en concreto, un enema, 100 mg en 60 ml de solución isotónica se administra una vez/día. El enema debe retenerse en el intestino el mayor tiempo posible; para prolongar la retención y extender la distribución se suele administrar por la noche, con el paciente acostado en el lado izquierdo con las caderas elevadas (9).

La budesonida es un corticosteroide con un metabolismo de primer paso hepático alto (> 90%), por lo que, la administración oral puede tener un efecto significativo en la enfermedad del tracto GI.

La budesonida vía oral tiene menos efectos adversos que la prednisolona pero no es tan eficaz y se utiliza típicamente para la enfermedad menos grave (10). Es por ello que, habitualmente, para el tratamiento de las proctosigmoiditis ulcerosas se administra budesonida vía rectal con similar eficacia y seguridad que la hidrocortisona en vía rectal (11). La budesonida puede ser eficaz en el mantenimiento de la remisión durante 3 a 6 meses (12).

Los corticoides por vía tópica tienen menos problemas de efectos adversos que los corticoides sistémicos y la eficacia de los mismos por vía tópica es parecida a los derivados de 5-ASA por vía tópica rectal (13).

### **1.5.3.- Medicamentos inmunomoduladores**

La Azatioprina y la 6-mercaptopurina inhiben la función de las células T. Son eficaces a largo plazo y pueden disminuir los requisitos de corticosteroides y mantener la remisión durante años. Estos medicamentos a menudo requieren de 1 a 3 meses para producir beneficios clínicos, por lo que los corticoides no se pueden retirar por lo menos hasta el segundo mes.

El metotrexato 15 a 25 mg por vía oral es beneficioso para muchos pacientes con enfermedad de Crohn refractaria a corticoides o corticosteroides dependiente.

La ciclosporina bloquea la activación de los linfocitos y puede beneficiar a los pacientes con CU grave que no responde a los corticosteroides y que de lo contrario puede requerir colectomía.

### **1.5.4.- Medicamentos anticitoquina**

Infliximab, Certolizumab y adalimumab, contienen anticuerpos del Factor de necrosis tumoral (TNF). Estos agentes son útiles en la enfermedad de Crohn.

Varios anticuerpos anti - interleuquina y las interleuquinas pueden disminuir la respuesta inflamatoria y se están estudiando para la enfermedad de Crohn.

Anticuerpos de moléculas de adhesión leucocitaria como Natalizumab, vedolizumab, y tofacitinib se están evaluando como agentes de segunda línea para los casos más refractarios de la enfermedad de Crohn.

Varios pacientes han muerto de sepsis después de su uso anti- TNF, por lo que estos medicamentos están contraindicados cuando la infección bacteriana controlada está presente.

### **1.5.5.- Antibióticos y probióticos**

Los antibióticos pueden ser útiles en la enfermedad de Crohn, pero son de uso limitado en la CU.

Metronidazole 500 a 750 mg por vía oral tres veces al día durante 4 a 8 semanas puede controlar la enfermedad de Crohn leve y ayudar a curar fístulas. Sin embargo, los efectos adversos (particularmente neurotoxicidad) a menudo se oponen a la finalización del tratamiento (14).

Ciprofloxacino 500 a 750 mg puede ser menos tóxico. Muchos expertos recomiendan metronidazole y ciprofloxacino en combinación (15)

Varios microorganismos no patógenos (por ejemplo, *Escherichia coli* comensal y especies de *Lactobacillus* y *Saccharomyces*) administrados diariamente como probióticos pueden ser eficaces en la prevención de la pouchitis (inflamación aguda de la bolsa construida quirúrgicamente para reemplazar el recto extraído en casos de CU).

El principio para la terapia incluye inducción y mantenimiento de la remisión, prevención de las complicaciones y optimización del momento de la cirugía; la terapia de esta entidad es secuencial, es decir la terapia de mantenimiento está determinada por la terapia de inducción (15).

En la siguiente figura (figura 1.1.), se muestra un esquema piramidal del tratamiento propuesto para la colitis ulcerativa de acuerdo a su severidad:

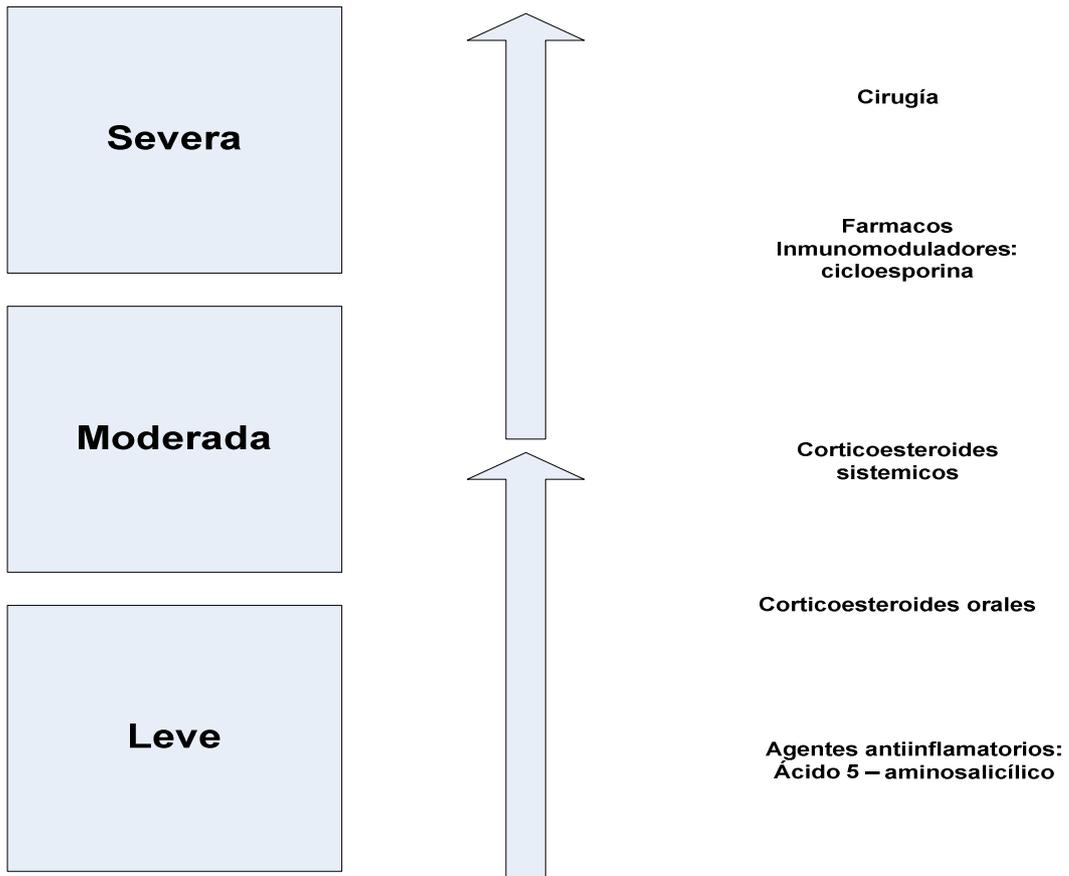


Figura 1.1.: Esquema piramidal del tratamiento propuesto para la colitis ulcerativa de acuerdo con su severidad (15).

La pirámide terapéutica propuesta para la enfermedad de Crohn de acuerdo con su severidad, es la indicada en la figura 1.2.:

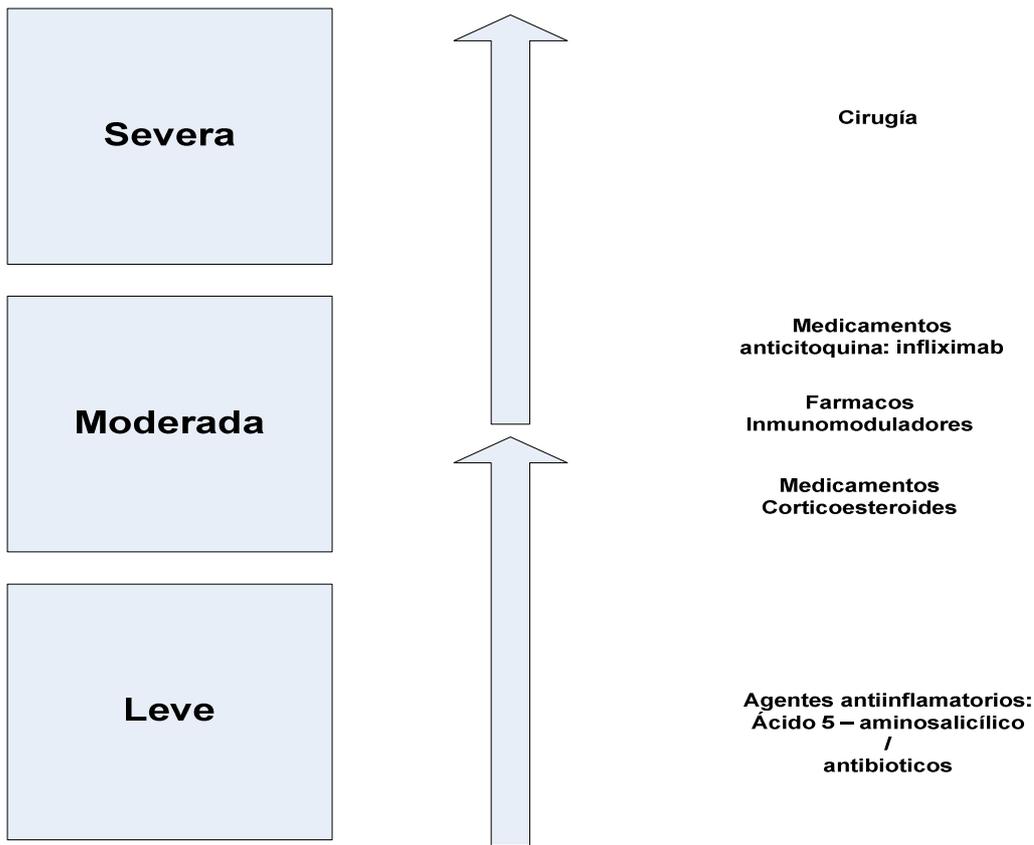


Figura 1.2.: Esquema piramidal del tratamiento propuesto para la Enfermedad de Crohn de acuerdo con su severidad (15).

La acción de mayor trascendencia y la que mayoritariamente genera su amplia utilización es la acción antiinflamatoria. La acción antiinflamatoria de los glucocorticoides es evidente a nivel **macroscópico**, disminuyendo rápidamente el rubor local, el calor, el dolor y la tumefacción, signos clásicos fundamentales de la inflamación. Son también evidentes a nivel **microscópico**, disminuyendo la acumulación de líquidos en el área inflamada (edema), el depósito de fibrina, la dilatación capilar, la migración de leucocitos al área inflamada y la actividad fagocítica. Los glucocorticoides actúan siempre sobre el efecto, es decir, la inflamación y no sobre los agentes etiológicos. De ahí que su acción sea paliativa o supresora, y no curativa.

## CAPÍTULO 2: TRATAMIENTO CON CORTICOESTEROIDES: HIDROCORTISONA

### 2.1.- INTRODUCCIÓN (16, 17)

La hidrocortisona o cortisol es el principal glucocorticoide segregado por la corteza suprarrenal humana, en concreto en la zona fasciculada y el esteroide más abundante en la sangre periférica. El precursor en la síntesis de la hidrocortisona es el colesterol, que en su mayor parte, proviene de las lipoproteínas del plasma, si bien también es sintetizado a partir de radicales acetato.

La hidrocortisona posee básicamente 21 átomos de carbono repartidos a lo largo de un núcleo central, el ciclopentanoperhidrofenantreno, formado por 3 anillos de hexano y un cuarto de pentano. Posee un doble enlace entre la posición 4 y 5, un grupo cetónico en la posición 3 y un grupo hidroxilo en la posición 17, esencial para el efecto antiinflamatorio (figura 2.1.).

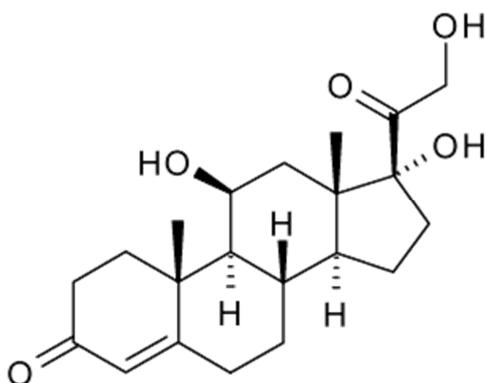


Figura 2.1.: Estructura química de la hidrocortisona

La hidrocortisona, y en general los corticoides, tienen dos acciones: una acción glucocorticoide y una acción mineralocorticoide. Los efectos de dichas acciones son opuestos y es común la re síntesis de las moléculas para incrementar o reducir uno de los dos efectos.

En la búsqueda de una mayor acción glucocorticoide y reducción de la mineralcorticoide, se desarrolló una primera generación de glucocorticoides sintéticos (prednisona y prednisolona) al introducir un doble enlace entre las posiciones 1 y 2. Posteriormente, mediante la adición de grupos fluorados a la molécula se sintetizaron compuestos como la dexametasona y la betametasona, con una potencia de acción considerablemente superior a los anteriores, pero también con mayores efectos secundarios. Buscando la reducción de estos últimos se sintetizaron los derivados oxazólicos, que ejercerían menores efectos sobre el metabolismo hidrocarbonado y el metabolismo del calcio, y cuyo principal representante es el deflazacort (figura. 2.2.).

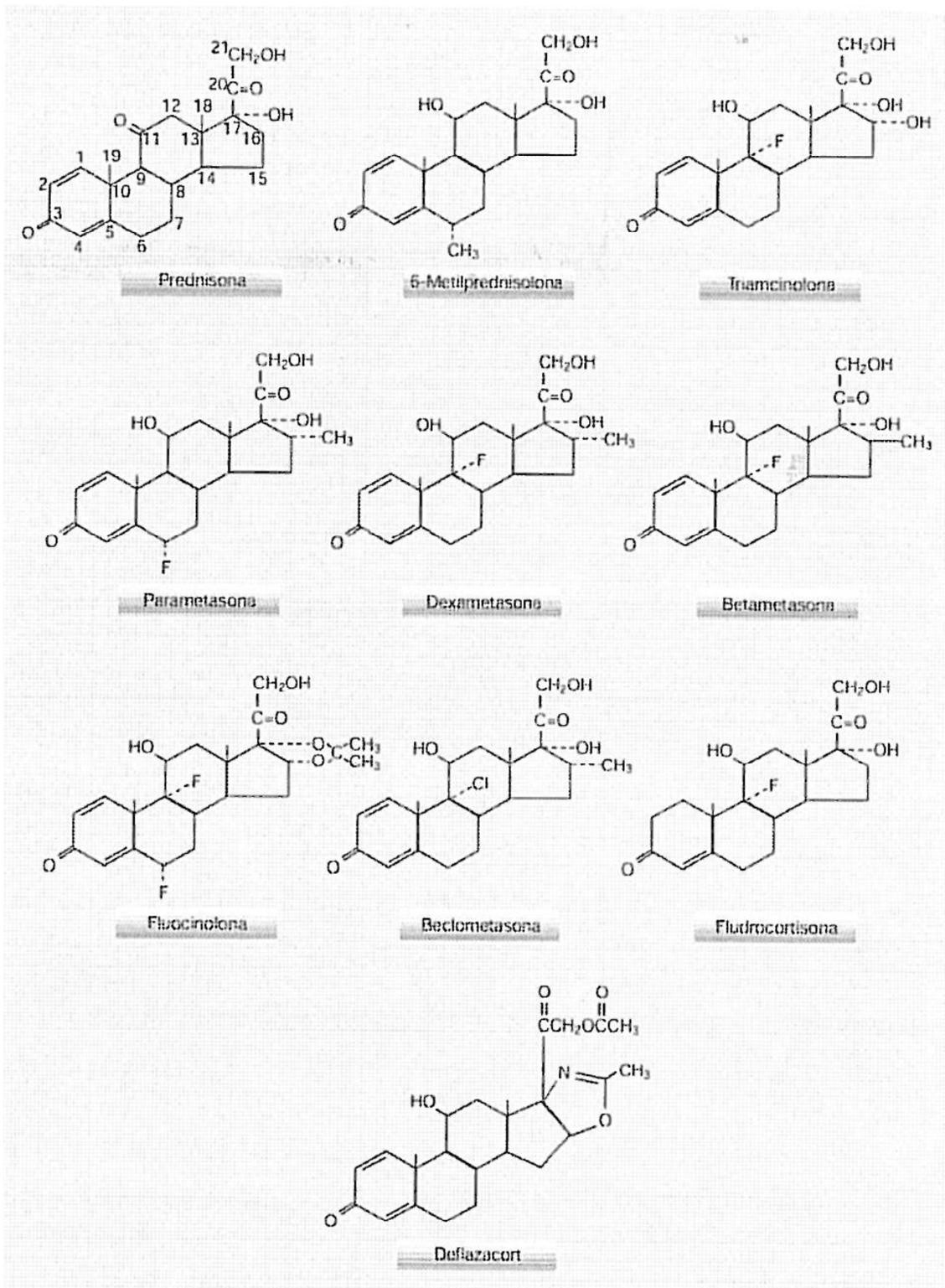


Figura 2.2.: Figuras correspondientes a las diferentes moléculas que se obtienen a partir del anillo básico de los esteroides (17).

De todos ellos, la hidrocortisona es la que ha demostrado una acción terapéutica más adecuada para el tratamiento de las patologías irritables del colon, por lo que es el medicamento del cual se pretende desarrollar un nuevo medicamento para al tratamiento del síndrome del colon irritable.

Existen varias sales de la hidrocortisona: acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, valerato de hidrocortisona, hemisuccinato de hidrocortisona (sodio hidrogenofosfato de hidrocortisona), fosfato sódico de hidrocortisona, succinato sódico de hidrocortisona, propionato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, glicirricinato de hidrocortisona, alcoholaturo de hidrocortisona. Todas estas sales son insolubles o prácticamente insolubles en agua, a excepción de fosfato sódico de hidrocortisona y succinato sódico de hidrocortisona que son totalmente solubles en agua.

La mayoría de medicamentos formulados que actualmente se encuentran en el mercado, contiene hidrocortisona base o acetato de hidrocortisona como principio activo. Debido a ello, este trabajo se centra en el estudio de las siguientes sales de hidrocortisona:

- acetato de hidrocortisona
- hidrocortisona base

La síntesis comercial más interesante de la hidrocortisona es la siguiente: oxidación de  $17\alpha$ , 21-dihidroxipregn-4-en-3, 20-diona, que se obtiene fácilmente a partir de diosgenina. El diacetato de este compuesto se somete a la hidroxilación en la posición  $11\beta$  mediante microorganismos de diferentes especies de *Rhizopus*, *Aspergillus* o *Streptomyces*. Por saponificación posterior se obtiene la hidrocortisona.

En el siguiente diagrama de flujo (figura 2.3.), se observan los pasos a seguir en el proceso de síntesis para la obtención final de la molécula de hidrocortisona según información recibida del proveedor de la molécula (18).

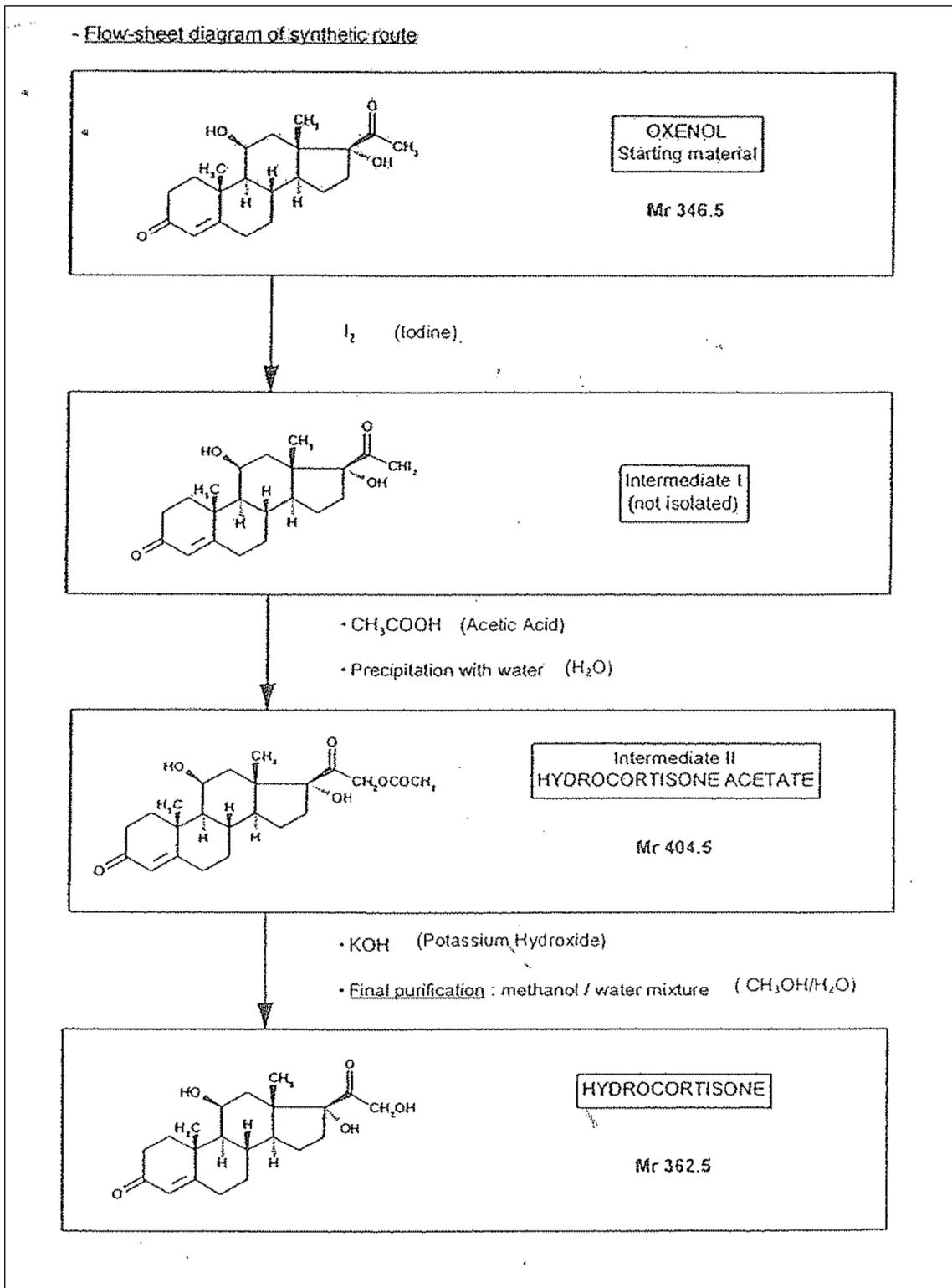


Figura 2.3. Esquema representativo del proceso de síntesis de la hidrocortisona base.

En el siguiente diagrama de flujo (figura 2.4.), se observan los pasos a seguir en el proceso de síntesis para la obtención final de la molécula de acetato de hidrocortisona según información recibida del proveedor de la molécula (19).

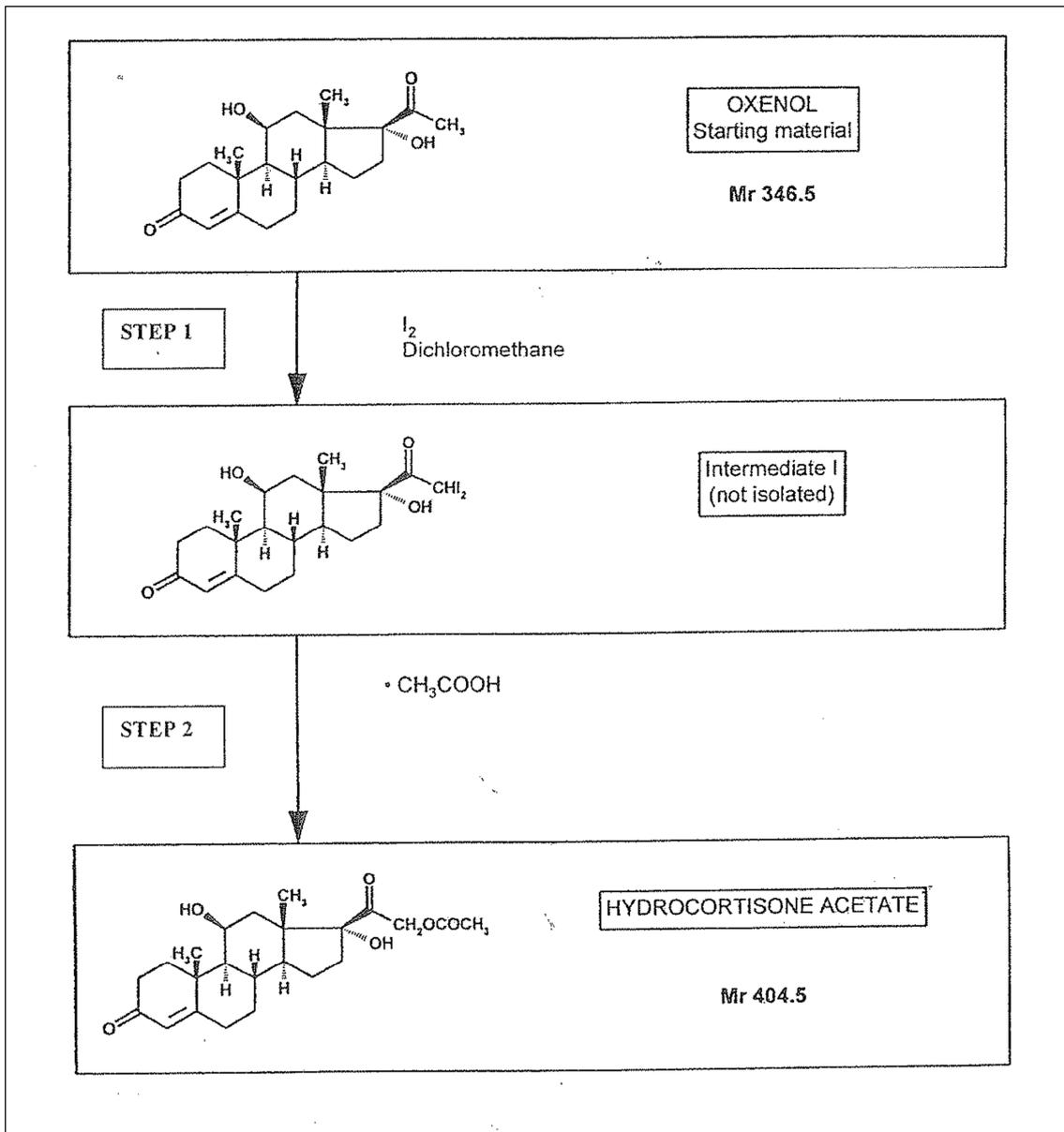


Figura 2.4. Esquema representativo del proceso de síntesis del acetato de hidrocortisona

## 2.2.- CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS (16, 17)

La secreción de la hidrocortisona en el cuerpo humano depende de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), segregada por la adenohipófisis, que a su vez, está modulada en su secreción por una hormona hipotalámica, la hormona liberadora de corticotropina (CRF o CRH), sensible a estímulos neuroendocrinos como el estrés y el ritmo vigilia-sueño. La ACTH actúa sobre la corteza suprarrenal favoreciendo la captación de colesterol y estimulando los sistemas enzimáticos mitocondriales y

microsomales para convertir el colesterol en hidrocortisona (cortisol), que posteriormente será liberado a la sangre.

Existe también un mecanismo de retroalimentación negativa, mediante el cual la secreción de ACTH y de CRF disminuye a medida que aumenta la concentración de hidrocortisona en plasma. Por otra parte, la secreción de hidrocortisona y de ACTH adopta un ritmo circadiano. El nivel más bajo de secreción de hidrocortisona se encuentra alrededor de la media noche, mientras que su nivel más alto aparece hacia las 8 de la mañana, encontrándose niveles inversos de ACTH y CRF a esas mismas horas.

La hidrocortisona es un esteroide con doble función metabólica:

- acción glucocorticoide: metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y grasas
- acción mineralocorticoide: homeostasis del agua y los electrolitos

Su empleo en clínica se debe fundamentalmente al efecto antiinflamatorio.

### **2.2.1. Acción glucocorticoide:**

#### **a) Metabolismo de los hidratos de carbono:**

La administración de hidrocortisona, estimula la gluconeogénesis, la glucogénesis, y eleva la glucosa y el piruvato sanguíneos (acción hiperglucemiante de los glucocorticoides). El incremento de la gluconeogénesis ocurre a partir de las proteínas principalmente. Debido al efecto antianabólico de la hidrocortisona, aumentan los aminoácidos plasmáticos, siendo desviados desde los tejidos, sobre todo músculo estriado, al hígado donde son, en gran proporción, transformados en glucosa. También puede ocurrir aumento del glucógeno hepático y una menor utilización periférica de la glucosa.

#### **b) Metabolismo protéico**

La hidrocortisona disminuye la utilización de los aminoácidos para la síntesis proteica (efecto antianabólico) aumentando la desaminación y conversión de los aminoácidos en glucosa (gluconeogénesis). También aumenta la excreción urinaria del nitrógeno.

En el hígado, inducen la síntesis de las enzimas que intervienen en la gluconeogénesis y en el metabolismo proteico. La movilización de aminoácidos desde tejidos periféricos hacia el hígado, acción catabólica, puede producir efectos patológicos indeseables, que deben evaluarse. Este sería el origen de la osteoporosis que pueden provocar los glucocorticoides, por reducción de la matriz ósea proteica y pérdida consecutiva de calcio. El mismo mecanismo, movilización periférica de aminoácidos, puede originar el típico adelgazamiento de la piel, la disminución de la masa muscular (miopatía corticoidea), la atrofia linfoidea y el balance negativo de nitrógeno.

Por lo tanto, los glucocorticoides estimulan la glucogénesis hepática, inhiben la síntesis periférica de proteínas y estimulan la síntesis de proteínas y enzimas en el hígado como la glucosa 6 fosfatasa, fructuosa 6 difosfatasa y fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa.

### **c) Metabolismo lipídico**

La oxidación, síntesis, movilización y depósito de la grasa, está influenciada por la hidrocortisona. La administración crónica de la hidrocortisona produce un síndrome de hiperfunción suprarrenal o de Cushing, que se caracteriza por alteraciones en la distribución de los lípidos, que se depositan sobre la unión cervico dorsal de la columna (jiba de búfalo), en la fosa supraclavicular, y en la mejilla (cara de luna llena), también en hígado y en tronco; por otro lado disminuye en las extremidades.

#### **2.2.2. Acción mineralocorticoide.**

Las hormonas corticoadrenales, tienen gran influencia en el mantenimiento de un normal metabolismo de agua y electrolitos, siendo la aldosterona el agente hormonal más potente en tal sentido. Los glucocorticoides especialmente la hidrocortisona, producen retención de sodio y agua, y promueven excreción de potasio e hidrógeno. El aumento de la reabsorción de sodio se debe a una acción renal directa, como en el caso de la aldosterona que produce un aumento de la síntesis de enzimas ribosomales que intervienen en la reabsorción tubular de sodio.

Los glucocorticoides, disminuyen también la absorción de calcio en la mucosa intestinal, ya que antagonizan a la vitamina D, aumentando su excreción renal. El

balance negativo de calcio que puede así provocar se refleja en la utilidad terapéutica que pueden tener los glucocorticoides en las hipercalcemias.

### **2.3.- CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS (17, 20)**

#### **2.3.1.- Absorción**

Los corticoesteroides en general se absorben rápidamente a través del tracto gastrointestinal. También se absorben bien cuando se administran localmente.

Después de su uso vía local, particularmente cuando la piel no es continua o cuando se administra rectalmente en forma de enema, una cantidad suficiente de corticoesteroide podría absorberse provocando efectos sistémicos. Esto también puede ocurrir con otro tipo de rutas locales como la vía inhalatoria.

Las formas de corticoesteroides solubles en agua suelen administrarse vía inyección intravenosa para proporcionar una rápida respuesta. Efectos más prolongados se consiguen utilizando formas de corticoesteroides lipófilas mediante administración vía inyección intramuscular.

#### **2.3.2.- Distribución**

Más del 90% de la hidrocortisona está unida a proteínas plasmáticas.

La hidrocortisona atraviesa rápidamente la placenta.

#### **2.3.3. Metabolismo**

La hidrocortisona se metaboliza en el hígado y en muchos tejidos del cuerpo humano en metabolitos de degradación como la tetrahidrocortisona y el tetrahidrocortisol.

#### **2.3.4. Excreción**

Los metabolitos de degradación se excretan en la orina, principalmente conjugados con glucorónidos y con una proporción muy pequeña de hidrocortisona inalterada.

## **2.4.- USO TERAPÉUTICO, VÍAS DE ADMINISTRACIÓN Y DOSIS (20-23)**

La hidrocortisona es un corticoesteroide con actividad glucocorticoide y con actividad mineralocorticoide. Como cortisol, es el esteroide glucocorticoide más importante secretado por la corteza adrenal.

La hidrocortisona se utiliza habitualmente como un potente mineralocorticoide, como terapia sustitutoria en insuficiencia adrenocortical. También se podría usar aprovechando sus propiedades glucocorticoides para indicaciones en las que esta terapia es necesaria, aunque se prefiere utilizar medicamentos con menores efectos mineralocorticoides.

La dosis se puede expresar en términos de molécula “base”. 112 mg de Acetato de hidrocortisona o 128 mg de Hemisuccinato (hidrogeno succinato) de hidrocortisona, son equivalentes a 100 mg de hidrocortisona base.

De todas formas, las esterificaciones generalmente alteran la potencia de las moléculas, y por lo tanto, compuestos con cantidades equivalentes de contenido de hidrocortisona, podrían no tener un efecto clínico equivalente.

En administraciones **vía oral**, normalmente se utiliza hidrocortisona liposoluble, como el Cipionato ester de hidrocortisona.

En indicaciones de **terapia de sustitución** en insuficiencia adrenocortical aguda o crónica, los requerimientos normales son administrar de 20 a 30 mg al día (normalmente administrados en dos dosis, la más grande por la mañana y la más pequeña por la tarde, para imitar el ritmo circadiano del cuerpo). Los niños deben tomar de 400 a 800 microgramos/kg al día en dos o tres dosis divididas. Es posible que se necesite adicionar cloruro sódico si hay una secreción defectuosa de aldosterona. La actividad mineralocorticoide se suplementa normalmente por acetato de fludrocortisona vía oral. Se han usado regímenes similares para corregir la deficiencia glucocorticoide de la hiperplasia adrenal congénita.

La hidrocortisona también se puede administrar **vía intravenosa**, a través de inyección lenta o trasfusión, con derivados hidrosolubles como succinato sódico de hidrocortisona o fosfato sódico de hidrocortisona, cuando se necesita un efecto rápido en **emergencias**. Estas condiciones de emergencia son por ejemplo insuficiencia aguda adrenocortical causada por crisis Addisoniana o crisis post adrenalectomía, por retirada abrupta de la terapia en pacientes tratados con corticoesteroides, o por la inhabilidad de las glándulas adrenales para poder hacer frente al estrés aumentado en pacientes con emergencias alérgicas como anafilaxis o asma aguda severa y shock. La dosis habitual es la equivalente entre 100 y 500 mg de hidrocortisona repetida 3 ó 4 veces en 24 horas, según las condiciones de severidad así como la respuesta del paciente. A los niños menores de un año de edad se les debe administrar 25 mg, a los niños entre 1 y 5 años, se les debe administrar 50 mg y a los niños entre 6 y 12 años se les debe administrar 100 mg.

Se debe administrar fluidos y electrolitos si se cree necesario para corregir cualquier desorden metabólico asociado.

Cualquiera de las dosis especificadas puede también administrarse vía intramuscular, pero la respuesta parece ser menos rápida que la observada vía intravenosa.

Los corticoesteroides son considerados terapia secundaria en los shocks anafilácticos debido a su relativamente lento comienzo de acción, a pesar de que la hidrocortisona vía intravenosa puede ser útil asociada con adrenalina en la prevención de futuros deterioros en pacientes afectados severamente.

En pacientes con estados de deficiencia adrenal, la terapia suplementaria corticoesteroide puede ser necesaria durante operaciones quirúrgicas. Succinato sódico de hidrocortisona o fosfato sódico de hidrocortisona pueden ser administrados vía intramuscular o vía intravenosa antes de la intervención quirúrgica. Se han propuesto varias pautas de administración. En pacientes que toman más de 10 mg de prednisolona vía oral, o su equivalente diario, el formulario británico nacional, recomienda el siguiente régimen:

Intervención quirúrgica menor con anestesia general: la dosis de corticoesteroide oral habitual la misma mañana de la intervención, o de 25 a 50 mg de hidrocortisona (generalmente como succinato sódico) vía intravenosa. La dosis de corticoesteroide oral habitual se reanuda después de la intervención.

Intervención quirúrgica mayor: la dosis de corticoesteroide oral habitual la misma mañana de la intervención y de 25 a 50 mg de hidrocortisona vía intravenosa, seguido de dosis similares de hidrocortisona 3 veces al día durante 24 horas en intervenciones moderadas y de 48 a 72 horas en intervenciones mayores. Cuando se paran las inyecciones de hidrocortisona, se reanuda la dosis habitual de corticoesteroide.

En caso de **inyecciones locales** en tejidos blandos, habitualmente se usa la hidrocortisona en forma de fosfato sódico ó ésteres de succinato sódico. La dosis habitual en términos de hidrocortisona es de 100 a 200 mg. En el caso de inyecciones intra articulares, se usa el acetato de hidrocortisona en dosis de 5 a 50 mg dependiendo del tamaño de la articulación.

En el caso de aplicaciones **vía tópica** para el tratamiento de desordenes varios de la piel, se usa habitualmente la hidrocortisona base, el acetato, buteprato, butirato y los ésteres de valerato en forma de cremas, ungüentos o lociones. Las concentraciones habituales oscilan en el intervalo de 0,1 a 2,5%. A pesar de que se considera que la hidrocortisona posee menores efectos adversos sobre la piel y es menos probable que cause supresión adrenal que otros corticoesteroides tópicos más potentes, debería de tenerse en cuenta que la formulación o vehículo en el que se administra, así como el tipo de esterificación presente, pueden modificar sustancialmente las propiedades. Otros factores que también influyen en el grado de absorción son el lugar de aplicación, la utilización de ropa oclusiva, el grado de daño en la piel y el tamaño del área en donde se aplica la preparación.

Asimismo, existe un medicamento en el mercado en forma de enema rectal con hemisuccinato de hidrocortisona al 0.02% entre otros principios activos, con indicación terapéutica para las rectitis, fisuras anales y hemorroides.

La hidrocortisona o sus ésteres están también disponibles en una gran variedad de formas farmacéuticas, incluyendo oftálmicas, dentales y aplicaciones rectales para el tratamiento de alteraciones alérgicas e inflamatorias, como es el caso de la indicación del medicamento objeto de desarrollo.

Otros ésteres de hidrocortisona que ocasionalmente se usan son el aceponato, el glicirretinato y el propionato. Alguno de estos ésteres, como el aceponato, puede presentar actividad tópica modificada.

## **2.5.- EFECTOS SECUNDARIOS O ADVERSOS (20, 24 - 26)**

El efecto adverso de los corticoesteroides puede venir provocado por la acción no deseada mineralocorticoide o glucocorticoide o por la inhibición del eje hipotalámico-pituitario-adrenal.

Los efectos adversos de la **acción mineralocorticoide** se manifiestan en efectos sobre el equilibrio electrolítico de los fluidos, como la retención de sodio y agua con edema e hipertensión y un aumento de la excreción de potasio con la posibilidad de una alcalosis hipocalcémica. En pacientes susceptibles, pueden también inducir un fallo cardíaco. Se han descrito casos de hipopotasemia e hipomagnesemia asociado a altas dosis de terapia con hidrocortisona intravenosa en pacientes alcohólicos con trombocitopenia inmune.

Los efectos adversos de la **acción glucocorticoide** se manifiestan en:

- Efectos sobre la movilización de calcio y fósforo, con la osteoporosis y fracturas espontáneas.
- Pérdida de músculo (miastenia) y depleción de nitrógeno.
- Hiperglucemia con una acentuación o precipitación del estado diabético.

Una incapacidad en la reparación del tejido dañado y de la función inmune puede provocar un retraso en la cicatrización de heridas y una susceptibilidad aumentada a todo tipo de infecciones, incluyendo septicemias, tuberculosis, infecciones fúngicas e infecciones virales. Las infecciones se pueden ver enmascaradas por el efecto antiinflamatorio, analgésico y antipirético de los glucocorticoides. La severidad de la

varicela puede verse aumentada en pacientes que reciben una terapia con corticosteroides sistémicos.

Otros efectos adversos incluyen:

- Irregularidades menstruales
- Adelgazamiento de la piel
- Trastornos oculares incluyendo glaucoma y cataratas
- Hipertensión benigna intracraneal
- Pancreatitis aguda
- Trastornos mentales y neurológicos
- Necrosis no vascular del hueso.

El aumento en la coagulación de la sangre puede provocar complicaciones trombolíticas.

El efecto de retroalimentación negativa de los glucocorticoides sobre el eje hipotalámico-pituitario-adrenal, puede provocar una atrofia adrenal. Esto produce secundariamente insuficiencia adrenocortical.

Dosis altas de corticosteroides pueden provocar síntomas típicos del efecto Cushing en la corteza adrenal.

Cuando se aplica tópicamente, particularmente sobre aéreas extensas, sobre piel no continua o bajo uso de ropa oclusiva, los corticoesteroides pueden absorberse en cantidades suficientes como para causar efectos sistémicos. El uso prolongado de preparaciones oftálmicas que contienen corticoesteroides, puede causar aumento de la presión intraocular y reducción de la función visual.

Hipersensibilidad y anafilaxia:

Se han descrito casos de reacciones de hipersensibilidad y anafilaxis asociado al uso intravenoso de hidrocortisona. Aplicaciones tópicas también pueden producir hipersensibilidad.

Los efectos adversos deberían ser tratados sintomáticamente con dosis de corticoesteroides reducidas o disminuidas en la medida de lo posible.

## **2.6.- INTERACCIONES (20)**

El uso concurrente de barbitúricos, carbamacepina, fenitoína, primidona o rifampicina, puede aumentar el metabolismo de los corticoesteroides y por lo tanto reducir los efectos sistémicos. En cambio, anticonceptivos orales o ritonavir pueden aumentar las concentraciones plasmáticas de corticoesteroides.

El uso de corticoesteroides con diuréticos reductores del potasio, como las tiazidas o la furosemida pueden causar excesiva pérdida de potasio. También hay un riesgo alto de hipopotasemia con tratamientos concurrentes con anfotericina B o terapias con broncodilatadores como xantinas o agonistas beta<sub>2</sub>. Cuando los corticoesteroides son administrados con medicamentos Antiinflamatorios no esteroídicos (AINEs), el riesgo de incidencia de sangrado gastrointestinal y úlcera aumenta.

Los corticoesteroides también afectan a la respuesta de los anticoagulantes. Asimismo las personas diabéticas e hipertensas pueden necesitar unos requerimientos diferentes de antidiabéticos y antihipertensivos.

Los corticoesteroides también pueden disminuir las concentraciones en suero de salicilatos así como disminuir también el efecto de las anticolinesterasas en la miastenia gravis.

## **2.7.- CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y FÍSICO-QUÍMICAS**

En este apartado, se estudian las diferentes características químicas y físico-químicas de las diferentes sales de hidrocortisona que se plantean estudiar describiendo la nomenclatura, características principales, síntesis, identificación, perfil de impurezas y características de estabilidad.

### 2.7.1. Acetato de Hidrocortisona

Según la definición de la Farmacopea Europea 7ª edición (27), el acetato de hidrocortisona contiene no menos del 97,0% y no más del 102,0% de 11β, 17-Dihidroxi-3,20-dioxopregn-4-en-21-il acetato. La fórmula es C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub> y tiene un peso molecular de 404,5.

Es un polvo cristalino, blanco o casi blanco, prácticamente insoluble en agua, poco soluble en etanol anhidro y en cloruro de metileno. Funde a unos 220 °C, con descomposición.

Se debe proteger de la luz porque sufre fotodegradación.

La estructura química del acetato de Hidrocortisona es la que se muestra en la figura siguiente:

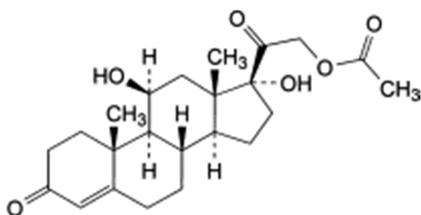


Figura 2.5. Estructura química del acetato de hidrocortisona

Las especificaciones establecidas para el acetato de Hidrocortisona y que la materia prima adquirida del proveedor Aventis Pharma ha de cumplir, son las siguientes (cuadro 2.1.)

PARÁMETRO A ESTUDIAR	ESPECIFICACIONES
<b>Características</b> (Ph. Eur 7.0.) (27)	<p><i>Aspecto:</i> polvo cristalino, blanco o casi blanco.</p> <p><i>Solubilidad:</i> prácticamente insoluble en agua, poco soluble en etanol anhidro y en cloruro de metileno.</p>
<p><b>Identificación:</b></p> <p><b>-Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo</b> (Ph. Eur 7.0.) (27) (USP 36) (28)</p> <p><b>-Examinar los cromatogramas obtenidos en la valoración</b> (Ph. Eur 7.0.) (27).</p> <p><b>-Cromatografía en capa fina</b> (Ph. Eur 7.0.) (27)</p> <p><b>-Coloración roja con ácido sulfurico</b> (Ph. Eur 7.0.) (27)</p> <p><b>-Reacción del acetilo</b> (Ph. Eur 7.0.) (27)</p> <p><b>-Espectrofotometría de Absorción UV</b> (USP 36) (28)</p>	<p>Positiva según patrón</p> <p>El pico principal del cromatograma obtenido con la disolución problema (b) es similar en tiempo de retención y tamaño al pico principal del cromatograma obtenido con la disolución de referencia (d).</p> <p>La mancha principal de cada uno de los cromatogramas obtenidos con las disoluciones problema es similar en posición y tamaño a la mancha principal del cromatograma obtenido con la correspondiente disolución de referencia.</p> <p>Positiva.</p> <p>Positiva según patrón</p> <p>La Absorbancia, calculada sobre la sustancia seca, no difiere más del 2,5%.</p>

<b>Solventes residuales por Cromatografía de gases</b> <b>-Diclorometano</b> <b>-Dimetilformamida</b>  <b>Agua + Solventes residuales</b> (ensayo del proveedor)	$\leq 500$ ppm $\leq 3000$ ppm  $\leq 1.0\%$ w/w
<b>Pérdida por desecación (60 °C, 3 h)</b> (Ph. Eur 7.0.) (27) (USP 36) (28)	$\leq 1,0\%$ w/w (USP 36) (28) $\leq 0,5\%$ w/w (Ph. Eur 7.0.) (27)
<b>Cenizas sulfatadas</b> (ensayo del proveedor)	$\leq 0,1\%$ w/w
<b>Residuo ignición</b> (USP 36) (28)	$\leq 0,5\%$
<b>Rotación óptica específica</b> (Ph. Eur 7.0.) (27) (USP 36) (28)	Entre 158° y 167° (calculado frente a la sustancia seca como referencia)
<b>Sustancias relacionadas por HPLC</b> (Ph. Eur 7.0.) (27) (USP 36) (28) <b>-Impureza C</b> <b>-Impureza A</b> <b>-Impureza B, D, E</b> <b>-Impureza G</b> <b>-Otras impurezas</b>  <b>-Impurezas totales</b>	$\leq 0,6\%$ w/w (Ph. Eur 7.0.) (27) $\leq 0,4\%$ w/w (Ph. Eur 7.0.) (27) $\leq 0,3\%$ w/w (Ph. Eur 7.0.) (27) $\leq 0,15\%$ w/w (Ph. Eur 7.0.) (27) $\leq 1,0\%$ w/w (USP 36) (28) $\leq 0,1\%$ w/w (Ph. Eur 7.0.) (27) $\leq 2,0\%$ w/w (USP 36) (28) $\leq 1,0\%$ w/w (Ph. Eur 7.0.) (27)
<b>Determinación cuantitativa por HPLC</b> (USP 36) (28) (Ph. Eur 7.0.) (27)	Entre 97.0 – 102.0% w/w (calculado frente a la sustancia seca como referencia)

Cuadro 2.1.: Parámetros a estudiar para la evaluación de la materia prima y sus especificaciones

La **identificación** de la molécula, se realiza por una serie de técnicas analíticas que se detallan a continuación.

### 1.- Espectro infrarrojo (29)

Mediante pastillas de KBr se realiza el espectro infrarrojo de acetato de hidrocortisona. Los principales picos se encuentran en las siguientes longitudes de onda: 1750, 1702, 1640  $\text{cm}^{-1}$  según se muestra en la figura 2.6.

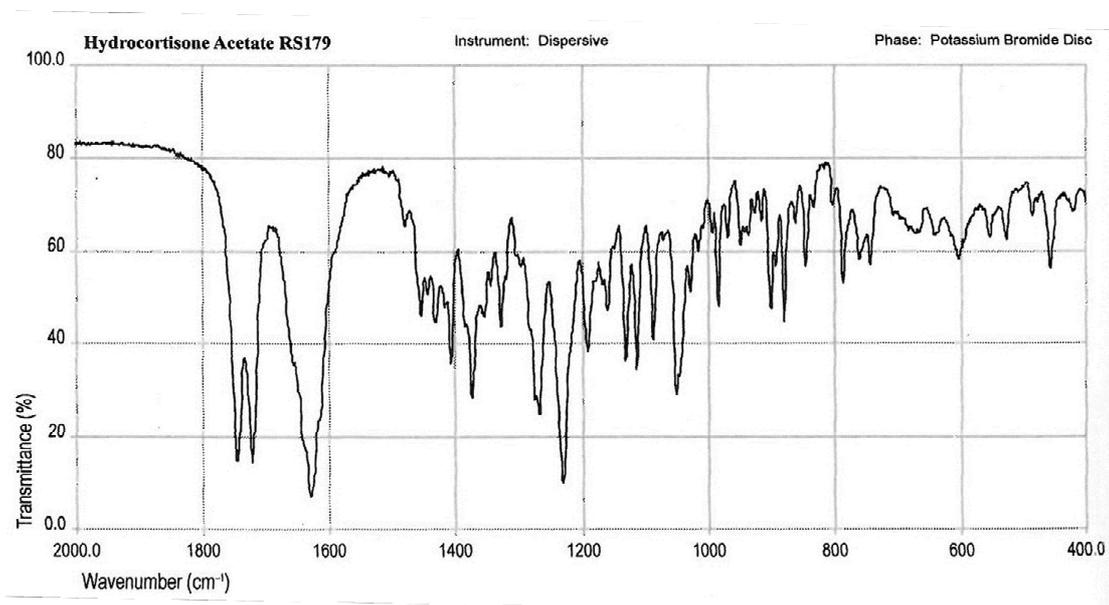


Figura 2.6. Espectro infrarrojo del acetato de hidrocortisona

### 2.- Espectro Ultravioleta (28, 32)

En una solución alcohólica con metanol con una concentración de la molécula de 10  $\mu\text{g}$  por mL, el pico máximo de absorción se encuentra a una longitud de onda de 242 nm según se muestra en la figura 2.7.

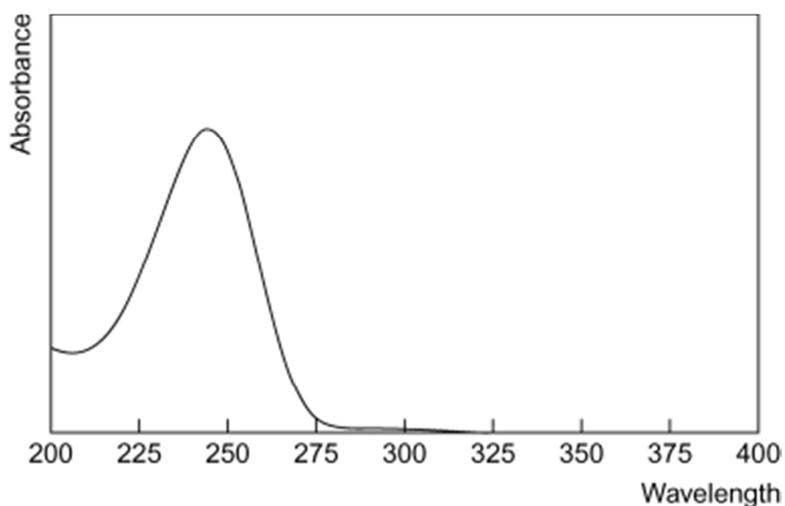


Figura 2.7. Espectro ultravioleta del acetato de hidrocortisona

El **perfil de impurezas** del acetato de hidrocortisona puede ser tanto de síntesis como productos de degradación. Las impurezas descritas en la monografía del principio activo en la Farmacopea europea (27) y en la Farmacopea británica (29) son las siguientes:

- Hidrocortisona base (11 $\beta$ ,17,21-trihidroxi-pregn-4-eno-3,20-diona) (Impureza A)

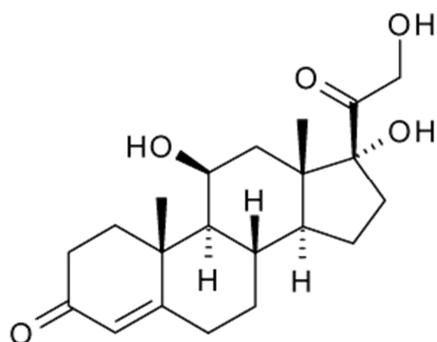


Figura 2.8. Impureza A del acetato de hidrocortisona

- Oxenol: R1=R2=R3=H: 11 $\beta$ ,17-dihidroxi-pregn-4-eno-3,20-diona (Impureza B).

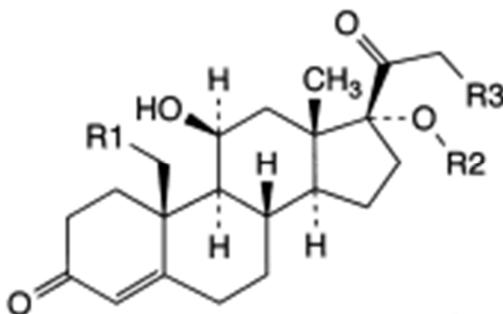


Figura 2.9. Impureza B del acetato de hidrocortisona

- Acetato de prednisolona (acetato de 11 $\beta$ ,17-dihidroxi-3,20-dioxopregna-1,4-dien-21-ilo) (Impureza C)

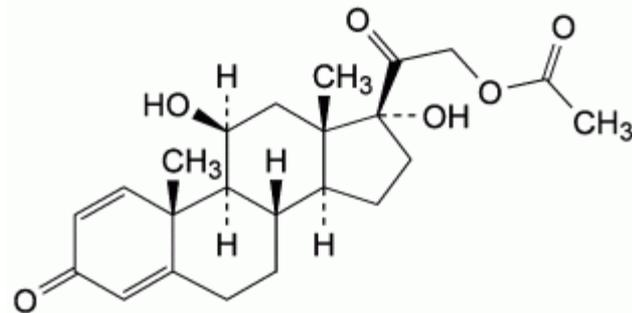


Figura 2.10. Impureza C del acetato de hidrocortisona

- Acetato de Cortisona (acetato de 17-hidroxi-3,11,20-trioxopregn-4-en-21-ilo) (Impureza D).

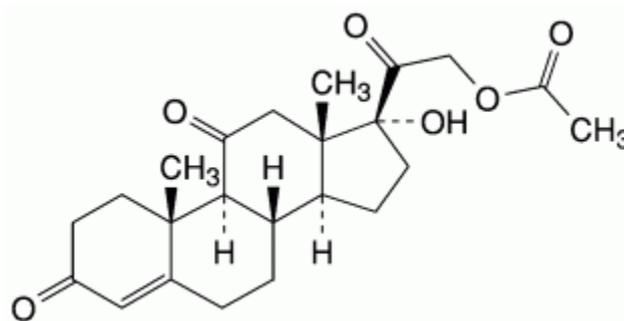


Figura 2.11. Impureza D del acetato de hidrocortisona

- Acetato de 17-hidroxi-3,20-dioxopregna-4,9(11)-dien-21-ilo (Impureza E).

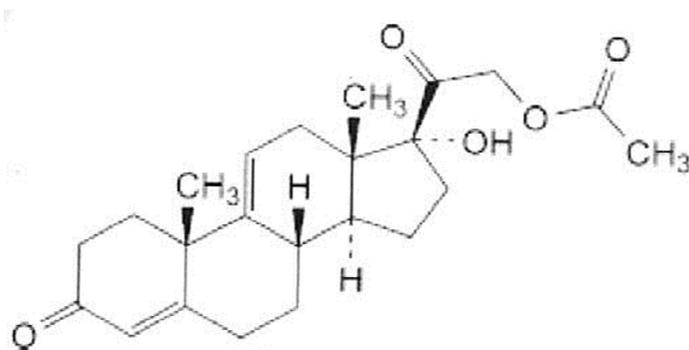


Figura 2.12. Impureza E del acetato de hidrocortisona

- Acetato de epi-hidro cortisona: acetato de  $11\alpha,17$ -dihidroxi-3,20-dioxopregn-4-en-21-ilo (Impureza F).

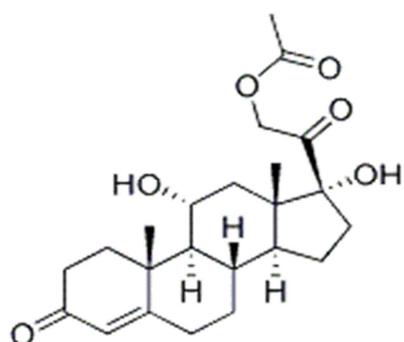


Figura 2.13. Impureza F del acetato de hidrocortisona

- Diacetato de 17-hidroxi-3,20-dioxopregn-4-eno-11 $\beta$ , 21-diilo (Impureza G).

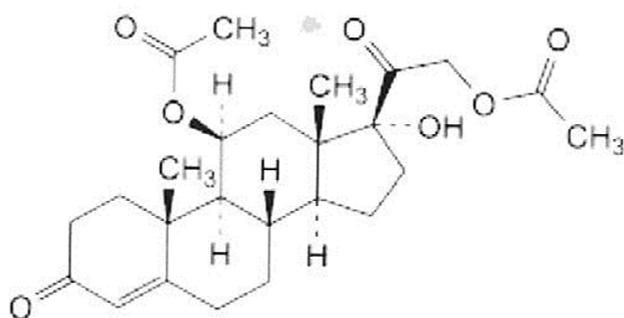
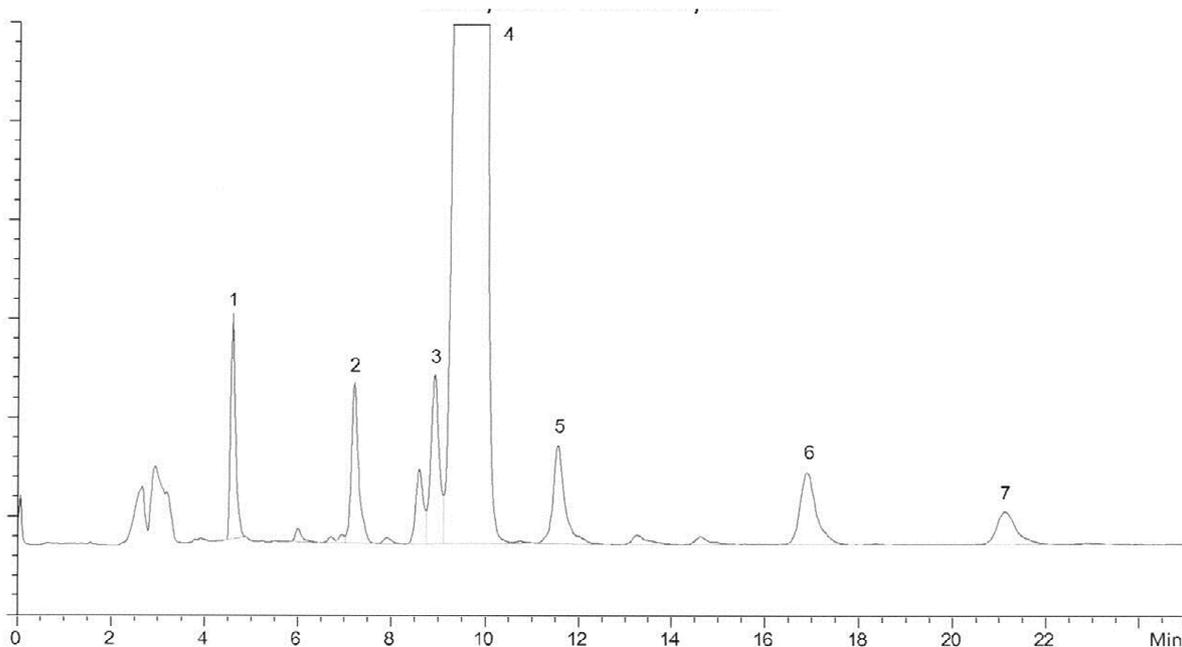


Figura 2.14. Impureza G del acetato de hidrocortisona

Todas estas impurezas pueden identificarse y cuantificarse por cromatografía líquida de alta resolución. En la figura 2.15. se muestra el perfil de impurezas del acetato de hidrocortisona por cromatografía líquida de alta resolución:



1: Impureza A   2: Impureza B   3: Impureza C   4: Acetato de hidrocortisona  
5: Impureza D   6: Impureza G   7: Impureza E

Figura 2.15.: Cromatograma que muestra las sustancias relacionadas en una solución de acetato de hidrocortisona espiciada con las impurezas A, B, C, D, E y G.

En cuanto a las características de **estabilidad** del acetato de hidrocortisona, la principal recomendación que se da en las monografías es que se ha de conservar en envases herméticamente cerrados y protegidos de la luz.

Los datos de estabilidad del proveedor del acetato de hidrocortisona empleado en la parte registrada de estos lotes según condiciones ICH son los siguientes (30):

**PRODUCT : HYDROCORTISONE ACETATE**

Batch control number : CH 001M - 7V0375 BC

Beginning of the study : May 1997

Packaging : polyethylene bag inside cardboard drum

Conditions	Time points	Characters	Color value	Related substances by HPLC (per cent)								HPLC assay (% w/w) on anhydrous	Acidity (% w/w)
				Epithydrocortisone acetate	Hydrocortisone	Oxendolone	Prednisolone acetate	Cortisone acetate	Cortisone acetate	Any other impurity > 0.2%	Total content		
+25°C ± 2°C 60% RH ± 5%	0	complies	1.1	0.03	0.09	0.30	0.14	0.15	0.10	0	0.9	98.75	0.06
	3 months	complies	2.1	0.07	0.35	0.30	0.13	0.16	0.12	0	1.2	98.4	-
	6 months <sup>(*)</sup>	complies	2.2	(0.08) 0.06	(0.36) 0.35	(0.31) 0.30	(0.22) 0.14	(0.11) 0.11	(0) 0	(1.23) 1.1	97.1	0.06	
	9 months	complies	2.4	below LoQ <sup>(***)</sup>	0.35	0.30	0.09	0.15	0.12	0	1.0	98.0	-
	12 months	complies	1.1	0.16	0.50	0.30	0.09	0.15	0.13	0	1.3	98.3	-
	18 months	complies	1.7	below LoQ <sup>(***)</sup>	0.35	0.30	0.11	0.16	0.12	0	1.0	98.6	-
	24 months	complies	2.1	below LoQ <sup>(***)</sup>	0.40	0.30	0.10	0.17	0.12	0	1.1	99.6	-
	36 months	complies	2.5	below LoQ <sup>(***)</sup>	0.35	0.30	0.08	0.18	0.10	0	1.0	98.0	-
	48 months	complies	2.1	below LoQ <sup>(***)</sup>	0.35	0.30	0.09	0.17	0.12	0	1.0	97.3	-
	60 months	complies	2.1	below LoQ <sup>(***)</sup>	0.35	0.30	0.09	0.17	0.10	0	1.0	98.6	-
	3 months	complies	2.3	0.15	0.45	0.30	0.13	0.16	0.10	0	1.3	98.3	-
	6 months <sup>(**)</sup>	complies	2.8	(0.11) 0.12	(0.39) 0.45	(0.31) 0.30	(0.13) 0.10	(0.20) 0.15	(0.10) 0.11	(0) 0	(1.30) 1.2	98.2	0.06
9 months	complies	2.3	0.08	0.45	0.30	0.08	0.15	0.12	0	1.1	99.3	-	
12 months	complies	2.8	below LoQ <sup>(***)</sup>	0.40	0.30	0.09	0.19	0.16	0	1.1	97.6	-	
Specifications		white to practically white powder	≤ 3	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.2	0	≤ 1.5	96.5 to 101.5 <sup>(****)</sup>	≤ 0.1

(\*) Specification required at the beginning of the study.

(\*\*) At 6 months, two HPLC methods are used for related substances, the results are thus reported for both methods: routine control HPLC (in parenthesis) / HPLC method validated for stability testing.

(\*\*\*) LoQ = limit of quantitation

(\*\*\*\*) Specifications calculated with reference to the anhydrous substance (instead of the dried substance)

Cuadro 2.2. Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad del lote CH001M-7V0375 BC del principio activo acetato de hidrocortisona y extraído del DMF del proveedor de la materia prima.

PRODUCT : HYDROCORTISONE ACETATE  
Batch control number : CH 002M - 7V0392 BC

Beginning of the study : May 1997 Packaging : polyethylene bag inside cardboard drum

Conditions	Time points	Characters	Color value	Related substances by HPLC (per cent)								HPLC assay (% w/w) on anhydrous	Acidity (% w/w)	
				Epithyrocortisone acetate	Hydrocortisone	Oxenol	Prednisolone acetate	Cortisone acetate	Cortinene acetate	Any other impurity > 0.2 (%)	Total content			
+25°C ± 2°C 60% R.H. ± 5%	0	complies	0.8	0.05	0.10	0.25	0.25	0.15	0.08	0	0.9	98.0	0.06	
	3 months	complies	2.5	0.08	0.30	0.20	0.25	0.17	0.09	0	1.1	99.0	-	
	6 months (*)	complies	2.3	(0.10) 0.12	(0.34) 0.40	(0.22) 0.20	(0.24) 0.19	(0.23) 0.14	(0.09) 0.09	(0) 0	(1.25) 1.1	97.3	0.06	
	9 months	complies	1.9	below LoQ	0.35	0.20	0.18	0.16	0.09	0	1.0	97.6	-	
	12 months	complies	1.1	below LoQ	0.35	0.20	0.20	0.17	0.10	0	1.0	98.1	-	
	18 months	complies	1	below LoQ	0.35	0.25	0.20	0.18	0.10	0	1.1	98.0	-	
	24 months	complies	1.9	0.06	0.40	0.20	0.20	0.18	0.09	0	1.2	99.8	-	
	36 months	complies	2.6	below LoQ	0.35	0.20	0.20	0.19	0.07	0	1.0	98.8	-	
	48 months	complies	1.6	below LoQ	0.35	0.20	0.20	0.19	0.18	0	1.0	97.7	-	
	60 months	complies	2.2	below LoQ	0.35	0.20	0.20	0.18	0.18	0	1.0	99.0	-	
	3 months	complies	2.2	2.2	0.20	0.45	0.20	0.25	0.17	0.09	0	1.4	98.1	-
	6 months (**)	complies	2.3	2.3	(0.12) 0.11	(0.38) 0.40	(0.22) 0.20	(0.24) 0.19	(0.20) 0.15	(0.09) 0.09	(0) 0	(1.31) 1.1	98.0	0.06
9 months	complies	2.3	2.3	0.09	0.40	0.20	0.19	0.17	0.09	0	1.1	99.4	-	
12 months	complies	2.1	2.1	below LoQ	0.35	0.20	0.19	0.18	0.11	0	1.0	98.1	-	
Specifications		white to practically white powder	≤ 3	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.2	0	≤ 1.5	96.5 to 101.5 (**)	≤ 0.1	

(\*) Specification required at the beginning of the study.

(\*\*) At 6 months, two HPLC methods are used for related substances, the results are thus reported for both methods: routine control HPLC (in parenthesis) / HPLC method validated for stability testing.

(\*\*\*) Specifications calculated with reference to the anhydrous substance (instead of the dried substance).

Cuadro 2.3. Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad del lote CH002M-7V0375 BC del principio activo acetato de hidrocortisona y extraído del DMF del proveedor de la materia prima.

**PRODUCT : HYDROCORTISONE ACETATE**

Batch control number : CH 003M - 7V0408 BD

Beginning of the study : May 1997

Packaging : polyethylene bag inside cardboard drum

Conditions	Time points	Characters	Color value	Related substances by HPLC (per cent)										HPLC assay (% w/w) on anhydrous	Acidity (% w/w)	
				Epihydrocortisone acetate	Hydrocortisone	Oxerol	Prednisolone acetate	Cortisone acetate	Cortinene acetate	Any other impurity > 0.2 (%)	Total content					
+25°C ± 2°C 60% RH ± 5%	0	complies	2.0	0.06	0.07	0.30	0.09	0.19	0.10	0	0.9	0	0.9	99.3	0.06	
	3 months	complies	3.4	0.10	0.35	0.30	0.10	0.20	0.11	0	1.2	0	1.2	98.6	-	
	6 months (*)	complies	2.2	(0.12) 0.07	(0.35) 0.35	(0.29) 0.30	(0.10) 0.07	(0.26) 0.18	(0.10) 0.11	(0) 0	(1.27) 1.1	(0) 0	(1.27) 1.1	97.5	0.06	
	9 months	complies	3.0	below LoQ	0.40	0.25	0.06	0.20	0.12	0	1.0	0	1.0	98.5	-	
	12 months	complies	1.9	below LoQ	0.35	0.25	0.07	0.20	0.13	0	1.0	0	1.0	99.2	-	
	18 months	complies	1.9	below LoQ	0.30	0.30	0.08	0.20	0.12	0	1.0	0	1.0	98.8	-	
	24 months	complies	2.1	below LoQ	0.35	0.25	0.07	0.25	0.11	0	1.0	0	1.0	100.1	-	
	36 months	complies	2.4	below LoQ	0.35	0.25	0.07	0.20	0.08	0	1.0	0	1.0	98.1	-	
	48 months	complies	2.1	below LoQ	0.35	0.30	0.07	0.20	0.11	0	1.0	0	1.0	98.4	-	
	60 months	complies	2.4	below LoQ	0.35	0.30	0.07	0.20	0.08	0	1.0	0	1.0	99.3	-	
	+40°C ± 2°C 75% RH ± 5%	3 months	complies	2.3	0.20	0.45	0.30	0.10	0.20	0.10	0	1.4	0	1.4	98.1	-
		6 months (**)	complies	2.9	(0.14) 0.07	(0.37) 0.35	(0.29) 0.30	(0.10) 0.07	(0.24) 0.18	(0.10) 0.10	(0) 0	(1.31) 1.1	(0) 0	(1.31) 1.1	98.4	0.06
9 months		complies	2.2	0.09	0.40	0.25	0.06	0.19	0.09	0	1.1	0	1.1	97.2	-	
12 months		complies	2.4	0.14	0.45	0.25	0.06	0.20	0.12	0	1.2	0	1.2	96.9	-	
Specifications		white to practically white powder	≤ 3	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.2	≤ 0.5	0	≤ 1.5	96.5 to 101.5 (**)	≤ 0.1		

(\*) Specification required at the beginning of the study.

(\*\*) At 6 months, two HPLC methods are used for related substances, the results are thus reported for both methods: routine control HPLC (in parenthesis) / HPLC method validated for stability testing.

(\*\*\*) Specifications calculated with reference to the anhydrous substance (instead of the dried substance).

Cuadro 2.4. Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad del lote CH003M-7V0408 BD del principio activo acetato de hidrocortisona y extraído del DMF del proveedor de la materia prima.

De los mismos, puede concluirse que el acetato de hidrocortisona presenta un tiempo de reanálisis de 60 meses en condiciones climáticas controladas correspondientes a la zona climática II y que no necesita condiciones especiales de almacenamiento en cuanto a la temperatura y la humedad se refiere.

### **2.7.2. Hidrocortisona base**

Según la definición de la Farmacopea Europea 7ª edición (31), la hidrocortisona base contiene no menos del 97,0% y no más del 103,0% de 11β, 17-Trihidroxipregn-4-ene-3,20-dione.

La fórmula es  $C_{21}H_{30}O_5$  y tiene un peso molecular de 362,46.

La **estructura química** de la hidrocortisona base es la siguiente:

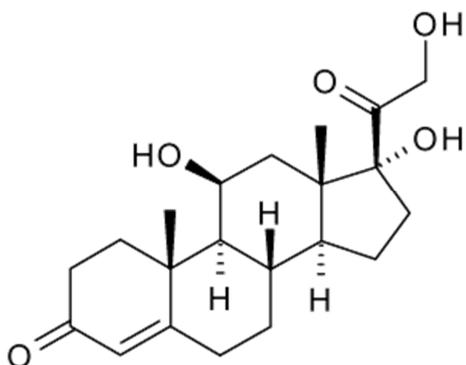


Figura 2.16. Estructura química de la hidrocortisona base.

Es un polvo cristalino blanco o casi blanco. Presenta polimorfismo. Es prácticamente insoluble en agua. Poco soluble en alcohol, acetona y diclorometano. Se debe proteger de la luz porque sufre fotodegradación.

Las especificaciones establecidas para la Hidrocortisona y que la materia prima adquirida del proveedor Aventis Pharma ha de cumplir, son las siguientes (cuadro 2.5.)

PARÁMETRO A ESTUDIAR	ESPECIFICACIONES
<b>Características</b> (Ph. Eur 7.0.) (31)	<p><i>Aspecto:</i> polvo cristalino, blanco o casi blanco.</p> <p><i>Solubilidad:</i> prácticamente insoluble en agua, bastante soluble en acetona y en etanol al 96 por ciento, poco soluble en cloruro de metileno.</p> <p>Presenta polimorfismo</p>
<p><b>Identificación:</b></p> <p><b>-Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo</b> (Ph. Eur 7.0.) (31) (USP 36) (28)</p> <p><b>-HPLC</b> (Ph. Eur 7.0.) (31)</p> <p><b>-Cromatografía de Capa fina</b> (Ph. Eur 7.0.) (31)</p> <p><b>-Coloración roja con ácido sulfurico</b> (Ph. Eur 7.0.) (31)</p> <p><b>-Espectrofotometría de Absorción UV</b> (USP 36) (28)</p>	<p>Positiva según patrón</p> <p>El pico principal del cromatograma obtenido con la disolución problema es similar en tiempo de retención y tamaño al pico principal del cromatograma obtenido con la disolución de referencia (c).</p> <p>La mancha principal de cada uno de los cromatogramas obtenidos con las disoluciones problema es similar en posición y tamaño a la mancha principal del cromatograma obtenido con la correspondiente disolución de referencia.</p> <p>Positiva</p> <p>La Absorbancia, calculada sobre la sustancia seca, no difiere más del 2,5%.</p>

<b>Solventes residuales por Cromatografía de gases</b>	
<b>-Diclorometano</b>	≤ 500 ppm
<b>-Dimetilformamida</b>	≤ 3000 ppm
<b>Agua + Solventes residuales</b> (ensayo del proveedor)	≤ 1.0% w/w
<b>Pérdida por desecación (105 °C)</b> (Ph. Eur 7.0.) (31) (USP 36) (28)	≤ 1,0% w/w
<b>Cenizas sulfatadas</b> (ensayo del proveedor)	≤ 0,1% w/w
<b>Residuo ignición</b> (USP 36) (28)	≤ 0,5%
<b>Rotación óptica específica</b> (Ph. Eur 7.0.) (31)	Entre 162° y 168° (calculado frente a la sustancia seca como referencia)
<b>Rotación óptica específica</b> (USP 36) (28)	Entre 150° y 156° (calculado frente a la sustancia seca como referencia)
<b>Sustancias relacionadas por HPLC</b> (Ph. Eur 7.0.) (31) (USP 36) (28)	
<b>-Impureza C, D, E, I</b>	≤ 0,5% w/w
<b>-Impureza G</b>	≤ 0,4% w/w
<b>-Impureza F</b>	≤ 0,3% w/w
<b>-Impureza A, B</b>	≤ 0,2% w/w
<b>-Impureza N, H</b>	≤ 0,15% w/w
<b>-Otras impurezas</b>	≤ 0,5% w/w (USP 36) (28) ≤ 0,1% w/w (Ph. Eur 7.0.) (31)
<b>-Impurezas totales</b>	≤ 2,0% w/w
<b>Determinación cuantitativa por HPLC</b> (USP 36) (28)	Entre 97.0 – 102.0% w/w (calculado frente a la sustancia seca como referencia)

<b>Determinación cuantitativa por espectrofotometría</b> (Ph. Eur 7.0.) (31)	Entre 97.0 – 103.0% w/w (calculado frente a la sustancia seca como referencia)
--	--

Cuadro 2.5.: Parámetros a estudiar para la evaluación de la materia prima y sus especificaciones

La **identificación de la molécula**, se realiza por una serie de técnicas analíticas que se detallan a continuación:

1.- Espectro infrarrojo (29).

Mediante pastillas de KBr se realiza el espectro infrarrojo de hidrocortisona. Los principales picos se encuentran en las siguientes longitudes de onda: 1640, 1702, 1610, 1220, 1042, 1115  $\text{cm}^{-1}$ , según se muestra en la figura 2.17.

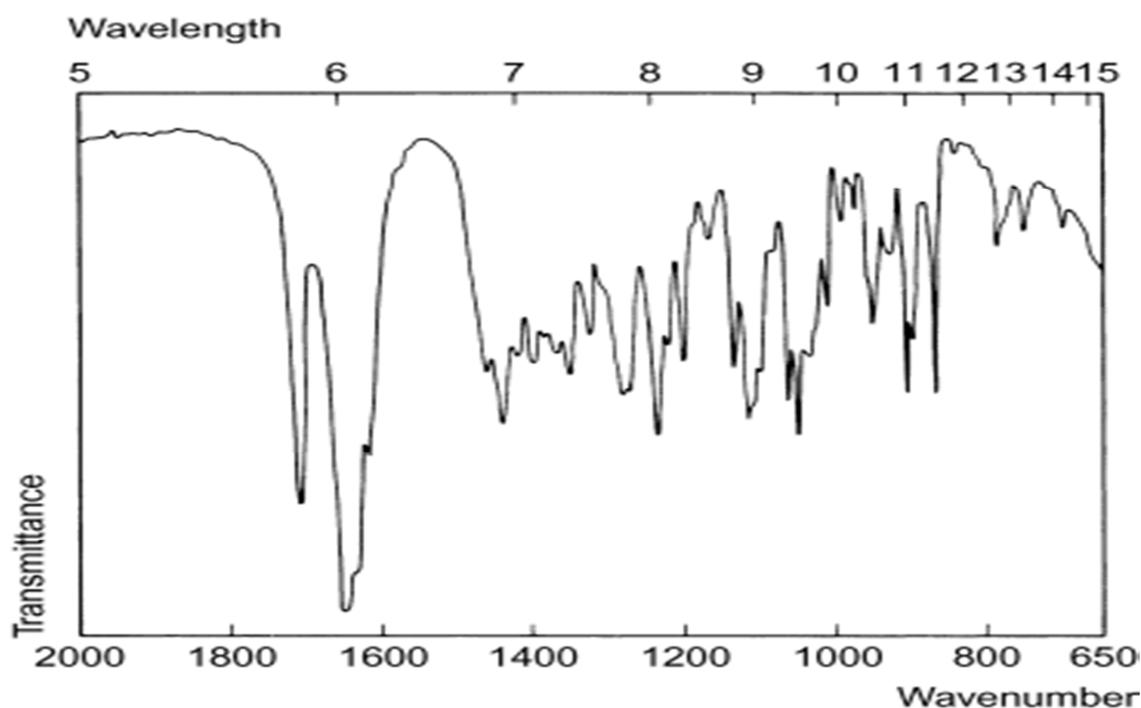


Figura 2.17. Espectro infrarrojo de la hidrocortisona

## 2.- Espectro Ultravioleta (28,32)

En una solución alcohólica con metanol con una concentración de la molécula de 10  $\mu\text{g}$  per mL, el pico máximo de absorción se encuentra a una longitud de onda de 242 nm, según se muestra en la figura 2.18.

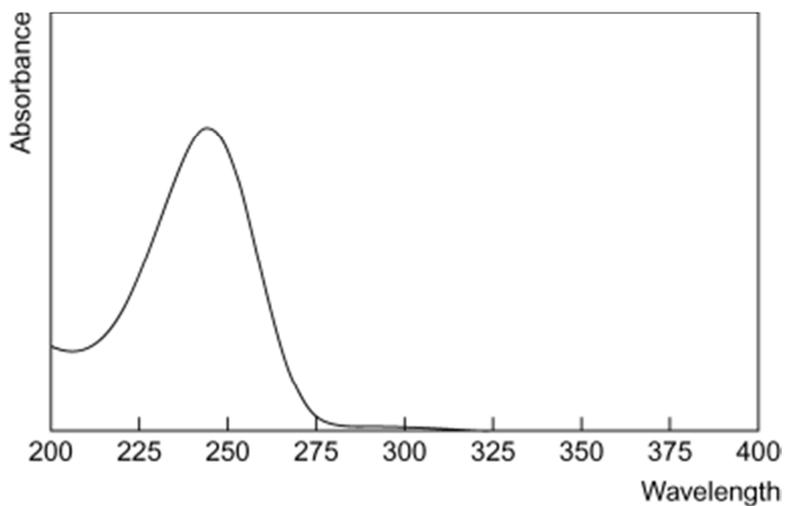


Figura 2.18. Espectro ultravioleta de la hidrocortisona

El **perfil de impurezas** de la hidrocortisona base puede ser tanto de síntesis como productos de degradación. Las impurezas están descritas en la Farmacopea Europea y en la Farmacopea Británica, y son las siguientes (29, 31):

- Impureza A: Prednisolona (11 $\beta$ ,17,21-trihidroxipregna-1,4-dieno-3,20-diona)

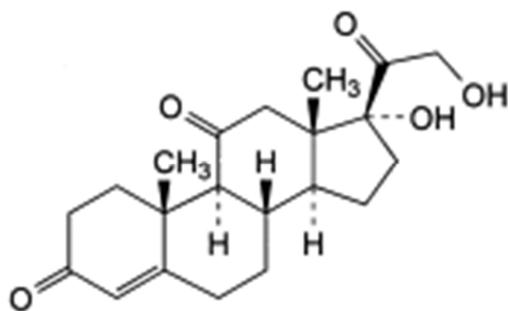


Figura 2.19. Impureza A de la hidrocortisona base

- Impureza B: Cortisona (17,21-dihidroxipreg-4-eno-3,11,20-trione).

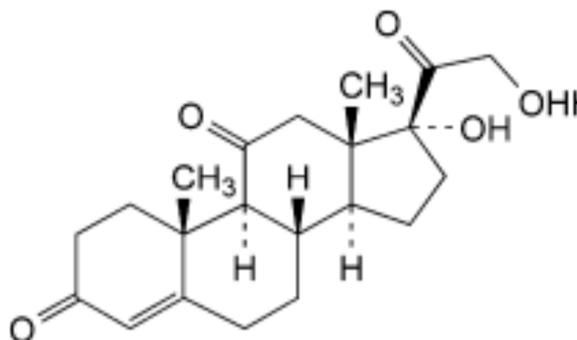


Figura 2.20. Impureza B de la hidrocortisona base

- Impureza C: Acetato de hidrocortisona (acetato de 11 $\beta$ ,17-dihidroxi-3,20-dioxopreg-4-en-21-ilo),

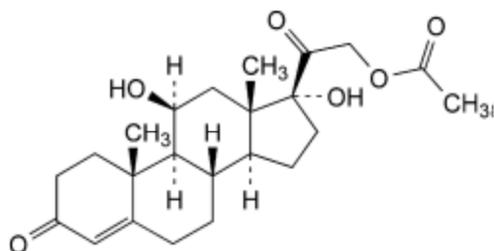


Figura 2.21. Impureza C de la hidrocortisona base

- Impureza D:  $R_1=R_3=OH$ ,  $R_2=R_4=H$ ,  $R_5=CH_2OH$ : 6 $\beta$ ,11 $\beta$ ,17,21-tetrahidroxipreg-4-eno-3,20-diona (6 $\beta$ -hidroxihidrocortisona),
- Impureza F:  $R_1=R_2=R_3=R_4=H$ ,  $R_5=CH_2OH$ : 17,21-dihidroxipreg-4-eno-3,20-diona (sustancia S de Reichstein)
- Impureza G:  $R_1=R_2=R_4=H$ ,  $R_3=OH$ ,  $R_5=CHO$ : 11 $\beta$ ,17-dihidroxi-3,20-dioxopreg-4-en-21-al (21-aldehído de hidrocortisona)
- Impureza H:  $R_1=R_4=H$ ,  $R_2=R_3=OH$ ,  $R_5=CH_2OH$ : 7 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17,21-tetrahidroxipreg-4-eno-3,20-diona (7 $\alpha$ -hidroxihidrocortisona),
- Impureza I:  $R_1=R_2=H$ ,  $R_3=R_4=OH$ ,  $R_5=CH_2OH$ : 11 $\beta$ ,14,17,21-tetrahidroxipreg-4-eno-3,20-diona (14 $\alpha$ -hidroxihidrocortisona),
- Impureza K:  $R_1=R_2=R_3=R_4=H$ ,  $R_5=CH_2-O-CO-CH_3$ : acetato de 17-hidroxi-3,20-dioxopreg-4-en-21-ilo (21-acetato de sustancia S de Reichstein)

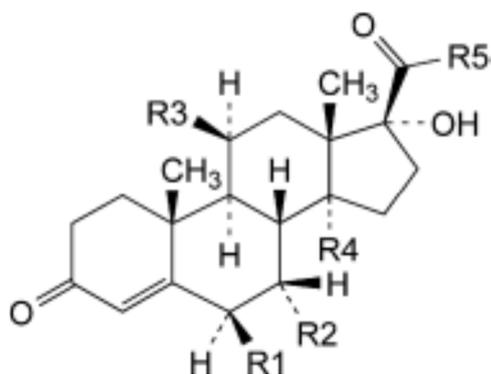


Figura 2.22. Estructura de las impurezas D, F, G, H, I, K de la hidrocortisona base

- Impureza E:  $11\beta,17,21$ -trihidroxipregna-4,6-dieno-3,20-diona ( $\Delta^6$ -hidrocortisona)

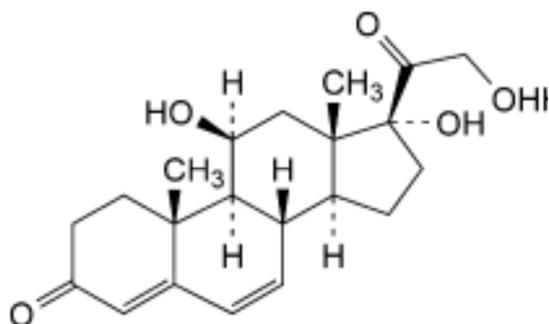


Figura 2.23. Impureza E de la hidrocortisona base

- Impureza J:  $R_1=H$ ,  $R_2=CO-CH_3$ ,  $R_3=OH$ : acetato de  $11\beta,21$ -dihidroxi-3,20-dioxopregna-4-en-17-ilo (17-acetato de hidrocortisona)
- Impureza L:  $R_1=R_2=R_3=H$ :  $11\beta,17$ -dihidroxipregna-4-eno-3,20-diona (oxenol)
- Impureza O:  $R_1=R_3=OH$ ,  $R_2=H$ :  $11\beta,17,19,21$ -tetrahidroxipregna-4-eno-3,20-diona (19-hidroxihidrocortisona)

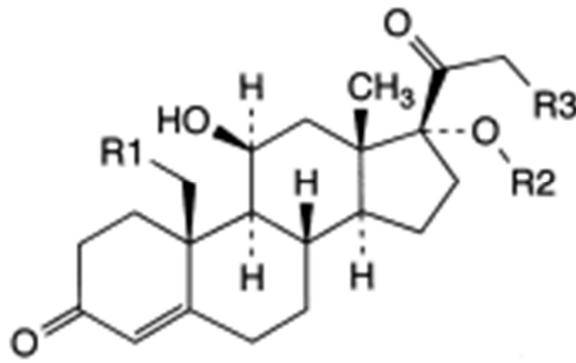


Figura 2.24. Estructura de las impurezas J, L, O de la hidrocortisona base

- Impureza M: 11 $\alpha$ ,17,21-trihidroxipregn-4-eno-3,20-diona (*epi*-hidrocortisona)

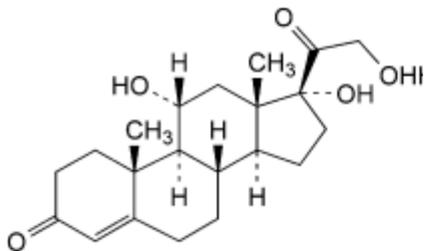


Figura 2.25. Impureza M de la hidrocortisona base

- Impureza N: 11 $\beta$ ,17,21-trihidroxi-21-(11 $\beta$ ,17,21-trihidroxi-3,20-dioxopregn-4-en-21-il)pregn-4-eno-3,20-diona (dímero de hidrocortisona)

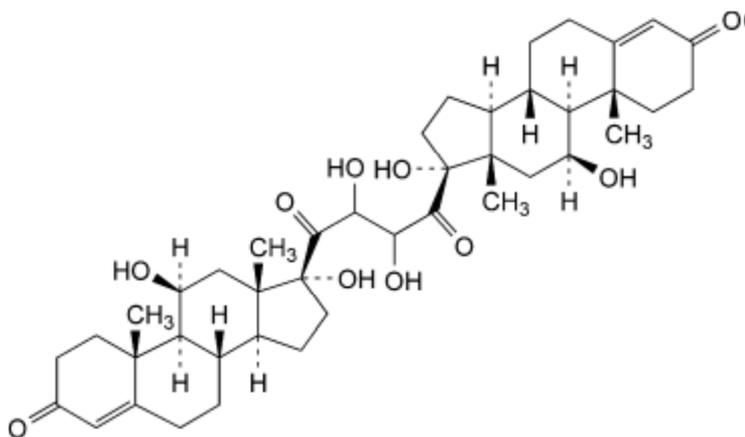
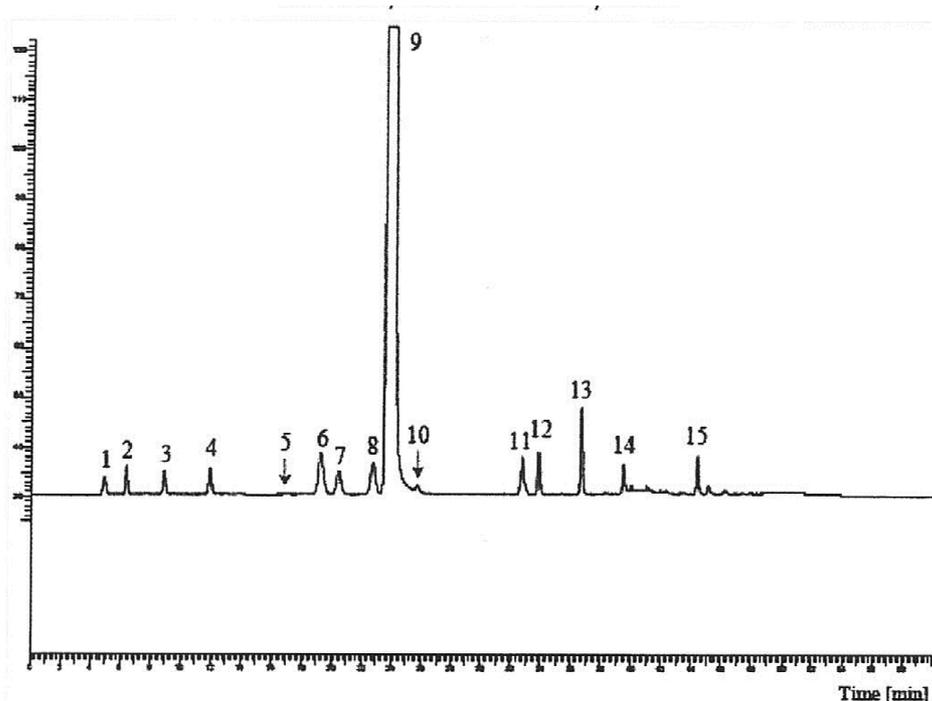


Figura 2.26. Impureza N de la hidrocortisona base

Todas estas impurezas pueden identificarse y cuantificarse por cromatografía líquida de alta resolución. En la figura 2.27. se muestra el perfil de impurezas de la hidrocortisona base por cromatografía líquida de alta resolución:



1: Impureza D    2: Impureza H    3: Impureza O    4: Impureza I    5: Impureza M  
6: Impureza G    7: Impureza E    8: Impureza A    9: Hidrocortisona    10: Impureza B  
11: Impureza J    12: Impureza F    13: Impureza C    14: Impureza N    15: Impureza K

Figura 2.27.: Cromatograma que muestra las sustancias relacionadas en una solución de hidrocortisona espicada con las impurezas.

En cuanto a las características de **estabilidad** de la hidrocortisona, la principal recomendación que se da en las monografías es que se ha de conservar en envases herméticamente cerrados y protegidos de la luz.

Los datos de estabilidad del proveedor de la hidrocortisona empleada en la parte registrada de estos lotes según condiciones ICH son los siguientes (33):

PRODUCT : HYDROCORTISONE  
 Batch control number : CH 002M - 7V0418BD

Beginning of the study : May 1997

Packaging : Polyethylene bags inside cardboard drum

Conditions	Time points	Characters	Color value	Related substances by HPLC (per cent)( <sup>2</sup> )							HPLC assay (per cent w/w) (on anhydrous)	Polymorphism	Granulometry	
				Coritstone	Hydroxy androstenedione + 21- aldehyde deriv.	Oxenol	Hydrocortisone acetate	Delta-6 hydrocortisone ( <sup>3</sup> )	Any other impurity > 0.2	Total content				
+25°C ± 2°C 60% RH ± 5%	Initial	complex	1.4	0	0	0	0.25	-	0	0.3	98.0	/	satisfactory	
	3 months	complex	1.6	<0.05	<0.05	0.07	0.25	No change	0	0.3	99.9	/	/	
	6 months	complex	2.2	<0.05	<0.05	0.06	0.25	No change	0	0.3	99.2	/	/	
	9 months	complex	1.8	<0.05	<0.05	0.05	0.25	No change	0	0.3	99.3	/	/	
	12 months	complex	1.3	<0.05	<0.05	0.07	0.25	No change	0	0.3	99.4	/	/	
	18 months	complex	1.0	<0.05	0.05	0.06	0.25	No change	0	0.4	99.4	/	/	
	24 months	complex	1.3	<0.05	<0.05	0.06	0.25	No change	0	0.3	99.7	/	/	
	36 months	complex	1.5	0.06	<0.05	0.06	0.20	No change	0	0.4	99.4	/	/	
	48 months	complex	1.4	0.09	<0.05	0.06	0.25	No change	0	0.4	99.3	/	/	
	60 months	complex	1.4	<0.05	0.05	0.07	0.25	No change	0	0.4	99.6	Polymorph I	No change	
	+40°C ± 2°C 75% RH ± 5%	1 month	complex	1.1	<0.05	<0.05	0.06	0.25	No change	0	0.3	100.7	/	/
		3 months	complex	1.2	<0.05	<0.05	0.05	0.25	No change	0	0.3	100.7	/	/
6 months		complex	2.4	<0.05	<0.05	0.06	0.25	No change	0	0.3	99.6	/	/	
9 months		complex	2.1	0.05	0.05	<0.05	0.25	No change	0	0.4	97.9	/	/	
12 months	complex	2.0	0.08	<0.05	0.06	0.25	No change	0	0.5	100.0	/	/		

(<sup>2</sup>) Specifications provided correspond with those effective at the beginning of the study

(<sup>3</sup>) Delta-6-Hydrocortisone is not quantified. Compare to the reference product (initial product stored at -20°C).

Cuadro 2.6. Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad del lote CH002M-7V0418 BD del principio activo hidrocortisona y extraído del DMF del proveedor de la materia prima

PRODUCT : **HYDROCORTISONE** Beginning of the study : May 1997 Packaging : Polyethylene bags inside cardboard drum  
 Batch control number : CH 003M - 7V0431BD

Conditions	Time points	Characters	Color value	Related substances by HPLC (per cent)( <sup>1</sup> )						HPLC assay (per cent w/w) (on anhydrous)	Polymorphism	Granulometry	
				Cortisone	Hydroxy androstenedione + 21-aldehyde deriv.	Oxenol	Hydrocortisone acetate	Delta-6- hydrocortisone ( <sup>2</sup> )	Any other impurity > 0.2				Total content
	Initial	complies	1.1	0	0.05	0.06	0.30	-	0	0.4	98.9	/	satisfactory
+25°C ± 2°C 60% RH ± 5%	3 months	complies	1.1	< 0.05	0.05	0.06	0.30	No change	0	0.4	98.4	/	/
	6 months	complies	1.8	< 0.05	0.05	< 0.05	0.30	No change	0	0.4	99.4	/	/
	9 months	complies	2.0	0.05	0.06	< 0.05	0.25	No change	0	0.4	99.2	/	/
	12 months	complies	1.6	0.05	< 0.05	0.06	0.30	No change	0	0.4	99.0	/	/
	18 months	complies	1.2	0.05	0.09	0.06	0.30	No change	0	0.5	99.6	/	/
	24 months	complies	1.3	0.08	0.06	0.06	0.30	No change	0	0.5	99.8	/	/
	36 months	complies	1.6	0.09	0.06	0.06	0.30	No change	0	0.6	99.3	/	/
	48 months	complies	1.2	0.12	< 0.05	0.06	0.30	No change	0	0.6	99.3	/	/
	60 months	complies	1.4	0.09	0.10	0.06	0.30	No change	0	0.5	99.3	Polymorph I	No change
	1 month	complies	0.8	< 0.05	0.05	0.06	0.30	No change	0	0.4	99.9	/	/
	3 months	complies	1.0	0.07	0.06	0.05	0.30	No change	0	0.5	100.2	/	/
	6 months	complies	1.5	0.07	0.08	0.06	0.30	No change	0	0.5	99.2	/	/
9 months	complies	2.1	0.06	0.08	0.07	0.30	No change	0	0.5	97.9	/	/	
12 months	complies	2.0	0.08	< 0.05	0.06	0.30	No change	0	0.5	99.2	/	/	

(<sup>1</sup>) Specifications provided correspond with those effective at the beginning of the study  
 (<sup>2</sup>) Delta-6-Hydrocortisone is not quantified. Compare to the reference product (initial product stored at -20°C).

Cuadro 2.7. Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad del lote CH003M-7V0431 BD del principio activo hidrocortisona y extraído del DMF del proveedor de la materia prima

PRODUCT :HYDROCORTISONE  
 Batch control number :CH.004M - 7V0450BD Beginning of the study : May 1997 Packaging : Polyethylene bags inside cardboard drum

Conditions	Time points	Characters	Color value	Related substances by HPLC (per cent)( <sup>6</sup> )						HPLC assay (per cent w/w) (on anhydrous)	Polymorphism	Granulometry		
				Cortisone	Hydroxy androstenedione + 21-aldehyde deriv.	Oxenol	Hydrocortisone acetate	Delta-6- hydrocortisone ( <sup>7</sup> )	Any other impurity > 0.2				Total content	
+25°C ± 2°C 60% RH ± 5%	Initial	complies	0.7	0.06	0	0.06	0.25	-	0	0.4	98.7	/	satisfactory	
	3 months	complies	0.7	0.06	< 0.05	0.05	0.30	No change	0	0.4	99.7	/	/	
	6 months	complies	2.2	0.07	< 0.05	0.05	0.25	No change	0	0.4	99.4	/	/	
	9 months	complies	2.1	0.05	0.05	0.05	0.25	No change	0	0.4	98.0	/	/	
	12 months	complies	1.0	0.07	0.08	0.05	0.25	No change	0	0.5	99.4	/	/	
	18 months	complies	1.1	0.11	0.08	0.06	0.25	No change	0	0.5	100.3	/	/	
	24 months	complies	1.1	0.10	0.06	0.06	0.25	No change	0	0.5	98.7	/	/	
	36 months	complies	1.4	0.13	0.09	0.06	0.25	No change	0	0.5	98.5	/	/	
	48 months	complies	1.7	0.14	< 0.05	0.06	0.25	No change	0	0.6	99.1	/	/	
	60 months	complies	1.3	0.15	0.10	0.06	0.25	No change	0	0.6	99.5	Polymorph I	No change	
	+40°C ± 2°C 75% RH ± 5%	1 month	complies	1.3	0.05	0.05	0.05	0.25	No change	0	0.4	98.8	/	/
		3 months	complies	0.8	0.09	0.06	0.05	0.25	No change	0	0.5	99.4	/	/
6 months		complies	1.8	0.09	0.08	< 0.05	0.30	No change	0	0.5	98.6	/	/	
9 months		complies	1.9	0.10	0.08	0.06	0.25	No change	0	0.5	97.8	/	/	
	12 months	complies	1.5	0.13	< 0.05	0.06	0.25	No change	0	0.5	99.9	/	/	

(<sup>6</sup>) Specifications provided correspond with those effective at the beginning of the study  
 (<sup>7</sup>) Delta-6-Hydrocortisone is not quantified. Compare to the reference product (initial product stored at -20°C).

Cuadro 2.8. Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad del lote CH004M-7V0450 BD del principio activo hidrocortisona y extraído del DMF del proveedor de la materia prima

De los mismos, puede concluirse que la hidrocortisona presenta un tiempo de reanálisis de 60 meses en condiciones climáticas controladas correspondientes a la zona climática II y que no necesita condiciones especiales de almacenamiento, en cuanto a la temperatura y humedad se refieren.



## **CAPÍTULO 3: FORMAS FARMACEUTICAS SEMISOLIDAS**

### **3.1.- INTRODUCCIÓN (34-38)**

Las formas de dosificación semisólidas tópicas se presentan normalmente en forma de cremas, geles, ungüentos, o pastas. Cuando un gran volumen de gas se dispersa en un líquido o crema, se producen las espumas. Todas estas formas farmacéuticas, contienen uno o más ingredientes activos disueltos o dispersados de manera uniforme en una base adecuada y cualquiera de los excipientes adecuados, tales como emulgentes, agentes que aumentan la viscosidad, agentes antimicrobianos, antioxidantes, o agentes estabilizantes. Las preparaciones susceptibles al crecimiento de microorganismos deben contener un agente antimicrobiano adecuado en una concentración apropiada a menos que las propias preparaciones tengan propiedades antimicrobianas adecuadas (como por ejemplo, preparaciones farmacéuticas alcohólicas). Se debe asegurar durante los estudios de desarrollo del preparado farmacéutico que dichos excipientes no afecten negativamente a la estabilidad del producto final o a la disponibilidad del ingrediente activo en el sitio de acción; no debe haber ninguna incompatibilidad entre cualquiera de los componentes de la forma de dosificación.

Las preparaciones semisólidas para aplicación cutánea se formulan para conseguir una liberación local o transdérmica de los principios activos, o para su acción emoliente o protectora. Tienen un aspecto homogéneo.

La elección de una base para formas de dosificación semi-sólidas depende de muchos factores: el efecto terapéutico deseado, la naturaleza del ingrediente activo para ser incorporado, la disponibilidad del ingrediente activo en el sitio de acción, la vida útil del producto terminado y las condiciones ambientales en las que el producto está destinado a ser administrado.

La base no debe irritar ni sensibilizar la piel, ni debe retrasar la cicatrización de heridas. Debe ser suave, inerte, inodora, estable física y químicamente, y compatible con la piel y el ingrediente activo a incorporar. Normalmente debe tener la suficiente consistencia de modo que se extienda y ablande fácilmente cuando se aplica tensión.

Puede ser necesario que una forma de dosificación semisólida tópica sea estéril, por ejemplo, cuando se pretende usar en heridas grandes abiertas o piel severamente lesionada.

Las disoluciones, emulsiones y suspensiones rectales pueden contener excipientes, por ejemplo para ajustar la viscosidad de la preparación, para ajustar o estabilizar el pH, para incrementar la solubilidad del principio o principios activos o para estabilizar la preparación. Estas sustancias no afectan adversamente a la acción medicamentosa buscada ni causan una irritación local excesiva en las concentraciones empleadas. Las disoluciones, emulsiones y suspensiones rectales se presentan en envases de volumen comprendido entre 2,5 ml y 2000 ml. El envase está adaptado a la administración en el recto o bien va acompañado del aplicador correspondiente.

### **3.2.- FORMAS FARMACEUTICAS SEMISOLIDAS**

Según comentado previamente, las siguientes formas farmacéuticas se consideran semisólidas:

- ✓ Ungüentos.
- ✓ Pomadas o pastas
- ✓ Cremas
- ✓ Geles

Se detallaran las formas farmacéuticas escogidas para el estudio del preparado farmacéutico que se pretende desarrollar en la presente tesis, incluyendo la espuma como forma de dosificación alternativa a evaluar.

#### **3.2.1.- Crema**

##### **3.2.1.1. – Definición (34)**

Las emulsiones son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotas normalmente excediendo 0,1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los dos líquidos son inmiscibles,

químicamente no reactivos y que forman sistemas caracterizados por poca o nada estabilidad termodinámica. El material dispersado en pequeñas partículas se denomina fase interna, dispersada o discontinua. El otro material se denomina fase externa, continua o medio de dispersión.

Las cremas por lo tanto son emulsiones, preparaciones multifásicas constituidas por una fase lipófila y una fase acuosa. Su consistencia y sus propiedades dependen del tipo de emulsión, bien sea agua /aceite (hidrófobas) o aceite/agua (hidrófilas) y la naturaleza de los sólidos de la fase interna. Las cremas están destinadas para su aplicación en la piel o ciertas mucosas con efecto protector, terapéutico o profiláctico, en particular cuando no se necesita un efecto oclusivo. Las cremas pueden ser:

- Cremas hidrófobas (agua/aceite): Son habitualmente anhidras y absorben sólo pequeñas cantidades de agua. Estas preparaciones contienen agentes emulgentes del tipo agua en aceite tales como lanolina, ésteres del sorbitano y monoglicéridos. En las cremas lipófilas la fase continua es la fase lipófila.

Este tipo de emulsiones se usan típicamente como emolientes. Existen en un intervalo amplio de consistencias dependiendo de los componentes de la fase oleosa, de la fase acuosa y del emulgente.

- Cremas hidrófilas: Contienen bases miscibles con agua. En las cremas hidrófilas la fase externa es la fase acuosa. Estas preparaciones contienen agentes emulgentes del tipo aceite en agua tales como jabones de sodio o de trietanolamina, alcoholes grasos sulfatados, polisorbatos y ésteres de ácidos y de alcoholes grasos polioxietilenados, combinados, si es necesario, con agentes emulgentes del tipo agua en aceite. Estas cremas son fundamentalmente miscibles con las secreciones cutáneas.

### **3.2.1.2.- Proceso para preparar una crema (39)**

En el proceso de preparación de una emulsión, el método de adición de la fase oleosa y de la fase acuosa, el ratio de adición, la temperatura de cada fase y el ratio de enfriamiento tras la mezcla de las fases tienen un efecto considerable en el tamaño de distribución de la gota, de la viscosidad y en la estabilidad de la emulsión final.

Asimismo, la localización del emulsificante (fase oleosa o fase acuosa), también se debe investigar.

En la preparación de emulsiones aceite/agua, la fase oleosa se añade normalmente sobre la fase acuosa, aunque muchos tecnólogos prefieren la técnica de la inversión, es decir, la adición de la fase acuosa sobre la fase oleosa.

En la preparación de emulsiones agua/aceite, la fase acuosa se añade lentamente sobre la fase oleosa con agitación constante. Normalmente estas emulsiones se homogeneizan o micronizan para disminuir el tamaño de gotita de la fase interna lo que incrementa la estabilidad y mejora el brillo de la emulsión.

La práctica más habitual para formular emulsiones es preparar una fase oleosa que contenga todos los ingredientes solubles en aceite y calentarla alrededor de 5 – 10 °C por encima del punto de fusión del ingrediente de mayor punto de fusión. La fase acuosa normalmente se calienta a la misma temperatura y posteriormente las dos fases se mezclan. Se debe prestar atención para no calentar las fases excesivamente (por encima de 85 °C) porque puede ocurrir degradación de los componentes más sensibles como hidrólisis de los emulgentes, descomposición de los conservantes o decoloración de las aminas (estearato de trietanolamina).

Tras la formación de la emulsión a elevada temperatura, el ratio de enfriamiento es extremadamente importante para determinar la textura final y la consistencia de la emulsión. Esto es debido al tipo de cristalización de alguno de los componentes de alto peso molecular como ácido esteárico, alcohol cetílico y gliceril monoestearato. La transferencia del proceso de enfriamiento de pequeña escala a escala industrial requiere una evaluación profunda sobre la agitación y el enfriamiento. Es aconsejable usar equipos con camisas calefactoras por las que pasa el agua para la preparación a escala industrial de emulsiones, de forma que los ciclos de calentamiento y enfriamiento se puedan controlar con más cuidado.

Para el desarrollo de un producto a escala laboratorio, los equipos que se usan deben de simular el equipo de fabricación que se necesitará cuando el producto se fabrique a escala industrial. En este sentido, se deben evitar usar equipos de laboratorio que

podrían posteriormente no estar disponibles a escala industrial. Será complicado predecir el tiempo de mezclado exacto y la velocidad rotacional del mezclador, pero en general las características generales del proceso pueden ser bastante acertadas si se usan mezcladores idénticos a diferentes escalas. Las operaciones de mezclado y de agitación son críticas en la preparación de emulsiones y en el laboratorio a escalas de trabajo de 0,5 kg – 1 kg, estas operaciones pueden controlarse cuidadosamente.

En el desarrollo del proceso de fabricación, el tiempo de fabricación, la temperatura y el trabajo mecánico son las tres variables en la fabricación de semisólidos emulsificados. Los tres factores están interrelacionados y deben de controlarse durante la fabricación.

Existen equipos disponibles para controlar automáticamente muchos aspectos de la fabricación de emulsiones como el control completo de la temperatura en la camisa calefactada, la regulación del tiempo de mezclado y el ratio de agitación.

Durante la fabricación industrial, los componentes de la fase oleosa se mezclan en su totalidad en un reactor de acero inoxidable con presión y camisa calefactada, de forma que se funden y se mezclan. Posteriormente la fase oleosa se transfiere por gravedad o mediante una bomba al tanque en donde se formará la emulsión, y cuyas paredes han sido calentadas a la misma temperatura que se encuentra la fase oleosa para prevenir que alguno de sus componentes con mayor punto de fusión se congelen. Los componentes de la fase acuosa se disuelven en agua purificada y se filtran. Los principios activos solubles se suelen adicionar a la fase acuosa siempre y cuando las altas temperaturas no degraden dicho principio activo. Si no puede ser, el principio activo se suele incorporar a la crema una vez la emulsión se ha formado y se ha enfriado.

La fase oleosa y acuosa se mezclan normalmente a una temperatura de entre 70 y 72 °C debido a que a esta temperatura se produce una mezcla más íntima de ambas fases. La temperatura de mezclado puede disminuirse unos cuantos grados siempre y cuando el punto de fusión de la fase oleosa sea suficientemente bajo como para prevenir una cristalización prematura o congelación de sus componentes. En el caso de que se pueda disminuir la temperatura de mezclado de las fases, el tiempo de enfriamiento también se reduce, aspecto positivo sobre todo en tamaños de lote industriales grandes.

Tras la adición de las fases, el ratio de enfriamiento es generalmente bajo de forma que se permita una mezcla adecuada mientras la emulsión todavía es líquida. La temperatura del medio de enfriamiento de la camisa del reactor (generalmente agua) debe disminuirse gradualmente con un ratio constante con la mezcla de la emulsión.

El ajuste final del contenido de agua de la emulsión no es fácil de realizar una vez la emulsión se ha creado. La elaboración de varios lotes, ayuda a determinar la cantidad de agua que se ha perdido durante el calentamiento del proceso, y esta pérdida de agua debe de añadirse a la cantidad de agua requerida al inicio de la fabricación.

Durante el proceso de agitación, en muchas ocasiones se puede formar espuma. Este fenómeno ocurre porque los tensioactivos solubles que se necesitan para emulsionar las dos fases, reducen la tensión superficial de la interfase aire-agua. Por lo tanto este problema se suele producir en lotes de escalado especialmente en productos de alta viscosidad. Para prevenirlo, el líquido que se incorpora debe entrar en el reactor de mezclado por debajo de la superficie del otro líquido.

Otra forma de evitar la formación de espuma es trabajar en condiciones de vacío. Si aun así, todavía no se evita o reduce la creación de espuma, se suele adicionar antiespumantes (los más comunes son alcoholes de cadena larga), aunque si es posible, se recomienda no usar porque pueden ser una fuente de incompatibilidad química.

En la siguiente figura, se muestra el proceso de fabricación de una crema descrito en el presente apartado.

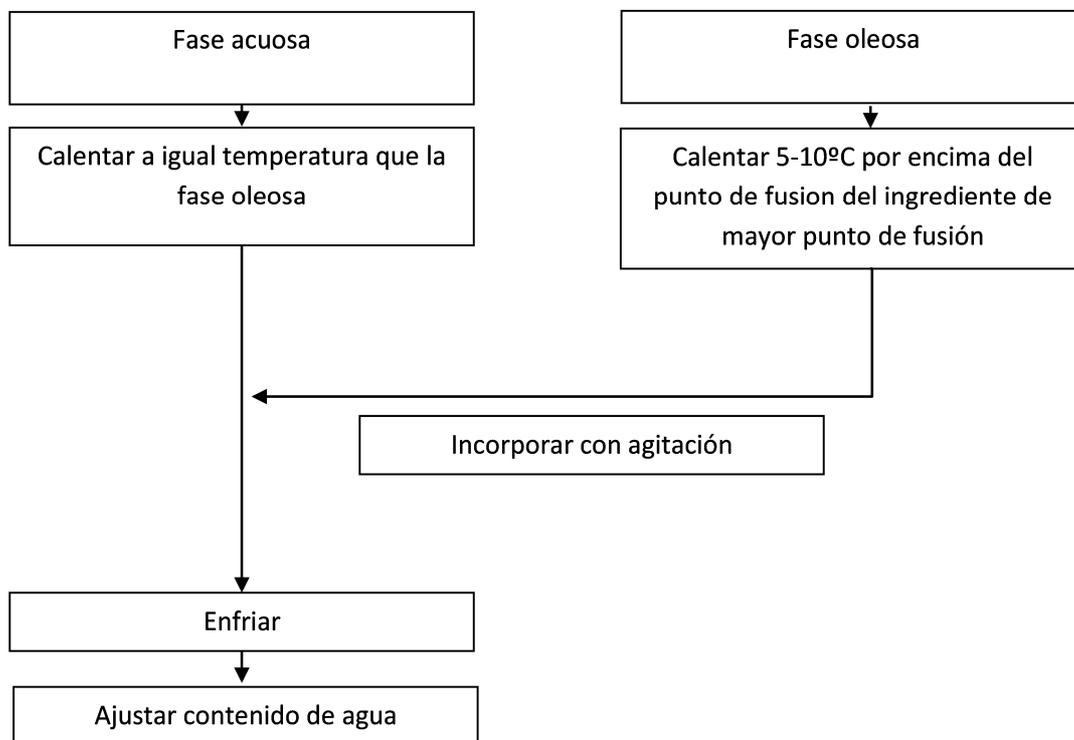


Figura 3.1. Esquema del proceso de fabricación de una crema.

### 3.2.1.3.- Propiedades de las cremas (40)

#### 1. Apariencia y sensación

Las emulsiones pueden variar en apariencia debido a la viscosidad, características de fluidez, brillo, suavidad, perlencia, textura y opacidad. Pueden variar en aplicación y sensación debido a la oleaginosidad, pegajosidad, humedad, propiedades deslizantes, textura arenosa, propiedades de difusión y tiempo de secado.

Estas propiedades, incluyendo estabilidad y tipo de emulsión, dependen en gran medida de las propiedades físicas y químicas de la fase oleosa y acuosa, el ratio de ambas fases, la concentración de tensioactivo utilizado, el orden de adición de los componentes, la temperatura de emulsificación y el método y velocidad de enfriamiento.

Las sensaciones táctiles de untuosidad y pegajosidad provienen de los excipientes que se quedan en la piel formando un film tras la aplicación de la emulsión. El ácido esteárico y el alcohol cetílico producen films no pegajosos en las cremas.

## 2. Tamaño de gotita de la fase interna

La viscosidad y apariencia de la emulsión se controlan en parte por el tamaño de partícula de la fase interna (ver cuadro 3.1.).

<b>Tamaño de gotita (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Apariencia</b>
<b>&gt;1</b>	Blanco
<b>0.1 – 1</b>	Azul-Blanco
<b>0.05 – 0.1</b>	Opalescente, semitransparente
<b>&lt;0.5</b>	Transparente

Cuadro 3.1.: apariencia de la emulsión en función del tamaño de gotita de la fase interna (40).

Si el tamaño de gotita es mayor de 1  $\mu\text{m}$ , la emulsión es blanca lechosa. Esta impresión visual de blancura es debida a la dispersión de la luz y los índices de refracción diferentes del medio de dispersión y dispersado. Conforme el tamaño de gotita de la fase interna disminuye, la emulsión cambia de blanca lechosa a más transparente. Cuando la fase interna se reduce a 0,1  $\mu\text{m}$  o menor, se crea una microemulsión o emulsión micelar.

El tamaño de gotita depende del tipo y cantidad de tensioactivo, de la cantidad de energía que se aporta para preparar una emulsión y del orden de adición de los ingredientes.

Conforme el tamaño de gotita de la fase interna disminuye, la emulsión se vuelve más estable. De hecho, este parámetro se usa para monitorizar la estabilidad a través del microscopio. El tamaño de gotita media de una emulsión recién hecha es de alrededor 1 a 3  $\mu\text{m}$ . Tras permanecer a temperatura ambiente durante 1 a 3 meses, el tamaño de gotita media de la emulsión puede aumentar a 7  $\mu\text{m}$  o más, concluyendo que el producto tiene un tiempo de vida limitado mostrando inestabilidad a temperatura ambiente.

El análisis del tamaño de gotita se puede determinar con una gran variedad de métodos, cada uno de ellos proporcionando diferente media de tamaño de gotita de los sistemas heterodispersos. El método más común es la determinación de la distribución del tamaño de la gota mediante la observación de la emulsión usando un microscopio provisto de un micrómetro.

### 3. pH

El pH de la emulsión se considera un parámetro importante de las emulsiones. El pH de la piel, que suele estar entre 4 y 6, tiende a ajustarse a este pH cuando se altera por la aplicación de un producto tópico a diferente pH.

El pH del principio activo es el que presenta una influencia más elevada en el pH de la emulsión.

### 4. Viscosidad

Una vez se ha escogido la emulsión y tensioactivo adecuado, se debe trabajar en conseguir una consistencia de producto adecuada para la estabilidad deseada y características de flujo apropiadas.

La viscosidad es una de las propiedades más importantes de las emulsiones ya que las variaciones en dicho parámetro son obvias ante el paciente. Las fluctuaciones de viscosidad durante el almacenamiento son uno de los mayores problemas para la química de la emulsión.

La viscosidad es la medida de la resistencia de un fluido a cambiar de forma debido a la fricción interna. Es un parámetro muy importante en emulsiones tópicas, ya que el producto está diseñado para proporcionar una sensación especial y ser dispensado de los diferentes tipos de envases a menudo con restricciones en la salida del producto.

La unidad de medida de la viscosidad es el poise, el cual se define como la fuerza tangencial necesaria para mantener la viscosidad a  $1 \text{ cm}^{-1} \times \text{segundo}$  entre dos planos cada uno de  $1 \text{ cm}^2$  de área. El centipoise (cP), que corresponde a 0.01 poise, es la unidad común para definir la viscosidad.

Aunque es imposible predecir la viscosidad de una emulsión con exactitud, en general hay una relación lineal entre la viscosidad de una emulsión y la viscosidad de la fase continua. Otros factores que afectan son el proceso de fabricación, la distribución del tamaño de las gotitas dispersadas, la concentración de la fase interna, la viscosidad de la fase externa, la estructura química del agente emulsificante, las propiedades física del film adsorbido en la interfase aceite-agua y la concentración.

La mejor forma de usar determinaciones de la viscosidad para predecir el tiempo de vida de la emulsión, es relacionarla con cambios en el tamaño de gotita. De una forma general, la disminución de la viscosidad con el tiempo, refleja un incremento en el tamaño de gotita debido a la coalescencia y es indicativo de un limitado tiempo de vida. La velocidad de incremento del tamaño medio de la gotita y los cambios de viscosidad resultantes, pueden usarse para predecir los cambios de viscosidad que ocurrirán a lo largo de un periodo de tiempo largo.

Existen tres métodos básicos para determinar la viscosidad o consistencia. El primer método mide la velocidad de flujo del producto a través de un capilar o un orificio. El segundo método mide la velocidad a la cual un objeto extraño caerá o subirá a través de un producto. El último método mide el esfuerzo de torsión inducido cuando el producto se somete a una cizalla. La elección del método depende del tipo de producto a examinar así como de la facilidad con la que el método puede usarse en dicho producto. Existe una amplia variedad de viscosímetros comercialmente. Se debe seleccionar uno con el intervalo de viscosidades adecuado según la aplicación del producto. El instrumento debe proporcionar la información reológica adecuada mediante el intervalo de velocidad deseado, el tiempo bajo cizalla y la temperatura. Esto a su vez debe combinarse con la facilidad de la operativa, buena reproducibilidad y relativo bajo coste.

#### **3.2.1.4.- Estabilidad de las cremas (41)**

En una emulsión correctamente formulada, deben coincidir varios criterios. Probablemente, el más importante y más fácilmente evidente es que la emulsión posea una adecuada estabilidad física; sin esto, cualquier emulsión pronto se volverá a separar en sus fases iniciales. Adicionalmente y como ocurre en otras formas farmacéuticas

como comprimidos o soluciones, el principio activo deberá ser químicamente estable en presencia de todos los excipientes a usar en la formulación.

En general, las emulsiones son sistemas heterogéneos y como tal, son susceptibles a cambios de fases cuando se almacenan incorrectamente. De hecho, no se puede indicar de ninguna emulsión que sea verdaderamente estable, aunque algunos productos son menos estables que otros.

Tan pronto se prepara una emulsión, los procesos dependientes del tiempo y de la temperatura comienzan a afectar a su separación. Durante el almacenamiento, la inestabilidad de la emulsión queda evidenciada por la sedimentación, por la agregación reversible (floculación) y por la agregación irreversible (coalescencia).

No hay ningún método suficientemente rápido y sensible para determinar la potencial inestabilidad en una emulsión. Para predecir la estabilidad a largo plazo, se requiere la introducción de estrés de forma que acelere la inestabilidad del producto.

Las condiciones de estrés normalmente utilizadas para evaluar la estabilidad de las emulsiones incluyen envejecimiento y temperatura, centrifugación, y agitación. Es importante considerar que el test de envejecimiento acelerado debería sólo acelerar los procesos que ocurren en un proceso de inestabilidad bajo condiciones normales de almacenamiento. Si el estrés es excesivo, pueden ocurrir procesos anormales, no siendo por lo tanto representativo del comportamiento en condiciones normales.

El ensayo más usado para estresar una emulsión es la temperatura. El argumento del por que aumentando temperaturas se predice la inestabilidad, viene de la conocida relación entre la constante  $k$  para una reacción química, y la temperatura  $t$ , expresada en la ecuación de Arrhenius. Representando el  $\log k$  versus  $1/T$ , se puede determinar  $k$  a cualquier temperatura.

Está generalmente reconocido que en el caso de las emulsiones, los cambios en la temperatura pueden provocar nuevas reacciones. La exposición a 25 °C y a 37 °C ofrece información adecuada. De todas formas, se ha demostrado que hay emulsiones que son estables a 40 °C y no pueden tolerar temperaturas alrededor de los 55 °C o 60 °C aunque

sea durante pocas horas. Vistos estos problemas, el tiempo de vida de una emulsión no puede ser predicho normalmente estudiando las emulsiones a temperaturas altas de 50 °C aunque sea durante periodos de tiempo cortos, a menos que haya una razón para creer que la preparación se expondrá a tan alta temperatura en condiciones normales.

Un uso particular de evaluar el tiempo de vida de una emulsión es realizar ciclos entre dos temperaturas, intentado evitar temperaturas extremas (como máximo entre 4 °C y 45 °C).

El tiempo de vida de una emulsión bajo condiciones normales de almacenamiento puede predecirse rápidamente por la observación de la separación de la fase interna debido a la coalescencia o precipitado cuando la emulsión se ha expuesto a la centrifugación. La Ley de Stokes muestra que la sedimentación es una función de la gravedad y que por lo tanto un incremento en la gravedad acelerará la separación. Becher (42) indica que la centrifugación a 3750 rpm en una centrífuga de 10 cm de radio durante 5 h, es equivalente al efecto de la gravedad durante un año.

La ultracentrifugación a velocidades extremas (del orden de 25.000 rpm o más), puede producir efectos que no se observan durante el envejecimiento normal de una emulsión.

Actualmente, no existe un acuerdo general sobre el diseño adecuado para realizar los tests de stress de temperatura y centrifugación.

### **3.2.2.- Espumas**

#### **3.2.2.1. Definición (43, 44)**

Las espumas medicamentosas son preparaciones que se componen de un gran volumen de gas (propelente) disperso en un líquido o semisólido tipo emulsión, que generalmente contiene uno o varios principios activos, un tensioactivo para permitir su formación y otros excipientes. Las espumas medicamentosas están destinadas a aplicarse en la piel o en las mucosas.

El propelente usado en una emulsión es una parte importante de este sistema y determina el tipo de espuma producida. El propelente normalmente se considera parte de la fase inmisible, y forma una espuma estable cuando está incluido en la fase interna de la emulsión.

Como se puede observar en la figura 3.2.a, cuando el propelente se encuentra en la fase interna, el vapor del propelente debe pasar a través de la formulación de la emulsión para escapar a la atmósfera. En este trayecto a través de la emulsión, el propelente vaporizado atrapado forma una matriz que se desarrollará en espuma como se observa en la figura 3.2.b.

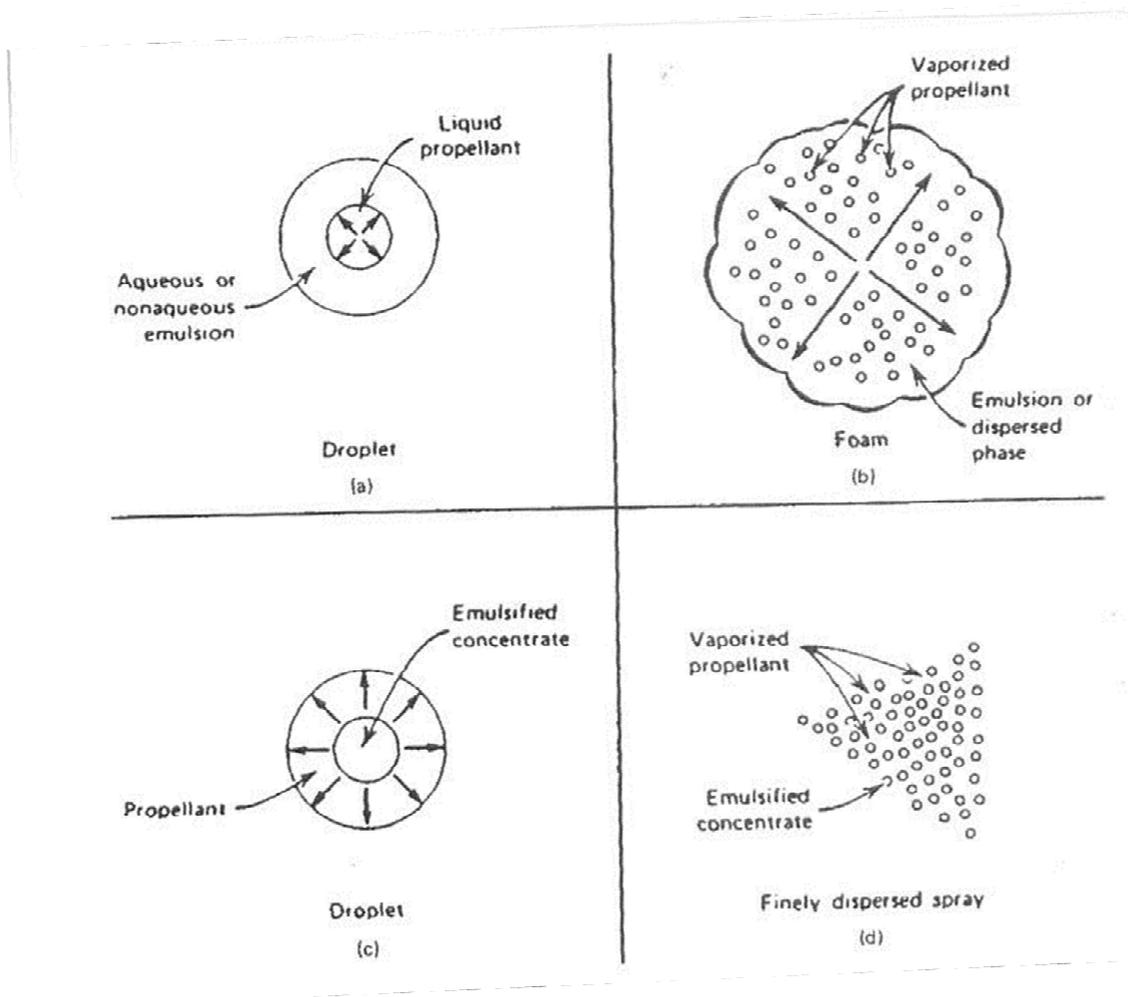


Figura 3.2. Emulsión típica con propelente en la fase interna o externa. (a) Propelente en la fase interna, (b) formación de una espuma aerosol, (c) propelente en la fase externa, y (d) formación de un spray húmedo.

Las espumas medicamentosas se forman generalmente en el momento de su administración a partir de una preparación líquida contenida en un envase a presión. El envase lleva un dispositivo consistente en una válvula y un pulsador para administrar la espuma.

Las espumas medicamentosas destinadas a su uso sobre piel gravemente dañada o sobre heridas abiertas importantes son estériles.

Las espumas medicamentosas suministradas en envases a presión cumplen los requisitos de la monografía Preparaciones farmacéuticas en envase a presión <0523> (44).

### **3.2.2.2.- Proceso para preparar una espuma (42)**

Las espumas medicamentosas estériles se preparan utilizando productos y métodos que permitan asegurar su esterilidad y que impidan la introducción de contaminantes y el crecimiento de microorganismos.

El proceso de fabricación y envasado de una espuma deben considerarse simultáneamente como parte de la operación global de fabricación. La emulsión que contiene el principio activo y otros excipientes inertes e incluso podría contener pequeñas porciones de propelente, se suele formular por separado y posteriormente mezclar con el resto de propelente. Seguidamente se usa el sistema adecuado de llenado, ya sea por presión o por llenado en frío. El método de elección suele ser el de presión por su eficiencia productiva referente a la velocidad de llenado.

### **3.2.2.3.- Ensayos a realizar en la espumas (44, 45)**

Los ensayos a realizar en las espumas no difieren de otros sistemas usados en formas farmacéuticas no aerosoles a excepción de los diferentes ensayos en proceso que son necesarios para asegurar que la concentración se ha preparado correctamente.

A tal efecto suele determinarse la riqueza para determinar el nivel de principio activo presente.

Los pesos de la emulsión y del propelente deben controlarse durante el proceso de fabricación de una forma rutinaria a modo de control en proceso. Un error en cualquiera de ambos pesos afectará a la cantidad de principio activo presente en el producto final.

Otros ensayos esenciales en el proceso de fabricación de una espuma son los siguientes:

#### Distribución del tamaño de gotita

El tamaño de gotita es una característica importante para los inhaladores y viene en parte determinado por la formulación y válvula de salida del producto.

El tamaño de gotita se determina por la técnica de impactación, microscopio o técnica de rayo laser.

Otro instrumento usado en la determinación de la distribución del tamaño de gotita es el Malvern particle sizer. Este instrumento utiliza difracción de laser para determinar el tamaño de gotita. Cuando una partícula dispersa la luz, produce una intensidad de luz única que puede ser exactamente medida usando un ordenador. La intensidad de la luz depende del tamaño de la gotita.

#### Uniformidad de dosis

Generalmente se mide determinando el peso actual de producto dispensado cada vez que la válvula se abre. El dispensador de la dosis debe estar dentro de especificaciones desde la primera hasta la última dosis.

De todas formas, se debe considerar el problema del cebado de la válvula en las primeras dosis, así como la disminución de producto por la válvula en las últimas 10-12 dosis. Con el objetivo de asegurar que el número de dosis que se administra es el que aparece en el etiquetado del producto, se suele añadir un exceso de producto a cada envase.

Es necesario controlar el peso del producto liberado no sólo en un mismo envase, sino también de envase a envase.

### Uniformidad de contenido

Asimismo se debe analizar la cantidad de principio activo presente en cada dosis dispensada. Esto generalmente es la uniformidad de contenido. Cada dosis dispensada, se recoge en un solvente adecuado y se analiza. En alguna ocasión puede ocurrir que la cantidad de producto dispensado esté dentro de especificaciones, pero en cambio la cantidad de principio activo presente no sea la adecuada. Esto puede ser debido a la aglomeración de gotículas, a que el principio activo se quede pegado en las paredes del envase y a la absorción del principio activo por la válvula y sus componentes.

### Test de integridad (46)

La USP/NF 36 tiene un ensayo específico para determinar este parámetro debido a que todos los aerosoles presentan algún tipo de fuga durante un largo periodo de tiempo.

Para realizar este ensayo, se seleccionan 12 contenedores en aerosol. Se pesa cada contenedor y se registra dicho peso en mg como  $W_1$ . A continuación se dejan dichos contenedores en posición vertical a una temperatura de  $25.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un mínimo de 3 días y de nuevo se pesa cada envase volviendo a registrar el peso en mg como  $W_2$ . Se determina el tiempo, T, en horas, durante el cual los envases estuvieron bajo el ensayo. Se calcula el ratio de fuga, en mg por año, de cada uno de los contenedores según la siguiente formula:

$$(365\text{ días}) (24\text{ horas} / T\text{ horas}) (W_1 - W_2)$$

El ensayo cumple si el ratio de fuga medio por año de los 12 envases no es más del 3,5% del peso neto de llenado y ninguno de los contenedores fuga más del 5,0% del peso de llenado neto por año. Si un envase fuga más del 5.0% por año y ninguno de los envases fuga más del 7.0% por año, determinar el ratio de fuga de otros 24 envases de la manera indicada en el presente documento. No más de 2 de los 36 envases fuga más del 5.0% del peso de llenado neto por año y ninguno de los 36 envases fuga más del 7.0% del peso medio de llenado por año.

### Duración de la expansión

La evaluación de este parámetro es especialmente importante con algunos productos en espuma que contienen principios activos muy potentes como esteroides tipo el acetato de hidrocortisona, usado en la presente tesis.

La expansión de la espuma modifica la cantidad de principio activo dispensado.

A continuación se presenta un aparato y el ensayo correspondiente para analizar la expansión de la espuma según describe la Farmacopea Europea en su monografía sobre el control de espumas.

El aparato (Figura 3.3.) se compone de una bureta de 50 ml y 15 mm de diámetro interno, con una escala graduada de 0,1 ml, que lleva una llave de una sola vía de 4 mm de diámetro. La señal correspondiente a 30 ml está como mínimo a 210 mm del eje de la llave. La parte inferior de la bureta está conectada al botón pulsador del envase donde se genera la espuma por medio de un tubo de plástico no mayor que 50 mm y de 4 mm de diámetro interno. Mantener el envase a unos 25 °C durante al menos 24 horas. Agitar el envase, con cuidado de no calentarlo, para homogeneizar la fase líquida de su contenido y expulsar unos 5 ml a 10 ml de la espuma, desechándolos. Conectar el pulsador a la salida de la bureta. Oprimir el botón e introducir unos 30 ml de espuma de una sola vez. Cerrar la llave y, al mismo tiempo, poner en marcha un cronómetro y leer el volumen de espuma en la bureta. Leer el volumen cada 10 segundos, hasta que alcance su valor máximo. Realizar tres medidas. En ninguno de los casos se requiere un tiempo superior a 5 minutos para obtener el volumen máximo.

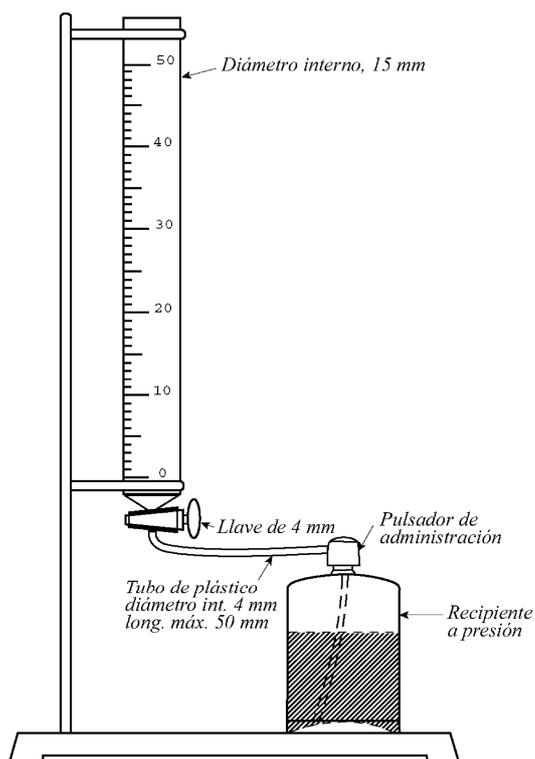


Figura 3.3. Aparato para la determinación de la duración de la expansión

#### Densidad relativa de la espuma.

Mantener el envase a unos 25 °C durante al menos 24 horas. Tomando precauciones para evitar que se caliente, adaptar al pulsador de administración un tubo rígido de 70 mm a 100 mm de longitud y aproximadamente 1 mm de diámetro interno. Agitar el envase para homogeneizar la fase líquida de su contenido y expulsar unos 5 ml a 10 ml de espuma, desechándolos. Tarar una cápsula de fondo plano de unos 60 ml de volumen y unos 35 mm de altura. Colocar en una esquina de la cápsula el extremo del tubo rígido unido al botón de administración. Presionar el pulsador y llenar la cápsula uniformemente con un movimiento circular. Cuando la espuma se haya expandido completamente, nivelarla con un portaobjetos, eliminando el exceso de espuma. Pesar. Determinar la masa del mismo volumen de agua R, llenando para ello la misma cápsula con agua R

La densidad relativa de la espuma equivale a la relación:

$m$  = masa en gramos de la muestra de espuma,

$e$  = masa en gramos del mismo volumen de agua R.

Realizar tres medidas. Ninguno de los valores individuales se desvía del valor medio más del 20 por ciento.

#### **3.2.2.4.-Estabilidad de las espumas (45)**

Un programa de estabilidad para un aerosol farmacéutico consiste en examinar todos los materiales usados en el producto, por separado y de una forma colectiva. Los propelentes no presentan problemas de estabilidad ya que todos ellos son materiales muy estables cuando se usan con excipientes de uso farmacéutico. La característica más importante del programa de estabilidad, especialmente para inhaladores, es la compatibilidad entre principio activo y los propelentes, envase y válvula.

Además del ensayo de riqueza para el principio activo, la mayoría de los otros parámetros del ensayo están relacionados con la evaluación fisicoquímica del producto.

Los parámetros que habitualmente se evalúan en un estudio de estabilidad de una espuma son densidad de la espuma y sus características, cantidad de dosis liberada, cantidad de principio activo, presión, pérdida del peso, tamaño de gotitas, productos de degradación, viscosidad, interacción del producto con la válvula, interacción del producto con el envase.

#### **3.2.3.- Geles (34-37)**

##### **3.2.3.1- Definición**

Los geles están formados por líquidos gelificados con la ayuda de agentes gelificantes apropiados. Son preparaciones homogéneas claras y semisólidas. Los geles se aplican a la piel o a ciertas mucosas para fines protectores, terapéuticos o profilácticos. Los geles a menudo proveen una liberación más rápida del principio activo, independiente de la hidrosolubilidad de dicho principio activo en comparación con las cremas y pomadas.

Existen los siguientes tipos de geles:

➤ Geles lipófilos

Los geles lipófilos (oleogeles) son preparaciones cuyas bases están constituidas habitualmente por parafina líquida con polietileno o por aceites grasos gelificados con sílice coloidal o por jabones de aluminio o zinc.

➤ Geles hidrófilos

Los geles hidrófilos (hidrogeles) son preparaciones cuyas bases generalmente son agua, glicerol y propilenglicol gelificado con la ayuda de agentes gelificantes apropiados tales como almidón, derivados de la celulosa, carbómeros y silicatos de magnesio y aluminio.

### **3.2.3.2.- Excipientes para preparar un gel**

Como en la formulación de cualquier forma farmacéutica, deben considerarse las características físico-químicas y farmacológicas del principio activo, a las que estará supeditado el vehículo excipiente, en este caso el gel.

Los excipientes que forman o pueden formar parte de un gel son los siguientes:

➤ Líquido a gelificar

También llamado diluyente, y es el componente mayoritario, que en el caso de los lipogeles suele ser aceites y en el caso de los hidrogeles suele ser agua, glicerol, propilenglicol u otro líquido hidrófilo.

➤ Gelificante:

Suele ser un polímero natural o sintético, a una concentración baja, inferior al 10% y que forma una matriz tridimensional en el seno del líquido hidrófilo o lipófilo.

➤ Regulador de pH (si procede)

Hay un tipo de polímero que da lugar a un gel dependiendo del pH del medio. Dan lugar a soluciones ácidas, de aspecto lechoso, que al neutralizar con las bases adecuadas, aumentan la viscosidad y disminuyen la turbidez del medio.

- Conservantes y/o antimicrobianos  
Deben elegirse de acuerdo con las características del agente gelificante, los coadyuvantes y principios activos, y teniendo siempre presente cual será la utilización del gel.
- Antioxidantes  
La introducción de antioxidantes en la formulación de un gel viene supeditada a la reactividad del principio activo ante la oxidación del medio.
- Estabilizantes
- Espesante  
Se introducen en la formulación en el caso de que se quiera aumentar la viscosidad de un gel.

### **3.2.3.3.- Proceso para preparar un gel**

En principio, la elaboración de geles no implica dificultad técnica; sin embargo, según el dispositivo empleado puede incorporarse aire con facilidad, perdiendo entonces en gran medida una de sus principales características organolépticas, la transparencia.

En la industria farmacéutica se suele trabajar en reactores al vacío o mediante desaireación posterior.

Los geles obtenidos con determinados polímeros varían su viscosidad según la técnica y el tiempo empleado en su agitación. En algún caso, también influye la temperatura.

Una vez elegido el vehículo líquido, el producto gelificante y la base para la neutralización (cuando sea precisa), solamente debe ponerse el producto gelificante en contacto con el medio líquido, para que se vaya embebiendo y de lugar al gel (gelificación directa) o por posterior gelificación mediante neutralización.

La incorporación del principio activo, por lo general, se efectúa por disolución en el medio líquido, previamente a la incorporación de la base gelificante.

Cuando por las características del principio activo, no permitan incorporarlo inicialmente, se añade sobre el gel, una vez obtenido, mediante agitación.

Los principios activos insolubles o poco miscibles en agua o solubles en otro disolvente (por ejemplo alcohol), pueden incorporarse mediante uno de los siguientes sistemas:

- Disolver en un medio hidroalcohólico y posteriormente gelificar.
- Elaborar el gel en agua y añadir el principio activo disuelto en alcohol, considerando el grado alcohólico final para evitar la floculación del polímero.

Si el principio activo no fuera soluble en agua, alcohol u otro disolvente hidrófilo, pero sí en aceite, se puede disolver en aceite y añadirlo al gel, ya que los geles acuosos, de elevada viscosidad, admiten la incorporación de productos oleosos a concentraciones moderadas, dispersándose estos en el gel.

Durante el desarrollo de formas farmacéuticas gelificadas, cuya formulación contenga un conservante antimicrobiano, debe demostrarse la necesidad y la eficacia del conservante escogido.

Durante la fabricación, envasado, conservación y distribución de formas farmacéuticas gelificadas se toman las medidas necesarias para garantizar la calidad microbiológica del producto.

Durante la fabricación de las formas farmacéuticas gelificadas, se toman las medidas adecuadas para confirmar que se cumplen las propiedades reológicas definidas.

#### **3.2.3.4.- Características de los geles**

Idealmente, los agentes gelificantes para productos farmacéuticos deberían ser inertes, seguros y no reactivos con otros componentes de la formulación. Una incompatibilidad que ocurre a menudo es la combinación de un principio activo catiónico, un conservante o un tensioactivo con un formado de gel aniónico. En estos casos, la sustancia catiónica pierde su actividad o precipita. El alginato sódico también ha demostrado en ocasiones que reduce la concentración de conservantes catiónicos en solución.

La adición de un agente gelificante en la formulación debe proveer a la misma una naturaleza razonablemente sólida durante el almacenamiento que pueda ser rota fácilmente cuando está sujeta a fuerzas de cizalla como por ejemplo las generadas por la agitación de una botella, apretón de un tubo o durante la aplicación tópica.

El gel debe mostrar ligeros cambios de viscosidad bajo variaciones de temperatura durante el uso normal y el almacenamiento. Esto minimiza cambios inaceptables en las características del producto.

Muchos geles, particularmente aquellos de naturaleza polisacárida, son susceptibles de degradación microbiológica. La incorporación de un conservante adecuado podría prevenir de contaminación y consecuentemente de la pérdida de las características del gel debido al ataque microbiológico.

Las características del gel deben ir alineadas con el uso propuesto. Un gel por vía tópica no debe ser pegajoso. Una elevada concentración del gelificante o el uso de un excesivo peso molecular podrían producir un gel difícil de dispensar o de aplicar. Un gel oftálmico debe ser estéril.

#### Capacidad de hinchamiento

Los geles pueden hincharse, absorbiendo líquido con un incremento en el volumen. La capacidad de hinchamiento puede observarse en la fase inicial de la disolución. Los solventes penetran en la matriz del gel. Las interacciones entre gel-gel son sustituidas por interacciones gel-solvente.

Una capacidad de hinchamiento limitada es generalmente el resultado de cierto grado de reticulación en la matriz del gel que previene la disolución total.

#### Sinéresis

Muchos sistemas en gel padecen una contracción al ponerse en pie. El líquido intersticial es expulsado juntándose en la superficie del gel por lo que el gel pasa de ser una sustancia homogénea a una segregación de componentes sólidos separados y

contenidos en la fase líquida. Este proceso es conocido como sinéresis. La sinéresis no está limitada a hidrogeles orgánicos sino que también se ha observado en organogeles e hidrogeles inorgánicos. Típicamente, la sinéresis se vuelve más pronunciada cuando la concentración del polímero disminuye.

El mecanismo de contracción se ha relacionado con la relajación de presiones elásticas desarrolladas durante la formación del gel. Cuando estas presiones son aliviadas, el espacio intersticial disponible para el solvente se reduce, forzando la expulsión del fluido. Efectos osmóticos, así como pH y concentración electrolítica están implicadas en la influencia de la sinéresis.

### Estructura

Las partículas inorgánicas son capaces de gelificar un vehículo mediante la formación de estructura “castillo de naipes”. Determinadas arcillas, como la bentonita o el caolín, poseen una estructura laminar que se hidrata con facilidad. Las superficies planas de las partículas de bentonita se cargan negativamente mientras que los bordes se cargan positivamente. La atracción de la cara de los bordes de esas láminas coloidales, crea una red tridimensional de partículas a través del líquido, inmovilizando el solvente. Las interacciones que se producen entre las partículas son débiles, rompiéndose al agitar.

Las largas cadenas de los agentes gelificantes orgánicos se extienden en buenos solventes, como sería el caso de geles acuosos, debido a la formación de puentes de hidrógeno entre el agua y los grupos hidroxilos del agente gelificante. En un solvente pobre, la molécula de gel estaría más o menos fuertemente enrollada, prefiriendo una interacción con ella misma que una interacción con el solvente. Cada segmento de las moléculas disueltas está en constante movimiento aleatorio, zarandeadas por el movimiento de las moléculas del solvente a través del líquido. Este movimiento aleatorio sirve para entrelazar filamentos del polímero, siendo dicho entrelazado el responsable de la viscosidad y estructura de los geles orgánicos.

Los polímeros orgánicos usados en los hidrogeles tienden a ser cubiertos con agua de hidratación. Esto permite a las moléculas del polímero deslizarse una sobre otra a bajas concentraciones debido a la lubricidad de las moléculas de agua que intervienen. Si el

grado de hidratación es bajo, las fuerzas de atracción intermoleculares, como los puentes de hidrogeno y las fuerzas de Van der Waals, forman unos puentes secundarios débiles entre las moléculas de polímero. A concentraciones de polímero suficientemente altas, se puede formar una red continua de cadenas de interacción débiles. La asociación de estas cadenas podría producir pequeñas regiones locales de naturaleza cristalina dispersada en el lecho de polímero entrelazado.

Las sales pueden atraer parte del agua de hidratación del polímero, permitiendo la formación de más puentes secundarios intermoleculares, produciendo gelificación y precipitación. Esto es conocido como salificación. Los cationes multivalentes tienen un efecto fuerte en las soluciones de polímeros aniónicos. La formación de puentes en los polímeros por el efecto de los cationes di o trivalentes, como ocurre en la adición de cobre a la soluciones de carboximetilcelulosa sódica o alginato sódico y cálcico, produce la formación del gel.

Los alcoholes tienen un efecto similar. Además, los alcoholes alteran las características de los solventes cambiando el parámetro de solubilidad. La adición de un alcohol a menudo provoca coacervación en lugar de gelificación. Coacervación es la producción de una fase rica en polímero, viscosa y solvatada, dejando atrás una fase que es mayoritariamente solvente y por lo tanto pobre en polímero.

La mayoría de gelificantes son más solubles en agua caliente que en agua fría.

Algunos polímeros muestran gelificación térmica. Estos polímeros son más solubles en agua fría; las soluciones de estos materiales, gelifican cuando se calientan. Algunos ejemplos son la metilcelulosa y el poloxamer.

La gelificación debida a cambios en la hidratación por cambios en la temperatura, tiende a ser reversible. Los geles licuan y se vuelven a restablecer de nuevo cuando la temperatura vuelve a su valor inicial. La gelificación producida por reacciones químicas como los puentes salinos o reticulación, es irreversible. Estos geles no pueden licurarse por dilución o cambios de temperatura.

El peso molecular es una consideración importante en la formación de un gel. Polímeros muy largos puede enredarse en mayor medida, lo que lleva a una mayor viscosidad de gel a una concentración dada. De esta forma, se puede requerir una menor concentración de un polímero de alto peso molecular para gelificar el solvente. Esto puede ser un inconveniente por ejemplo en la difusión difícil de un gel tópico debido a las interacciones de alta cohesión entre los filamentos de gel. Del mismo modo, un polímero de bajo peso molecular requiere una alta concentración para crear viscosidad y formar un gel, posiblemente con el consecuente incremento de coste debido a la cantidad de gelificante utilizada.

## Reología

Soluciones de agentes gelificantes y de dispersiones de sólidos flocculados son, típicamente pseudoplásticos, exhibiendo un comportamiento de flujo no newtoniano caracterizado por una viscosidad decreciente con un incremento en la velocidad de cizallamiento. Este comportamiento es debido a la progresiva rotura de la estructura del sistema.

La estructura tenue de las partículas inorgánicas dispersadas en agua se interrumpe cuando se aplica una fuerza cortante. Conforme aumenta dicha fuerza cortante, cada vez más asociaciones interparticulares se rompen exhibiendo una mejor tendencia a fluir.

Similarmente, para macromoléculas dispersadas en un solvente, la tensión de cizallamiento aplicada tiende a alinear las moléculas en dirección a dicha tensión aplicada. Las moléculas se enderezan, llegando a ser menos enredadas a medida que aumenta el cizallamiento, lo que reduce la resistencia al flujo.

### **3.2.3.5. Estabilidad de un gel**

La formulación y fabricación de un sistema en forma de gel no es completa sin la evaluación de la estabilidad de dicho sistema.

## Definición

Una formulación en gel que no es estable o adecuada para comercializar bajo circunstancias normales, exhibiría cambios irreversibles en sus propiedades reológicas de magnitud suficiente como para provocar que fuera inaceptable en su uso final.

Ejemplos de geles inestables incluyen aquellos que se establecen durante el almacenamiento y que ya no se pueden exprimir a partir del tubo, o aquellos geles que proceden con separación de fases, ya sea del líquido (como ocurre en la sinéresis) o del sólido (como en la sedimentación de partículas) y también aquellos que sufren una pérdida progresiva de viscosidad o consistencia cambiando de semisólida a líquido viscoso.

Es importante remarcar que el comportamiento reológico es complejo. Un cambio en el comportamiento reológico debe ser interpretado en su propio marco de referencia, es decir las propiedades deseadas del producto final. Así pues, una pequeña disminución de la viscosidad en un champú transparente podría ser mucho menos significativa que el mismo cambio en un producto tópico con un principio activo en suspensión.

## Pruebas

La mayoría de los geles muestran un comportamiento reológico no newtoniano y, por lo tanto, no pueden ser caracterizados por una medida única de viscosidad. A pesar de ello, las determinaciones de viscosidad aparente determinadas en una única velocidad de cizallamiento pueden ser útiles para comparar entre sí diferentes lotes o muestras almacenadas a lo largo del tiempo. Una medida en un punto único no proporciona ninguna pista del comportamiento del material a ninguna otra velocidad de cizalla, y nadie puede usar el resultado del ensayo a otra velocidad de cizalla para extrapolar el comportamiento a otra velocidad de cizalla. Un ensayo es válido si duplica la velocidad de cizallamiento de la propiedad que se está analizando. Por ejemplo, velocidades de cizalla muy bajas deberían usarse para determinar el valor del rendimiento. Del mismo modo, las pruebas de extensibilidad deberían de utilizar velocidades de cizalla altas para aproximar el alto cizallamiento experimentado por el producto cuando se frota en la piel.

El valor del rendimiento de un material viscoelástico puede determinarse con un penetrómetro. El penetrómetro es un cono o aguja de metal, a pesar de que también se han usado conos con ángulos duales consistentes en un cono de ángulo pequeño montado sobre un cono con un ángulo más amplio. En este ensayo se determina la profundidad de la penetración resultante del contacto del cono con el producto bajo condiciones de fuerzas conocidas.

La fórmula que se aplica para determinar el valor del rendimiento con un cono de ángulo simple es la siguiente:

$$S_0 = \frac{K_1 m g}{p^n}$$

en donde:

$S_0$  = valor del rendimiento

$m$  = masa del cono y de las partes móviles

$g$  = aceleración debido a la gravedad

$p$  = profundidad de la penetración

$n$  = constante de la materia, aproximadamente 2

$K_1 = 1/\pi \cos^2 \alpha \cos \alpha$  ( $2\alpha$  es el ángulo del cono)

Valores de rendimiento dentro del intervalo de 100-1000 dinas/cm<sup>2</sup> se clasifican como fácilmente extensibles. Por debajo de este intervalo, el material es demasiado blando y fluido. Por encima de este intervalo, el material es demasiado duro y no puede extenderse.

La estructura de los geles, como se ha descrito anteriormente, se produce debido a interacciones partícula-partícula o entrelazado molecular. El movimiento aleatorio conduce a la rotura continua y la reforma de los enlaces. La teoría viscoelástica también considera estos procesos opuestos. A bajas velocidades, el material se comporta de una forma elástica debido a los fuertes enlaces. Conforme el stress aplicado va aumentando, la estructura es modificada al someterse a un proceso de rotura del

enlace y reforma. Con la fuerza aplicada necesaria, se rompen suficientes enlaces de forma que la estructura se altera y se produce el flujo viscoso. La elasticidad inherente en un sistema como éste, permite recuperar parte de la deformación, aunque no toda, cuando el estrés es liberado. Curvas con deslizamientos demuestran gráficamente este comportamiento progresivo. La primera ventaja de caracterizar este sistema en cuestión de esta forma es que características fundamentales de viscosidad y elasticidad pueden obtenerse con mínimo estrés mecánico. Por lo tanto, los cambios sutiles que ocurren con el almacenamiento o el uso pueden ser evaluados y estandarizados, lo que lleva a definir el valor de una estabilidad aceptable.

Muchos otros ensayos son utilizados para examinar productos semisólidos en general, y en concreto geles. Estos ensayos exponen al producto a condiciones estresantes para determinar el intervalo de condiciones bajo las cuales el producto se comportaría bien. Ciclos de congelación-descongelación se pueden usar para ver si la separación o la sinéresis pueden ocurrir. El almacenamiento de muestras a varias temperaturas proporciona buena información sobre los requerimientos de almacenamiento de un gel. Las temperaturas elevadas usadas para estudiar estos requerimientos, no deberían de ser muy altas, probablemente no deberían de sobrepasar 45-50 °C. Las conclusiones obtenidas en este ensayo de temperaturas elevadas deberían ser moderadas con el conocimiento de que podría no existir una correlación con el almacenamiento a temperatura ambiente durante un largo período de tiempo debido a la posibilidad de que los cambios en las fases ocurran a altas temperaturas pero no a temperatura ambiente. Una prueba de envío es útil. El envío de un lote de un gel lo somete a golpes y variaciones de temperatura que el producto experimentará cuando se comercialice. Si el gel permanece inalterado en destino, significa que ha pasado satisfactoriamente un ensayo importante.



## **PARTE EXPERIMENTAL**



## **CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE LA FORMULACIÓN Y TÉCNICA DE ELABORACIÓN**

Se pretende desarrollar un preparado semisólido que contenga hidrocortisona como principio activo en una concentración del 1%.

Para la selección de la formulación y proceso de fabricación final, se trabaja con el acetato de hidrocortisona y con la hidrocortisona base como principios activos. La concentración de hidrocortisona base equivalente a la de acetato de hidrocortisona sería de 1,11%.

Una vez estudiado y seleccionado la formulación y proceso de fabricación, se realizarán estudios de estabilidad con las dos formas de principio activo utilizados, para evaluar cual de ellos es el que tiene propiedades de estabilidad mejores y por lo tanto el que se deberá escoger en la formulación final.

La administración del preparado será vía rectal en forma de enema.

Se pretende buscar una formulación, utilizando una serie de excipientes, en la que la hidrocortisona sea estable, segura y eficaz en la concentración mencionada y mediante la administración rectal en forma de enema para el tratamiento de la colitis ulcerosa.

Para ello se estudiarán las siguientes formas farmacéuticas:

1. Emulsión
2. Espuma
3. Gel

### **4.1. EMULSION**

Se estudian varias formulaciones y procesos de fabricación de emulsiones con el fin de obtener un preparado estable y de aspecto correcto.

#### **4.1.1. Diseño de la formulación**

Tal y como está descrito en el apartado 3.2.1. , las cremas son emulsiones constituidas por una fase lipófila y una fase acuosa. Asimismo, en una crema tiene que haber un agente emulgente que es el que cohesionará la fase acuosa con la fase oleosa.

En determinadas ocasiones en la fase acuosa se añade un viscosizante para proporcionar finalmente una emulsión más estable. En otras, con el fin de crear una crema de aspecto más suave y con mayor capacidad de penetración, se suele añadir un emoliente.

En casos como el actual, en donde el principio activo es muy insoluble en bastante medios, se suele utilizar solubilizantes que permitan incorporar el principio activo con más facilidad.

Para preservar la crema de posible contaminación microbiológica y oxidación, es habitual incluir conservantes y antioxidantes. También se suele incluir un agente quelante a base de compuestos orgánicos capaces de formar complejos con iones metálicos, que detienen la actividad catalítica de dichos iones en el proceso de oxidación de reacción en cadena. Esta reacción no previene que se realice la oxidación normal sino únicamente retarda la formación del peróxido y al mismo tiempo prolonga el periodo de inducción que evitará cualquier tipo de reacción entre posibles trazas de metales que pudieran quedar en el preparado.

Por último, se utilizara un agente acidificante y un agente alcalino, para proporcionar a la crema el pH requerido.

Se realiza una búsqueda bibliográfica de productos que puedan realizar las funciones arriba mencionadas para crear una crema (47):

<b>Función</b>	<b>Nombre Farmacopea europea</b>	<b>Sinónimo</b>
<u>Fase acuosa</u>	Agua purificada	Agua purificada
<p>Comentarios:</p> <p>Se decide utilizar el <u>agua purificada</u> como disolvente de la fase acuosa ya que es uno de los componentes más comunes y asequibles económicamente hablando en la industria farmacéutica y por lo tanto uno de los más usados.</p> <p>La concentración a utilizar, será la cantidad suficiente para completar el 100% de la totalidad de los ingredientes de la crema.</p>		

Cuadro 4.1. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de Fase acuosa.

<u>Fase oleosa (48)</u>	Aceite de oliva	Aceite de oliva
	Aceite de almendra	Aceite de almendra
	Aceite de ricino	Aceite de ricino
	Aceite de cacahuete	Aceite de cacahuete
	Lauroyl macroglyceridos or Linoleoyl macroglyceridos or Oleoyl macroglyceridos	Labrafil M
<p>Comentarios:</p> <p>En general, cualquier aceite vegetal que como tal, contenga una mezcla de glicéridos de ácidos grasos, podría ser utilizado como disolvente de la fase oleosa. En concreto, se escoge el <u>aceite de oliva</u> porque es uno de los que más fácilmente se encuentra en el mercado, además de que económicamente tiene también sus ventajas competitivas. Asimismo, hay experiencia en el uso del aceite de oliva en enemas, linimentos, ungüentos y jabones (49).</p> <p>El aceite de oliva, contiene la siguiente composición de ácidos grasos: Ácido mirístico (14 : 0), ≤0.5%, ácido palmítico (16 : 0), 7.5–20.0%, ácido palmitoleico (16 : 1), 0.3–5.0%, ácido heptadecenoico (17 : 1), ≤0.3%, ácido esteárico (18 : 0), 0.5–5.0%, ácido oleico (18 : 1), 55.0–83.0%, ácido linoleico (18 : 2), 3.5–21.0%, ácido linolenico (18 : 3), ≤0.9%, ácido araquídico (20 : 0), ≤0.6%, ácido eicosenoico (20 : 1), ≤0.4%, ácido behénico (22 : 0), ≤0.2%, ácido lignocérico (24 : 0), ≤1.0%. También hay presencia de esteroides.</p>		

Como alternativa, se escoge un glicérido de macrogol compuesto por ésteres de polietilenglicol y una fracción de glicéridos. Actúa asimismo de tensioactivo y está asociado con una mayor penetración del medicamento.

Se escoge en concreto el glicérido de macrogol oleoil (Labrafil M1944) con un balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de 4.

Cuadro 4.2. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de Fase oleosa.

Agente emulgente	Alcohol cetosteárico	Lanette O®
	Palmitoestearato de etilenglicol, estearato de PEG- 6 y estearato de PEG-32	Tefose 63®
	Laurilsulfato sódico	Laurilsulfato sódico
	Hidroxipropilcelulosa	Hidroxipropilcelulosa
	Carbomero	Carbopol

Comentarios:

Basado en la experiencia previa con el Alcohol cetosteárico se escoge este agente emulgente para realizar la preparación de la crema tópica. En las formulaciones farmacéuticas tópicas, este agente emulgente suele aumentar la viscosidad y actuar como un emulsificante en emulsiones A/O y O/A. El Alcohol cetosteárico estabiliza la emulsión y también actúa como co-emulsificante disminuyendo por lo tanto la cantidad total de tensioactivo necesaria para crear una emulsión estable.

Como alternativa se escoge la mezcla de Palmitoestearato de etilenglicol, estearato de PEG- 6 y estearato de PEG-32 (Tefose 63®) puesto que es la mezcla con propiedades emulgentes recomendadas para la fase oleosa anteriormente escogida (Labrafil M1944). Es un emulgente no iónico aceite en agua muy usado para aplicación en mucosas debido a la probada tolerancia de las mucosas. Las características sensoriales y de textura incluyen emulsiones blancas y brillantes con textura suave, capacidad de extensión excelente y suavidad durante la aplicación.

Cuadro 4.3. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de emulgente.

Emoliente	Oleato de decilo	Cetiol V
	Parafina	Vaselina filante
	Glicerina	Glicerina
	Lanolina	Lanolina
Comentarios:		
<p>Basada en la experiencia previa, se escogen el <u>oleato de decilo</u> y la <u>parafina</u> como agentes emolientes.</p>		

Cuadro 4.4. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de emoliente.

Agente solubilizante	Dietilenglicol monoetil éter	Etoxidiglicol
	Ciclodextrina	Ciclodextrina
	Fosfolípidos	Fosfolípidos
Comentarios:		
<p>Basado en la experiencia, se escoge el <u>dietilenglicol monoetil éter</u> como agente solubilizante. Este producto suele tener un amplio espectro de compatibilidad química y es ampliamente usado en preparaciones farmacéuticas orales, dérmicas y parenterales. Asimismo, el agente solubilizante escogido actúa como potenciador de la penetrabilidad en la piel para múltiples principios activos, principalmente aquellos con baja solubilidad.</p>		

Cuadro 4.5. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de agente solubilizante.

Conservante antimicrobiano	Metilparahidroxibenzoico / Metilparabeno	Nipagin
	Propilparahidroxibenzoico / Propilparabeno	Nipasol
	Ácido benzoico	Ácido benzoico
	Fenoxietanol	Fenoxietanol
Comentarios:		
<p>Se escoge el <u>metilparabeno</u> y el <u>propilparabeno</u> puesto que son los conservantes más usados en formas farmacéuticas semisólidas.</p> <p>La combinación de metilparabeno (0,18%) junto con el propilparabeno (0,02%), se suele usar para conservar algunas formas farmacéuticas parenterales ya que dicha combinación tiene un</p>		

efecto sinérgico.

Los parabenos son efectivos en un intervalo de pH muy amplio y tienen un amplio espectro antimicrobiano aunque son más efectivos frente a hongos y levaduras.

En ambos conservantes, se usa la forma no sódica porque, a pesar de que es menos soluble en agua, el pH de la formulación final se mantiene en valores alrededor de 5,0, a diferencia de si se usa la forma sódica en donde el pH aumenta hasta valores alrededor de 9.

Cuadro 4.6. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de conservante antimicrobiano.

Agente quelante	Edetato disódico	EDTA
	Ácido pentético	Ácido pentético
<p>Comentarios:</p> <p>Basado en la experiencia formulando este tipo de preparaciones, se escoge el <u>EDTA</u> como agente acomplejante. Este producto es usado en amplio intervalo de preparaciones farmacéuticas incluyendo preparaciones tópicas en concentraciones típicas de entre 0.005% y 0,1%.</p> <p>Las formas de edetato sódico forman complejos solubles en agua (quelatos) con productos alcalinos e iones de metales pesados. La forma quelato tiene menos propiedades inestabilizadoras que el ion libre y por esta razón los agentes quelantes son frecuentemente descritos como secuestradores de iones de las soluciones.</p>		

Cuadro 4.7. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de Agente quelante.

Agente antioxidante	Butilhidroxianisol	BHA
	Butilhidroxitolueno	BHT
	Ácido ascórbico	Vitamina C
<p>Comentarios:</p> <p>Basado en la experiencia formulando este tipo de preparaciones, se escoge el <u>BHA</u> como antioxidante con algunas propiedades antimicrobianas.</p> <p>Este producto se suele usar en combinación con otros antioxidantes como butilhidroxitolueno y secuestrantes o sinérgicos como ácido cítrico.</p>		

El BHA es fenólico y sufre reacciones características de los fenoles. Es incompatible con agentes oxidantes y sales férricas. De ahí que trazas de metales y la exposición a la luz, causen pérdida de actividad.

Cuadro 4.8. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de agente antioxidante.

Agente acidificante	<p>Ácido cítrico</p> <p>Ácido sulfúrico</p> <p>Ácido clorhídrico</p>	Ácido cítrico
<p>Comentarios:</p> <p>Cualquier ácido en solución puede ser utilizado como agente acidificante. Basado en la experiencia, se usará el <u>ácido cítrico</u> para ajustar el pH de la preparación formulada.</p>		

Cuadro 4.9. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de agente acidificante.

Agente alcalinizante	<p>Trietanolamina</p> <p>Hidroxido sódico</p> <p>Bicarbonato sódico</p>	Trietanolamina
<p>Comentarios:</p> <p>Se escoge la <u>trietanolamina</u> como agente alcalinizante debido a su amplio uso en formulaciones farmacéuticas tópicas, principalmente en emulsiones.</p>		

Cuadro 4.10. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de agente alcalinizante.

Viscosizante acuosa	fase	Almidón de maíz Alginato sódico Maltodextrina Hipromelosa	Almidón de maíz
Comentarios:  Por la experiencia como agente viscosizante, se escoge el <u>almidón de maíz</u> con el objetivo de preparar un engrudo de almidón previo a la incorporación de la fase oleosa. La preparativa de este engrudo, se explica ampliamente en el apartado 4.1.5.			

Cuadro 4.11. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de viscosizante de la fase acuosa.

#### **4.1.2. Materias primas**

##### **4.1.2.1. Principio activo**

Los principios activos evaluados en la presente tesis son el acetato de hidrocortisona y la hidrocortisona base. Ambos están ampliamente caracterizados y descritos en el apartado 2.7.1. y 2.7.2..

##### **4.1.2.2. Excipientes (47)**

En el cuadro 4.12. se lista los excipientes escogidos para la fabricación de la crema con acetato de hidrocortisona, así como su función y proveedor.

<b>Nombre Farmacopea europea</b>	<b>Sinónimo</b>	<b>Función</b>	<b>Proveedor</b>
Aceite de oliva	Aceite de oliva	Disolvente fase oleosa	Basf
Caprylocaproyl macroglyceridos Lauroyl macroglyceridos Linoleoyl macroglyceridos Oleoyl macroglyceridos Stearoyl macroglyceridos	Labrafil M	Disolvente fase oleosa	Gattefosse
Almidón de maíz	Almidón de maíz	Viscosizante fase acuosa	Cargill
Alcohol cetosteárico	Lanette	Agente emulgente	Basf
Palmitoestearato de polietilenglicol y etilenglicol	Tefose 63	Agente emulgente no iónico	Gattefosse
Oleato de decilo	Cetiol V	Emoliente	Basf
Parafina	Vaselina filante	Emoliente	Parchem
Metilparahidroxibenzoico / Metilparabeno (*)	Nipagin	Conservante antimicrobiano	Clariant
Propilparahidroxibenzoico / Propilparabeno (*)	Nipasol	Conservante antimicrobiano	Clariant
Edetato disódico	EDTA	Agente quelante	Parchem
Butilhidroxianisol	BHA	Agente antioxidante	
Dietilenglicol monoetil éter	Etoxidiglicol	Agente solubilizante	Gattefosse
Agua purificada	Agua purificada	Disolvente fase acuosa	In house
Ácido cítrico	Ácido cítrico	Agente acidificante	Basf
Trietanolamina	Trietanolamina	Agente alcalinizante	Basf

(\*) En ambos conservantes, se usa la forma no sódica porque, aunque es menos soluble en agua, el pH de la formulación final se mantiene en valores alrededor de 5,0, a diferencia de si se usa la forma sódica en donde el pH aumenta hasta valores alrededor de 9.

Cuadro 4.12. Lista de excipientes escogidos para fabricar la crema con acetato de hidrocortisona

### **4.1.3. Equipos**

Los equipos que se utilizan para fabricar la crema con acetato de hidrocortisona, se listan en el cuadro 4.13.:

<b>Equipos de fabricación</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Reactor de acero inoxidable con agitación y camisa calefactora	SIMPLEX	RS-45
Balanza	Delta Range	PG4002-S
Balanza	Mettler Toledo	AG204DR
Agitador	IKA	RW 20 digital
Helice agitadora	IKA	R 1385
Ancora agitadora	IKA	R 1330
Contenedor inoxidable	Glatt	No procede
Placa calefactora	IKA	C-MAG HP 10 IKATHERM®

Cuadro 4.13.: Listado de los equipos de fabricación, marca y modelo utilizados para fabricar la crema con acetato de hidrocortisona

### **4.1.4. Metodología (50-51)**

El estudio de la formulación se inicia a partir de dos formulas base con los siguientes excipientes propuestos:

#### 4.1.4.1. Formulación 1

Componentes	Cantidad (g)
Acetato de hidrocortisona	1,1100
Aceite de oliva	7,0000
Almidón de maíz	3,0000
Lanette	2,5000
Cetiol V	3,0000
Nipagin	0,1800
Nipasol	0,0200
EDTA	0,0005
BHA	0,0100
Etoxidiglicol	3,300
Agua purificada c.s.p.	79,8795
Ácido cítrico anhidro	c.s.p.
Trietanolamina	c.s.p.
Total	100.00

Cuadro 4.14. Lista de excipientes y principio activo que componen la Formulación 1

#### 4.1.4.2. Formulación 2

Componentes	Cantidad (g)
Acetato de hidrocortisona	1,1100
Tefose 63	15,0000
Labrafil M	3,0000
Vaselina Filante	0,1000
Nipagin	0,1800
Nipasol	0,0200
EDTA	0,0005
BHA	0,0100
Etoxidiglicol	3,300
Agua purificada c.s.p.	77,2795
Ácido cítrico anhidro	c.s.p.
Trietanolamina	c.s.p.
Total	100,00

Cuadro 4.15. Lista de excipientes y principio activo que componen la Formulación 2

La especificación del pH de la emulsión es un parámetro importante para la estabilidad de la formulación, ya que las posibles variaciones que ocurran en el resultado de dicho parámetro, son indicativas de la existencia de posibles alteraciones físicas, químicas y/o galénicas de del producto. Dicho parámetro, se estudiará en el capítulo 8 dedicado a la estabilidad del preparado farmacéutico en desarrollo. Para el estudio de la técnica de elaboración, el pH de la formulación lo ajustaremos entre 4,00 y 5,00.

Para elaborar el proceso de fabricación de la emulsión, las fases oleosa y acuosa son preparadas separadamente y después se incorporara una sobre la otra. Además la fase dispersante (fase acuosa) no contiene la totalidad de su disolvente. El resto del disolvente de la fase dispersante se añade después de la incorporación de la totalidad de la fase interna en la fase dispersante obteniéndose una emulsión primaria. El principio activo se añade a continuación en la emulsión primaria.

Antes de realizar cada una de las fases del proceso de fabricación, el equipo, los útiles de producción y la zona de trabajo deben ser inspeccionados y estar absolutamente limpios.

#### **4.1.5. Resultados experimentales y discusión de la Formulación 1**

Partiendo de la formulación 1 citada en el anterior apartado, se inician los estudios de elaboración de la emulsión que dará lugar al medicamento deseado.

El proceso de fabricación de la emulsión, y sus consecuentes pasos, serán las fases Fase1.1, Fase1.2, Fase2, Fase3 y Fase4.

Proceso de fabricación	Fase 1.1	Fase 1.2	Fase 2	Fase 3	Fase 4
Fase acuosa (engrudo de almidón) Incorporación del almidón en caliente.	-Almidón de maíz -Agua purificada -Nipagin -EDTA		45,00	45,00	45,00
Fase acuosa (engrudo de almidón) Incorporación del almidón en frío		-Almidón de maíz -Agua purificada -Nipagin -EDTA	-	-	-
Fase oleosa	-	-	-Aceite de oliva -Lanette -Cetiol V -BHA -Nipasol	-	-
Emulsión primaria	-	-	-	Fase oleosa sobre fase acuosa	-
Dispersión del principio activo (acetato Hidrocortisona o hidrocortisona base)	-	-	-		Principio activo Etoxidiglicol Agua purificada

- Preparación del engrudo de almidón Fase 1.1.:

Se comienza con los estudios experimentales para formar el **engrudo de almidón**, con la finalidad de optimizar su formación al considerarse un proceso crítico que puede afectar posteriormente a la estabilidad de la emulsión final.

El engrudo de almidón será la fase acuosa de la emulsión que posteriormente se creará al mezclarse con la fase oleosa.

Fórmula:

<b>Productos</b>	<b>%</b>
Almidón de maíz	3,0000
----- Agua purificada cps	97,0000
<b>Total</b>	<b>100,0000</b>

Se prepara un engrudo de almidón siguiendo los siguientes pasos del proceso de fabricación:

1. Llenar un recipiente con el agua purificada.
2. Calentar a 90 °C con agitación lenta.
3. Añadir el almidón y mantener agitación rápida durante 30 minutos.
4. Verificar la formación del engrudo de almidón.

Se observa que se forma un exceso de espuma que puede sobresalir por el recipiente.

Al calentar el agua purificada a 90 °C se observa que comienza a evaporarse. Para evitarlo se cubre el recipiente con una hoja de papel de aluminio. Asimismo se observa dificultad para mantener una temperatura de 90 °C.

El engrudo creado es de alta viscosidad produciéndose problemas a nivel de agitación. Se usa un imán de mayor tamaño y se disminuye la velocidad de agitación.

Se observa formación de grumos incluso después de agitar 50 minutos más.

La conclusión del proceso de fabricación del engrudo de almidón de la Fase 1.1 es que no es correcto.

No se llega a añadir ni el Nipagin ni el EDTA ya que las características del engrudo de almidón creado no son las adecuadas.

- Se ensaya el proceso de fabricación del engrudo de almidón según los siguientes pasos (Ref1.2.):

1. Llenar un recipiente con agua purificada.
2. Calentar a 90 °C con agitación rápida.
3. Añadir el almidón lentamente en agua purificada fría y homogeneizar agitando manualmente.
4. Verificar la formación del engrudo de almidón.
5. Enfriar agitando lentamente.

En esta ocasión, el mucílago de almidón creado es una dispersión translúcida viscosa sin grumos, dándose por lo tanto por correcto el proceso de fabricación del engrudo de almidón.

Posteriormente, se repite el proceso de fabricación del engrudo de almidón evaluado antes, pero incorporando el EDTA y Nipagin dentro del proceso de fabricación según los siguientes pasos:

- 1 Llenar un recipiente con agua purificada
- 2 Calentar hasta 90 °C de temperatura con agitación rápida. Cubrir el recipiente con una hoja de papel de aluminio para evitar la evaporación.
- 3 Añadir el Nipagin y homogeneizar manualmente.
- 4 Añadir el almidón lentamente en agua fría y homogeneizar agitando manualmente.
- 5 Verificar la formación del engrudo de almidón.
- 6 Añadir el EDTA y homogeneizar con agitación rápida (10 minutos)

Se obtiene una solución translúcida muy viscosa debido a una fuerte evaporación de agua.

- Fase 2:

Se continúa con el proceso de obtención de la formación de la **emulsión final**.

Para ello se inicia la preparación de la fase oleosa de la emulsión.

Formula de la fase oleosa de la emulsión:

<b>Productos</b>	<b>%</b>
Aceite de oliva	7,0000
Lanette	2,5000
Cetiol V	3,0000
BHA	0,0100
Nipasol	0,0200
<b>Total</b>	

Proceso de fabricación de la fase oleosa de la emulsión:

- 1 Colocar en un vaso de precipitados:

Aceite de oliva

Lanette

Cetiol V

BHA

Nipasol

- 2 Calentar hasta 70 °C bajo agitación lenta.
- 3 Verificar la homogenización de la fase oleosa.

- Fase 3: Preparación de la emulsión primaria:

- 1 Verificar que la temperatura de las fases acuosa y oleosa sea a 70 °C.
- 2 Añadir la fase oleosa sobre la fase acuosa lentamente bajo fuerte agitación.
- 3 Homogeneizar durante 10 minutos a 1100 rpm

Dejar reposar la emulsión durante 2 horas.

- Fase 4: Dispersión del principio activo (acetato de hidrocortisona o hidrocortisona base)

A continuación se prepara la dispersión del principio activo (acetato de hidrocortisona o hidrocortisona base) para posteriormente introducirla en la emulsión primaria creada:

Mezclar el principio activo y el etoxidiglicol y dispersarlos después en el agua purificada.

<b>Productos</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Acetato de Hidrocortisona	1,1100	-
Hidrocortisona base	-	1,0000
Etoxidiglicol	3,3000	3,3000
Agua purificada cps	95,5900	95,7000
<b>Total</b>	<b>100,0000</b>	<b>100,0000</b>

Incorporación de la dispersión de principio activo en la emulsión primaria:

- 1 Verificar que la emulsión primaria no esté a una temperatura superior a 40 °C.
- 2 Añadir la dispersión del principio activo con fuerte agitación de cizalla.
- 3 Añadir el agua purificada.

La emulsión obtenida presenta un aspecto sin grumos y blanca.

A continuación se ajusta el pH entre 4,0 y 5,0 con una solución del 1% de ácido cítrico anhidro utilizando 0,70 ml de dicha solución para obtener una media del pH en tres ensayos de 4,76 (especificación entre 4,0 y 5,0).

Se controla la viscosidad de la emulsión obteniendo un valor de viscosidad media de 3520 cps en tres ensayos (modelo de rotación RV5, velocidad de rotación 50).

Se controla la extensibilidad de la emulsión obteniendo un valor de extensibilidad media de 504,2 mm<sup>2</sup> en tres ensayos.

Por último se determina el signo de la fase externa y de la fase interna de la emulsión:

- **Por el control de la conductividad:**

La conductividad media a 22,5 °C es de 162,53 µS/cm. La fase externa es la fase acuosa

- **Por el control con ayuda de un colorante:**

Se toma un colorante hidrosoluble (rojo 4R E-124, número de lote 0012001) y se mezcla con la emulsión. Al microscopio, todo se observa de color rojo excepto los glóbulos de aceite.

El colorante hidrosoluble se solubiliza en la emulsión, por lo tanto la fase externa es la fase acuosa.

La emulsión obtenida es por lo tanto una emulsión O/A (Aceite en Agua).

Las características de la crema obtenida con la formulación 1 son adecuadas desde el punto de vista galénico y desde el punto de vista de fabricación industrial. Así mismo, se considera que la administración de esta crema también es la adecuada ya que se han obtenido las características adecuadas en cuanto a pH, viscosidad y extensibilidad adecuadas. Podría ser una de las formulaciones propuestas pendiente a confirmar con posteriores formulaciones estudiadas.

#### **4.1.6. Resultados experimentales y discusión de la Formulación 2**

Partiendo de la formulación 2 citada en el anterior apartado, se inician los estudios de elaboración de la emulsión que dará lugar al medicamento deseado.

El proceso de fabricación de la emulsión, y sus consecuentes pasos, serán las referencias Fase1, Fase2, Fase3 y Fase4.

Proceso de fabricación	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
Fase acuosa	-Agua purificada -Nipagin -EDTA	-	-	-
Fase oleosa	-	-Tefose 63 -Labrafil -Vaselina Filante -BHA -Nipasol	-	-
Emulsión primaria	-	-	Fase oleosa sobre fase acuosa	-
Dispersión del principio activo (acetato Hidrocortisona o hidrocortisona base)	-	-		Principio activo Etoxidiglicol Agua purificada

- Fase 1: Preparación de la fase acuosa:

Se comienza con los estudios experimentales para formar la **fase acuosa**, cuyo componente principal es el agua.

Fórmula:

Productos	%
EDTA	0,0005
Nipagin	0,1800
Agua purificada cps	97,0000
<b>Total</b>	<b>100,0000</b>

Se incorpora el EDTA y el Nipagin dentro del proceso de fabricación según los siguientes pasos:

1. Llenar un recipiente con agua purificada
2. Calentar hasta 90 °C de temperatura con agitación rápida. Cubrir el recipiente con una hoja de papel de aluminio para evitar la evaporación.
3. Añadir el Nipagin y homogeneizar manualmente.
4. Añadir el EDTA y homogeneizar con agitación rápida (10 minutos)

Se obtiene una solución translúcida muy viscosa debido a una fuerte evaporación de agua.

- Fase 2: Preparación de la fase oleosa

Se continúa con el proceso de obtención de la **fase oleosa** de la emulsión.

Formula de la fase oleosa de la emulsión:

<b>Productos</b>	<b>%</b>
Tefose 63	15,0000
Labrafil M	3,0000
Vaselina Filante	0,1000
BHA	0,0100
Nipasol	0,0200
<b>Total</b>	

Proceso de fabricación de la fase oleosa de la emulsión:

- 1 Colocar en un vaso de precipitados:
  - i. Tefose 63
  - ii. Labrafil M
  - iii. Vaselina filante
  - iv. BHA
  - v. Nipasol

2. Calentar hasta 70 °C bajo agitación lenta.
3. Verificar la homogenización de la fase oleosa.

- Fase 3: Preparación de la emulsión primaria:

- 1 Verificar que la temperatura de las fases acuosa y oleosa sea a 70 °C.
- 2 Añadir la fase oleosa sobre la fase acuosa lentamente bajo fuerte agitación.
- 3 Homogeneizar durante 10 minutos a 1100 rpm

Dejar reposar la emulsión durante 2 horas.

- Fase 4: Dispersión del principio activo (acetato de hidrocortisona o hidrocortisona base)

A continuación se prepara la dispersión del principio activo (acetato de hidrocortisona o hidrocortisona base) para posteriormente introducirla en la emulsión primaria creada:

Mezclar el principio activo y el etoxidiglicol y dispersarlos después en el agua purificada.

<b>Productos</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Acetato de Hidrocortisona	1,1100	-
Hidrocortisona base	-	1,0000
Etoxidiglicol	3,3000	3,3000
Agua purificada cps	95,5900	95,7000
<b>Total</b>	<b>100,0000</b>	<b>100,0000</b>

Incorporación de la dispersión de principio activo en la emulsión primaria:

- 1 Verificar que la emulsión primaria no esté a una temperatura superior a 40 °C.
- 2 Añadir la dispersión del principio activo con fuerte agitación de cizalla.
- 3 Añadir el agua purificada.

La emulsión obtenida presenta un aspecto sin grumos y blanca.

A continuación se ajusta el pH entre 4,0 y 5,0 con una solución del 1% de ácido cítrico anhidro utilizando 0,20 ml de dicha solución para obtener una media del pH en tres ensayos de 4,45 (especificación entre 4,0 y 5,0).

Se controla la viscosidad de la emulsión obteniendo un valor de viscosidad media de 2552 cps en tres ensayos (modelo de rotación RV5, velocidad de rotación 50).

Se controla la extensibilidad de la emulsión obteniendo un valor de extensibilidad media de 610,5 mm<sup>2</sup> en tres ensayos.

Por último se determina el signo de la fase externa y de la fase interna de la emulsión:

▪ **Por el control de la conductividad:**

La conductividad media a 22,5 °C es de 154,23 µS/cm. La fase externa es la fase acuosa.

▪ **Por el control con ayuda de un colorante:**

Se toma un colorante hidrosoluble (rojo 4R E-124, número de lote 0012001) y se mezcla con la emulsión. Al microscopio, todo se observa de color rojo excepto los glóbulos de aceite.

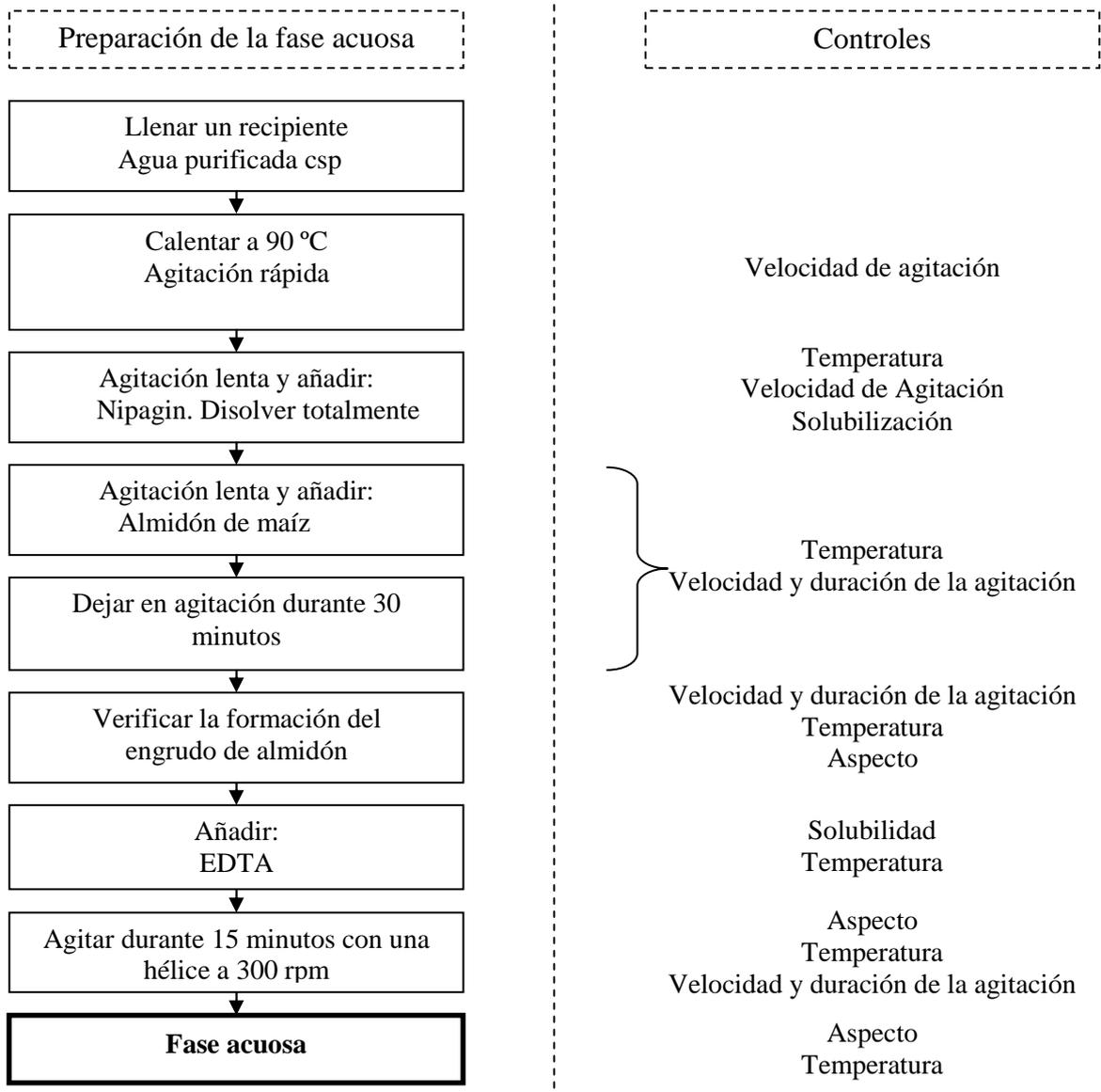
El colorante hidrosoluble se solubiliza en la emulsión, por lo tanto la fase externa es la fase acuosa.

La emulsión obtenida es por lo tanto una emulsión O/A (Aceite en Agua).

Las características de la crema obtenida con la formulación 2 son adecuadas desde el punto de vista galénico y desde el punto de vista de fabricación industrial. Así mismo, se considera que la administración de esta crema también es la adecuada ya que se han obtenido las características adecuadas en cuanto a pH, viscosidad y extensibilidad adecuadas. Podría ser una de las formulaciones propuestas pendiente a confirmar con posteriores formulaciones estudiadas.

**4.1.7. Diagrama del proceso de fabricación del producto acabado y controles en proceso (IPC) (52-53).**

A continuación se muestra el flujo o diagrama del proceso de fabricación del producto acabado y sus controles en proceso de la formulación 1.



Preparación de la fase oleosa

Añadir:  
Aceite de oliva  
Lanette  
Cetiol V  
BHA y Nipasol

Calentar hasta 70 °C  
con agitación lenta

**Fase oleosa**

Solubilización  
Temperatura  
Velocidad de agitación  
Aspecto

Preparación de la dispersión del principio activo

Dispersión del principio activo  
en etoxidiglicol con agitación  
Añadir agua purificada

**Suspensión de principio activo (acetato de hidrocortisona o hidrocortisona base)**

Temperatura  
Agitación  
Aspecto

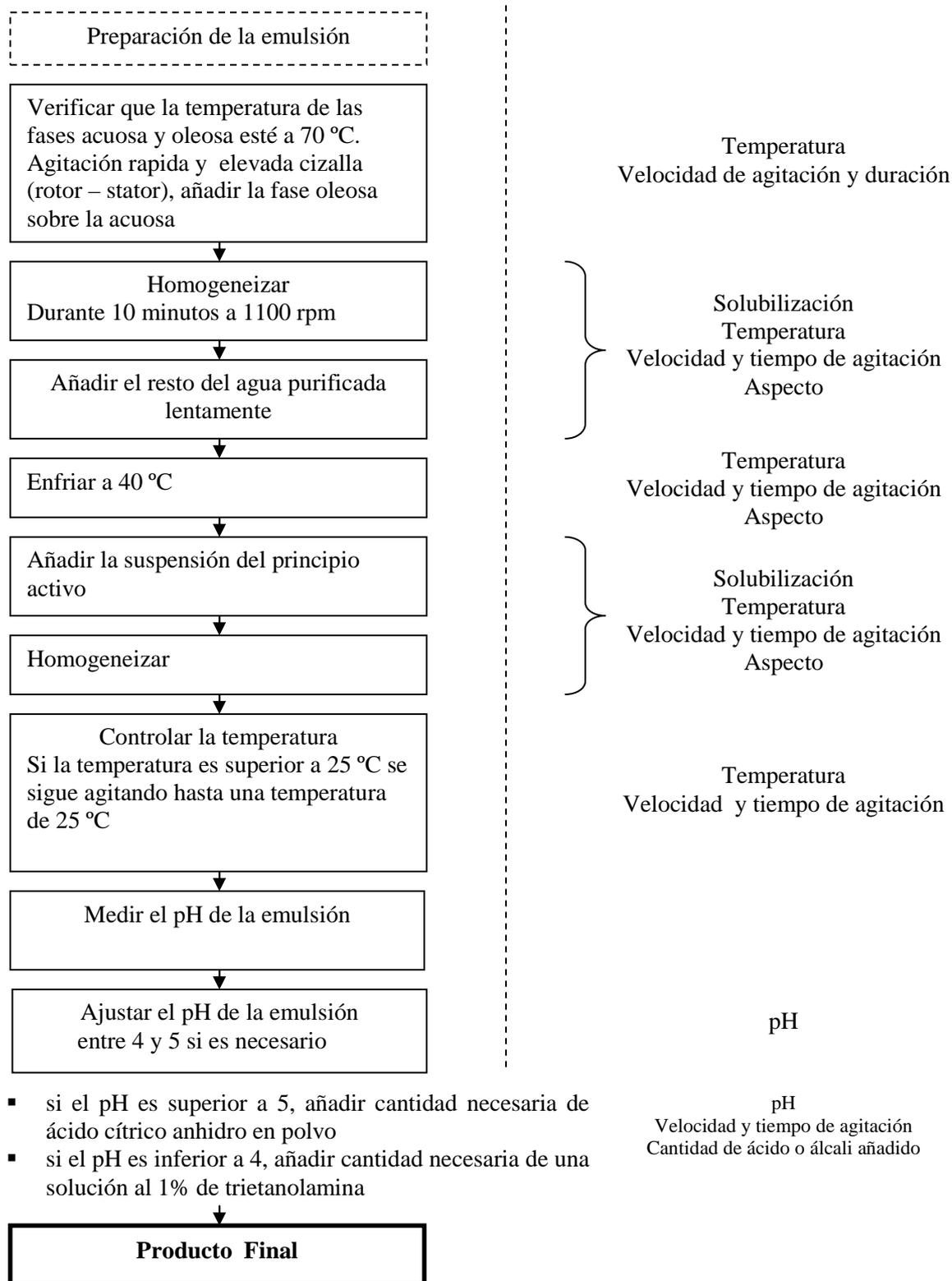
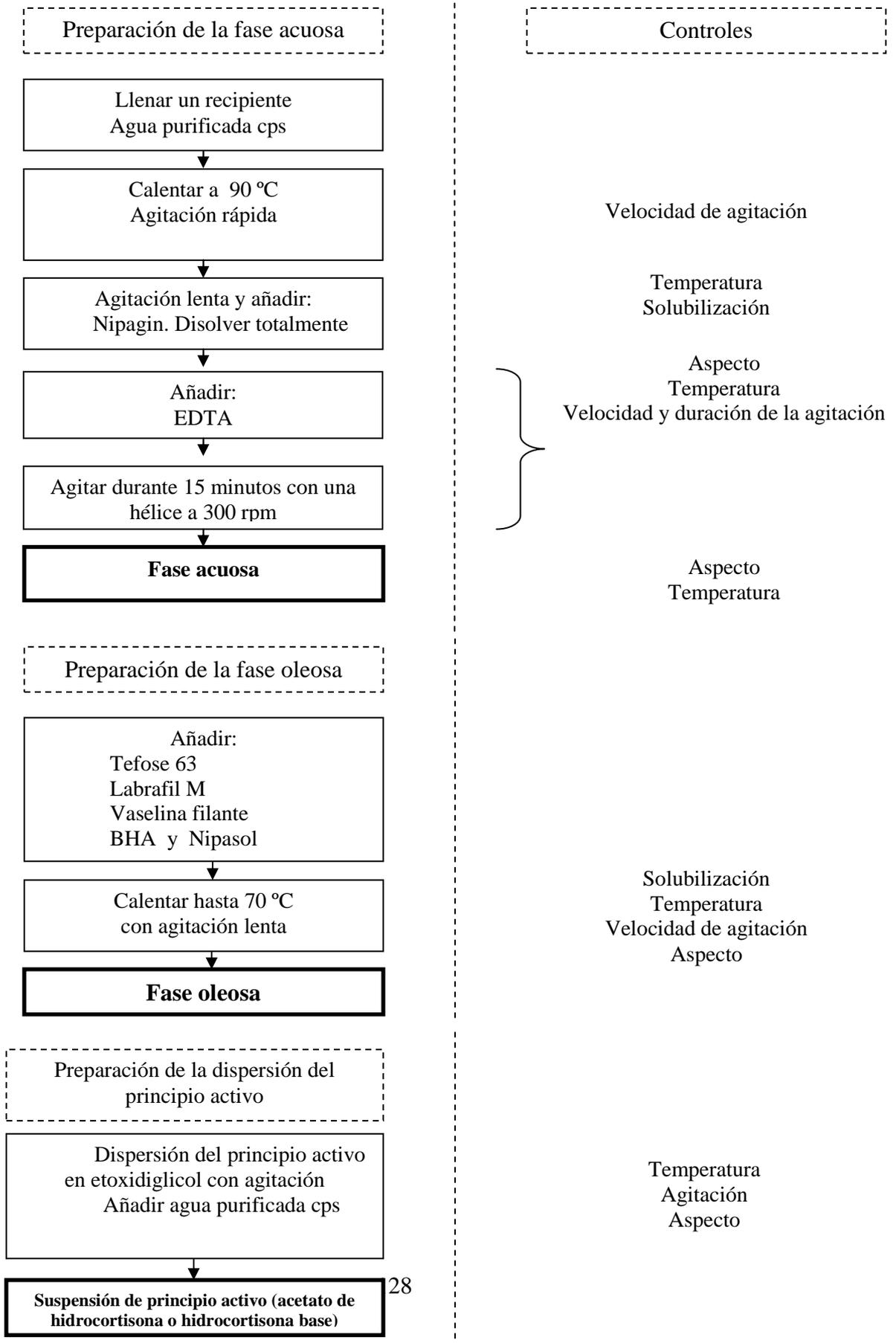


Figura 4.1.: Flujo del proceso de fabricación del producto acabado y sus controles en proceso de la formulación 1.

A continuación se muestra el flujo o diagrama del proceso de fabricación del producto acabado y sus controles en proceso de la formulación 2.



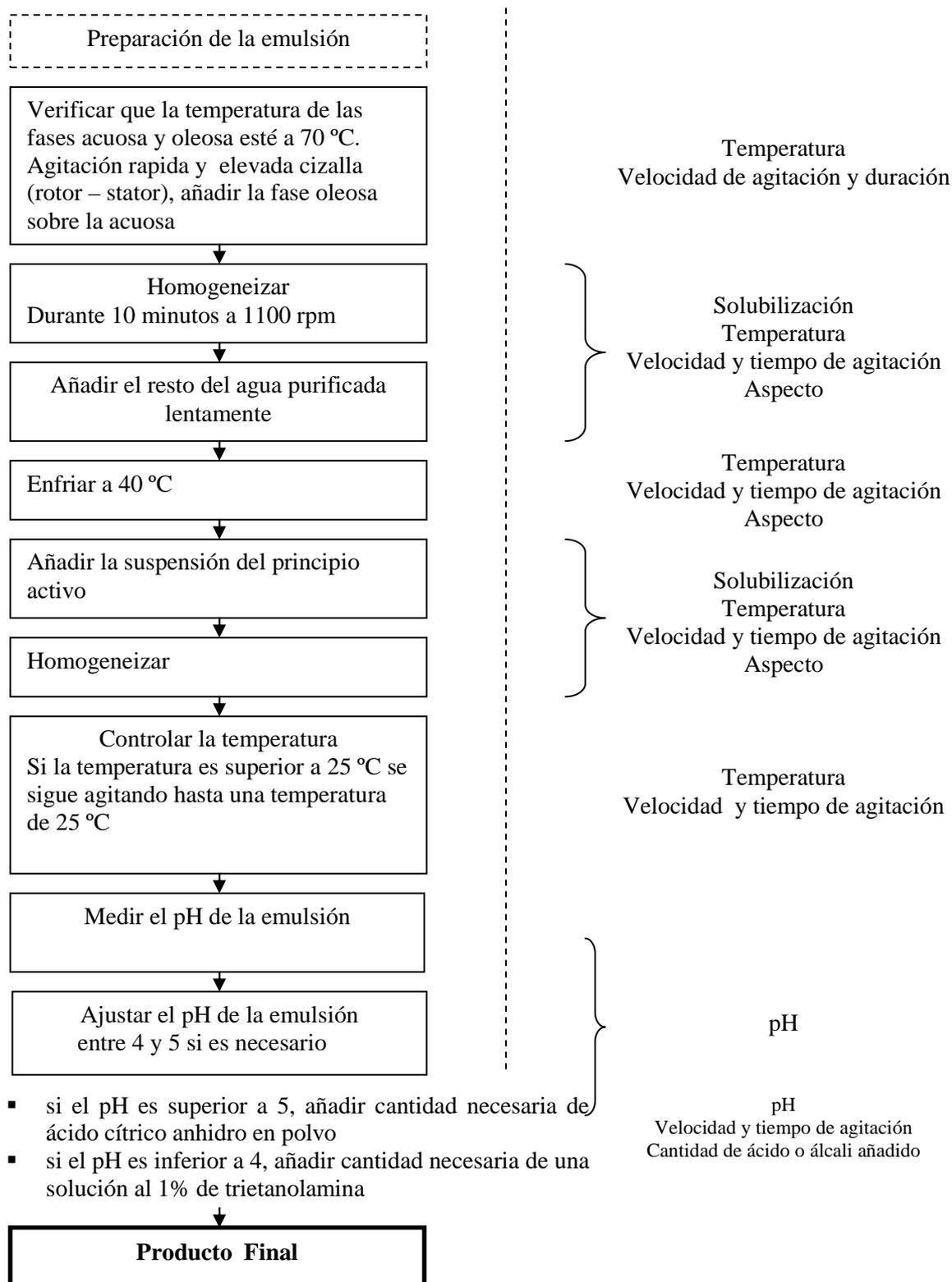


Figura 4.2.: Flujo del proceso de fabricación del producto acabado y sus controles en proceso de la formulación 2.

#### **4.1.8. Control de puntos críticos**

##### Temperatura del producto:

Es necesario controlar la temperatura del producto para asegurar y comprobar que el producto no ha estado expuesto a una temperatura que podría deteriorarlo. Además para incorporar la fase oleosa sobre la fase acuosa, las dos fases deben estar a la misma temperatura o la fase oleosa a una temperatura superior a la fase acuosa que actúa como receptora.

##### Velocidad y duración de la agitación:

Es necesario controlar la velocidad de agitación y el tiempo de la misma para asegurar una buena homogeneización de todos los componentes, así como la correcta formación de la emulsión.

##### pH:

Es necesario controlar el pH por razones de estabilidad del producto, y seguridad de empleo.

##### Aspecto:

Es necesario controlar el aspecto del producto después de cada etapa de mezcla para asegurar y confirmar el buen respecto de los parámetros del proceso.

#### **4.2. ESPUMA**

Dado que el tratamiento de los corticoides para la indicación de proctitis ulcerosa o proctosigmoiditis en espuma o en enema son igual de efectivos y seguros, y que al parecer los pacientes prefieren la espuma por la sensación de alivio y facilidad en la aplicación de la misma, se ha evaluado también el estudio de la espuma como posible forma farmacéutica para el medicamento desarrollado en la presente tesis.

### **4.2.1. Diseño de la formulación**

En este caso, se parte de la formulación en crema estudiada en el capítulo anterior, de forma que la elección de los excipientes que formarán parte de la crema más adecuada ya viene explicado en el apartado 4.1.1. Diseño de la formulación.

Posteriormente, en el capítulo 4.2.4. se estudia el agente espumante más adecuado para el preparado con acetato de hidrocortisona.

### **4.2.2. Materias primas**

#### **4.2.2.1. Principio activo**

Los principios activos evaluados en la presente tesis son el acetato de hidrocortisona y la hidrocortisona base. Ambos están amplicamente caracterizados y descritos en el apartado 2.7.1. y 2.7.2..

#### **4.2.2.2. Excipientes**

En el cuadro 4.16. se lista los excipientes escogidos para la fabricación de la espuma con acetato de hidrocortisona, así como su función y proveedor.

<b>Nombre europea</b>	<b>Farmacopea</b>	<b>Sinónimo</b>	<b>Función</b>	<b>Proveedor</b>
Aceite de oliva		Aceite de oliva	Disolvente fase oleosa	Basf
Almidón de maíz		Almidón de maíz	Viscosizante fase acuosa	Cargill
Alcohol cetosteárilico		Lanette	Agente emulgente	Basf
Oleato de decilo		Cetiol V	Emoliente	Basf
Metilparahidroxibenzoico / Metilparabeno (*)		Nipagin	Conservante antimicrobiano	Clariant
Propilparahidroxibenzoico / Propilparabeno (*)		Nipasol	Conservante antimicrobiano	Clariant
Edetato disódico		EDTA	Agente quelante	Parchem
Butilhidroxianisol		BHA	Agente antioxidante	
Dietilenglicol monoetil éter		Etoxidiglicol	Agente solubilizante	Gattefosse
Agua purificada		Agua purificada	Disolvente fase acuosa	In house
Ácido cítrico anhidro		Ácido cítrico anhidro	Agente acidificante	Basf
Trietanolamina		Trietanolamina	Agente alcalinizante	Basf

(\*) En ambos conservantes, se usa la forma no sódica porque, aunque es menos soluble en agua, el pH de la formulación final se mantiene en valores alrededor de 5,0, a diferencia de si se usa la forma sódica en donde el pH aumenta hasta valores alrededor de 9.

Cuadro 4.16. Lista de excipientes escogidos para fabricar una espuma con acetato de hidrocortisona

### **4.2.3. Equipos**

Los equipos que se utilizan para fabricar la espuma con acetato de hidrocortisona, se listan en el cuadro 4.17.:

<b>Equipos de fabricación</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Reactor de acero inoxidable con agitación y camisa calefactora	SIMPLEX	RS-45
Balanza	Delta Range	PG4002-S
Balanza	Mettler Toledo	AG204DR
Agitador	IKA	RW 20 digital
Helice agitadora	IKA	R 1385
Ancora agitadora	IKA	R 1330
Contenedor inoxidable	Glatt	No procede
Placa calefactora	IKA	C-MAG HP 10 IKATHERM®

Cuadro 4.17.: Listado de los equipos de fabricación, marca y modelo utilizados para fabricar la espuma con acetato de hidrocortisona

#### **4.2.4. Metodología (50-51)**

El medicamento es una espuma destinada a ser administrada en la zona rectal (aplicación tópica) donde debe romperse fácilmente (“Quick Breaking Foam”).

Dicho medicamento se basa en la elaboración de una emulsión para vehiculizar el principio activo el cual presenta una fuerte hidrofobia y por este motivo es poco soluble en agua. La formulación de una emulsión permite homogeneizar la dispersión del acetato de hidrocortisona o hidrocortisona base y estabilizar la forma farmacéutica. Además, la fase oleosa de la emulsión, facilita la penetración del principio activo a través de la piel y la mucosa.

Como el medicamento está destinado a ser aplicada en piel y mucosas inflamadas, su administración en forma de espuma ofrece una sensación de frescor agradable para el paciente.

El problema de este tipo de formulaciones es su estabilidad. Para facilitar su empleo se escoge la preparación de una emulsión y la de crear una espuma en el momento de la administración.

El estudio de la formulación se inicia partiendo de la emulsión desarrollada y estudiada en el apartado anterior (FORMULACIÓN 1), debido a los resultados de estabilidad mejores obtenidos con la formulación 1 que con la 2 expuestos en el capítulo 8. Los componentes de la formulación, por lo tanto, son los siguientes:

Componentes	Cantidad (g)
Acetato de hidrocortisona	1,1100
Aceite de oliva	7,0000
Almidón de maíz	3,0000
Lanette	2,5000
Cetiol V	3,0000
Nipagin	0,1800
Nipasol	0,0200
EDTA	0,0005
BHA	0,0100
Etoxidiglicol	3,3000
Agua purificada c.s.p.	79,8795
Ácido cítrico anhidro	c.s.p.
Trietanolamina	c.s.p.
Total	100.00

Cuadro 4.18. Lista de excipientes y principio activo que componen la Formulación 1

El proceso de fabricación es también el descrito en el apartado anterior para la Formulación 1.

#### **4.2.5. Resultados experimentales y discusión**

A partir de la creación de la emulsión final obtenida, se procede al estudio de la formación de la espuma. Para ello se elabora un plan de experimentación con el fin de poder valorar de un modo exhaustivo el efecto de diferentes agentes espumantes.

Dichos agentes espumantes serán las referencias Ref 6, Ref 7, Ref 8 y Ref 9 que se acondicionarán en un pulverizador manual.

Formulaciones de los ensayos a partir de la emulsión final obtenida:

Nombre materias	Ref 6	Ref 7	Ref 8	Ref 9
	%	%	%	%
Emulsión final obtenida	50,00	50,00	50,00	50,00
Agua purificada cps	45,00	45,00	45,00	45,00
Lauril sarcosinato Na	5,00	-	-	-
Tween 80	-	5,00	-	-
Laurilsulfato de Na	-	-	5,00	-
Cremophor RH40	-	-	-	5,00
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

Proceso de fabricación:

- Preparación de la emulsión Ref 6:

- 1 Mezclar el lauril sarcosinato de Na con el agua agitando hasta su completa disolución.
- 2 Añadir la solución del punto anterior 1 a la emulsión bajo intensa agitación.

- Preparación de la emulsión Ref 7:

- 1 Mezclar el Tween 80 con agua.
- 2 Calentar bajo agitación suficiente hasta la disolución completa del Tween 80.
- 3 Añadir la solución del punto anterior 2 a la emulsión bajo agitación intensa.

- Preparación de la emulsión Ref 8:

- 1 Mezclar poco a poco el lauril sulfato de Na con agua agitando hasta la completa disolución del lauril sulfato de Na.
- 2 Añadir la solución del punto anterior 1 a la emulsión bajo fuerte agitación

- Preparación de la emulsión Ref 9:

- 1 Mezclar el Cremophor RH40 con agua.
- 2 Calentar agitando suficientemente para que la disolución del Cremophor RH40. sea completa
- 3 Añadir la solución del punto anterior 2 a la emulsión bajo fuerte agitación.

Posteriormente se controla el pH de las diferentes referencias obtenidas para obtener una emulsión con un pH entre 4,00 y 5,00, añadiendo 0,10 ml de una solución de ácido cítrico al 1% para obtener un valor 4,64 en la Ref 6, y 4,46 en la ref 7, 0,05 ml de una solución de ácido cítrico al 1% para obtener un valor 4,86 en la Ref 8 y 5,07 en la referencia 9. La referencia 9, en concreto, es difícil de ajustar entre un pH de 4,00 y 5,00, ya que pequeñas cantidades de solución ácida diluida no son suficiente para ajustar la preparación entre un pH entre 4,00 y 5,00 y en cambio cuando se añade un poco más de cantidad de dicha solución ácida, el valor de pH se ajusta por debajo de 4,00.

Acondicionado de las emulsiones Ref 6, Ref 7, Ref 8 y Ref 9:

Todas las emulsiones obtenidas han sido acondicionadas en un pulverizador manual plástico de color blanco y opaco con un sistema dosificador.

Resultados de la preparación y del material de acondicionamiento de las emulsiones Ref 6, Ref 7, Ref 8 y Ref 9:

Todas las emulsiones obtenidas son blancas muy fluidas y con una espuma en la superficie. La formación de espuma proviene del aire que se introduce en el producto en el momento de la incorporación de la solución del tensioactivo a la emulsión.

Al pulsar no sale espuma sino un líquido.

Conclusión de la formación de la espuma en las emulsiones Ref 6, Ref 7, Ref 8 y Ref 9:

En estas fórmulas con este tipo de material de acondicionamiento los ensayos no son satisfactorios, por lo que se debe modificar la formula y/o el tipo de material de acondicionamiento.

Con el fin de conseguir la formación de una espuma a la salida del recipiente pulverizador, se plantean tres nuevas formulaciones a partir de las tres fórmulas viables del ensayo anterior (Ref 6, Ref 7 y Ref 8, ya que la Ref 9 no se considera viable por tener unos valores de pH difíciles de ajustar), pero modificando la cantidad de agua purificada adicionada. Así, se plantea introducir menor cantidad de agua con el fin de aumentar la viscosidad de la fórmula y favorecer, en consecuencia, la formación de espuma.

Formulaciones de los ensayos a partir de la emulsión final obtenida:

<b>Nombre materias</b>	<b>Ref 10</b>	<b>Ref 11</b>	<b>Ref 12</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Emulsión final obtenida	75,00	75,00	75,00
Agua purificada cps	20,00	20,00	20,00
----- Lauril sarcosinato Na	5,00	-	-
----- Tween 80	-	5,00	-
----- Laurilsulfato de Na	-	-	5,00
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

Proceso de fabricación:

- Preparación de la emulsión Ref 10:
  1. Mezclar el lauril sarcosinato de Na con agua agitando hasta que esté completamente disuelto.

2. Añadir la solución del punto anterior 1 a la emulsión agitando con fuerte agitación.

- Preparación de la emulsión Ref 11:

1. Mezclar el Tween 80 con agua.
2. Calentar con agitación suficiente hasta la disolución completa del Tween 80.
3. Añadir la solución del punto anterior 2 a la emulsión con agitación fuerte.

- Preparación de la emulsión Ref 12:

1. Mezclar el lauril sulfato Na con el agua.
2. Calentar agitando suficientemente hasta su completa disolución.
3. Añadir la solución del punto anterior 2 a la emulsión bajo fuerte agitación.

Posteriormente se controla el pH de las diferentes referencias obtenidas para obtener una emulsión con un pH entre 4,00 y 5,00, añadiendo 15,30 ml de una solución de ácido cítrico al 1% para obtener un valor de 5,47 en la Ref 10, 0,20 ml de una solución de ácido cítrico al 1% para obtener un valor de 5,18 en la Ref 11 y 0,10 ml de una solución de ácido cítrico al 1% para obtener un valor de 5,33 en la referencia 12.

Se observa que el pH no es conforme en todas las referencias a pesar de realizar dicho ajuste, ya que el pH se sitúa en todos los casos entre 5 y 5,5. Al tratarse de un pH cercano a las especificaciones del producto y siendo éste un parámetro que no afecta a la formación de espuma (que es lo que se está estudiando con estas formulaciones) se prosigue con el estudio considerando aceptables las emulsiones obtenidas.

Se controla la conductividad de las emulsiones obteniendo los siguientes valores:

<b>Referencia ensayo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Conductividad Media (μS/cm)</b>
Ref 10	21,5	174,33
Ref 11	21,5	144,87
Ref 12	21,5	115,93

Para todas las referencias, la conductividad indica que la fase externa es la fase acuosa.

A continuación se controla la viscosidad de la emulsión obteniendo los siguientes resultados:

<b>Referencia ensayo</b>	<b>Modelo móvil de rotación</b>	<b>Velocidad de rotación</b>	<b>Factor</b>	<b>Viscosidad Media (cps)</b>
Ref 10	RV2	50	8	107
Ref 11	RV2	50	8	165
Ref 12	RV2	50	8	401

Las emulsiones obtenidas son blancas, fluidas y de fase externa acuosa.

Acondicionado de las emulsiones Ref 10, Ref 11 y Ref 12:

Todas las emulsiones obtenidas han sido guardadas en un frasco de vidrio o de plástico opaco o transparente.

A partir de estas emulsiones se realizan dos ensayos de formación de espuma.

El objetivo del primer ensayo es observar si se forma espuma con las emulsiones de las Ref 10, 11 y 12 en un pulverizador manual.

Para ello, se acondiciona la emulsión en un pulverizador manual, se aprieta el sistema dosificador y se verifica la formación de la espuma cuando el producto salga del recipiente.

En el caso de este primer ensayo, no sale espuma cuando se ejerce presión sobre el sistema dosificador, sale líquido.

Por lo tanto para las fórmulas con este tipo de material de acondicionamiento, los ensayos no son satisfactorios, por lo que se debe modificar la formula y/o el material de acondicionamiento. En este caso, una vez ya se ha trabajado sobre la fórmula, se plantea el cambio de pulverizador, pasando de un sistema manual a un sistema presurizado.

El objetivo del segundo ensayo es observar si se forma espuma con las emulsiones de las Ref 10, 11 y 12 en un pulverizador de aluminio, con gas propulsor (mezcla de propano-butano).

***Datos generales sobre el propelente:***

Nombre del producto: KAP 48

Mezcla de propano y butano (25,150 / 74,850)

Insoluble en agua

Densidad: 0,5581

Presión de vapor absoluto a 20 °C: 421 kPa

Presión de vapor absoluto a 25 °C: 483 kPa

Fuentes:        Typical Analysis Report  
                  Ficha de Datos de Seguridad  
                  Ficha de Datos Técnicos KAP 48/3.2

Se introducen aproximadamente 20% de un propelente por envase en función de la cantidad de producto empleada.

Para ello, se acondiciona la emulsión en el recipiente, se cierra dicho recipiente con ayuda de un sistema pulverizador y se añade alrededor de 10 g de gas y se verifica la formación de la espuma cuando el producto salga del recipiente.

En el caso de este segundo ensayo, los resultados obtenidos son los siguientes:

Referencia de ensayo	Cantidad condicionada		Formación de espuma		Observaciones
	Emulsión (ml)	Gas (g)	Si	No	
Ref 10	50	10,37	X		Bien
Ref 11	50	9,82	X		Medio
Ref 12	50	10,38		X	Nulo

Cuadro 4.19.: Tabla de Envasado y Resultados experimentales

La fórmula que contiene el lauril sarcosinato de Na (Ref 10) presenta unos resultados muy satisfactorios.

Para la fórmula que contiene el Tween 80 (Ref 11) y con este tipo de envasado, los ensayos son medianamente satisfactorios (formación de espuma poco consistente).

Para la fórmula que contiene el Lauril sulfato Na (Ref 12), los ensayos no son satisfactorios ya que no forma espuma.

Por lo tanto la elección del agente espumante para la formula final se decanta hacia el lauril sarcosinato de Na.

Para verificar la formación de una buena y correcta espuma con el lauril sarcosinato de Na como agente espumante acondicionado en un pulverizador con propelente, se vuelve a elaborar un nuevo lote.

La formula a utilizar es la formula numero 1, con el mismo proceso de fabricación utilizado anteriormente en la preparación del engrudo de almidón, de la fase acuosa, de la fase oleosa, de la dispersión de acetato de hidrocortisona y de finalmente la emulsión final, obteniéndose una emulsión sin grumos de color blanca.

Las características del nuevo preparado obtenido son los siguientes:

<b>Ensayos</b>	<b>Resultado</b>	<b>Observaciones</b>
Aspecto	Blanca, sin grumos y de fase externa acuosa	
pH	6,62	Se decide ajustar el pH a un valor entre 4,0 y 5,0 después de añadir el agente espumante
Viscosidad	3027 cps	Modelo de rotación RV4, velocidad de rotación 50
Conductividad media	116,40 $\mu\text{S}/\text{cm}$	
Extensibilidad media	545,3 $\text{mm}^2$	
Tamaño de los glóbulos de la emulsión	entre 1 y 5 $\mu\text{m}$	Microscopía óptica. Esta medida es característica de una emulsión regular lechosa blanca.

Cuadro 4.20. Cuadro resumiendo las características de la emulsión preparada.

A dicha emulsión se le añade el agente espumante lauril sarcosinato de Na, lentamente con agitación fuerte y alta velocidad de cizallamiento, evitando en la medida de lo posible la incorporación de aire al interior de la emulsión según la formulación y proceso de fabricación descrito anteriormente (Ref 10).

Ensayos	Resultado	Observaciones
Aspecto	Blanca, sin grumos y de fase externa acuosa	
pH	Inicial: 8,03 Final (tras ajuste): 4,49	Se decide ajustar el pH directamente con ácido cítrico anhidro para reducir el pH hasta un valor entre 4,0 y 5,0. Se usan 2,21 mg de ácido cítrico anhidro.
Viscosidad	1020 cps	modelo de rotación RV4, velocidad de rotación 50
Conductividad media	443,67 $\mu\text{S}/\text{cm}$	
Extensibilidad media	691,4 mm <sup>2</sup>	
Tamaño de los glóbulos de la emulsión	Entre 1 y 9 $\mu\text{m}$ . La mayor parte de los glóbulos tienen un tamaño de 3 $\mu\text{m}$	Microscopía óptica. Esta medida es característica de una emulsión regular lechosa blanca.
Densidad	0,81 g/ml	
Aspecto	Blanca, sin grumos y de fase externa acuosa	

Cuadro 4.21. Cuadro resumiendo las características de la emulsión preparada tras adicionar el agente espumante lauril sarcosinato de sodio.

A continuación se acondiciona esta emulsión en un pulverizador de aluminio con propelente gas líquido (butano/propano) siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Llenar el recipiente del pulverizador.
2. Cerrar con la válvula.
3. Llenar con gas un 20%
4. Poner el botón para presionar.
5. Probar la formación de la espuma.

El resultado obtenido es el siguiente:

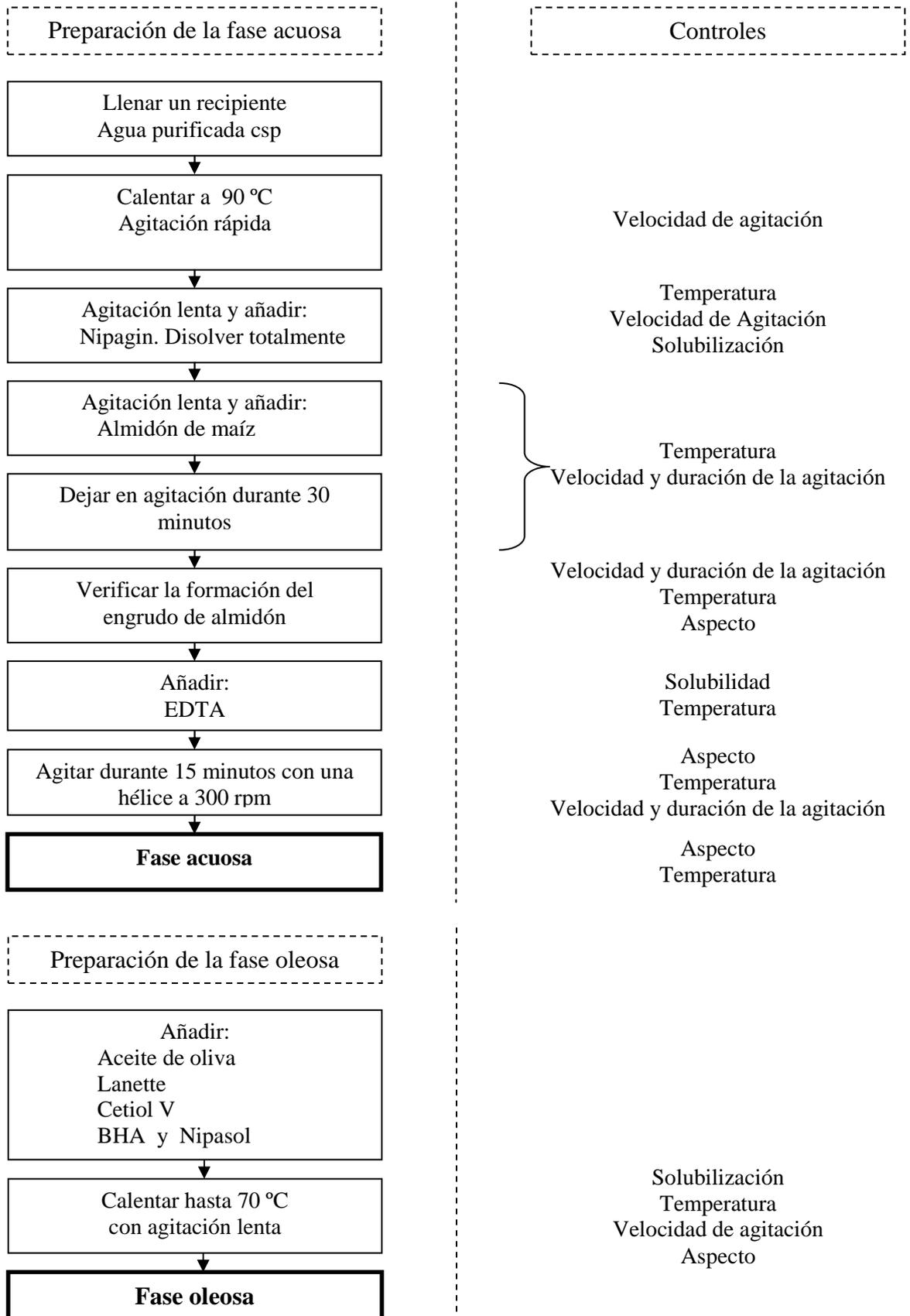
N° Botella	Cantidad llenada		Presión (Bar)	Formación de espuma		Observaciones
	Emulsión (g)	Gas (g)		Si	No	
1	79,74	9,90	≈ 5	x		Imposibilidad de poner más gas.
2	50,29	11,53	< 5	x		-
3	50,25	9,90	< 5	x		-
4	50,99	13,34	< 5	x		-

Cuadro 4.22. Cuadro de seguimiento de llenado y resultado

Las características de la espuma obtenida formado por la emulsión de la referencia 10 tras añadirle el agente espumante lauril sarcosinato de sodio y el gas propelente líquido son adecuadas desde el punto de vista galénico. Asimismo, se considera que la administración de esta espuma también es la adecuada ya que se han obtenido las características adecuadas en cuanto a pH, viscosidad y extensibilidad adecuadas. Podría ser una de las formulaciones propuestas pendiente a confirmar con posteriores formulaciones estudiadas.

#### **4.2.6. Diagrama del proceso de fabricación del producto acabado y controles en proceso (IPC) (52-53).**

A continuación se muestra el flujo o diagrama del proceso de fabricación del producto acabado y sus controles en proceso para la espuma.



Preparación de la dispersión del principio activo

Dispersión del principio activo en etoxidiglicol con agitación  
Añadir agua purificada cps

**Suspensión de principio activo**

Preparación de la emulsión

Verificar que la temperatura de las fases acuosa y oleosa esté a 70 °C.  
Agitación rápida y elevada cizalla (rotor – stator), añadir la fase oleosa

Homogeneizar  
Durante 10 minutos a 1100 rpm

Añadir el resto del agua purificada lentamente

Enfriar a 40 °C

Añadir la suspensión del principio activo

Homogeneizar

Controlar la temperatura  
Si la temperatura es superior a 25 °C se sigue agitando hasta una temperatura de 25 °C

Incorporar la dispersión con el agente espumante

Controlar el pH de la emulsión  
Si es necesario ajustar entre 4 y 5

Temperatura  
Agitación  
Aspecto

Temperatura  
Velocidad de agitación y duración

Solubilización  
Temperatura  
Velocidad y tiempo de agitación  
Aspecto

Temperatura  
Velocidad y tiempo de agitación  
Aspecto

Solubilización  
Temperatura  
Velocidad y tiempo de agitación  
Aspecto

Temperatura  
Velocidad y tiempo de agitación

Velocidad de agitación

pH

- si el pH es superior a 5, añadir cantidad necesaria de ácido cítrico anhidro en polvo
- si el pH es inferior a 4, añadir cantidad necesaria de una solución al 1% de trietanolamina

pH  
Velocidad y tiempo de agitación  
Cantidad de ácido o álcali añadido

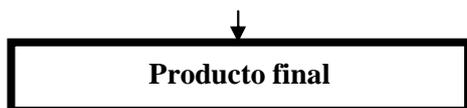


Figura 4.3.: Flujo del proceso de fabricación del producto acabado y sus controles en proceso de la espuma.

#### **4.2.7. Control de puntos críticos**

##### pH:

Es necesario controlar el pH por razones de estabilidad del producto, y seguridad de empleo.

##### Aspecto:

Es necesario controlar el aspecto del producto después de cada etapa de mezcla para asegurar y confirmar el buen respecto de los parámetros del proceso.

### **4.3. GEL**

#### **4.3.1. Diseño de la formulación**

Tal y como está descrito en el apartado 3.2.3., los geles están formados por líquidos gelificados con la ayuda de agentes gelificantes apropiados.

En casos como el actual, en donde el principio activo es muy insoluble en bastante medios, se suele utilizar solubilizantes que permitan incorporar el principio activo con más facilidad.

Para preservar el gel de posible contaminación microbiológica y oxidación, es habitual incluir conservantes y antioxidantes, sobre todo en formas farmacéuticas en donde el

principal componente es el agua. También se suele incluir un agente quelante a base de compuestos orgánicos capaces de formar complejos con iones metálicos, que detienen la actividad catalítica de dichos iones en el proceso de oxidación de reacción en cadena. Esta reacción no previene que se realice la oxidación normal sino únicamente retarda la formación del peróxido y al mismo tiempo prolonga el periodo de inducción que evitará cualquier tipo de reacción entre posibles trazas de metales que pudieran quedar en el preparado.

Por último, se utilizara un regulador del pH que neutralizará la base adecuada aumentando la viscosidad de la solución y por lo tanto ayudando a la creación del gel.

Se realiza una búsqueda bibliográfica de productos que puedan realizar las funciones arriba mencionadas para crear un gel (47):

<b>Función</b>	<b>Nombre Farmacopea europea</b>	<b>Sinónimo</b>
<u>Fase acuosa</u>	Agua purificada	Agua purificada
<p>Comentarios:</p> <p>Se decide utilizar el <u>agua purificada</u> como disolvente de la fase acuosa ya que es uno de los componentes más comunes y asequibles económicamente hablando en la industria farmacéutica y por lo tanto uno de los más usados.</p> <p>La concentración a utilizar, será la cantidad suficiente para completar el 100% de la totalidad de los ingredientes del gel.</p>		

Cuadro 4.23. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de Fase acuosa.

Agente gelificante	Carbomero	Carbopol 934
	Goma Agar, goma xantana, goma guar	Goma Agar, goma xantana, goma guar
	Alquil éteres de polioxietileno	Macrogol
<p>Comentarios:</p> <p>Se escoge el <u>carbomero</u> por la amplia experiencia que hay en la preparación de geles con este</p>		

polímero, así como por las referencias bibliográficas que hay con el mismo en la preparación geles para administración rectal (54-55).

Los carbómeros son polímeros sintéticos del ácido acrílico de alto peso molecular y con carácter aniónico que dan lugar a dispersiones en medio acuoso, hidroalcohólico y con distintos solventes orgánicos. Están reticulados tanto con alilos de sacarosa como con alil éteres de pentaeritritol. Contienen entre un 52% y un 68% de grupos ácido carboxílico (COOH).

Los carbómeros dispersados, forman dispersiones coloidales ácidas que, cuando se neutralizan, producen geles altamente viscosos. Geles acuosos neutralizados son más viscosos a un pH de 6-11. La viscosidad se reduce considerablemente a valores de pH de menos de 3 o superior a 12, o en la presencia de electrolitos fuertes (56).

Existen diferentes tipos de Carbopol, que vienen designados por un número, pero los que más se utilizan actualmente en farmacia son el Carbopol 934 y el Carbopol 940.

Cuadro 4.24. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de agente gelificante.

Agente solubilizante	Esteres de polioxietileno de sorbitán de ácidos grasos	Polisorbato 80
	Ciclodextrina	Ciclodextrina
	Fosfolípidos	Fosfolípidos

Comentarios:

Se escoge los Esteres de polioxietileno de sorbitán de ácidos grasos como agente solubilizante puesto que es el tensioactivo más comúnmente utilizado en productos parenterales aprobados por la FDA (57). Los polisorbatos también se han utilizado para mejorar la estabilidad química de la solución de las formulaciones (58). En aplicaciones tópicas, los polisorbatos también se utilizan como emolientes por sus características higroscópicas y por lo tanto por aumentar la capacidad de retención de agua de la formulación.

Cuadro 4.25. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de agente solubilizante.

Conservante antimicrobiano	Metilparahidroxibenzoico / Metilparabeno	Nipagin
	Propilparahidroxibenzoico / Propilparabeno	Nipasol
	Ácido benzoico	Ácido benzoico
	Fenoxietanol	Fenoxietanol
Comentarios: Se escoge el <u>metilparabeno</u> y el <u>propilparabeno</u> siguiendo el mismo racional expuesto en el apartado 3.1.1.		

Cuadro 4.26. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de conservante antimicrobiano.

Agente quelante	Edetato disódico	EDTA
	Ácido pentético	Ácido pentético
Comentarios: Se escoge el <u>EDTA</u> como agente acomplejante siguiendo el mismo racional expuesto en el apartado 3.1.1.		

Cuadro 4.27. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de agente quelante.

Agente antioxidante	Butilhidroxianisol	BHA
	Butilhidroxitolueno	BHT
	Ácido ascórbico	Vitamina C
Comentarios: Se escoge el <u>BHA</u> como antioxidante siguiendo el mismo racional expuesto en el apartado 3.1.1.		

Cuadro 4.28. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de agente antioxidante.

Agente alcalinizante	Trietanolamina	Trietanolamina
	Hidroxido sódico	Hidroxido sódico
	Bicarbonato sódico	Bicarbonato sódico
Comentarios:		
<p>Para neutralizar la dispersión coloidal ácida que forma el carbomero en suspensión con el agua, se necesita un agente alcalinizante. En este desarrollo, se escoge la <u>trietanolamina</u> debido a su amplio uso en formulaciones farmacéuticas tópicas y al carácter menos fuerte que tiene dicho componente versus el hidróxido sódico (pH de la trietanolamina en solución 0,1N es de 10,5 versus al pH del hidróxido sódico en solución 5% es de 14). Ambos pueden perfectamente usarse en la neutralización del carbomero, pero se puede controlar mejor con la trietanolamina que con el hidróxido sódico.</p>		

Cuadro 4.29. Tabla donde se muestran los diferentes excipientes que pueden tener la función de agente alcalinizante.

#### **4.3.2. Materias primas**

##### **4.3.2.1. Principio activo**

Los principios activos evaluados son el acetato de hidrocortisona y la hidrocortisona base. Ambos están amplicamente caracterizados y descritos en el apartado 2.7.1. y 2.7.2.

##### **4.3.2.2. Excipientes (47)**

En el cuadro 4.30. se lista los excipientes escogidos para la fabricación del gel con acetato de hidrocortisona, así como su función y proveedor.

<b>Nombre europea</b>	<b>Farmacopea</b>	<b>Sinónimo</b>	<b>Función</b>	<b>Proveedor</b>
Carbomero		Carbopol 934	Agente gelificante	Lubrizol
Esteres de polioxietileno de sorbitán de ácidos grasos		Polisorbato 80 / Tween 80	Tensioactivo	Merck
Trietanolamina		Trietanolamina	Regulador del pH	Basf
Metil parahidroxibenzoico / Metilparabeno		Nipagin	Conservante antimicrobiano	Clariant
Propil parahidroxibenzoico / Propilparabeno		Nipasol	Conservante antimicrobiano	Clariant
Edetato disódico		EDTA	Agente quelante	Parchem
Butilhidroxianisol		BHA	Agente antioxidante	
Agua purificada		Agua purificada	Diluyente	In house

Cuadro 4.30.: Lista de excipientes escogidos para fabricar un gel con acetato de hidrocortisona

### **4.3.3. Equipos**

Los equipos que se utilizan para fabricar el gel con acetato de hidrocortisona, se listan en el cuadro 4.31.:

<b>Equipos de fabricación</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Reactor de acero inoxidable con agitación y camisa calefactora	SIMPLEX	RS-45
Balanza	Delta Range	PG4002-S
Balanza	Mettler Toledo	AG204DR
Agitador	IKA	RW 20 digital
Helice agitadora	IKA	R 1385
Ancora agitadora	IKA	R 1330
Contenedor inoxidable	Glatt	No procede

Cuadro 4.31: Listado de los equipos de fabricación, marca y modelo utilizados para fabricar la crema con acetato de hidrocortisona.

#### **4.3.4. Metodología (50-51)**

El estudio de la formulación se inicia con los siguientes excipientes propuestos en la siguiente formulación:

Componentes	Cantidad (g)
Acetato de hidrocortisona	1,1100
Carbopol 934	0,5000
Polisorbato 80	0,4000
Nipagin	0,1800
Nipasol	0,0200
EDTA	0,0005
BHA	0,0100
Trietanolamina 10 N	c.s.p.
Agua purificada c.s.p.	97,7795
Total	100,00

Cuadro 4.32: Lista de excipientes y principio activo que componen la formulación en forma de gel.

La especificación del pH del gel es un parámetro importante para la estabilidad de la formulación, así como para la formación del gel propiamente dicho. Para ello, se establecerá que el pH del gel debe estar comprendido entre 5,00 y 6,00, valor necesario para neutralizar el gel y por lo tanto que adquiera viscosidad y se forme el gel.

Para elaborar el proceso de fabricación del gel, el producto gelificante es añadido al medio líquido y se va incorporando en éste, de forma que por posterior neutralización se forma el gel.

La incorporación del principio activo se realiza en este caso una vez se ha neutralizado el gel.

Antes de realizar cada una de las fases del proceso de fabricación, el equipo, los útiles de producción y la zona de trabajo deben ser inspeccionados y estar absolutamente limpios.

### **4.3.5. Resultados experimentales y discusión**

Partiendo de la formulación 3 citada en el anterior apartado, se inician los estudios de elaboración del gel que dará lugar al medicamento deseado.

El proceso de fabricación del gel, y sus consecuentes pasos, serán las Fase a, Fase b, Fase c y Fase d.

<b>Proceso de fabricación</b>	<b>Fase a</b>	<b>Fase b</b>	<b>Fase c</b>	<b>Fase d</b>
Preparación del gel (neutralización)	-Agua -Nipagin -Nipasol -Carbopol 934 -TEA			
Adición del EDTA		-EDTA	-	-
Dispersión BHA y Polisorbato	-	-	-BHA -Polisorbato 80	-
Dispersión del principio activo (acetato de hidrocortisona o hidrocortisona base)	-	-	-	-Principio activo -Agua purificada

- Fase a: preparación del gel (neutralización):

Se comienza con los estudios experimentales para formar el gel. Dicho gel tiene que tener unas propiedades de aspecto concretas (translucido y sin grumos).

Fórmula:

<b>Productos</b>	<b>%</b>
Nipagin	0,1800
Nipasol	0,0200
Carbopol 934	0,5000
Agua purificada cps	78,3045

Los pasos del proceso de fabricación utilizado son los siguientes:

1. Llenar un recipiente con el agua purificada.
2. Añadir el nipagin, nipasol y carbopol 934 con agitación rápida.
3. Mantener la agitación rápida durante 15 minutos
4. Dejar reposar durante 3 horas para que el carbopol 934 se humecte.

Cuando se incorporan los conservantes, se aprecia que cuesta dispersar, por ello se utiliza agitación rápida.

Una vez el gel ha reposado durante 3 horas, no se aprecia visiblemente ninguna partícula de producto sin disolver.

Para neutralizar el gel y por lo tanto viscosizarlo y gelificarlo se añade Trietanolamina 10 N. Se añade cantidad suficiente para conseguir un pH entre 5 y 6.

La cantidad de Trietanolamina utilizada es de 0,8 ml.

La Trietanolamina se incorpora con velocidad baja con el fin de no crear aire ni burbujas durante dicha incorporación.

El gel creado tiene una viscosidad media sin presentar por lo tanto problemas de agitación.

El gel creado presenta un aspecto translucido viscoso y sin grumos, dándose por lo tanto por correcto el proceso de fabricación.

- Fase b adición del EDTA:

Posteriormente, se procede con la incorporación del resto de componentes. En concreto se añade el EDTA al gel formado mediante agitación suave y lentamente.

- Fase c Dispersion del BHA y Polisorbato 80:

A continuación se prepara la dispersión de BHA en el Polisorbato 80 para posteriormente introducirla en el gel creado.

Para ello, se mezcla el BHA y el polisorbato 80 y se agitan separadamente hasta que se homogeneícen.

<b>Productos</b>	<b>%</b>
BHA	0,0100
Polisorbato 80	0,4000

La dispersión formada, se incorpora en el gel creado mediante agitación media y lentamente con el fin de no crear burbujas durante dicha incorporación.

- Fase d Dispersión del principio activo (acetato de hidrocortisona o hidrocortisona base):

A continuación se prepara la dispersión de principio activo para posteriormente introducirla en el gel creado. Para ello se dispersa el principio activo en el agua purificada mediante agitación.

<b>Productos</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Acetato de Hidrocortisona	1,1100	-
Hidrocortisona base	-	1,0000
Agua purificada cps	5,0000	5,0000
<b>Total</b>	<b>100,0000</b>	<b>100,0000</b>

La dispersión formada, se incorpora en el gel creado mediante agitación media y lentamente con el fin de no crear burbujas durante dicha incorporación.

Se deja agitar el gel con agitación suave durante 10 minutos más con el fin de homogeneizar todos los componentes incorporados y se deja reposar.

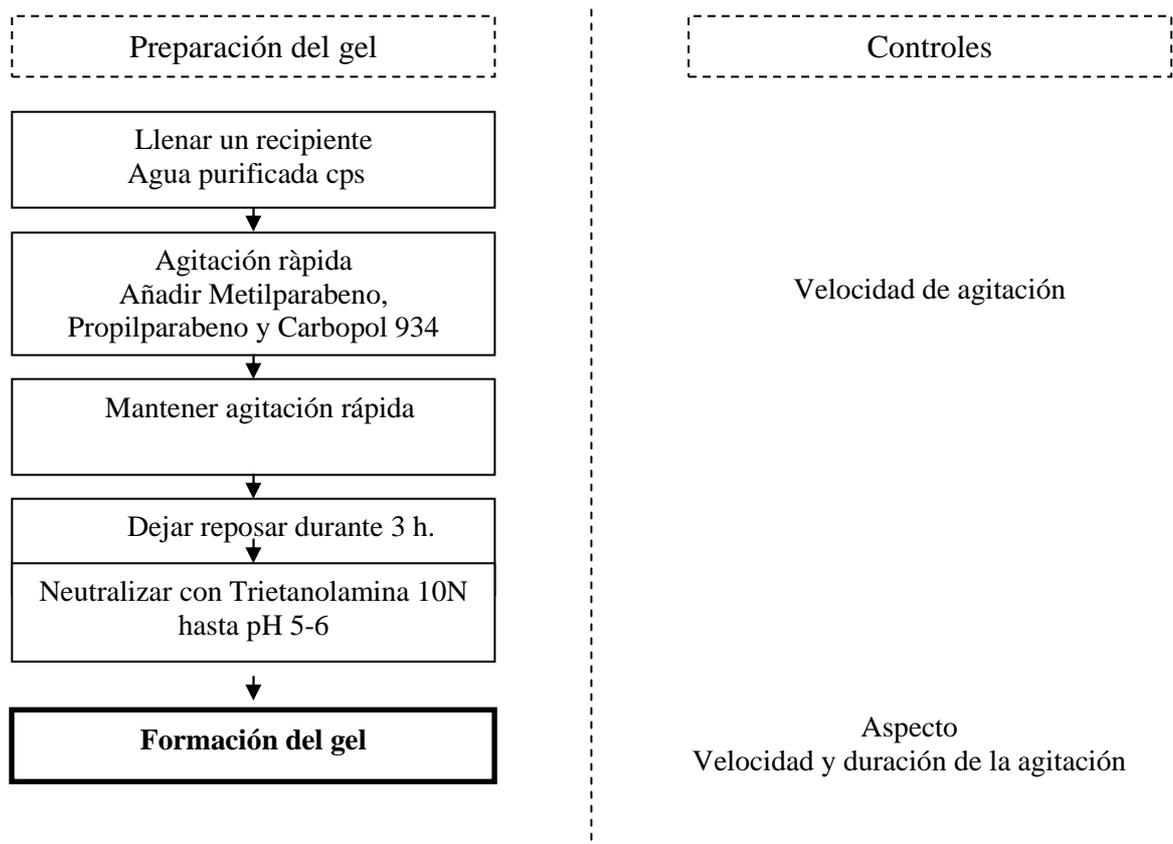
Se vuelve a controlar el pH de la formulación obtenida con el fin de verificar que permanece a pH entre 5 y 6 a pesar de los componentes introducidos.

El gel obtenido presenta un aspecto translucido, sin grumos y con poco aire.

Se controla la viscosidad del gel obteniendo un valor de viscosidad media de 620 cps en tres ensayos (modelo de rotación RV5, velocidad de rotación 50).

**4.3.6. Diagrama del proceso de fabricación del producto acabado y controles en proceso (IPC) (52-53).**

A continuación se muestra el flujo o diagrama del proceso de fabricación del producto acabado y sus controles en proceso de la formulación en gel.



Preparación de la dispersión del BHA

Dispersión del BHA en Polisorbato 80 con agitación

**Suspensión de BHA**

Preparación de la dispersión del principio activo

Dispersión del principio activo en Agua purificada con agitación

**Suspensión de principio activo**

Preparación de la formula final

Añadir EDTA al gel formado con agitación suave

Añadir la dispersion de BHA al gel formado con agitación suave

Añadir la dispersión de principio activo al gel formado con agitación suave

Homogeneizar y dejar reposar

Agitación  
Aspecto

Agitación  
Aspecto

Solubilización  
Velocidad y tiempo de agitación  
Aspecto

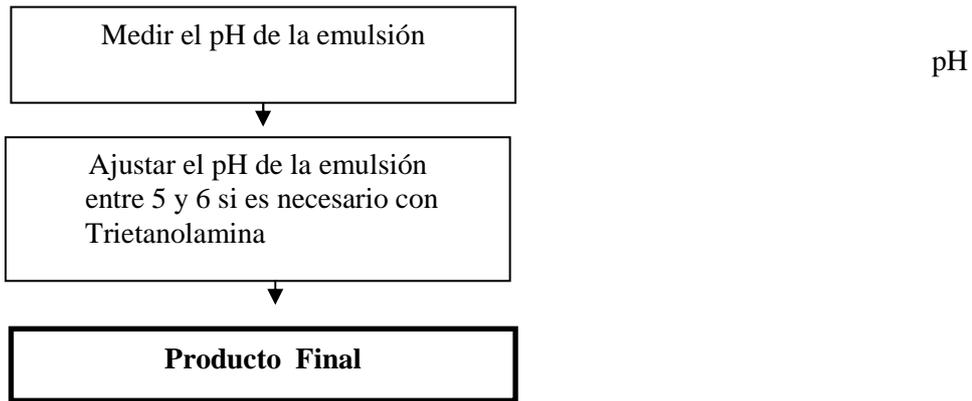


Figura 4.4.: Flujo del proceso de fabricación del producto acabado y sus controles en proceso de la formulación 3 en gel.

#### **4.3.7. Control de puntos críticos**

##### Velocidad y duración de la agitación:

Es necesario controlar la velocidad de agitación y el tiempo de la misma para asegurar una buena homogeneización de todos los componentes, así como la incorporación de aire a la misma.

##### pH:

Es necesario controlar el pH por razones de estabilidad del producto, y seguridad de empleo.

##### Aspecto:

Es necesario controlar el aspecto del producto después de cada etapa de mezcla para asegurar y confirmar el buen respecto de los parámetros del proceso.

#### **4.4. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD PRELIMINAR**

Durante el desarrollo de un medicamento, se realizan estudios de estabilidad de una o varias formulaciones para evaluar los parámetros o características de la misma con el fin de escoger la formulación más estable.

Estos estudios de estabilidad se conocen como “preliminares” y pueden o no cumplir las condiciones y requisitos establecidos por las ICH comentadas en el capítulo 8. Estos estudios no se utilizarán en ningún caso para proporcionar los datos necesarios a incluir en el documento de registro, sino para obtener datos suficientes para proporcionar conclusiones relativas a la estabilidad de las diferentes formulaciones y parámetros estudiados en cuestión que ayudarán a decidir cual o cuales son las formulaciones definitivas de las cuales realizaremos el estudio de estabilidad definitivo detallado en el capítulo 8.

Asimismo, estos datos de estabilidad pueden sustituir a los estudios de preformulación debido a que pueden servir para valorar la compatibilidad entre excipientes y el principio activo a evaluar.

Los parámetros que se estudiarán en este estudio de estabilidad preliminar serán los siguientes:

- Principio activo: sal o forma del principio activo más adecuada para la estabilidad de la formulación. Se estudiará el acetato de hidrocortisona y la hidrocortisona base.
- Envase: se estudia un envase opaco frente a un envase transparente para ver cual es el que protege mejor de la luz exterior.
- pH: Se estudiarán dos intervalos de pH bastante separados (entre 3,0 y 4,0 y entre 5,0 y 6,0) con el fin de evaluar si la estabilidad de la formulación es mejor en alguno de los pH establecidos.

##### **4.4.1. Diseño del estudio**

Se diseñan los siguientes estudios de estabilidad:

#### **4.4.1.1. Estudio de estabilidad con el objetivo de elegir la sal de Hidrocortisona más estable**

Se diseña un estudio de estabilidad a largo plazo (ELP) en tres condiciones diferentes de humedad y temperatura relativa durante un periodo de 24 meses.

Se estudian tres formulaciones diferentes según formulación y metódica de fabricación comentada anteriormente; en el caso de la emulsión, se utiliza la formula numero 1 con el proceso de fabricación descrito en el apartado 4.1.7. y la formulación 2 con el proceso de fabricación descrito en el apartado 4.1.7. En el caso del gel, se utiliza la formula numero 3 con el proceso de fabricación descrito en el apartado 4.3.6.

Todas las formulaciones estudiadas se preparan por un lado con acetato de hidrocortisona como principio activo y se introducen en el estudio de estabilidad, y por otro lado con hidrocortisona base y se introducen también en el estudio de estabilidad.

De esta forma, los preparados se disponen en tres cámaras climáticas, cada una de ellas en las siguientes condiciones de temperatura y humedad relativa:

- Cámara de estabilidad A:  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  y  $60\% \pm 5\%$  Humedad relativa
- Cámara de estabilidad B:  $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  y  $75\% \pm 5\%$  Humedad relativa
- Estufa a  $50\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Humedad relativa no controlada

En cada cámara climática se introduce una cantidad suficiente de unidades de cada lote para cubrir cada uno de los tiempos a evaluar, así como realizar los ensayos previsto a cada tiempo.

Los tiempos en los que se realizan los ensayos establecidos para determinar la validez de los preparados se detalle en el cuadro 4.33.

TIEMPO	CONDICIÓN CLIMÁTICA		
	Cámara A (25 °C / 60% HR)	Cámara B (40 °C / 75% HR)	Estufa (50 °C)
Inicial	SI		
7 días	NO	SI	SI
14 días	NO	SI	SI
1 mes	SI	SI	SI
45 días	NO	SI	SI
2 meses	SI	SI	SI
3 meses	SI	SI	SI
6 meses	NO	SI	NO
9 meses	NO	SI	NO
12 meses	SI	SI	NO
18 meses	SI	NO	NO
24 meses	SI	NO	NO

Cuadro 4.33.: Cuadro resumen de los tiempos de análisis del principio activo (acetato de hidrocortisona o hidrocortisona base) para el estudio de estabilidad preliminar.

En caso de que los resultados de los preparados en alguna de las condiciones sean no conformes, se suspenderá el estudio de estabilidad a esa condición y se estudiará la estabilidad en la condición siguiente inferior menos agresiva.

#### **4.4.1.2. Estudio de estabilidad con el objetivo de elegir el pH de la formulación más estable**

Se diseña un estudio de estabilidad a largo plazo (ELP) en la condición de humedad y temperatura relativa 25 °C ± 2°C y 60% ± 5% Humedad relativa, durante un periodo de 12 meses.

Se estudian tres formulaciones diferentes según formulación y metodica de fabricación comentada anteriormente; en el caso de la emulsión, se utiliza la formula numero 1 con el proceso de fabricación descrito en el apartado 4.1.7. y la formulación 2 con el proceso

de fabricación descrito en el apartado 4.1.7. En el caso del gel, se utiliza la formula numero 3 con el proceso de fabricación descrito en el apartado 4.3.6.

Las formulaciones en base crema [1 y 2], se preparan a dos pH diferentes; un pH entre 3,0 y 4,0 y otro pH entre 5,0 y 6,0. Dichos pH son lo suficientemente alejados como para poder observar tendencias de estabilidad entre las formulaciones preparadas a un pH u otro.

La formulación en gel [3] se neutraliza a pH entre 5,0 y 6,0. Por lo tanto, el pH de la formulación numero 3 se fijará entre estos límites y no se estudiara ningún otro intervalo de pH.

Los preparados se disponen en una cámara climática en las siguiente condicion de temperatura y humedad relativa:

- Cámara de estabilidad A: 25 °C ± 2°C y 60% ± 5% Humedad relativa

Se introduce una cantidad suficiente de unidades de cada lote para cubrir cada uno de los tiempos a evaluar, así como realizar los ensayos previsto a cada tiempo.

Los tiempos en los que se realizan los ensayos establecidos para determinar la validez de los preparados se detalle en el cuadro 4.34.

TIEMPO	CONDICIÓN CLIMÁTICA		
	Cámara A (25 °C / 60% HR)	Cámara B (40 °C / 75% HR)	Estufa (50 °C)
Inicial	SI		
12 meses	SI	NO	NO

Cuadro 4.34.: Cuadro resumen de los tiempos de análisis del pH para el estudio de estabilidad preliminar

En caso de que los resultados de los preparados en alguna de las condiciones no sean conformes, se suspenderá el estudio de estabilidad a esa condición.

#### **4.4.1.3. Estudio de estabilidad para elegir el envase primario en la que la formulación es más estable**

Se diseña un estudio de estabilidad a largo plazo (ELP) en tres condiciones diferentes de humedad y temperatura relativa durante un periodo de 24 meses.

Se estudian tres formulaciones diferentes según formulación y metodología de fabricación comentada anteriormente; en el caso de la emulsión, se utiliza la formula numero 1 con el proceso de fabricación descrito en el apartado 4.1.7. y la formulación 2 con el proceso de fabricación descrito en el apartado 4.1.7. En el caso del gel, se utiliza la formula numero 3 con el proceso de fabricación descrito en el apartado 4.3.6.

Todas las formulaciones preparadas se envasan en tres envases diferentes:

- envase de plástico de polietileno de alta densidad translúcido de 100 ml. Este envase se escoge como “peor caso” ya que es de plástico y permite el paso de la luz
- envase de plástico de polietileno de alta densidad opaco de 100 ml. Este envase se escoge como “segundo peor caso” ya que es de plástico pero se evita la interacción con la luz
- tubos de aluminio de 60 ml. Este envase se escoge como “mejor caso” o “control”, ya que es el material más inerte y evita también el paso de la luz.

Los preparados se disponen en tres cámaras climáticas, cada una de ellas en las siguientes condiciones de temperatura y humedad relativa:

- Cámara de estabilidad A:  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  y  $60\% \pm 5\%$  Humedad relativa
- Cámara de estabilidad B:  $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  y  $75\% \pm 5\%$  Humedad relativa
- Estufa a  $50\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Humedad relativa no controlada

En cada cámara climática se introduce una cantidad suficiente de unidades de cada lote para cubrir cada uno de los tiempos a evaluar, así como realizar los ensayos previsto a cada tiempo. El preparado envasado en el envase de plástico de polietileno de alta

densidad translúcido de 100 ml (peor caso) será el que primero se analice. En el caso de que el resultado no sea satisfactorio o salga fuera de especificaciones, se estudiará el segundo peor caso (envase de plástico de polietileno de alta densidad opaco de 100 ml), y si este a su vez tampoco fuera conforme, el caso control o mejor caso (tubo de aluminio de 60 ml).

Los tiempos en los que se realizan los ensayos establecidos para determinar la validez de los preparados se detalle en el cuadro 4.35.

TIEMPO	CONDICIÓN CLIMÁTICA		
	Cámara A (25 °C / 60% HR)	Cámara B (40 °C / 75% HR)	Estufa (50 °C)
Inicial	SI		
7 días	NO	SI	SI
14 días	NO	SI	SI
1 mes	SI	SI	SI
45 días	NO	SI	SI
2 meses	SI	SI	SI
3 meses	SI	SI	SI
6 meses	NO	SI	NO
9 meses	NO	SI	NO
12 meses	SI	SI	NO
18 meses	SI	NO	NO
24 meses	SI	NO	NO

Cuadro 4.35.: Cuadro resumen de los tiempos de análisis del principio activo envasado en diferentes envases para el estudio de estabilidad preliminar.

En caso de que los resultados de los preparados en alguna de las condiciones no sean conformes, se suspenderá el estudio de estabilidad a esa condición y se estudiará la estabilidad en la condición siguiente inferior menos agresiva.

## **4.4.2. Material y métodos**

### **4.4.2.1. Material**

Para la realización de los estudios de estabilidad se fabrican una serie de lotes a escala laboratorio. En concreto se fabrica un lote con la formulación en crema 1 y proceso de fabricación descrito en el apartado 4.1.7., otro lote con la formulación en crema 2 y proceso de fabricación descrito en el apartado 4.1.7. y otro lote con la formulación en gel 3 y proceso de fabricación descrito en el apartado 4.3.6.

El tamaño de cada uno de los lotes fabricados es de 4200 g.

Para estudiar el efecto de la sal de hidrocortisona utilizada, se fabrican todas las formulaciones anteriormente descritas con acetato de hidrocortisona y con hidrocortisona base.

En cuanto al acondicionamiento de los lotes elaborados, se utiliza un envase de plástico PE de alta densidad translucido de 100 ml, un envase de plástico PE de alta densidad opaco de 100 ml y tubos de aluminio de 60 ml, que se utilizan como material “control”.

### **4.4.2.2. Métodos**

El estudio de estabilidad se realiza en base a la determinación de los siguientes parámetros, considerados como críticos, cuyos ensayos se realizarán en todos los tiempos establecidos y comentados anteriormente:

1. Aspecto
2. Determinación de la riqueza de hidrocortisona (base o acetato según proceda).
3. pH

Los métodos de cada uno de los ensayos se describirán en el capítulo 7 correspondiente al control de producto acabado, por lo que en este capítulo no se describen.

### **4.4.3. 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 que por tanto será el marcador de la calidad o no calidad del producto durante todo el periodo en que dura dicho estudio.

En el cuadro 4.36. se resumen los ensayos a realizar, junto con los métodos utilizados y las especificaciones establecidas para llevar a cabo este estudio.

<b>ENSAYO</b>	<b>MÉTODO DE ANÁLISIS</b>	<b>ESPECIFICACIONES</b>
Aspecto	Método organoléptico	Emulsión blanca o gel transparente
Valoración	HPLC (Método propio)	100% (95 – 105%)
pH	Farmacopea Europea 7 <sup>a</sup> ed [2.2.3.]	3.5 (3.0 – 4.0) o 5.5 (5.0 – 6.0) según corresponda (en el caso de las formulaciones 1 y 2)

Cuadro 4.36. Tabla resumen de los métodos y especificaciones establecidos para el estudio de estabilidad

### **4.4.4. Evaluación de los métodos de estudio**

#### **4.4.4.1. Aspecto**

Los resultados obtenidos en el estudio, permiten observar las posibles variaciones habidas en el transcurso del almacenamiento, reflejo de la existencia de posibles alteraciones físicas, químicas y/o galénicas del producto.

#### **4.4.4.2. Ensayo de riqueza**

Los resultados experimentales obtenidos a lo largo del estudio, junto con el resto de características analizadas deben permitir evaluar la idoneidad del principio activo en la formulación en las condiciones de ensayo, así como la posible disminución significativa de su concentración.

#### 4.4.4.3. Control del pH

Los resultados experimentales obtenidos a lo largo del estudio, permiten observar las posibles variaciones habidas en el transcurso del almacenamiento. Un cambio en el pH de los preparados puede indicar un futuro problema de estabilidad tanto física como química.

#### 4.4.5. Resultados experimentales

A continuación se presentan los resultados experimentales obtenidos para cada uno de los lotes estudiados, tiempos estudiados y diferentes temperaturas. Estos resultados se resumen en los cuadros que a continuación se adjuntan junto con diferentes gráficas representativas de cada uno de los ensayos realizados.

#### CONDICIONES 25 °C ± 2 °C Y 60% ± 5% HR

FORMULACIÓN 1				
API: Acetato de hidrocortisona / pH: 3.5				
Tiempo	Envase	Aspecto	Valoración	pH
0	-	Crema blanca	100.5%	3.58
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	99.3%	-
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	101.0%	-
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	101.3%	-
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	102.5%	-
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	99.9%	-
12 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	100.2%	-
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	99.4%	4.30
18 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	102.8%	-
24 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	99.7%	-
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	100.5%	-

Cuadro 4.37.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 1 con acetato de hidrocortisona y pH 3.5 a las condiciones climáticas 25 °C/60% HR

<b>FORMULACIÓN 1</b>				
<b>API: Acetato de hidrocortisona / pH: 5.5</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>	<b>pH</b>
0	-	Crema blanca	100.7%	5.80
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	103.8%	-
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	101.9%	-
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	102.9%	-
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	98.5%	-
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	98.1%	-
12 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	98.9%	-
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	103.9%	3.90
18 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	98.8%	-
24 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	97.6%	-
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	99.8%	-

Cuadro 4.38.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 1 con acetato de hidrocortisona y pH 5.5 a las condiciones climáticas 25 °C/60% HR

<b>FORMULACIÓN 1</b>				
<b>API: Hidrocortisona base / pH: 3.5</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>	<b>pH</b>
0	-	Crema blanca	99.8%	3.20
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	98.5%	-
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	102.7%	-
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	100.0%	-
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	97.1%	-
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	102.1%	-
12 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	95.6%	-
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	95.6%	2.90
18 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	101.6%	-
24 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	-	-
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	90.0%	-

Cuadro 4.39.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 1 con hidrocortisona base y pH 3.5 a las condiciones climáticas 25 °C/60% HR

<b>FORMULACIÓN 1</b>				
<b>API: Hidrocortisona base / pH: 5.5</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>	<b>pH</b>
0	-	Crema blanca	99.2%	5.04
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	101.2%	-
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	100.9%	-
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	98.2%	-
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	97.6%	-
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	98.2%	-
12 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	104.9%	-
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	102.3%	5.00
18 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	101.1%	-
24 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	-%	-
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	101.8%	-

Cuadro 4.40.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 1 con hidrocortisona base y pH 5.5 a las condiciones climáticas 25 °C/60% HR

<b>FORMULACIÓN 2</b>				
<b>API: Acetato de hidrocortisona / pH: 3.5</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>	<b>pH</b>
0	-	Crema blanca	101.9%	-
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	97.3%	-
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	94.3%	-
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	86.6%	-
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	83.3%	-
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	80.9%	-
12 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca con partes negras debido a contaminación microbiana	-	-
	Envase plástico opaco		-	-
18 meses	Envase plástico opaco		-	-
24 meses	Envase plástico opaco		-	-
	Envase Aluminio		-	-

Cuadro 4.41.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 2 con acetato de hidrocortisona y pH 3.5 a las condiciones climáticas 25 °C/60% HR

<b>FORMULACIÓN 2</b>				
<b>API: Acetato de hidrocortisona / pH: 5.5</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>	<b>pH</b>
0	-	Crema blanca	102.5%	5.50
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	101.6%	-
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	99.7%	-
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	99.7%	-
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	96.5%	-
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	97.9%	-
12 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca con partes negras debido a contaminación microbiana	-	-
	Envase plástico opaco		-	-
18 meses	Envase plástico opaco		-	-
24 meses	Envase plástico opaco		-	-
	Envase Aluminio		-	-

Cuadro 4.42.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 2 con acetato de hidrocortisona y pH 5.5 a las condiciones climáticas 25 °C/60% HR

<b>FORMULACIÓN 2</b>				
<b>API: Hidrocortisona base / pH: 3.5</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>	<b>pH</b>
0	-	Crema blanca	99.1%	3.80
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	98.1%	-
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	102.5%	-
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	97.1%	-
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	98.1%	-
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	-%	-
12 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca con partes negras debido a contaminación microbiana	-	-
	Envase plástico opaco		-	-
18 meses	Envase plástico opaco		-	-
24 meses	Envase plástico opaco		-	-
	Envase Aluminio		-	-

Cuadro 4.43.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 2 con hidrocortisona base y pH 3.5 a las condiciones climáticas 25 °C/60% HR

<b>FORMULACIÓN 2</b>				
<b>API: Hidrocortisona base / pH: 5.5</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>	<b>pH</b>
0	-	Crema blanca	101.9%	5.87
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	101.3%	-
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	99.9%	-
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	100.7%	-
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	100.1%	-
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	99.2%	-
12 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca con partes negras debido a contaminación microbiana	-	-
	Envase plástico opaco		-	-
18 meses	Envase plástico opaco		-	-
24 meses	Envase plástico opaco		-	-
	Envase Aluminio		-	-

Cuadro 4.44.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 2 con hidrocortisona base y pH 5.5 a las condiciones climáticas 25 °C/60% HR

<b>FORMULACIÓN 3</b>				
<b>API: Acetato de hidrocortisona</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>	<b>pH</b>
0	-	Gel transparente	98.9%	5.57
1 mes	Envase plástico translucido	Gel transparente	99.1%	-
2 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente	100.5%	-
3 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente	98.8%	-
	Envase plástico opaco	Gel transparente	100.8%	-
	Envase Aluminio	Gel transparente	99.0%	-
12 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente	98.7%	-
	Envase plástico opaco	Gel transparente	98.5%	5.30
18 meses	Envase plástico opaco	Gel transparente	100.6%	-
24 meses	Envase plástico opaco	Gel transparente	100.9%	-
	Envase Aluminio	Gel transparente	101.7%	-

Cuadro 4.45.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 3 con acetato de hidrocortisona a las condiciones climáticas 25 °C/60% HR

FORMULACIÓN 3				
API: Hidrocortisona base				
Tiempo	Envase	Aspecto	Valoración	pH
0	-	Gel transparente	100.0%	5.57
1 mes	Envase plástico translucido	Gel transparente	100.9%	-
2 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente	102.0%	-
3 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente	98.1%	-
	Envase plástico opaco	Gel transparente	99.5%	-
	Envase Aluminio	Gel transparente	95.8%	-
12 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente	99.0%	-
	Envase plástico opaco	Gel transparente	99.3%	4.90
18 meses	Envase plástico opaco	Gel transparente	97.6%	-
24 meses	Envase plástico opaco	Gel transparente	93.4%	-
	Envase Aluminio	Gel transparente	85.5%	-

Cuadro 4.46.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 3 con hidrocortisona base a las condiciones climáticas 25 °C/60% HR

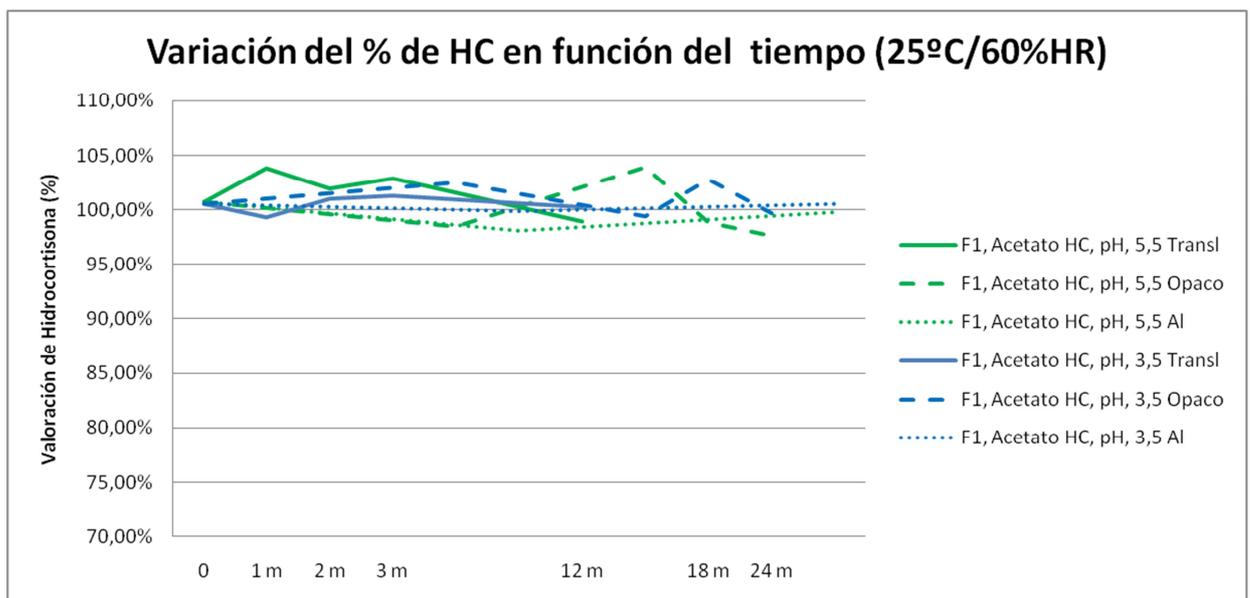


Figura 4.5.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 1** con **acetato de hidrocortisona**, a dos pH diferentes y envasado en tres envases diferentes.

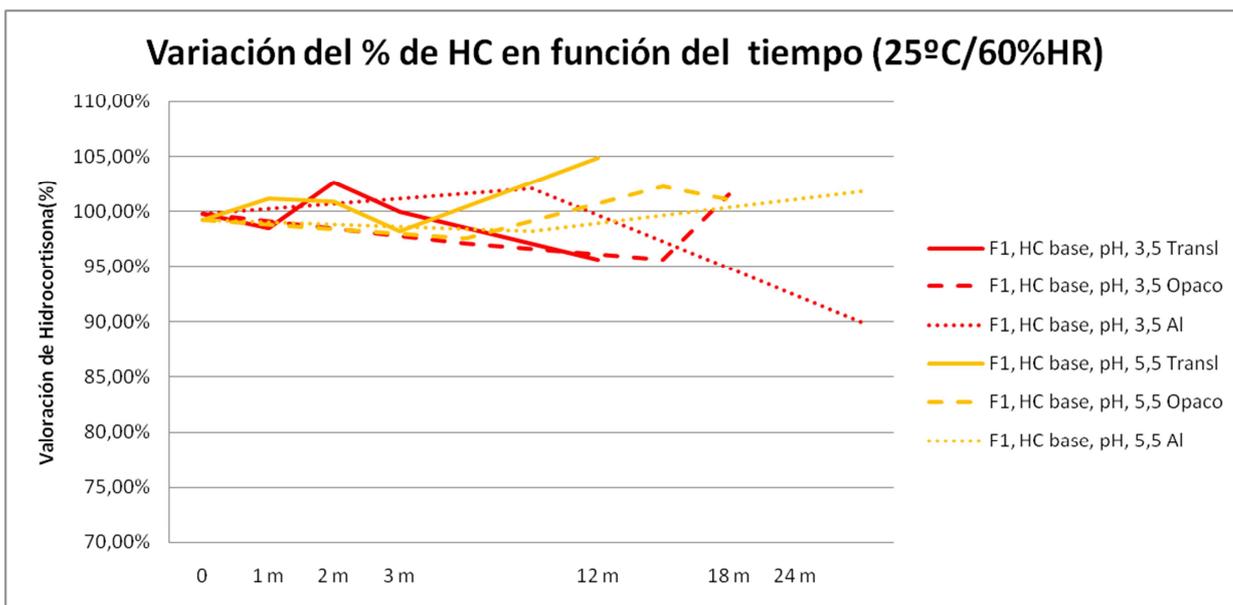


Figura 4.6.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 1** con **hidrocortisona base**, a dos pH diferentes y envasado en tres envases diferentes.

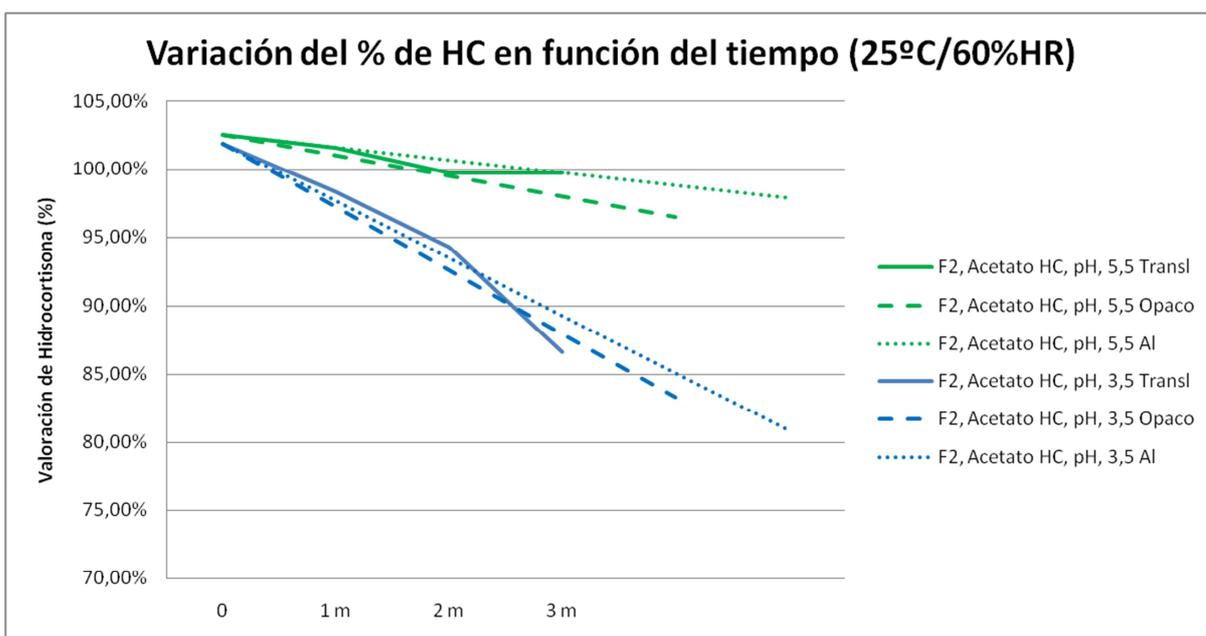


Figura 4.7.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 2** con **Acetato de hidrocortisona**, a dos pH diferentes y envasado en tres envases diferentes.

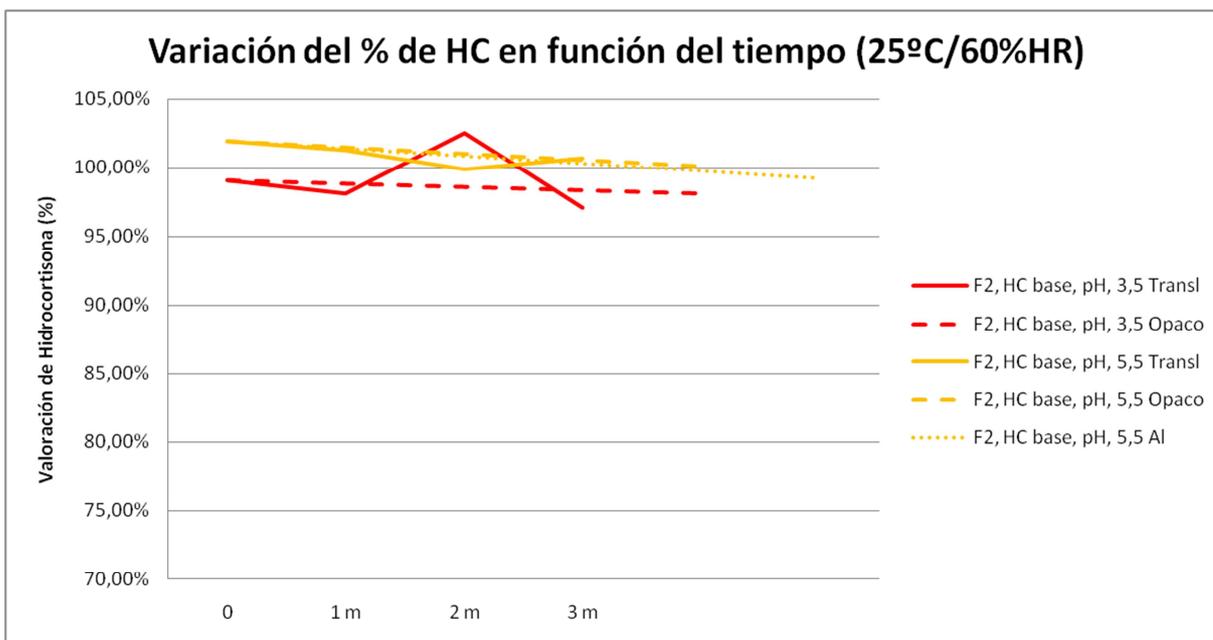


Figura 4.8.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 2** con **hidrocortisona base**, a dos pH diferentes y envasado en tres envases diferentes.

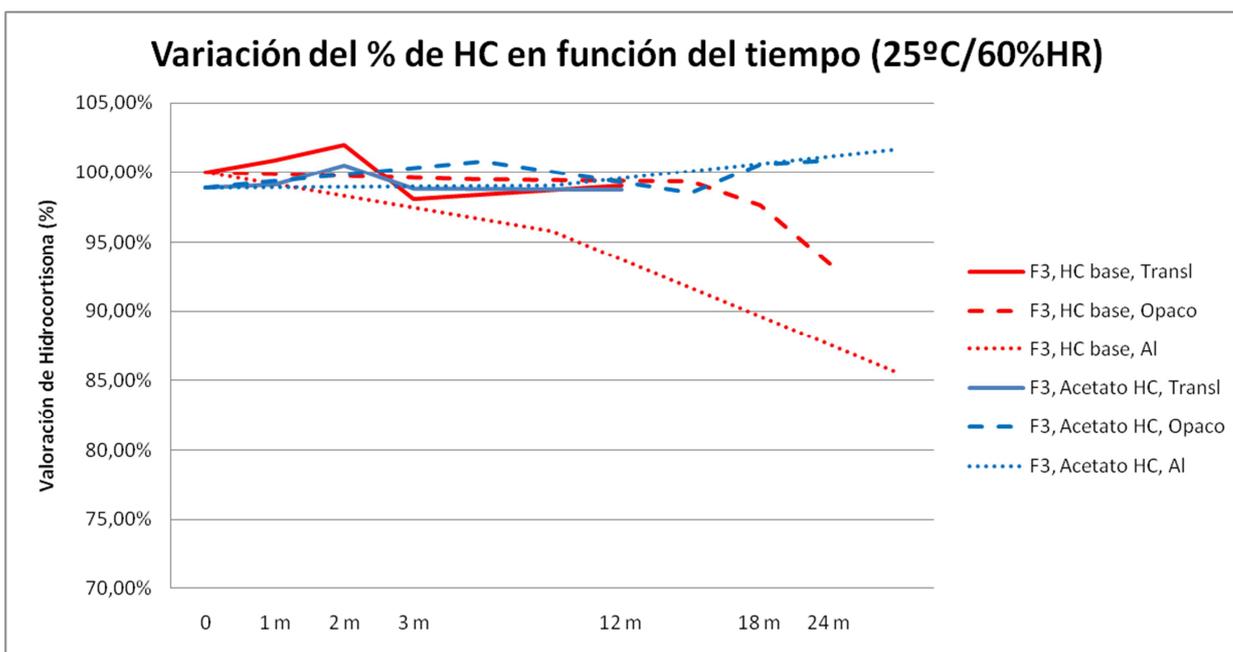


Figura 4.9.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 3** con **Acetato de hidrocortisona** e **hidrocortisona base**, y envasado en tres envases diferentes.

**CONDICIONES 40° ± 2°C Y 75% ± 5% HR**

<b>FORMULACIÓN 1</b>			
<b>API: Acetato de hidrocortisona / pH: 3.5</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	100.5%
7 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	98.0%
14 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	98.0%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	99.3%
45 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	99.1%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	98.4%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	98.6%
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	98.5%
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	101.5%
6 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	97.8%
9 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	99.6%
12 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	102.5%

Cuadro 4.47.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 1 con acetato de hidrocortisona y pH 3.5 a las condiciones climáticas 40 °C/75% HR

<b>FORMULACIÓN 1 (API: Acetato de hidrocortisona / pH: 5.5)</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	100.7%
7 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	99.0%
14 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	100.0%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	101.8%
45 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	99.2%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	98.2%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	97.1%
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	98.1%
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	103.4%
6 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	101.5%
9 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	100.9%
12 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	99.8%

Cuadro 4.48.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 1 con acetato de hidrocortisona y pH 5.5 a las condiciones climáticas 40 °C/75% HR.

<b>FORMULACIÓN 1 (API: Hidrocortisona base / pH: 3.5)</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	99.8%
7 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	102.0%
14 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	101.0%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	97.0%
45 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	96.4%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	96.7%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	87.7%
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	85.4%
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	87.9%
6 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	72.4%
9 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	59.1%
12 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	51.2%

Cuadro 4.49.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 1 con hidrocortisona base y pH 3.5 a las condiciones climáticas 40 °C/75% HR.

<b>FORMULACIÓN 1 (API: Hidrocortisona base / pH: 5.5)</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	99.2%
7 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	103.7%
14 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	102.1%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	99.9%
45 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	99.6%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	98.7%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	100.4%
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	99.9%
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	100.5%
6 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	95.1%
9 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	89.2%
12 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	86.1%

Cuadro 4.50.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 1 con hidrocortisona base y pH 5.5 a las condiciones climáticas 40 °C/75% HR

<b>FORMULACIÓN 2 (API: Acetato de hidrocortisona / pH: 3.5)</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	101.9%
7 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	101.8%
14 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	103.8%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	102.7%
45 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	103.9%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	93.5%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	96.9%
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	98.4%
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	98.4%
6 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	98.2%
9 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	97.5%
12 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	100.8%

Cuadro 4.51.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 2 con acetato de hidrocortisona y pH 3.5 a las condiciones climáticas 40 °C/75% HR

<b>FORMULACIÓN 2 (API: Acetato de hidrocortisona / pH: 5.5)</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	102.5%
7 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	104.5%
14 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	101.7%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	101.7%
45 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	103.5%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	102.5%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	100.0%
	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	98.3%
	Envase Aluminio	Crema blanca líquida	97.4%
6 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	101.5%
9 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	99.8%
12 meses	Envase plástico opaco	Crema blanca líquida	99.3%

Cuadro 4.52.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 2 con acetato de hidrocortisona y pH 5.5 a las condiciones climáticas 40 °C/75% HR

<b>FORMULACIÓN 2 (API: Hidrocortisona base / pH: 3.5)</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	99.1%
7 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	101.2%
14 días	Envase plástico translucido	Crema amarillenta	98.1%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema amarillenta	100.5%
45 días	Envase plástico translucido	Crema amarillenta	102.2%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema amarillenta	103.4%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema amarillenta	-%
	Envase plástico opaco	Crema amarillenta	98.5%
	Envase Aluminio	Crema amarillenta	93.3%
6 meses	Envase plástico opaco	Crema amarillenta	100.2%
9 meses	Envase plástico opaco	Crema amarillenta	101.4%
12 meses	Envase plástico opaco	Crema amarillenta	63.9%

Cuadro 4.53.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 2 con hidrocortisona base y pH 3.5 a las condiciones climáticas 40 °C/75% HR

<b>FORMULACIÓN 2 (API: Hidrocortisona base / pH: 5.5)</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	101.9%
7 días	Envase plástico translucido	Crema blanca líquida	100.0%
14 días	Envase plástico translucido	Crema amarillenta	104.6%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema amarillenta	103.4%
45 días	Envase plástico translucido	Crema amarillenta	98.6%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema amarillenta	101.5%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema amarillenta	102.4%
	Envase plástico opaco	Crema amarillenta	99.2%
	Envase Aluminio	Crema amarillenta	102.4%
6 meses	Envase plástico opaco	Crema amarillenta	102.3%
9 meses	Envase plástico opaco	Crema amarillenta	102.9%
12 meses	Envase plástico opaco	Crema amarillenta	83.8%

Cuadro 4.54.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 2 con hidrocortisona base y pH 5.5 a las condiciones climáticas 40 °C/75% HR

<b>FORMULACIÓN 3 (API: Acetato de hidrocortisona)</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Gel transparente	98.9%
7 días	Envase plástico translucido	Gel transparente	102.1%
14 días	Envase plástico translucido	Gel transparente	100.9%
1 mes	Envase plástico translucido	Gel transparente	99.9%
45 días	Envase plástico translucido	Gel transparente	101.4%
2 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente	98.6%
3 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente	101.3%
	Envase plástico opaco	Gel transparente	98.4%
	Envase Aluminio	Gel transparente	99.6%
6 meses	Envase plástico opaco	Gel transparente	102.4%
9 meses	Envase plástico opaco	Gel transparente	103.0%
12 meses	Envase plástico opaco	Gel transparente	99.8%

Cuadro 4.55.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 3 con acetato de hidrocortisona a las condiciones climáticas 40 °C/75% HR

FORMULACIÓN 3 (API: Hidrocortisona base)			
Tiempo	Envase	Aspecto	Valoración
0	-	Gel transparente	100.0%
7 días	Envase plástico translucido	Gel transparente	101.0%
14 días	Envase plástico translucido	Gel transparente	99.2%
1 mes	Envase plástico translucido	Gel transparente	99.4%
45 días	Envase plástico translucido	Gel transparente	96.5%
2 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente	96.3%
3 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente	89.0%
	Envase plástico opaco	Gel transparente	92.0%
	Envase Aluminio	Gel transparente	87.9%
6 meses	Envase plástico opaco	Gel transparente	89.2%
9 meses	Envase plástico opaco	Gel transparente	70.8%
12 meses	Envase plástico opaco	Gel transparente	73.9%

Cuadro 4.56.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 3 con hidrocortisona base a las condiciones climáticas 40 °C/75% HR

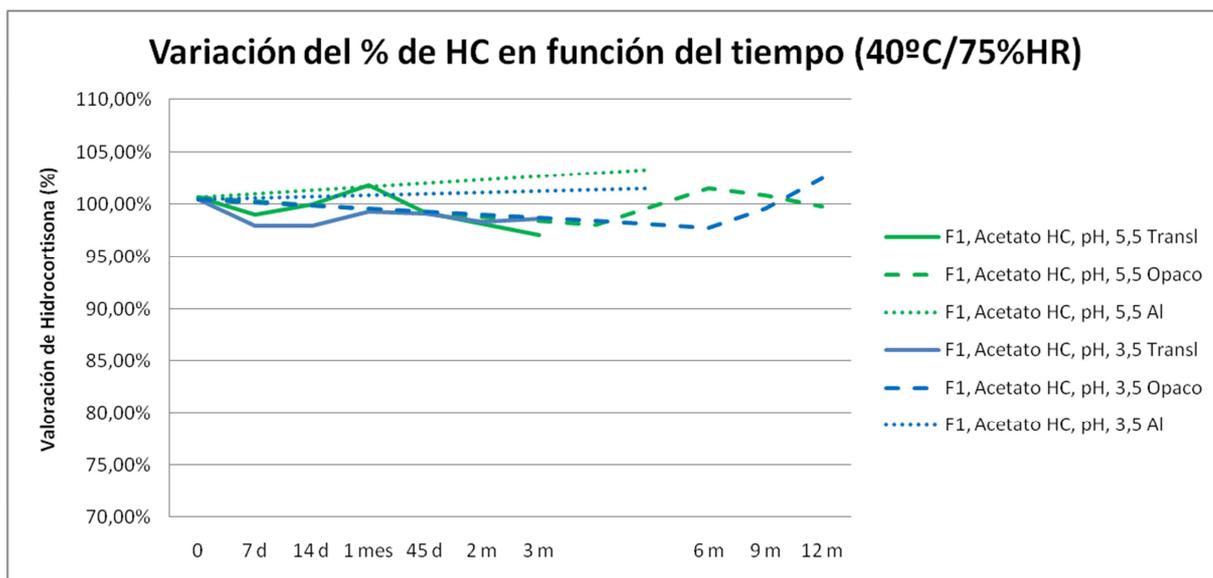


Figura 4.10.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 1** con **acetato de hidrocortisona**, a dos pH diferentes y envasado en tres envases diferentes.

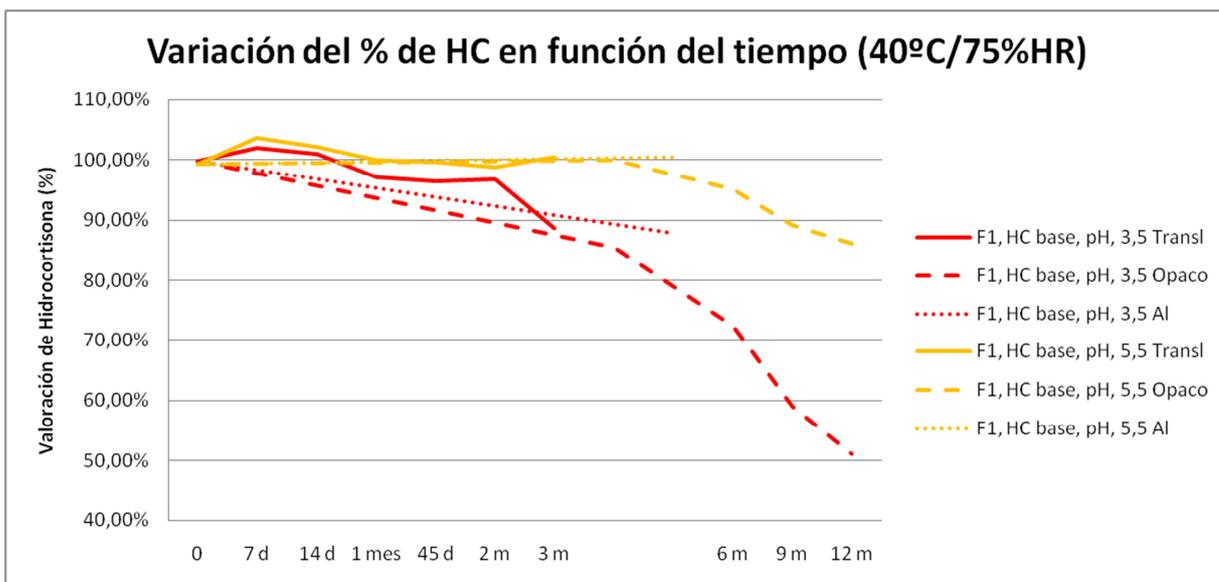


Figura 4.11.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 1** con **hidrocortisona base**, a dos pH diferentes y envasado en tres envases diferentes.

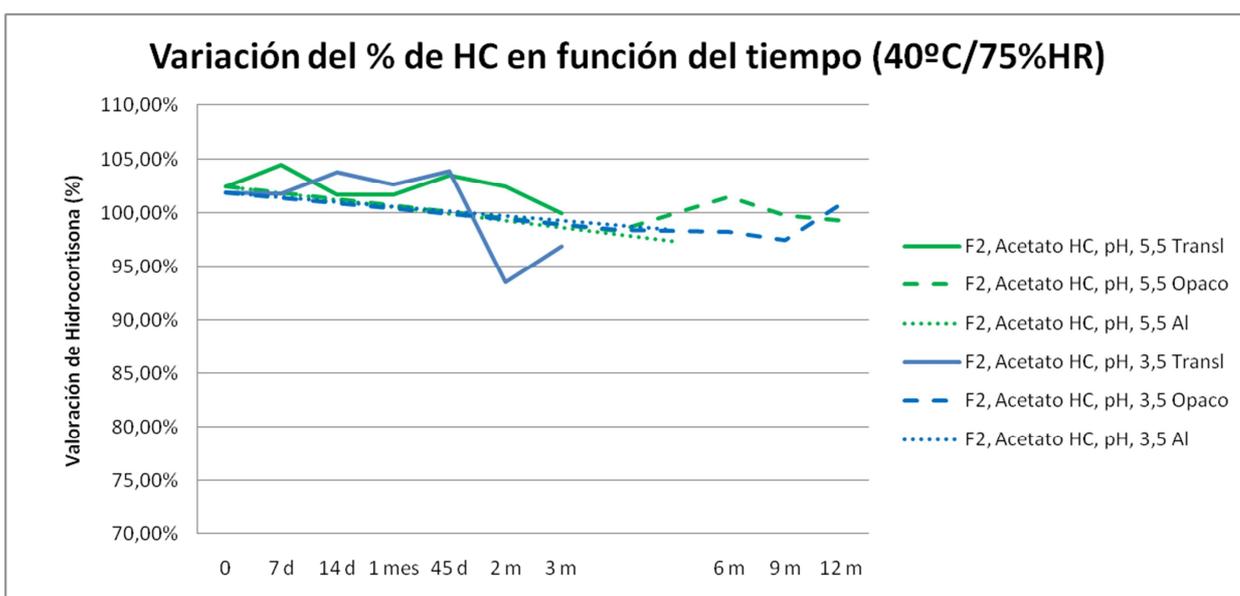


Figura 4.12.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 2** con **Acetato de hidrocortisona**, a dos pH diferentes y envasado en tres envases diferentes.

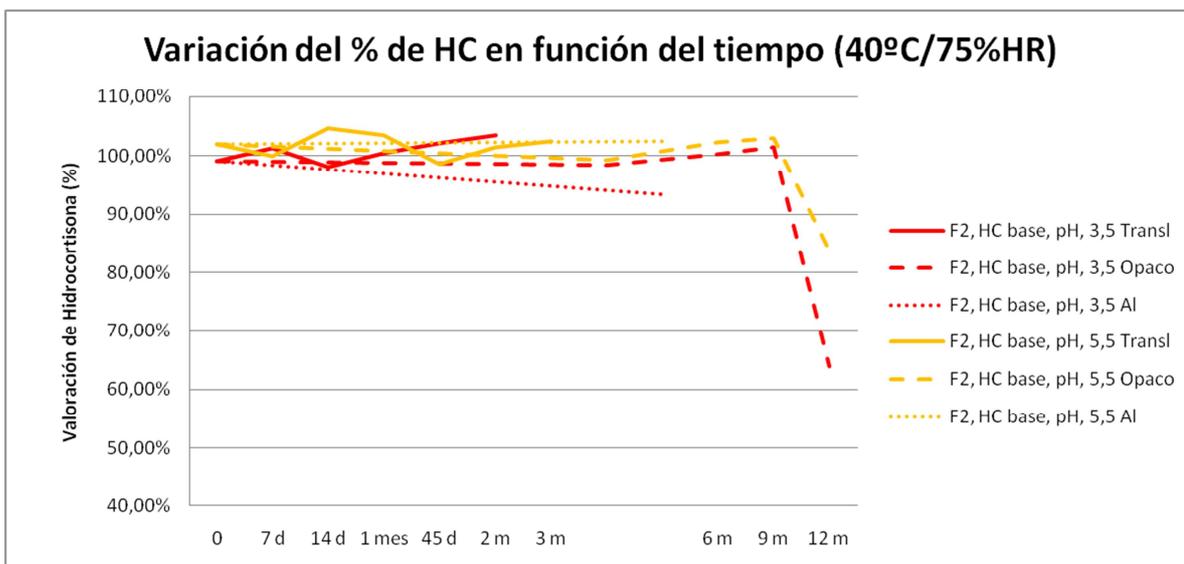


Figura 4.13.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 2** con **hidrocortisona base**, a dos pH diferentes y envasado en tres envases diferentes.

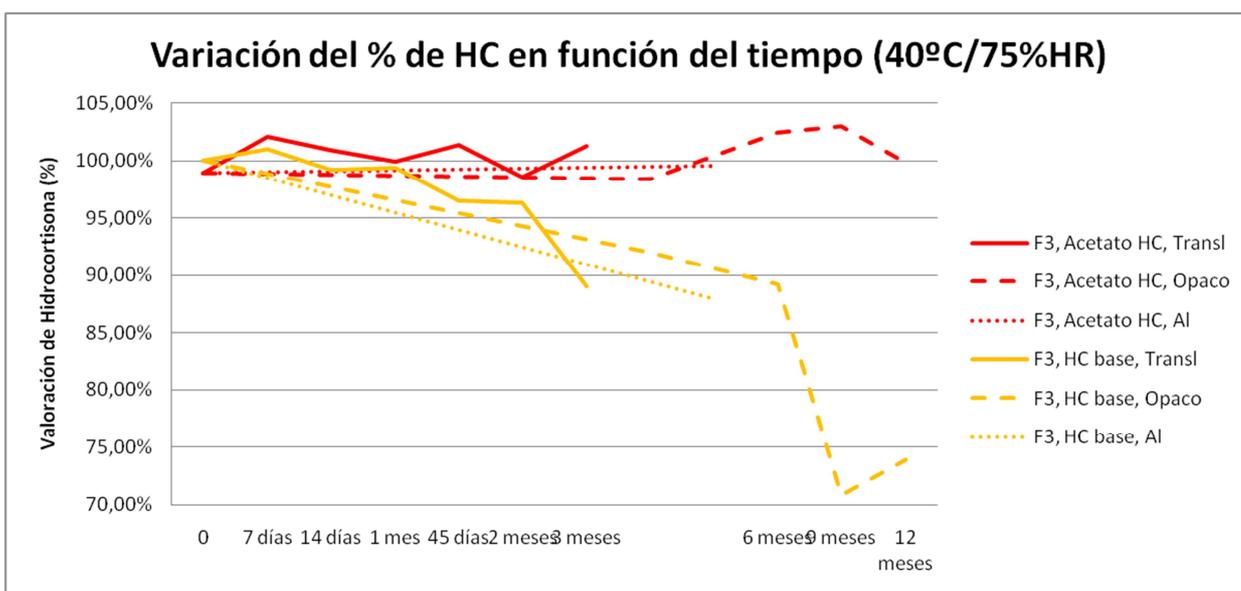


Figura 4.14.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 3** con **Acetato de hidrocortisona** e **hidrocortisona base**, y envasado en tres envases diferentes.

**CONDICIONES 50° ± 2°C**

<b>FORMULACIÓN 1</b>			
<b>API: Acetato de hidrocortisona / pH: 3.5</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	100.5%
7 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	100.7%
14 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	102.0%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	98.6%
45 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	101.9%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	88.7%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	76.7%
	Envase plástico opaco	Crema líquida amarilla	68.6%
	Envase Aluminio	Crema líquida amarilla con separación de fases	13.5%

Cuadro 4.57.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 1 con acetato de hidrocortisona y pH 3.5 a las condiciones climáticas 50 °C

<b>FORMULACIÓN 1</b>			
<b>API: Acetato de hidrocortisona / pH: 5.5</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	100.7%
7 días	Envase plástico translucido	Crema muy líquida blanca	101.9%
14 días	Envase plástico translucido	Crema muy líquida blanca	98.7%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema muy líquida blanca	97.7%
45 días	Envase plástico translucido	Crema muy líquida blanca	100.7%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema muy líquida blanca	101.3%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema muy líquida blanca	98.1%
	Envase plástico opaco	Crema muy líquida blanca	100.5%
	Envase Aluminio	Crema muy líquida blanca	101.3%

Cuadro 4.58.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 1 con acetato de hidrocortisona y pH 5.5 a las condiciones climáticas 50 °C

<b>FORMULACIÓN 1</b>			
<b>API: Hidrocortisona base / pH: 3.5</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	99.8%
7 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	102.0%
14 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	100.0%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	93.4%
45 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	80.6%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	75.9%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	57.7%
	Envase plástico opaco	Crema líquida amarilla	47.0%
	Envase Aluminio	Crema líquida amarilla con separación de fases	37.1%

Cuadro 4.59.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 1 con hidrocortisona base y pH 3.5 a las condiciones climáticas 50 °C

<b>FORMULACIÓN 1</b>			
<b>API: Hidrocortisona base / pH: 5.5</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	99.2%
7 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	103.0%
14 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	100.0%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	102.3%
45 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	93.8%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	92.2%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	70.1%
	Envase plástico opaco	Crema líquida amarilla	75.4%
	Envase Aluminio	Crema líquida amarilla con separación de fases	52.0%

Cuadro 4.60.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 1 con hidrocortisona base y pH 5.5 a las condiciones climáticas 50 °C

<b>FORMULACIÓN 2</b>			
<b>API: Acetato de hidrocortisona / pH: 3.5</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	101.9%
7 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	102.2%
14 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	103.7%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	99.9%
45 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	100.1%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	99.2%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	96.5%
	Envase plástico opaco	Crema líquida amarilla	76.3%
	Envase Aluminio	Crema líquida amarilla con separación de fases	79.2%

Cuadro 4.61.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 2 con acetato de hidrocortisona y pH 3.5 a las condiciones climáticas 50 °C

<b>FORMULACIÓN 2</b>			
<b>API: Acetato de hidrocortisona / pH: 5.5</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	102.5%
7 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	102.9%
14 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	101.4%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	101.3%
45 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	104.8%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	100.3%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	99.1%
	Envase plástico opaco	Crema líquida amarilla	99.7%
	Envase Aluminio	Crema líquida amarilla con separación de fases	91.9%

Cuadro 4.62.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 2 con acetato de hidrocortisona y pH 5.5 a las condiciones climáticas 50 °C

<b>FORMULACIÓN 2</b>			
<b>API: Hidrocortisona base / pH: 3.5</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	99.1%
7 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	97.7%
14 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	99.2%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	101.2%
45 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	101.2%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	103.9%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	101.3%
	Envase plástico opaco	Crema líquida amarilla	100.9%
	Envase Aluminio	Crema líquida amarilla con separación de fases	76.5%

Cuadro 4.63.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 2 con hidrocortisona base y pH 3.5 a las condiciones climáticas 50 °C

<b>FORMULACIÓN 2</b>			
<b>API: Hidrocortisona base / pH: 5.5</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Crema blanca	101.9%
7 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	102.9%
14 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	102.4%
1 mes	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	100.7%
45 días	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	99.0%
2 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	102.0%
3 meses	Envase plástico translucido	Crema líquida amarilla	102.3%
	Envase plástico opaco	Crema líquida amarilla	102.4%
	Envase Aluminio	Crema líquida amarilla con separación de fases	83.4%

Cuadro 4.64.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 2 con hidrocortisona base y pH 5.5 a las condiciones climáticas 50 °C

<b>FORMULACIÓN 3</b>			
<b>API: Acetato de hidrocortisona</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Gel transparente	98.9%
7 días	Envase plástico translucido	Gel transparente amarillento	103.0%
14 días	Envase plástico translucido	Gel transparente amarillento	104.3%
1 mes	Envase plástico translucido	Gel transparente amarillento	104.8%
45 días	Envase plástico translucido	Gel transparente amarillento	99.2%
2 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente amarillento	100.4%
3 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente amarillento	102.1%
	Envase plástico opaco	Gel transparente amarillento	100.8%
	Envase Aluminio	Gel transparente amarillento	96.1%

Cuadro 4.65.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 3 con acetato de hidrocortisona a las condiciones climáticas 50 °C

<b>FORMULACIÓN 3</b>			
<b>API: Hidrocortisona base</b>			
<b>Tiempo</b>	<b>Envase</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Valoración</b>
0	-	Gel transparente	100.0%
7 días	Envase plástico translucido	Gel transparente	101.0%
14 días	Envase plástico translucido	Gel transparente	90.8%
1 mes	Envase plástico translucido	Gel transparente	90.7%
45 días	Envase plástico translucido	Gel transparente	90.5%
2 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente	77.2%
3 meses	Envase plástico translucido	Gel transparente	67.8%
	Envase plástico opaco	Gel transparente	70.6%
	Envase Aluminio	Gel transparente	62.3%

Cuadro 4.66.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para la formulación 3 con hidrocortisona base a las condiciones climáticas 50 °C

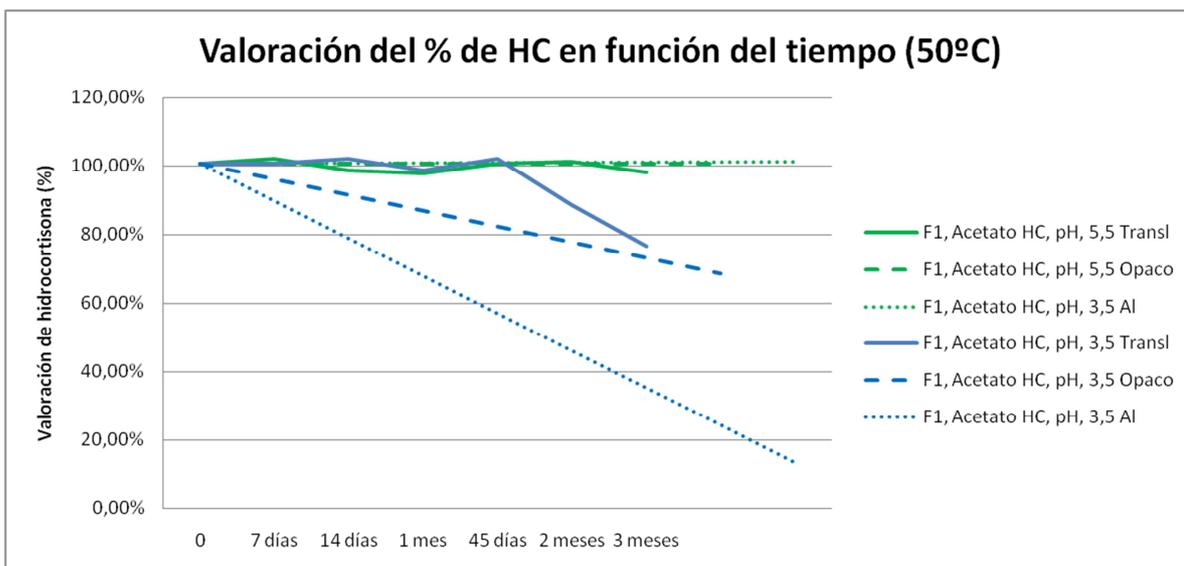


Figura 4.15.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 1** con **acetato de hidrocortisona**, a dos pH diferentes y envasado en tres envases diferentes.

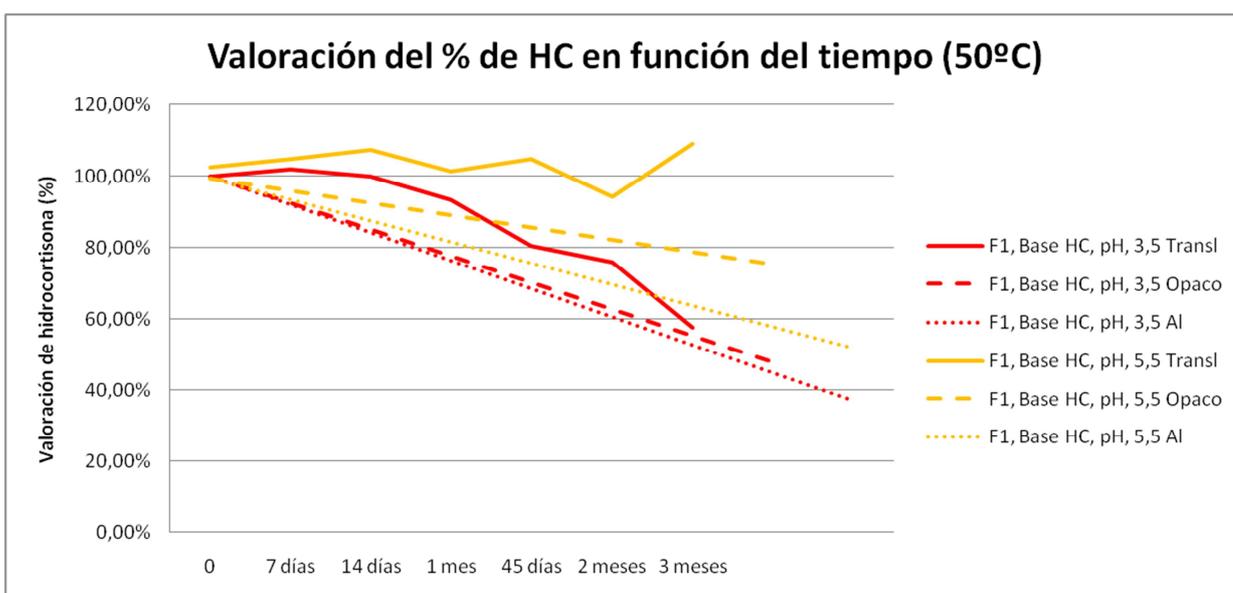


Figura 4.16.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 1** con **hidrocortisona base**, a dos pH diferentes y envasado en tres envases diferentes.

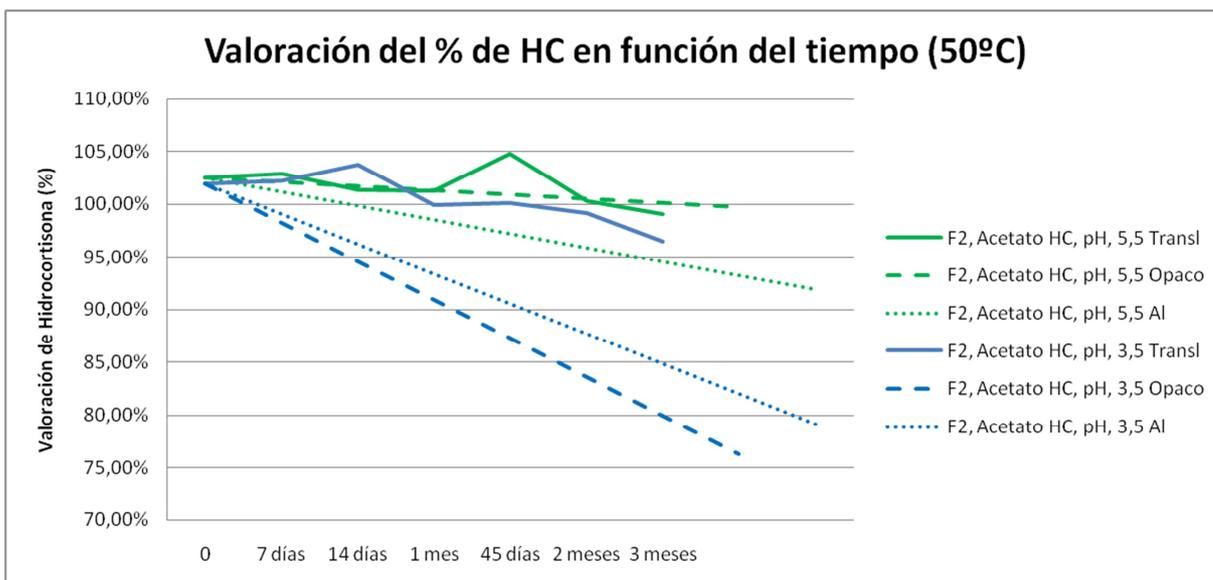


Figura 4.17.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 2** con **Acetato de hidrocortisona**, a dos pH diferentes y envasado en tres envases diferentes.

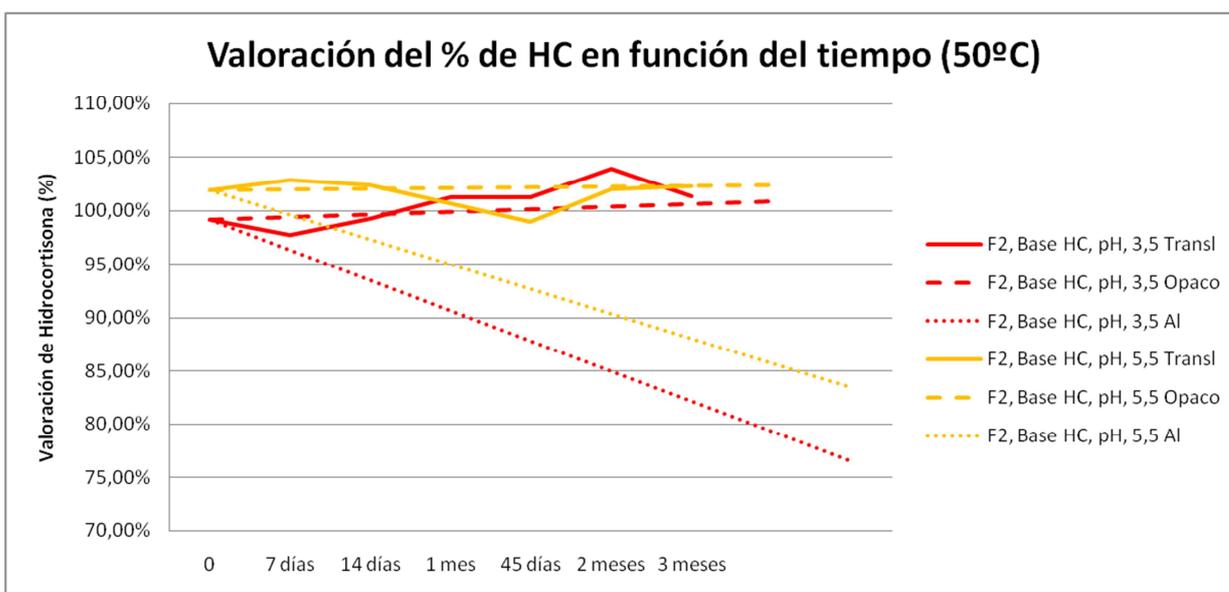


Figura 4.18.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 2** con **hidrocortisona base**, a dos pH diferentes y envasado en tres envases diferentes.

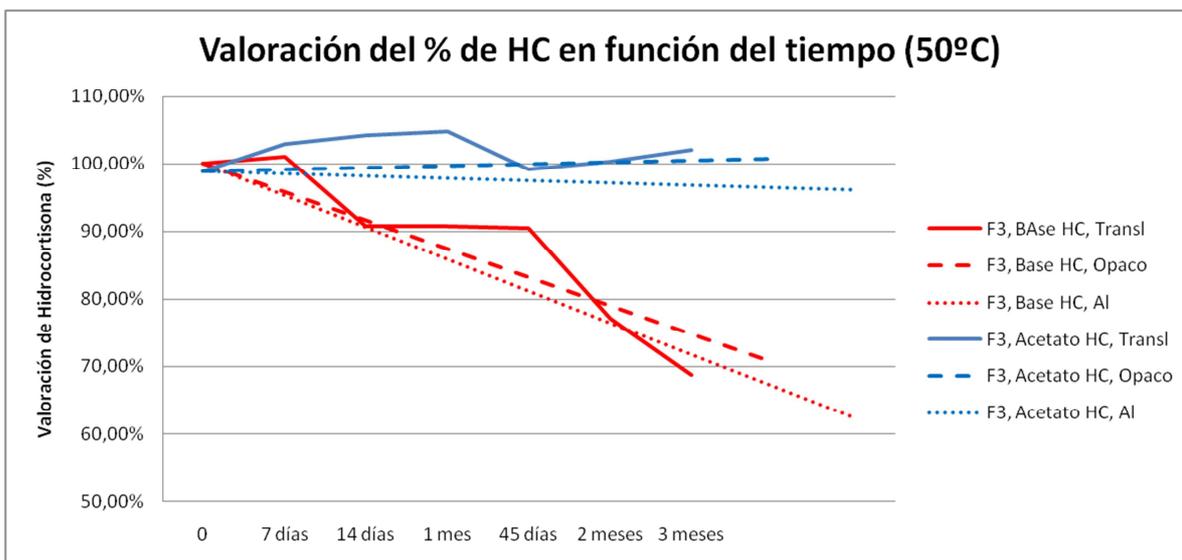


Figura 4.19.: Representación grafica correspondiente a la variación del % de hidrocortisona en función del tiempo para la **formulación 3** con **Acetato de hidrocortisona** e **hidrocortisona base**, y envasado en tres envases diferentes.

#### 4.4.6. Discusión

##### **4.4.6.1. Aspecto**

Para la formulación 1 en base crema y para la formulación 3 en base gel realizadas tanto con acetato de hidrocortisona así como hidrocortisona base a diferentes pH en el caso de la formulación 1, y en las siguientes condiciones de almacenamiento: 25 °C / 60%HR y 40 °C / 75%HR, y a todos los tiempos de muestra, se obtiene un aspecto correcto, acorde con las especificaciones establecidas para el producto acabado.

Para la formulación 2 en base crema se observa contaminación microbiana a partir del tercer mes de almacenamiento (no incluido) a todos los pH estudiados y solo en la condición de almacenamiento de 25 °C / 60% HR; de ahí que a esta condición no se pueda proseguir con los análisis planificados sobre todo de valoración de la riqueza del producto.

En general, en todas las muestras de las tres formulaciones (formulación 1, 2 y 3) almacenadas a 50 °C se observa un color amarillento y con cierta separación de fases.

Este fenómeno se considera normal a esta condición de almacenamiento puesto que se produce oxidación de la fase grasa de las formulaciones.

Este aspecto se hace más patente en las muestras envasadas en envases de aluminio.

Por lo tanto puede concluirse que tanto la formulación 1 como la formulación 3 mantienen las características relativas al aspecto intactas a lo largo del tiempo. En cambio no ocurre lo mismo con la formulación 2 en donde se produce contaminación microbiana.

#### **4.4.6.2. pH**

La formulación 1 en base crema con acetato de hidrocortisona es la que presenta más inestabilidad puesto que difícilmente mantiene el valor del pH conseguido a tiempo inicial. Esta observación ocurre tanto al pH 3.5 como a pH 5.5, en donde el valor de pH aumenta y disminuye en el tiempo respectivamente.

La formulación 1 en base crema con hidrocortisona base, por el contrario, si que mantiene las condiciones de pH iniciales en el tiempo.

La formulación 3 en base gel en general mantiene el pH inicial en el tiempo tanto con acetato de hidrocortisona como hidrocortisona base, aunque se aprecia una ligera mayor estabilidad con acetato de hidrocortisona.

Para la formulación 2 en base crema se observa contaminación microbiana a partir del tercer mes de almacenamiento (no incluido) a todos los pH estudiados y solo en la condición de almacenamiento de 25 °C / 60% HR; de ahí que a esta condición no se pueda proseguir con los análisis planificados y el pH por lo tanto no se haya podido determinar a lo largo del tiempo.

#### **4.4.6.3. Estudio de la riqueza / valoración de hidrocortisona**

Los resultados obtenidos en el estudio del ensayo de la cuantificación del principio activo hidrocortisona en las diferentes formulaciones se encuentran recogidos en los cuadros anteriormente expuestos.

En el caso de la formulación 1 los resultados obtenidos a la condiciones de almacenamiento de 25 °C / 60% Humedad relativa para los diferentes tiempos de estudio se encuentran dentro de los intervalos establecidos como límites (90-110%).

En el caso de las condiciones de almacenamiento de 40 °C / 75% humedad relativa, los resultados obtenidos son muy buenos ya que se encuentran dentro de los intervalos establecidos como límites (90-110%) y tan solo se observa una bajada significativa de hidrocortisona en el caso de la formulación con hidrocortisona base y a pH 3.5 (51%) a 12 meses. A destacar que los valores de hidrocortisona en la formulación con acetato de hidrocortisona permanecen inalterados a esta condición incluso a los 12 meses de estudio.

En el caso de las condiciones de almacenamiento de 50 °C, los resultados obtenidos, como era de suponer, presentan una bajada significativa de hidrocortisona durante los tres primeros meses de estudio a excepción de la formulación 1 con acetato de hidrocortisona a pH 5.5 que permanece inalterada.

En el caso de la formulación 2 los resultados obtenidos a la condiciones de almacenamiento de 25 °C / 60% Humedad relativa se han podido estudiar solo hasta los tres meses del estudio puesto que es cuando se detecta contaminación microbiana en todas las formulaciones. Hasta entonces, todos los resultados para los diferentes tiempos de estudio se encuentran dentro de los intervalos establecidos como límites (90-110%) a excepción de la formulación con acetato de hidrocortisona, pH 3.5 y en todos los diferentes envases escogidos para su almacenamiento.

En el caso de las condiciones de almacenamiento de 40 °C / 75% humedad relativa, los resultados obtenidos son muy buenos ya que se encuentran dentro de los intervalos establecidos como límites (90-110%) y tan solo se observa una bajada significativa de hidrocortisona en el caso de la formulación con hidrocortisona base y a los dos pH estudiados (3.5 y 5.5) a 12 meses. A destacar que los valores de hidrocortisona en la formulación con acetato de hidrocortisona permanecen inalterados a esta condición incluso a los 12 meses de estudio.

En el caso de las condiciones de almacenamiento de 50 °C, los resultados obtenidos, como era de suponer, presentan una bajada significativa de hidrocortisona durante los tres primeros meses de estudio a excepción de las formulaciones que se han conservado en envase translucido en donde la cantidad de hidrocortisona no ha bajado por debajo de los límites definidos (90-110%).

En el caso de la formulación 3 los resultados obtenidos a la condiciones de almacenamiento de 25 °C / 60% Humedad relativa para los diferentes tiempos de estudio se encuentran dentro de los intervalos establecidos como límites (90-110%).

En el caso de las condiciones de almacenamiento de 40 °C / 75% humedad relativa, los resultados obtenidos son muy buenos ya que se encuentran dentro de los intervalos establecidos como límites (90-110%) y tan solo se observa una bajada significativa de hidrocortisona en el caso de la formulación con hidrocortisona base (70%) a 12 meses. A destacar que los valores de hidrocortisona en la formulación con acetato de hidrocortisona permanecen inalterados a esta condición incluso a los 12 meses de estudio.

En el caso de las condiciones de almacenamiento de 50 °C, los resultados obtenidos, como era de suponer, presentan una bajada significativa de hidrocortisona durante los tres primeros meses de estudio principalmente en la formulación con hidrocortisona base. A destacar que las muestras correspondientes a la formulación 3 con acetato de hidrocortisona se mantienen estables en el tiempo

A destacar en general en todas las formulaciones y condiciones estudiadas, que el tipo de envase escogido no impacta en la riqueza que se encuentre en el producto

En todas las formulaciones se observa una alta dispersión en el valor de hidrocortisona obtenido. Esto es debido a que el tamaño del lote estudiado es muy pequeño y la homogeneidad del mismo no es la adecuada.

A pesar de ello, este estudio preliminar de estabilidad es muy válido para poder comparar entre las diferentes formulaciones y condiciones estudiadas.

## **CAPITULO 5: TECNOLOGÍA DE FABRICACIÓN INDUSTRIAL**

En el presente capítulo se procede a describir la tecnología de fabricación que se ha seguido a nivel industrial para dos de las tres formulaciones desarrolladas (emulsión y gel). En el caso de la espuma, esta formulación no llegó a escalarse a nivel industrial, debido a la dificultad en la búsqueda de la tecnología adecuada para elaborar los lotes industriales.

Para describir la tecnología de fabricación a nivel industrial, se presentan las guías de fabricación elaboradas en dicha fabricación industrial.

En concreto, se fabricaron dos lotes de la formulación en crema y dos lotes de la formulación en gel con una concentración de principio activo al 1%.

El tamaño de lote de la crema fue de 10 kg y el tamaño de lote del gel fue de 20 kg.

### **5.1. GUÍA DE FABRICACIÓN DE LA EMULSIÓN DE ACETATO DE HIDROCORTISONA**

A modo de ejemplo, se muestra la guía de fabricación correspondiente para el lote 1 de la crema al 1%.

<b>S D M</b>	<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: 12/05/06
Producto:	Sección: semisólidos	Lote: 1	Caducidad: --
Técnico responsable: <i>AAZ</i>	Observaciones: Crema 1%		Hoja: 1 de 7

### FÓRMULA DE FABRICACIÓN

Componentes	%	10.000,- g
Aceite de oliva	7,000	700,000 g
Almidon	3,000	300,000 g
Lanette N	2,500	250,000 g
Cetiol V	3,000	300,000 g
Dimetilpolisiloxano	0,500	50,000 g
Acetato de hidrocortisona	1,110	111,000 g
Metilparaben (no sódico)	0,180	18,000 g
Propilparabeno	0,020	2,000 g
EDTA	0,005	0,500 g
BHA	0,010	1,000 g
Etoxidiglicol	0,500	50,000 g
Agua desionizada c.s.p.	82,180	8218,000 g
<b>TOTAL</b>	<b>100,000</b>	<b>10.000,000 g</b>

#### PRECAUCIONES:

Para manejar la materia prima se debe:

- Utilizar mascarilla que cubra nariz y boca.
- Emplear gafas de protección ocular.
- Colocarse guantes.

En caso de contacto directo de dichos productos con la piel, lavarse con agua y jabón inmediatamente.

⊙ Controlar tiempo operación

✓T Verificar

Fecha:

Firmado:

<b>S D M</b>		<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: 12/05/08
Producto:	Sección: semisólidos	Lote: 1	Caducidad: --	
Técnico responsable: AAZ	Observaciones: Crema 1%		Hoja: 2 de 7	

**CONDICIONES PREVIAS**

	Comprobación	Firma
✓ Verificación de la limpieza de salas y maquinaria	<input checked="" type="checkbox"/>	Apels
✓ Pesada de materias primas y verificación etiquetas	<input checked="" type="checkbox"/>	Apels
✓ Presencia de la guía de fabricación	<input checked="" type="checkbox"/>	Apels
✓ Verificación de condiciones ambientales de la salas	<input checked="" type="checkbox"/>	Apels.

Código sala: Sala 30

Humedad relativa sala (%): ND Temperatura de la sala: ND

**EQUIPOS:**

Reactor de acero inoxidable  
Balanzas

 LACER, S.A.		MÁQUINA FRYMA	
ESPECIALIDAD PROCESADA CREMA SDM 0,17.		LOTE 2	
PRESENTACIÓN		FECHA FABRICACIÓN 11/05/08	
EFECTUADO POR: <u>AAZ</u>		FECHA: <u>11/05/08</u>	
VERIFICADO POR:		FECHA:	
<b>LIMPIO PUEDE UTILIZARSE</b>			

Ⓞ Controlar tiempo operación      ✓T Verif

Fecha:

Firmado:

<b>S D M</b>	<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: <u>12/05/06</u>
Producto:	Sección: semisólidos	Lote: <u>1</u>	Caducidad: --
Técnico responsable: <u>AAZ</u>	Observaciones: Crema 1%		Hoja: 3 de 7

**PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN:**

**a) PESADA DE MATERIAS PRIMAS**

En sala de pesadas, con balanza adecuada, pesar los componentes siguientes:

Componentes	P Teórico (g)	P Real (g)	Nº lote	Técnico
Aceite de oliva	700,000 g	700,8	2318-235	AAZ
Almidon	300,000 g	300,3	X752	AAZ
Lanette N	250,000 g	250,2	2313 X1016	AAZ
Cetiol V	300,000 g	299,9	X869	AAZ
Dimetilpolisiloxano	50,000 g	50,0	X754	AAZ
Acetato de hidrocortisona	111,000 g	111,1	DE16	AAZ
Metilparaben (no sódico)	18,000 g	18,0	X383	AAZ
Propilparabeno	2,000 g	2,0	23802	AAZ
EDTA	0,500 g	0,60	234102	AAZ
BHA	1,000 g	1,0	D204	AAZ
Etoxidiglicol	50,000 g	50,0	V1133	AAZ
Agua desionizada c.s.p.	8218,000 g			

✓ Verificar contenedores y etiquetas de las pesadas.

Modelo balanza: Delta range

Código balanza: DHBA 03

Fecha: 12/05/06

⊕ Hora inicio: 08:30

⊕ Hora final: 11:01

Firma: AAZ

⊕ Controlar tiempo operación

✓T Verificar

Fecha:

Firmado:

<b>S D M</b>	<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: <u>12/05/06</u>
Producto:	Sección: semisólidos	Lote: <u>1</u>	Caducidad: --
Técnico responsable: <u>AAU</u>	Observaciones: Crema 1%		Hoja: 4 de 7

Firma del verificador de pesadas: \_\_\_\_\_

**Observaciones en la fase de pesadas (excipientes y principio activo):**

**b) FASE DE PREPARACIÓN DE LA CREMA**

Fecha: 0915 12/05/06

⊕ Hora inicio: 0915

**Preparación de la fase acuosa**

1. Colocar en un reactor de acero inoxidable los siguientes componentes

<u>Componentes</u>	<u>Peso</u>	<u>Verificación</u>
Agua destilada	3500,000 g	<input checked="" type="checkbox"/> 3500,00 g
Almidon		<input checked="" type="checkbox"/>

Agitar con agitación de hélice.

Calentar hasta 90 °C con agitación de hélice.

Temperatura real: 84,5 °C

2. Cuando se alcance esta temperatura añadir los siguientes componentes:

<u>Componentes</u>	<u>Verificación</u>
Metilparaben	<input checked="" type="checkbox"/>
Propilparabeno	<input checked="" type="checkbox"/>

⊙ Controlar tiempo operación

✓T Verificar

Fecha:

Firmado:

<b>S D M</b>	<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: 12/05/06
Producto:	Sección: semisólidos	Lote:	Caducidad: --
Técnico responsable: <i>AAZ</i>	Observaciones: Crema 1%		Hoja: 5 de 7

~~Agitar con agitación lenta durante 10 minutos.~~

Tiempo de agitación real: \_\_\_\_\_ *emp. AAZ.*

Agitar con agitación rápida durante **15** minutos.

Tiempo de agitación real: 20 min

*Inicio 10:55.  
Final 11:15*

3. Transcurrido este tiempo comprobar que se ha formado el engrudo de almidón.
4. Si el engrudo es correcto dejar enfriar hasta llegar a una temperatura de 70 °C manteniendo la agitación lenta.
5. Añadir los siguientes componentes:

Componentes

Verificación

EDTA  
Dimetilpolisiloxano

Agitar durante 15 minutos con ~~la hélice a 300 rpm~~ *agitación rápida*

*Inicio = 11:25h.  
Final. 1140h*

Tiempo de agitación real: 15 min  
Temperatura real: 65,7 °C

**Preparación de la fase oleosa**

6. A parte mezclar los siguientes componentes:

Componentes

Verificación

*emp. AAZ*  
Aceite de oliva  
~~Etoxdiglicol~~ *Carboxe N*  
Cetiol V  
BHA

Calentar hasta 70 °C y agitar con agitación ~~de hélice~~ *rápida*  
Temperatura real: 71 °C

☉ Controlar tiempo operación

✓T Verificar

Fecha:

Firmado:

<b>S D M</b>	<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: <u>12/05/06</u>
Producto:	Sección: semisólidos	Lote: <u>1</u>	Caducidad: --
Técnico responsable: <u>AAR</u>	Observaciones: Crema 1%		Hoja: 6 de 7

7. Comprobar que la temperatura de la fase oleosa y la acuosa es de 70 °C y adicionar la fase oleosa sobre la acuosa con agitación rápida (1100 rpm) y dispersor, durante 10 minutos.

Tiempo de agitación real: 10 min.  
 Temperatura real: 70,2 °C

Inicio 11:45 h.  
 Final 11:55 h.

8. Añadir el resto de agua muy poco a poco con agitación de hélice.

Componentes	Peso	Verificación
Agua destilada	<u>3500,000 g</u> <u>2500,00g</u>	<input checked="" type="checkbox"/>

Inicio 12:00h  
 Final 12:10h.

**Preparación de la disolución de hidrocortisona.**

9. Dispersar los siguientes componentes a parte: con agitador de acero a 600rpm.

Componentes	Peso	Verificación
Acetato de Hidrocortisona		<input checked="" type="checkbox"/>
Etoxidiglicol		<input checked="" type="checkbox"/>
Agua destilada	<u>2218,000g</u> <u>2218,2g</u>	<input checked="" type="checkbox"/>

Inicio = 12:15h  
 Final = 12:30h

10. Cuando la emulsión esté a 40 °C, añadir la mezcla del paso 9 al reactor de acero inoxidable.

TA real 37,6 °C

11. Homogenizar durante 15 minutos (guardar parte del agua anterior para limpiar el vaso)

12. Analizar el producto según especificaciones.

13. Trasvasar el producto y envasar según la prueba a realizar.

⊕ Hora final: 14:10h

Peso final: ND

Firma del verificador de la pesada: ND

⊙ Controlar tiempo operación    ✓ T Verificar

Fecha:

Firmado:

Inicio 12:30h  
 Final: 12:45h

Dr. Ant. B...

Hacer el vacío a -800 mbar con agitador de ranuras  
Limpiar el producto a 25 °C con agitación (normal)

Inicio: 12:15  
 Final: 14:10

<b>S D M</b>	<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		<b>Fecha:</b> 12/05/106
<b>Producto:</b>	<b>Sección:</b> semisólidos	<b>Lote:</b> A	<b>Caducidad:</b> --
<b>Técnico responsable:</b> AAC	<b>Observaciones:</b> Crema 1%		<b>Hoja:</b> 7 de 7

**Observaciones en la fase de preparación de la crema:**

Ⓢ Controlar tiempo operación

✓T Verificar

Fecha:

Firmado:

El flujo del proceso de fabricación se presenta en la Figura 5.1.

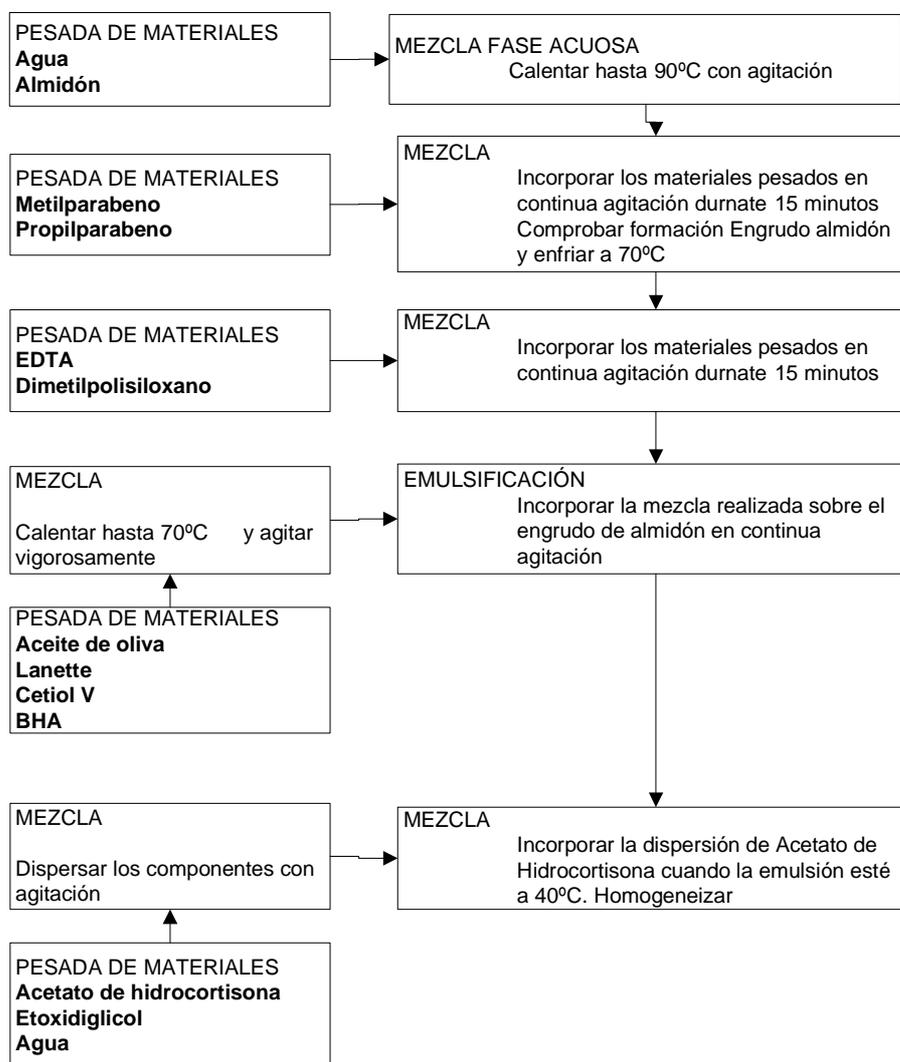


Figura 5.1. Flujo del proceso de fabricación de la emulsion con acetato de hidrocortisona.

## 5.2. GUÍA DE FABRICACIÓN DEL GEL DE ACETATO DE HIDROCORTISONA

A modo de ejemplo, se muestra la guía de fabricación correspondiente para el lote 1 del gel al 1%.

<b>S D M</b>		<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: <i>21/05/06</i>
Producto:	Sección: semisólidos	Lote: <i>2</i>	Caducidad: --	
Técnico responsable: <i>[Signature]</i>	Observaciones: Gel 1%		Hoja: 1 de 7	

### FÓRMULA DE FABRICACIÓN

Componentes	%	20.000,- g
Polisorbato 80	0,400	80,000 g
Trietanolamina	0,250	50,000 g
Carbopol 934	0,500	100,000 g
Acetato de hidrocortisona	1,110	222,000 g
Metilparaben	0,180	36,000 g
Propilparabeno	0,020	4,000 g
EDTA	0,001	0,100 g
BHA	0,010	2,000 g
Agua desionizada c.s.p.	97,529	19.505,800
<b>TOTAL</b>	<b>100,000</b>	<b>20.000,000 g</b>

#### PRECAUCIONES:

Para manejar la materia prima se debe:

- Utilizar mascarilla que cubra nariz y boca.
- Emplear gafas de protección ocular.
- Colocarse guantes.

En caso de contacto directo de dichos productos con la piel, lavarse con agua y jabón inmediatamente.

☉ Controlar tiempo operación

✓T Verificar

Fecha:

Firmado:

<b>S D M</b>	<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: 11/05/06
Producto:	Sección: semisólidos	Lote: 2	Caducidad: --
Técnico responsable: AAC	Observaciones: Gel 1%		Hoja: 2 de 7

### CONDICIONES PREVIAS

	Comprobación	Firma
✓ Verificación de la limpieza de salas y maquinaria	✓	Angel
✓ Pesada de materias primas y verificación etiquetas	✓	Angel
✓ Presencia de la guía de fabricación	✓	Angel
✓ Verificación de condiciones ambientales de la salas	✓	Angel

Código sala: SALA 21

Humedad relativa sala (%): Ni Temperatura de la sala: 22,2 °C

### EQUIPOS:

Reactor de acero inoxidable  
Balanzas

 LACER, S.A.		MÁQUINA
Especialidad procesada		LOTE
Gel SDM 1%		1
PRESENTACIÓN	FECHA FABRICACIÓN	
	10/05/06	
EFFECTUADO POR: AAC	FECHA: 11/05/06	
VERIFICADO POR:	FECHA:	
<b>LIMPIO PUEDE UTILIZARSE</b>		

© Controlar tiempo operación

✓T Verificar

Fecha:

Firmado:

<b>S D M</b>	<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: <i>MAY 10 G.</i>
Producto:	Sección: semisólidos	Lote: <i>2</i>	Caducidad: --
Técnico responsable: <i>AA</i>	Observaciones: Gel 1%		Hoja: 3 de 7

**PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN:**

**a) PESADA DE MATERIAS PRIMAS**

En sala de pesadas, con balanza adecuada, pesar los componentes siguientes:

Componentes	P Teórico (g)	P Real (g)	Nº lote	Técnico
Polisorbato 80	80,000 g	<i>80,02</i>	<i>X-1376</i>	<i>Ampel</i>
Trietanolamina	50,000 g	<i>50,1</i>	<i>ND</i>	<i>Ampel</i>
Carbopol 934	100,000 g	<i>100,00</i>	<i>N27</i>	<i>Ampel</i>
Acetato de hidrocortisona	222,000 g	<i>222,05</i>	<i>P216</i>	<i>Ampel</i>
Metilparaben	36,000 g	<i>36,02</i>	<i>X-303</i>	<i>Ampel</i>
Propilparabeno	4,000 g	<i>4,0</i>	<i>23802</i>	<i>Ampel</i>
EDTA	0,100 g	<i>0,102</i>	<i>T-573</i>	<i>Ampel</i>
BHA	2,000 g	<i>2,056</i>	<i>D204</i>	<i>Ampel</i>
Agua desionizada c.s.p.	19.505,800 g			

✓ Verificar contenedores y etiquetas de las pesadas.

Modelo balanza: *ND* Código balanza: *ND*

Fecha: *ND*

⊙ Hora inicio: *ND* ⊙ Hora final: *ND*

Firma: *ND*

Firma del verificador de pesadas: *ND*

**Observaciones en la fase de pesadas (excipientes y principio activo):**

⊙ Controlar tiempo operación

✓T Verificar

Fecha:

Firmado:

<b>S D M</b>	<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: <u>11/07/06</u>
Producto:	Sección: semisólidos	Lote: <u>2</u>	Caducidad: --
Técnico responsable: <u>AAU</u>	Observaciones: Gel 1%		Hoja: 4 de 7

**b) FASE DE PREPARACIÓN DEL GEL**

Fecha: 11/07/06

Ⓞ Hora inicio: 09:00

1. Colocar en un recipiente los siguientes componentes

<u>Componentes</u>	<u>Peso</u>	<u>Verificación</u>
Agua destilada c.s.p.	2.000 g	<input checked="" type="checkbox"/>
Calentar hasta 70-75 °C	<u>2000g</u>	
Temperatura real: <u>71°C</u>		

2. Añadir los siguientes componentes:

<u>Componentes</u>	<u>Verificación</u>
Metilparaben	<input checked="" type="checkbox"/>
Propilparabeno	<input checked="" type="checkbox"/>

3. Colocar en el reactor Multi-homo Brogli el siguiente componente

<u>Componentes</u>	<u>Peso</u>	<u>Verificación</u>
Agua destilada c.s.p.	15.000 g	<input checked="" type="checkbox"/>
	<u>15000g</u>	

4. Añadir los siguientes componentes:

<u>Componentes</u>	<u>Verificación</u>
Solución paso 2	<input checked="" type="checkbox"/>
Carbopol 934	<input checked="" type="checkbox"/>

Ⓞ Controlar tiempo operación

✓T Verificar

Fecha:

Firmado:

<b>S D M</b>	<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: <u>11/05/13</u>
Producto:	Sección: semisólidos	Lote: <u>2</u>	Caducidad: --
Técnico responsable: <u>AA</u>	Observaciones: Gel 1%		Hoja: 5 de 7

Agitar durante 15 minutos con la hélice a velocidad 2.

Hora inicio: 09:45  
 Hora final: 10:00  
 Tiempo de agitación real: 15 min  
 Temperatura de la dispersión: 24,4 °C

5. Dejar reposar durante 3 horas para que se humecte.

Hora inicio: 10:00 h  
 Hora final: 13:05 h  
 Tiempo de reposo real: 3 horas

6. Espesar con el siguiente componente:

Componentes

Verificación

Trietanolamina 10 N



Agitar durante 15 minutos a velocidad 2.

Inicio agitación: 13:05 h  
 Final agitación: 13:25

Mirar el pH en caso de que no esté entre 5 y 6 añadir:

Control pH: 5,35

Componentes

Verificación

Trietanolamina 10 N



⊙ Controlar tiempo operación

✓T Verificar

Fecha:

Firmado:

<b>S D M</b>		<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: <u>M10T106</u>
Producto:	Sección: semisólidos	Lote: 2	Caducidad: --	
Técnico responsable: <u>AAU</u>	Observaciones: Gel 1%		Hoja: 6 de 7	

7. En 50 g de agua añadir el EDTA. Agitar hasta total disolución y añadir al reactor.

Componentes

Verificación

EDTA  
Agua purificada



Inicio agitación: 13:30h  
Final agitación: 13:45h  
Tiempo de agitación real: 15 min

8. Añadir al reactor la mezcla del punto 7, agitar 15 minutos.

Inicio agitación: 13:45h  
Final agitación: 14:00h  
Tiempo de agitación real: 15 min *por AAU.*

9. Disolver los siguientes componentes a parte, agitar.

Componentes

Verificación

BHA  
Polisorbato 80



10. Añadir la mezcla del paso 9 al reactor de acero inoxidable. Agitar con agitación de hélice 15 minutos a velocidad 2.

Inicio agitación: 13:45h  
Final agitación: 14:00h  
Tiempo de agitación real: 15 min

⊙ Controlar tiempo operación

✓T Verificar

Fecha:

Firmado:

<b>S D M</b>	<b>GUÍA DE FABRICACIÓN</b>		Fecha: <u>11/05/06</u>
Producto:	Sección: semisólidos	Lote: <u>2</u>	Caducidad: --
Técnico responsable: <u>AA</u>	Observaciones: Gel 1%		Hoja: 7 de 7

11. Dispersar los siguientes componentes a parte, con agitación de ancla. ~ 750 rpm

Componentes	Peso	Verificación
Acetato de Hidrocortisona		<input checked="" type="checkbox"/>
Agua destilada	2000,00 g	<input checked="" type="checkbox"/>
Recuperar con 505,00 g de agua		<input checked="" type="checkbox"/>

12. Añadir la mezcla del paso 10 al reactor de acero inoxidable y agitar 15 minutos a velocidad 2.

Inicio agitación: 14:05  
 Final agitación: 14:20  
 Tiempo de agitación real: 15 min

13. Conectar la bomba de vacío (-0,9 bars).

14. Analizar el producto según especificaciones.

15. Trasvasar el producto y envasar según la prueba a realizar.

⊙ Hora final: 15:15 h

Peso final: ND

Firma del verificador de la pesada: ND

**Observaciones en la fase de preparación del gel:**

⊙ Controlar tiempo operación

✓T Verificar

Fecha:

Firmado:

El flujo del proceso de fabricación se presenta en la figura 5.2.

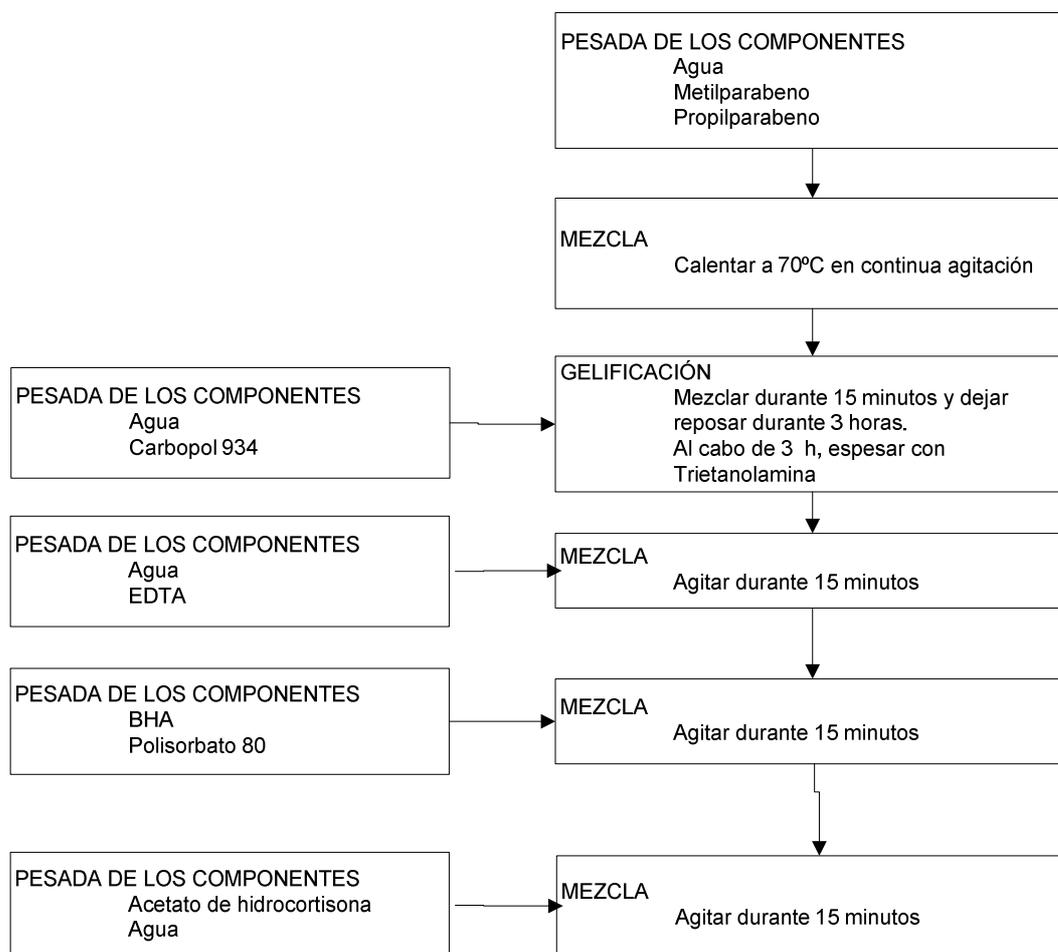


Figura 5.2. Flujo del proceso de fabricación del gel con acetato de hidrocortisona.



## **CAPÍTULO 6: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO HPLC FASE REVERSA INDICADOR DE ESTABILIDAD PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ACETATO DE HIDROCORTISONA, PROPILPARAHIDROXIBENZOICO, METILPARAHIDROXIBENZOICO, BUTILHIDROXIANISOL (BHA) Y SUS PRODUCTOS DE DEGRACIÓN EN UNA FORMULACIÓN EN GEL PARA APLICACIÓN RECTAL**

Se ha puesto a punto una nueva metodología analítica por HPLC para la cuantificación de acetato de hidrocortisona, propilparahidroxibenzoico, metilparahidroxibenzoico, butilhidroxianisol y productos de degradación del acetato de hidrocortisona, con el objetivo de utilizar dicha metodología en los estudios de estabilidad y control de calidad. Para su uso en condiciones GMP, es necesario y obligado proceder a su correcta validación.

### **6.1. INTRODUCCIÓN**

La validación se define como el establecimiento documentado de evidencias que proporcionen un alto grado de confianza de que un proceso específico produce consistentemente un producto que cumple con sus predeterminadas especificaciones y atributos de calidad y las seguirá produciendo en el futuro si se mantienen sus parámetros de trabajo (59). También se puede definir como la obtención de pruebas convenientemente documentadas, demostrativas que un método de fabricación o control, es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos (60).

Una definición más específica de una validación analítica (61), indica que es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos.

Los requisitos previos al inicio de una validación analítica consiste en trabajar según las normas correspondientes a las Buenas Prácticas de Laboratorio; por otro lado el procedimiento analítico a validar ha de estar bien desarrollado, probado y documentado

para asegurarse que la validación a realizar será satisfactoria al final de su estudio. También se ha de tener en cuenta que los instrumentos que se utilizan para el desarrollo de la metódica analítica y posterior validación de la misma, han de estar cualificados y calibrados. Por otro lado, el personal encargado de realizar dicha validación, ha de estar formado, es decir, ha de saber perfectamente la importancia que tiene la realización de cualquier tipo de validación. Por último, pero no menos importante, es la descripción de un protocolo de validación previo al inicio de la misma y en el que se hará constar todo lo que se desarrollará posteriormente en el estudio de validación. Este protocolo es también conocido como Plan Máster de Validación (61).

Sin embargo, antes de adentrarse en la realización del estudio de validación y en el desarrollo de los distintos parámetros a estudiar, es importante hacer algunas reflexiones acerca de la importancia de la validación. Una de las preguntas a realizar es por qué se ha de validar un método analítico. La primera respuesta que se tendría es que este método validado cumple con las exigencias legales tanto del registro de medicamentos como de las BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio), con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto. Sin embargo, la respuesta ha de ir más lejos y pensar que la razón de porqué validamos es para obtener más información del método en estudio y así obtener información de la fiabilidad de los resultados obtenidos, es decir, si no existe fiabilidad es imposible asegurar que el medicamento cumple con las especificaciones exigidas y por lo tanto su calidad es adecuada. Por otro lado si un método está validado se minimiza el número de fallos y repeticiones, permitiendo así un importante ahorro de costes (61).

Otra reflexión importante a realizar es cuándo se ha de validar y qué se ha de validar. Un método analítico se ha de validar después de haber sido desarrollado y probado y, de esta forma, tener un conocimiento previo de él y antes de ser utilizado en rutina. Por ello en el desarrollo previo es recomendable llevar a cabo el estudio de robustez (61) para garantizar la bondad del procedimiento analítico que se quiere validar. Por otro lado se ha de validar todo aquel método que de forma rutinaria vaya a ser utilizado para la determinación de alguna de las especificaciones marcadas para dicho medicamento o materia prima. Estos métodos se pueden clasificar de la siguiente forma:

- Ensayos de identificación
- Ensayos para la determinación del analito de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica.
- Ensayos para la determinación de características farmacotécnicas inherentes (Ej. ensayo de disolución).
- Ensayos de límites de impurezas y cuantificación de las mismas.
- Ensayos para la determinación de analitos en fluidos biológicos y en productos naturales.
- Ensayos microbiológicos

Para realizar la validación se han de seguir las pautas marcadas bien por la USP 36 (62) o bien por las ICH (63-64) que estarán descritas en el protocolo de validación. Si bien son directrices que no describen específicamente como realizar cada uno de los parámetros a estudiar, ni tampoco los límites a tener en cuenta, son directrices que van encaminadas a marcar el número de muestras a analizar para cada parámetro dejando la puerta abierta en cuanto a cómo se han de preparar estas muestras. Debido a que ninguna de las directrices nombradas anteriormente especifica los límites que han de cumplir los parámetros a estudiar, estos se marcan según el sistema de calidad implantado en el laboratorio. Sin embargo la mayoría de laboratorios intentan seguir unos criterios comunes y de esta forma uniformizar los límites establecidos.

Por último decir que el estudio de validación realizado está en vigor, bien hasta que se realice alguna modificación en el método, bien hasta que se cumpla el plazo de validez establecido en el protocolo o plan de validación.

Todas estas reflexiones ponen de manifiesto la importancia que tiene el estudio de validación de un método analítico.

En el desarrollo de un nuevo método analítico (como es el caso) y posterior validación, se han de seguir una serie de fases, fases que si bien no vienen descritas en ninguna guía, se describen a continuación en el orden que parece más lógico:

a) Características de practicabilidad

A la hora de desarrollar un método se ha de tener muy en cuenta estas características, características que evalúan la posibilidad de implementación en rutina del método analítico. Dichas características se refieren por ejemplo al tiempo de elución, coste, tamaño de la muestra necesaria, equipos, cualificación del personal, condiciones de seguridad, etc. Si estas características no se tienen en cuenta, el desarrollo de la metódica analítica para posteriormente aplicarla en rutina, pierde el sentido.

b) Estudios de estabilidad de la muestra (61)

Otra de las fases previas al inicio del estudio de validación y que se estudia durante el desarrollo de la metódica es la estabilidad de las diferentes soluciones que se preparan y que forman parte de la metódica de estudio. Al desarrollar este estudio se obtiene una información muy valiosa en cuanto al tiempo que las diferentes soluciones preparadas pueden permanecer inalteradas, antes de considerarlas como no aptas. Esta información ha de quedar reflejada en el protocolo de análisis de la metódica analítica definitiva.

c) Características de idoneidad (65)

La idoneidad es otro parámetro a tener en cuenta en el desarrollo de un método analítico. Las características de idoneidad, se refieren a un conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde a los requisitos fijados y que se han de mantener a lo largo del uso de la metódica analítica. Para definir estas características, se usa el estudio de robustez (60), que por una parte se utiliza para optimizar el método y por otra parte para ver la criticidad del valor de los parámetros antes de validar. Estas características de idoneidad quedan recogidas dentro del ensayo de idoneidad o “system suitability test”.

d) Características de fiabilidad

La última fase a tener en cuenta se refiere a las características de fiabilidad, características que muestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación: selectividad, linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad, criterios que dan pie a los diferentes

parámetros de validación (61). La selectividad determina la capacidad de un método para determinar el analito sin interferencias de ningún tipo. La linealidad e intervalo dan información sobre la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta obtenida. Otro parámetro fundamental de la validación es la precisión, que informa de la dispersión que existe entre los resultados obtenidos alrededor del valor central o valor medio. Muy relacionado con la precisión, se encuentra la exactitud, que expresa la diferencia entre el valor hallado en el análisis y el valor teórico o verdadero. El último criterio fundamental de la validación es la sensibilidad del método, que está relacionada con la cantidad mínima de analito requerida para obtener un resultado significativo (61).

A partir de aquí se desarrollan los diferentes parámetros de validación que dependen del tipo de ensayo que se quiera validar. En este aspecto, tanto la USP 36 (62) como las ICH Q2A (63) clasifican estos ensayos en diferentes categorías y en función de estas categorías se definen los diferentes parámetros a realizar, necesarios para cada uno de los ensayos. Según la USP 36 (62), los métodos de análisis se pueden dividir en 4 categorías para cada una de las cuales se realizarán unos u otros parámetros de validación (Cuadro 6.1.). La categoría 1 se refiere a los métodos de análisis para la cuantificación de componentes mayoritarios (ya sean principios activos o conservantes), tanto en materia prima como en el producto farmacéutico final. En la categoría 2 quedan incluidos aquellos métodos analíticos destinados a la determinación de impurezas y productos de degradación, tanto en materia prima como en producto acabado. Dentro de esta categoría se incluye tanto los ensayos de cuantificación, como los ensayos de test límite. En la categoría 3 se incluye todos aquellos métodos destinados a la realización de pruebas de comportamiento galénico. Por último, la categoría 4 se refiere a los ensayos destinados exclusivamente a la identificación de cualquier componente.

CATEGORÍAS					
PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	Categoría 1	Categoría 2		Categoría 3	Categoría 4
		Cuantitativo	Test límite		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite Detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO
Robustez	SI	SI	SI	SI	SI

Cuadro 6.1.: Clasificación de las diferentes categorías y parámetros de validación según la USP 36 (62).

\* Puede ser necesario en función de la naturaleza del ensayo.

Según queda descrito en las guías ICH Q2A (63), los métodos analíticos se dividen en 3 categorías. Una primera categoría de ensayos de identificación, una segunda categoría que incluye la determinación de impurezas y productos de degradación que al igual que en lo descrito en la USP 36 se subdivide en ensayos cuantitativos y test límite. La última categoría incluye todos los ensayos de valoración ya sea de contenido de un ensayo de disolución. Al igual que sucede en lo descrito en la USP 36, para cada uno de estos ensayos se determinan los parámetros de validación necesarios según queda reflejado en el cuadro 6.2.

PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	Identificación	Impurezas		Valoración -Disolución -Contenido
		Cuantitativo	Test límite	
Exactitud	NO	SI	NO	SI
Precisión				
Repetibilidad	NO	SI	NO	SI
Precisión intermedia	NO	SI	NO	SI
Selectividad	SI	SI	SI	SI
Límite Detección	NO	*	SI	NO
Límite cuantificación	NO	SI	NO	NO
Linealidad	NO	SI	NO	SI
Intervalo	NO	SI	NO	SI

Cuadro 6.2. Clasificación de las categorías de los ensayos y parámetros de validación según las ICH.

\* Puede ser necesario en función de la naturaleza del ensayo.

El método desarrollado para realizar el ensayo de valoración del principio activo, conservantes, antioxidantes y productos de degradación en el producto acabado, se ha validado con el fin de que sea adecuado como método de control de calidad rápido y fiable.

Asimismo, este método se ha desarrollado para ser utilizado en el estudio de estabilidad (capítulo 8) que se lleva a cabo con los dos lotes fabricados a escala piloto (20 kg) y para ser utilizados en el departamento de control de calidad de forma rutinaria para el control de los lotes fabricados a escala industrial por lo que son métodos utilizados para el control del producto acabado que se desarrolla en el capítulo 7.

Dichos métodos han de cumplir con todo lo explicado con anterioridad, demostrando así las características de practicabilidad, idoneidad y fiabilidad, asegurando de esta forma que los resultados obtenidos cada vez que se utilicen estos métodos, son correctos, asegurando así que el medicamento cumple con las especificaciones exigidas y por lo tanto su calidad es la adecuada. Dichas

validaciones se realizan según lo descrito en las guías ICH (63-64), en el capítulo de validación de la USP 36 (62).

## **6.2. METODOLOGÍA**

### **6.2.1. Desarrollo del método analítico**

Para el desarrollo de la metodología analítica propuesta por cromatografía líquida de alta resolución, se utilizan diferentes disolventes orgánicos como son el acetonitrilo y metanol, y diferentes soluciones reguladoras a partir de las cuales se podrá establecer cual es la mejor fase móvil para separar todos los compuestos. Además también se utilizan diferentes columnas cromatográficas que permitirán obtener el mejor método posible.

En concreto se ha usado un sistema cromatográfico líquido de alta resolución Hewlett-Packard 1200 (Agilent Technologies) con un horno para columnas (G1316A), una bomba cuaternaria (G1311A), un inyector automático (G1329A) y un detector DAD (G1315D) el cual se establece a una longitud de onda de 290 nm para el BHA y de 240 nm para el resto de los componentes. La adquisición de datos se lleva a cabo usando el paquete de software cromatográfico (Chemstation versión Rev.A.08.03[847]). Los resultados se tratan estadísticamente utilizando como herramienta el paquete estadístico Microsoft Excel 2000.

El Metanol, acetonitrilo y agua usado son de calidad HPLC y comprado en Panreac-Química S.A., Barcelona, España. El ácido ortofosfórico para análisis se ha comprado también en Panreac Química S.A., Barcelona, España. El agua ultrapurificada ha sido elaborada por un sistema Purelab system de Gradient A10 Milipore.

Los reactivos usados para el estudio del test de stress del principio activo (HCl 0.1N, NaOH 0.1N, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33% v/v) y permanganato potásico 0.1M) eran de grado analítico suministrados por Roig Farma S.A. (Barcelona, España) y Panreac-Química S.A. (Barcelona, España).

El lote de acetato de hidrocortisona utilizado para el desarrollo del estudio es el 1001223464 suministrado por el laboratorio farmacéutico Sanofi Aventis (Barcelona, España), el cual ha sido trazado con un patrón de referencia estándar lote 8.0 European Pharmacopoeia. El lote de metilparahidroxibenzoico utilizado para el desarrollo del estudio es el L10020306 suministrado por Fagron (Barcelona, España), el cual ha sido trazado con un patrón de referencia estándar lote 3.0 European Pharmacopoeia. El lote de propilparahidroxibenzoico utilizado para el desarrollo del estudio es el 0802140 suministrado por Fagron (Barcelona, España), el cual ha sido trazado con un patrón de referencia estándar lote 3.0 European Pharmacopoeia. El lote de BHA utilizado para el desarrollo del estudio de validación es el L10060351 suministrado por Fagron (Barcelona, España), el cual ha sido trazado con un patrón de referencia estándar lote 3.2 European Pharmacopoeia.

Las impurezas y productos de degradación utilizados son los siguientes: hidrocortisona trazado con un patrón de referencia estándar lote 8.1 European Pharmacopoeia, Cortisona lote 630 LGC European Pharmacopoeia, prednisolona acetato trazado con un patrón de referencia estándar lote 3.1 European Pharmacopoeia y cortisona acetato trazado con un patrón de referencia estándar 5.2 European Pharmacopoeia.

La preparación farmacéutica contiene un 1.11% de acetato de hidrocortisona, 0.02% de propilparahidroxibenzoico, 0.18% de metilparahidroxibenzoico y 0.01% de butilhidroxianisol. El resto de los excipientes del gel son: carbopol 934, polisorbato 80, trietanolamina y EDTA. El placebo para el estudio de validación, se prepara con dichos excipientes.

La separación cromatográfica del principio activo, conservantes y antioxidante, así como de los productos de degradación fue llevada a cabo usando una columna Zorbax SB- Phenyl de 150 mm x 4.6 mm i.d., de 5µm de tamaño de partícula y acero inoxidable. La fase móvil consiste en metanol calidad HPLC (solvente A), acetonitrilo calidad HPLC (solvente B) y agua calidad HPLC (solvente C) se introdujo mediante un programa de gradiente (Cuadro 6.3.).

Tiempo (min)	Solvente A %	Solvente B %	Solvente C %
0.0	25.0	15.0	60.0
15.0	25.0	15.0	60.0
20.0	20.0	20.0	60.0
30.0	20.0	20.0	60.0
35.0	25.0	15.0	60.0
45.0	25.0	15.0	60.0

Cuadro 6.3.: Programa del gradiente usado en el método cromatográfico.

Se prepara una fase móvil para las muestras. Cada litro de fase móvil para las muestras contiene un 20% de agua calidad HPLC y un 80% de acetonitrilo calidad HPLC.

Tanto el metanol, el acetonitrilo como el agua se degasificaron mediante filtración a través de un filtro de membrana GH de 0.45  $\mu\text{m}$ . El flujo fue de 1.5 ml  $\text{min}^{-1}$ . El detector DAD trabajó a una longitud de onda de 290 nm para el BHA y de 240 nm para el resto de componentes. El volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{l}$ . Durante el análisis, la columna fue equilibrada a 40  $^{\circ}\text{C}$ . Cada determinación requiere 45 minutos.

Se prepara una única **solución de referencia** con todos los analitos en estudio. Según se esquematiza en la figura 6.1., para ello se pesa la cantidad correspondiente de cada uno de ellos, disolviendo en fase móvil para muestras. La preparación específica individual para cada analito se detalla a continuación si bien al final sólo quedará una única solución de referencia.

Para preparar la solución de referencia del acetato de hidrocortisona a una concentración final teórica de 220  $\mu\text{g/ml}$ , se pesan 22 mg de acetato de hidrocortisona y se llevan a un matraz de 100ml. Se disuelven mediante sonicación durante 5 minutos en unos 80 ml de fase móvil para muestras. Se deja enfriar y se enrasa a 100 ml con más fase móvil.

Para preparar la solución de referencia del metilparahidroxibenzoico a una concentración final teórica de 180  $\mu\text{g/ml}$ , se pesan 18 mg de metilparahidroxibenzoico y se llevan a un matraz de 100 ml. Se disuelven mediante sonicación durante 5 minutos en

unos 80 ml de fase móvil para muestras. Se deja enfriar y se enrasa a 100 ml con más fase móvil.

Para preparar la solución de referencia del propilparahidroxibenzoico a una concentración final teórica de 20  $\mu\text{g/ml}$ , se pesan 20 mg de propilparahidroxibenzoico y se llevan a un matraz de 100ml. Se disuelven mediante sonicación durante 5 minutos en unos 80 ml de fase móvil para muestras. Se deja enfriar y se enrasa a 100 ml con más fase móvil. De esta solución, se toman 10 ml y se diluyen hasta 100 ml con más fase móvil para muestras.

Para preparar la solución de referencia del butilhidroxianisol a una concentración final teórica de 10  $\mu\text{g/ml}$ , se pesan 10 mg de butilhidroxianisol y se llevan a un matraz de 100ml. Se disuelven mediante sonicación durante 5 minutos en unos 80 ml de fase móvil para muestras. Se deja enfriar y se enrasa a 100 ml con más fase móvil. De esta solución, se toman 10 ml y se diluyen hasta 100 ml con más fase móvil para muestras.

Finalmente, para preparar la solución de referencia de los productos de degradación conocidos a una concentración final teórica de cada impureza de 2  $\mu\text{g/ml}$ , se pesan 10 mg de hidrocortisona, cortisona, acetato de prednisolona y acetato de cortisona, y se llevan a un matraz de 50ml. Se disuelven mediante sonicación durante 5 minutos en unos 40 ml de fase móvil para muestras. Se deja enfriar y se enrasa a 50 ml con más fase móvil.

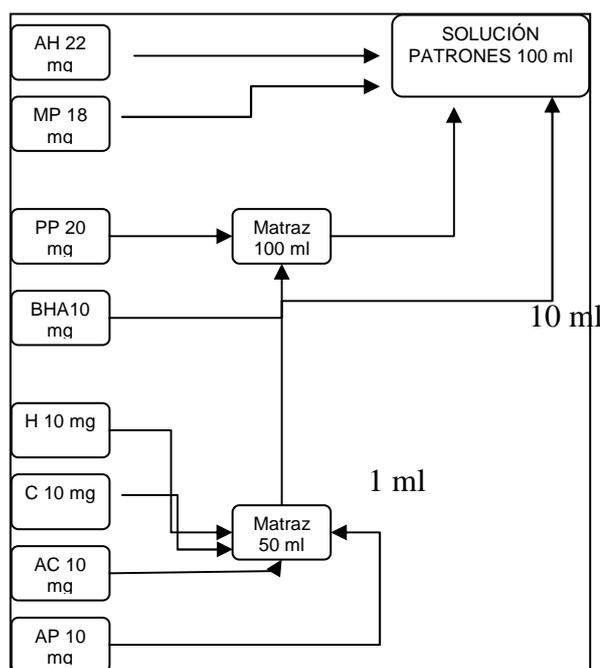


Figura 6.1. Resumen de la preparativa de la solución de referencia.

Tras obtener la solución de referencia, se toma una proporción y se filtra por filtros de membrana de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$ . La solución filtrada se transfiere a un vial para HPLC. Cada una de las soluciones preparadas se inyecta por duplicado en el cromatógrafo y se registran los correspondientes gráficos.

Para la determinación de la riqueza del gel a una concentración de 1.11% de acetato de hidrocortisona, se pesa aproximadamente la cantidad de 10 g del producto acabado. Dicha cantidad se transfiere a un matraz de 100 ml y se disuelve mediante sonicación durante 15 minutos en unos 80 ml de fase móvil para muestras, a continuación agitación magnética durante 45 minutos. Se enrasa con más fase móvil. Se toma una proporción de la solución preparada y se filtra por filtros de membrana de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$ . La solución filtrada se transfiere a un vial para HPLC y se inyecta por duplicado en el cromatógrafo registrándose los correspondientes gráficos. Esta solución sirve para la cuantificación de los conservantes, antioxidantes y productos de degradación.

Para la determinación del acetato de hidrocortisona, de esta solución, se toman 2 ml y se diluyen hasta 10 ml con más fase móvil para muestras. Se toma una proporción de la solución preparada y se filtra por filtros de membrana de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$ . La solución filtrada se transfiere a un vial para HPLC y se inyecta por duplicado en el cromatógrafo.

En la figura 6.2. se muestra un cromatograma representativo con todos los componentes posibles (principio activo, conservantes, antioxidante y productos de degradación), en donde se puede apreciar los picos bien separados de los diferentes componentes.

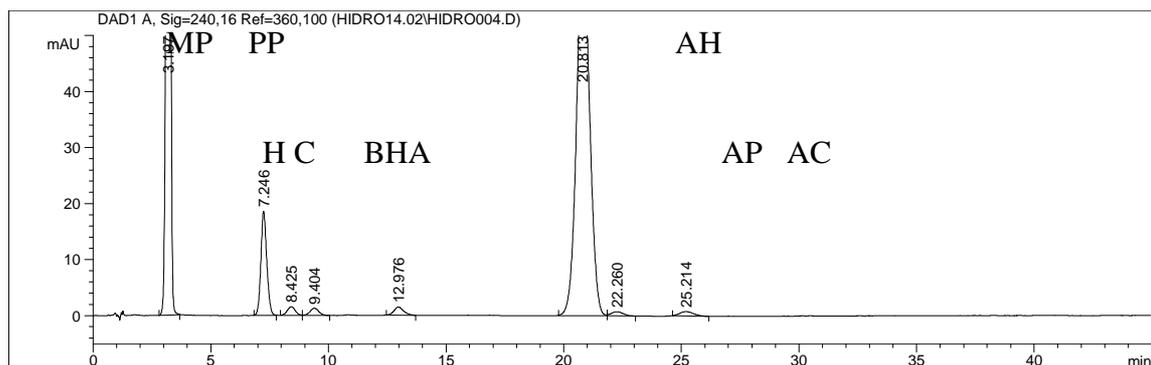


Figura 6.2.: Cromatograma representativo obtenido del estudio de idoneidad del sistema, en donde conservantes, antioxidante y productos de degradación aparecen junto con el principio activo. Metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico, hidrocortisona, cortisona, BHA, acetato de hidrocortisona, acetato de prednisolona, acetato de cortisona aparecen a 2.836, 6.118, 7.261, 7.854, 10.589, 17.520, 18.518 y 21.293 minutos respectivamente.

### 6.2.2. Definición de los parámetros de validación.

#### Selectividad

Capacidad para medir exacta y específicamente sin interferencias de impurezas de síntesis, productos de degradación, sustancias relacionadas, disolventes o excipientes que pueden estar presentes en la muestra.

#### Linealidad

Capacidad de un procedimiento analítico para obtener, dentro de un intervalo determinado, resultados directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra.

## Precisión

Es el parámetro que expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas obtenidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc) de aquí la importancia del estudio de precisión (60).

La precisión engloba diferentes tipos de estudios:

### *Repetitibilidad del sistema instrumental*

Capacidad del instrumento para reproducir sus propias medidas. Relacionado con el grado de precisión del instrumento. Se demuestra con resultados de inyecciones consecutivas de la misma muestra.

### *Repetitibilidad del método*

Grado de precisión entre los resultados individuales del ensayo, realizado repetidamente sobre una muestra homogénea. Cada uno de los resultados individuales obtenidos procede un análisis completo. Se demuestra con inyecciones consecutivas de diferentes muestras, según se indica en el método de valoración.

### *Precisión intermedia*

Grado de precisión de los datos obtenidos por un mismo analista en diferentes días y por analistas diferentes. Se comprueba con inyecciones consecutivas de muestras preparadas desde un principio en diferentes días por un mismo analista e inyecciones de muestras preparadas por dos analistas diferentes.

### *Exactitud*

Capacidad del sistema para ofrecer resultados próximos al verdadero. Es una medida del rigor del método analítico y refleja los posibles errores sistemáticos del método. Con este parámetro se establece la capacidad de recuperación del principio activo en la forma farmacéutica en solución que presenta la metodología analítica aplicada.

### *Intervalo de análisis*

Intervalo máximo y mínimo de concentración del analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones máximas y mínimas), dentro del cual se demuestran los criterios de precisión, exactitud y linealidad, verificando que el método analítico funciona correctamente.

### *Robustez*

Grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos en el análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones normales. Se expresa como la falta de influencia de las variables operacionales sobre los resultados. Los resultados obtenidos bajo diferentes condiciones se han de poder relacionar entre sí (son diferencias estadísticamente significativas).

### *Idoneidad del sistema*

Comprobación efectuada en un sistema cromatográfico para verificar que la resolución y la reproducibilidad del sistema es la adecuada para el análisis que se realiza justo antes de hacer el mismo.

En cuanto al parámetro robustez, aun estando descrito como un parámetro de validación tanto en las guías ICH (63-64) como en la USP (62), no lo incluyen dentro de los parámetros a estudiar dentro de cada una de las categorías descritas, dejando este ensayo como opcional. Sin embargo se trata de un ensayo que aporta mucha información previa al propio estudio de validación, por lo que se considera un ensayo fundamental a realizar. Por un parte sirve para determinar los puntos críticos de la metodología analítica, optimizando ésta finalmente (optimización de los parámetros de idoneidad) y por otro lado sirve para ver como después de pequeños pero deliberados cambios en la metodología no afecta al resultado en cuanto a la riqueza obtenida para el principio activo en el producto acabado.

Por otro lado el término robustez (Robustness) no debe confundirse con el término Ruggedness. Este último no viene descrito en las guías ICH (63-64) y sí en la farmacopea USP 36 (62). Ésta define el término de Ruggedness como el grado de reproducibilidad de los resultados mediante el análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones tales como diferentes laboratorios, diferentes analistas, diferentes instrumentos, lotes de reactivos, días, tiempos, diferentes temperaturas, etc. Es decir, se sigue el método analítico dentro de los parámetros especificados en él, pero introduciendo en las condiciones experimentales las variaciones habituales de laboratorio a laboratorio. Da una idea de la influencia que tienen las variables ambientales y operacionales del método en los resultados, por lo que podría asimilarse al término “reproducibilidad” descrito en las guías ICH respectivas.

### **6.2.3. Validación de la metodología analítica para la determinación de acetato de hidrocortisona, propilparahidroxibenzoico (4-hidroxybenzoic acid propyl ester, nipasol®), metilparahidroxibenzoico (4-hidroxybenzoic acid methyl ester, nipagin®) y butilhidroxianisol (BHA).**

La validación se efectúa siguiendo las directrices de las normativas ICH (63-64), estableciéndose las especificaciones según AOAC (66) y según trabajos aplicados por el equipo investigador (67).

#### **6.2.3.1. Idoneidad del sistema**

Para comprobar la idoneidad del sistema se prepara una muestra que contiene acetato de hidrocortisona, metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico y BHA a la concentración de trabajo (descrito en la preparación de la solución de referencia, ver apartado 6.2.1.) a la concentración máxima permitida. Se inyecta en el cromatógrafo previamente filtrada por filtros de peonza de 0.45 micrometros según metodología analítica descrita. Los parámetros a estudiar son el factor capacidad, factor cola, número de platos teóricos y resolución entre picos.

### **6.2.3.2. Selectividad**

El estudio de especificidad se divide en diferentes apartados, todos ellos encaminados a demostrar que los diferentes analitos analizados eluyen a un tiempo de retención donde ninguna otra sustancia, ya sea excipientes, sustancias relacionadas o productos de degradación interfieren con él.

#### **Identificación del principio activo y del resto de los analitos (metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico y butilhidroxianisol).**

Para la realización de este estudio, se prepara una solución a la concentración de trabajo conteniendo acetato de hidrocortisona materia prima con número de lote 1001223464 (P11/001), metilparahidroxibenzoico materia prima con número de lote L10020306 (P11/010), propilparahidroxibenzoico materia prima con número de lote 0802140 (P10/039) y butilhidroxianisol materia prima con número de lote L10060351 (P11/013), y se compara que los tiempos de retención eluyen al mismo tiempo que una solución preparada con acetato de hidrocortisona de Ph.Eur. referencia estándar cuyo lote corresponde a 8.0 (P11/005), que una solución preparada con metilparahidroxibenzoico de Ph.Eur. referencia estándar cuyo lote corresponde a 3.0 (P11/008), que una solución preparada de propilparahidroxibenzoico de Ph.Eur. referencia estándar cuyo lote corresponde a 3.0 (P11/009), y que una solución preparada de butilhidroxianisol de Ph.Eur. referencia estándar cuyo lote corresponde a 3.2 (P11/007).

#### **Ausencia de interferencia de los excipientes de la formulación**

Para la realización de este estudio, se preparan dos soluciones que se inyectan en el cromatografo previa filtración por filtros PVDF de 0.45 micrometros. La primera solución contiene la cantidad correspondiente de placebo. La segunda solución contiene la cantidad de acetato de hidrocortisona, conservantes y antioxidante necesaria para obtener la concentración de trabajo y la cantidad correspondiente de placebo. Con estas soluciones se pretende demostrar que no existe interferencia por parte de los componentes del placebo con la elución de los diferentes analitos.

### **Ausencia de interferencia de impurezas**

Para la realización de este estudio se aprovecha la solución preparada para el estudio de idoneidad del sistema. Con este estudio se pretende demostrar que no existe interferencia por parte de las impurezas aportadas por el proveedor de la materia prima con los analitos del estudio (acetato de hidrocortisona, conservantes y antioxidante).

### **Muestras sometidas a estrés**

Este estudio se realiza para observar los posibles productos de degradación que pueden generar en un principio activo y en el placebo cuando se someten a una serie de condiciones forzadas, demostrando así la selectividad y estabilidad del método propuesto.

Para ello, Cantidades adecuadas de gel o placebo fueron puestas bajo stress con HCl 0.1N y NaOH 0.1N. También se expusieron al efecto de la temperatura (105 °C), luz UV, luz infrarrojo y humedad relativa elevada (79%) durante 24 horas. Además, muestras de gel y placebo se expusieron a un tratamiento oxidante con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33% y a un tratamiento con permanganato potásico durante 24 h.

Cuando los diferentes tratamientos de degradación se completaron, se analizaron las muestras según la determinación de riqueza del producto terminado.

#### **6.2.3.3. Linealidad**

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon 3 linealidades individuales para cada analito en estudio con 3 soluciones preparadas mediante pesadas individuales, pesando la cantidad correspondiente de placebo, de tal manera que la concentración de trabajo descrita en la técnica para cada analito quede incluida dentro del intervalo de la concentración máxima y mínima preparada (120% y 80% respectivamente). Se inyectan por duplicado en el sistema cromatográfico, registrando la respuesta de cada una de las soluciones. Los resultados experimentales se representan gráficamente, obteniendo una curva de calibración y llevando a cabo el correspondiente estudio estadístico (ANOVA).

#### **6.2.3.4. Precisión**

Para llevar a cabo el estudio de precisión, se realizaron cuatro test diferentes partiendo del valor nominal correspondiente al 100% de concentración de trabajo.

El primer test consiste en determinar la precisión del sistema instrumental inyectando 6 veces consecutivas la solución patrón en un día, y repitiendo el mismo procedimiento el siguiente día.

El segundo test consiste en determinar la precisión de la solución patrón. Para ello se preparan seis muestras individuales de solución patrón desde un principio y de forma individual según indica el método, que contengan la concentración correspondiente al 100% de acetato de hidrocortisona, metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico y BHA. Se determinará la desviación relativa estándar del factor de respuesta (relación entre el área experimental y la concentración de estudio).

El tercer test consiste en determinar la precisión del método, realizando el mismo procedimiento en la solución problema que el descrito previamente para la solución patrón: se preparan seis muestras individuales de la solución problema correspondientes a la concentración de trabajo y se determina la desviación relativa estándar para el factor de respuesta obtenido.

Por último, la precisión intermedia, en donde se estudia la variabilidad del analista y de los días.

#### **6.2.3.5. Exactitud**

El método de recuperación se estudió a los niveles de concentración de 80% (3 muestras), 100% (3 muestras) y 120% (3 muestras), en donde una cantidad conocida de principio activo, conservantes y antioxidante fue añadido a una determinada cantidad de placebo. La cantidad de acetato de hidrocortisona, metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico y butilhidroxianisol fue calculada en relación con la cantidad añadida.

### **6.2.3.6. Robustez**

Con el fin de evaluar la robustez del método propuesto, se estudió la influencia de pequeñas variaciones deliberadas en los parámetros del método para determinar acetato de hidrocortisona, metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico y butilhidroxianisol en el gel. Los factores seleccionados a examinar fueron la longitud de onda del detector (nm), la temperatura de la columna (°C), el caudal de la bomba cromatográfica (flujo) (ml min<sup>-1</sup>), el volumen de inyección (μl) y el lote de la fase estacionaria (columna). Cada factor fue evaluado a tres niveles, excepto el lote de la fase estacionaria que fue estudiada a dos niveles (dos lotes). Se cambió un solo factor a cada tiempo para estimar el efecto. En cada ensayo, se estudiaron 3 muestras de producto terminado junto con la solución patrón.

### **6.2.4. Validación de la metodología analítica para la determinación de los productos de degradación**

#### **6.2.4.1. Idoneidad del sistema**

Para comprobar la idoneidad del sistema se prepara una muestra que contiene producto terminado y acetato de hidrocortisona a la concentración de trabajo. Se inyecta en el cromatógrafo según metodología analítica descrita. Los parámetros a estudiar son el factor capacidad, factor cola, número de platos teóricos y resolución entre picos.

El factor de capacidad se calcula según la fórmula siguiente:

$$k' = t_R - t_0 / t_0$$

#### **6.2.4.2. Estabilidad de la solución**

Se prepara una solución problema a la concentración de trabajo y una solución patrón según se indica en la preparación de la solución problema y patrón de la metodología analítica descrita. Estas soluciones se conservan a temperatura ambiente (25 °C) y se van inyectando muestras hasta las 96 horas.

El resultado refleja el porcentaje de recuperación de hidrocortisona acetato de la solución patrón y de la solución problema, como el porcentaje de recuperación del producto de degradación conocido como hidrocortisona tomando como 100% el tiempo 0.

#### **6.2.4.3. Selectividad**

El estudio de especificidad o selectividad se divide en diferentes apartados, todos ellos encaminados a demostrar que los productos de degradación analizados eluyen a un tiempo de retención donde ninguna otra sustancia, ya sea excipientes o principio activo interfieren con él.

#### **Identificación de los productos de degradación (hidrocortisona, cortisona, prednisolona, acetato de cortisona).**

Este parámetro queda estudiado en el informe de validación para la valoración de hidrocortisona acetato, conservantes y antioxidante según apartado 6.2.3..

#### **Ausencia de interferencia de los excipientes de la formulación**

Para demostrar la ausencia de interferencias de los excipientes de la formulación se prepara por un lado una solución de placebo y por otro una solución de producto terminado, y se tratan tal como se indica en el apartado de preparación de la solución problema del método analítico descrito según apartado 6.2.1.

Se cromatografían las soluciones obtenidas.

#### **Ausencia de interferencia de impurezas**

Para demostrar la ausencia de interferencia de las impurezas con el principio activo se prepara una solución que contiene producto terminado a la concentración de trabajo y las impurezas aportadas por el laboratorio a la concentración límite establecida para su estudio (0,1%), se aprovecha la solución preparada para la idoneidad.

Se cromatografía la solución obtenida.

### **Ausencia de interferencia de los disolventes de la extracción**

Este parámetro queda estudiado en el informe de validación para la valoración de hidrocortisona acetato, conservantes y antioxidante en producto terminado según apartado 6.2.3..

### **Ausencia de interferencia de las impurezas**

Para demostrar la ausencia de interferencia de las impurezas con el principio activo se prepara una solución que contiene producto terminado a la concentración de trabajo y las impurezas aportadas por el laboratorio a la concentración límite establecida para su estudio (0,1%), se aprovecha la solución preparada para la idoneidad.

Se cromatografía la solución obtenida.

### **Muestras sometidas a estrés**

Este estudio se realiza para ver los posibles productos de degradación que se pueden generar en los analitos en estudio cuando el producto terminado se somete a una serie de condiciones forzadas, demostrando así la selectividad del método. Por esto se preparan las siguientes muestras:

- **Producto terminado**

A) Producto terminado sometido a un tratamiento en medio ácido.

Pesar la cantidad aproximada de 10 g de producto terminado en un matraz de 50 mL y disolver mediante sonicación durante 15 minutos en unos 30 mL de fase móvil para muestras, a continuación agitar magnéticamente durante 45 minutos y añadir 5 mL de HCl 0,1M. Dejar actuar 24 horas, enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45 µm y hacer viales para HPLC.

B) Producto terminado sometido a un tratamiento en medio alcalino.

Pesar la cantidad aproximada de 10 g de producto terminado en un matraz de 50 mL y disolver mediante sonicación durante 15 minutos en unos 30 mL de fase móvil para muestras, a continuación agitar magnéticamente durante 45 minutos y añadir 5 mL de NaOH 0,1 M. Dejar actuar 24 horas, enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  y hacer viales para HPLC.

C) Producto terminado sometido a temperatura.

Pesar la cantidad de producto terminado previamente sometido a una temperatura de 105 °C durante 24 horas, según se indica en la preparación de la solución problema. Disolver mediante sonicación durante 15 minutos en unos 40 mL de fase móvil para muestras, a continuación agitar magnéticamente durante 45 minutos. Enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  y hacer viales para HPLC.

D) Producto terminado sometido a un tratamiento oxidante

- Pesar la cantidad aproximada de 10 g de producto terminado en un matraz de 50 mL y disolver mediante sonicación durante 15 minutos en unos 30 mL de fase móvil para muestras, a continuación agitar magnéticamente durante 45 minutos y añadir 5 mL de agua oxigenada 33%. Dejar actuar 24 horas, enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  y hacer viales para HPLC.
- Pesar la cantidad aproximada de 10 g de producto terminado en un matraz de 50 mL y disolver mediante sonicación durante 15 minutos en unos 30 mL de fase móvil para muestras, a continuación agitar magnéticamente durante 45 minutos y añadir 5 mL de permanganato potásico 0,1M. Dejar actuar 24 horas, enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  y hacer viales para HPLC.

E) Producto terminado sometido a luz IR.

Pesar la cantidad de producto terminado previamente expuesto a la luz infrarroja durante 24 horas, según se indica en la preparación de la solución problema. Disolver mediante sonicación durante 15 minutos en unos 40 mL de fase móvil para muestras, a

continuación agitar magnéticamente durante 45 minutos. Enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  y hacer viales para HPLC.

F) Producto terminado sometido a luz UV.

Pesar la cantidad de producto terminado previamente expuesto a la luz UV durante 24 horas, según se indica en la preparación de la solución problema. Disolver mediante sonicación durante 15 minutos en unos 40 mL de fase móvil para muestras, a continuación agitar magnéticamente durante 45 minutos. Enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  y hacer viales para HPLC.

G) Producto terminado sometido a humedad elevada.

Pesar la cantidad de producto terminado que previamente ha permanecido en un humectador a 79% HR durante 24 horas, según se indica en la preparación de la solución problema. Disolver mediante sonicación durante 15 minutos en unos 40 mL de fase móvil para muestras, a continuación agitar magnéticamente durante 45 minutos. Enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  y hacer viales para HPLC

- **Placebo**

A) *Placebo sometido a un tratamiento en medio ácido.*

Actuar del mismo modo que en el apartado A de producto terminado utilizando sólo la cantidad de placebo correspondiente a la concentración de trabajo.

B) *Placebo sometido a un tratamiento en medio alcalino.*

Actuar del mismo modo que en el apartado B de producto terminado utilizando sólo la cantidad de placebo correspondiente a la concentración de trabajo.

C) *Placebo sometido a temperatura.*

Actuar del mismo modo que en el apartado C de producto terminado utilizando sólo la cantidad de placebo correspondiente a la concentración de trabajo.

*D) Placebo sometido a un tratamiento oxidante.*

Actuar del mismo modo que en el apartado D de producto terminado utilizando sólo la cantidad de placebo correspondiente a la concentración de trabajo.

*E) Placebo sometido a luz infrarroja.*

Actuar del mismo modo que en el apartado E de producto terminado utilizando sólo la cantidad de placebo correspondiente a la concentración de trabajo.

*F) Placebo sometido a luz ultravioleta.*

Actuar del mismo modo que en el apartado F de producto terminado utilizando sólo la cantidad de placebo correspondiente a la concentración de trabajo.

*G) Placebo sometido a humedad elevada.*

Actuar del mismo modo que en el apartado G de producto terminado utilizando sólo la cantidad de placebo correspondiente a la concentración de trabajo.

• **Acetato de hidrocortisona**

A) Acetato de hidrocortisona sometido a un tratamiento en medio ácido.

Pesar 22 mg de acetato de hidrocortisona, llevarlo a un matraz de 10 mL y disolverlo mediante sonicación durante 5 minutos en unos 8 mL de fase móvil para muestras, añadir 1 mL de HCl 0,1M. Dejar actuar 24 horas, enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45 µm y hacer viales para HPLC.

B) Acetato de hidrocortisona sometido a un tratamiento en medio alcalino.

Pesar 22 mg de acetato de hidrocortisona, llevarlo a un matraz de 10 mL y disolverlo mediante sonicación durante 5 minutos en unos 8 mL de fase móvil para muestras, añadir 1 mL de NaOH 0,1M. Dejar actuar 24 horas, enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45 µm y hacer viales para HPLC.

C) Acetato de hidrocortisona sometido a temperatura.

Pesar 22 mg de acetato de hidrocortisona previamente sometido a una temperatura de 105 °C durante 24 horas y disolverlo mediante sonicación durante 5 minutos en unos 8 mL de fase móvil para muestras. Enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45 µm y hacer viales para HPLC.

D) Acetato de hidrocortisona sometido a un tratamiento en medio oxidante.

- a. Pesar 22 mg de acetato de hidrocortisona, llevarlo a un matraz de 10 mL y disolverlo mediante sonicación durante 5 minutos en unos 8 mL de fase móvil para muestras, añadir 1 mL de agua oxigenada 33%. Dejar actuar 24 horas, enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45 µm y hacer viales para HPLC.
- b. Pesar 11 mg de acetato de hidrocortisona, llevarlo a un matraz de 10 mL y disolverlo mediante sonicación durante 5 minutos en unos 8 mL de fase móvil para muestras, añadir 1 mL de permanganato potásico 0,1 M. Dejar actuar 24 horas, enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45 µm y hacer viales para HPLC.

E) Acetato de hidrocortisona sometido a luz infrarroja.

Pesar 22 mg de acetato de hidrocortisona previamente expuesto a la luz infrarroja durante 24 horas y disolverlo mediante sonicación durante 5 minutos en unos 8 mL de fase móvil para muestras. Enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45 µm y hacer viales para HPLC.

F) Acetato de hidrocortisona sometido a luz ultravioleta.

Pesar 22 mg de acetato de hidrocortisona previamente expuesto a la luz ultravioleta durante 24 horas y disolverlo mediante sonicación durante 5 minutos en unos 8 mL de fase móvil para muestras. Enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45 µm y hacer viales para HPLC.

G) Acetato de hidrocortisona sometido a humedad elevada.

Pesar 22 mg de acetato de hidrocortisona que previamente ha permanecido en un humectador a 79% HR durante 24 horas. Disolver mediante sonicación durante 5 minutos en unos 8 mL de fase móvil para muestras. Enrasar y finalmente filtrar la solución por filtros PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  y hacer viales para HPLC.

Cuando los diferentes tratamientos de degradación se completaron, se analizaron las muestras según la determinación de riqueza del producto terminado.

#### **6.2.4.4. Límite de detección y cuantificación**

Para el estudio del límite de detección y límite de cuantificación se utiliza una variante de Eurachem, basado en la realización de rectas de calibración. Para ello se sigue el siguiente procedimiento:

Se prepara una primera linealidad y se realiza un estudio para poder determinar qué puntos quedan fuera de este atributo. Para ello se hace un estudio de regresión lineal con 13 soluciones con unas concentraciones entre 0,11  $\mu\text{g/mL}$  y 3,52  $\mu\text{g/mL}$ . Las 13 soluciones se preparan mediante pesadas individuales de sustancia patrón de hidrocortisona acetato, de tal manera que la concentración de trabajo descrita en la técnica de 2,2  $\mu\text{g/mL}$  para cada producto de degradación quede incluida dentro del intervalo de la concentración máxima y mínima preparada (160% y 5% respectivamente). Se inyectan por duplicado en el sistema cromatográfico, registrando la respuesta de cada una de las soluciones.

Aquellos puntos extremos cuyo factor respuesta (área/concentración) sobrepasen el  $\pm 10\%$  de la pendiente obtenida por la regresión, se consideran fuera de la linealidad. En consecuencia la primera recta permite determinar las concentraciones que se consideren lineales y son las que se determinarán en las 3 linealidades del estudio.

#### **6.2.4.5. Linealidad**

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon 3 linealidades individuales con 7 soluciones de hidrocortisona acetato preparadas mediante pesadas individuales, de tal manera que la concentración de trabajo descrita en la técnica (2,2 µg/ml), quede incluida dentro del intervalo de la concentración máxima y mínima preparada (160% y 40% respectivamente). Se inyectan por duplicado en el sistema cromatográfico, registrando la respuesta de cada una de las soluciones. Los resultados experimentales se representan gráficamente, obteniendo una curva de calibración y llevando a cabo el correspondiente estudio estadístico (ANOVA).

#### **6.2.4.6. Precisión**

Para llevar a cabo el estudio de precisión, se realizaron cuatro test diferentes partiendo del valor nominal correspondiente al 100% de concentración de trabajo.

El primer test consiste en determinar la precisión del sistema instrumental inyectando 6 veces consecutivas de una misma muestra a distintos niveles de concentración, 160%, 100% y límite de cuantificación de la concentración de trabajo. Se comprueba la precisión intermedia del sistema instrumental repitiendo esta misma operación otro día. El segundo test consiste en determinar la precisión de la solución patrón. Para ello se preparan nueve muestras individuales de solución patrón desde un principio y de forma individual según indica el método. De las 9 muestras, se preparan 3 soluciones al límite de cuantificación, 3 soluciones que correspondan a la concentración de trabajo (2,2 µg/ml) y las restantes al 160% de la concentración de trabajo. Cada uno de los datos tabulados corresponde el valor medio de dos inyecciones de cada una de las preparaciones. Se determinará la desviación relativa estándar del factor de respuesta (relación entre el área experimental y la concentración de estudio).

El tercer test consiste en determinar la precisión del método, realizando el mismo procedimiento en la solución problema que el descrito previamente para la solución patrón: se preparan seis muestras individuales de la solución problema correspondientes a la concentración de trabajo y se determina la desviación relativa estándar para el factor

de respuesta obtenido. Cada uno de los datos tabulados corresponde el valor medio de dos inyecciones de cada una de las preparaciones.

Por último, la precisión intermedia, en donde se estudia la variabilidad del analista y de los días. Se determina analizando el contenido de acetato de hidrocortisona en la mezcla del producto final previamente homogeneizada. Para ello se preparan seis muestras de una concentración del 100% que son inyectadas. Los resultados obtenidos, expresados en forma de factor respuesta demuestran la precisión intermedia del método.

#### **6.2.4.7. Exactitud**

Se preparan 3 soluciones, conteniendo el 100% de la concentración de trabajo, 3 soluciones conteniendo el 160% de la concentración de trabajo y 3 soluciones conteniendo el 40% de la concentración de trabajo, todas ellas conteniendo la cantidad de placebo correspondiente. Las soluciones preparadas se analizan según la metodología señalada en el capítulo 6.2.1., utilizando la media del factor respuesta de la solución patrón (valor obtenido en el ensayo de repetibilidad de la solución patrón) para obtener los resultados. Los resultados obtenidos demuestran la exactitud del método.

Cada uno de los datos tabulados corresponde al valor medio de dos inyecciones de cada una de las preparaciones.

#### **6.2.4.8. Robustez**

Para demostrar este atributo se preparan 3 soluciones que contengan el 100% de principio activo (2,2 µg/ml) con la cantidad correspondiente de placebo y una solución patrón a la concentración de trabajo, según metodología analítica descrita. Estas muestras se inyectan en el cromatógrafo modificando la longitud de onda del detector, la temperatura de la columna, el caudal de la bomba cromatográfica (flujo), el volumen de inyección y el lote de la fase estacionaria. Se calcula el porcentaje hallado en cada muestra utilizando el patrón el cual se ha inyectado en cada una de las condiciones ensayadas, por lo que la secuencia seguida ha sido la siguiente, patrón y tres muestras.

Los resultados obtenidos se comparan con cada una de las inyecciones mediante un test estadístico ANOVA de una vía o dirección o bien un test estadístico t de Student cuando procede (variación del lote de la fase estacionaria) para comprobar si existen o no diferencias estadísticamente significativas.

Los datos relativos a las condiciones normales son los que corresponden a los cromatogramas obtenidos para el parámetro de la longitud de onda a 240 nm.

### **6.3. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN**

Los resultados de aceptación para cada uno de los estudios realizados están basados tanto en los criterios considerados por la AOAC (66), como en los criterios considerados en la monografía de validación de métodos analíticos editada por AEFI (61).

En cuanto al estudio de linealidad, los criterios de aceptación para el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) son respectivamente 0,995 y 0,990.

En cuanto al estudio de precisión, en lo que hace referencia a la repetibilidad del sistema instrumental, el límite máximo del coeficiente de variación porcentual (R.S.D.) se establece en un 1% tanto para el principio activo y sus productos de degradación como para los conservantes como para el antioxidante. Para el resto del estudio (repetibilidad de la solución patrón, repetibilidad de la solución problema y estudio de la precisión intermedia), dicho límite se establece en función del porcentaje en que se encuentra el analito en el preparado, según los cuadros establecidos por la AOAC; el porcentaje que representa el acetato de hidrocortisona en el preparado es de 1.11%, por lo tanto el límite máximo del coeficiente de variación porcentual corresponde a 2.7%; el porcentaje que representa el metilparahidroxibenzoico en el preparado es de 0.18% y el máximo que representan los productos de degradación es < 0.1%, por lo tanto el límite máximo del coeficiente de variación porcentual corresponde a 3.7%; el porcentaje que representa el propilparahidroxibenzoico y butilhidroxianisol en el preparado es de 0.02% y 0.01% respectivamente, por lo tanto el límite máximo del coeficiente de variación porcentual corresponde a 5.3%.

Por último, el criterio de evaluación para el estudio de la recuperación del método (exactitud) y el estudio de robustez para la validación de cada componente del producto acabado se establece entre 97% y 103% para el acetato de hidrocortisona, entre 95% y 105% para el metilparahidroxibenzoico y los productos de degradación y entre 90% y 107% para el propilparahidroxibenzoico y el butilhidroxianisol.

**6.3.1. Resultados experimentales del estudio de validación para la determinación de acetato de hidrocortisona, propilparahidroxibenzoico (4-hidroxybenzoic acid propyl ester, nipasol®), metilparahidroxibenzoico (4-hidroxybenzoic acid methyl ester, nipagin®) y butilhidroxianisol (BHA).**

**6.3.1.1. Idoneidad del sistema**

En el cuadro 6.4. se resumen los resultados experimentales obtenidos para los diferentes parámetros estudiados:

Producto	Factor capacidad	Factor cola	Platos teóricos	Resolución	T retención
Metilparahidroxibenzoico	1,581	0,985	13225	-	3,280
Propilparahidroxibenzoico	4,987	1,052	31644	11,742	7,610
BHA	9,899	1,024	41484	-	13,852
Hidrocortisona acetato	16,093	1,453	47362	13,357	21,725

Cuadro 6.4.: Resultados obtenidos del factor capacidad, factor cola, número de platos teóricos y resolución entre picos para los analitos estudiados.

Los resultados obtenidos en el estudio de idoneidad del sistema que se muestran en el cuadro 6.4. en cuanto al factor de capacidad, factor de cola, platos teóricos y resolución entre dos picos consecutivos se consideran correctos ya que los valores obtenidos se encuentran dentro de los intervalos considerados tanto en la Ph Eur como en las monografías de AEFI correspondiente a la validación de los métodos analíticos, siendo estos valores los siguientes:

Factor de capacidad:  $\geq 0,5$

Factor de cola: 0,8 – 2

Platos teóricos:  $> 2000$

Resolución:  $\geq 1$

### 6.3.1.2. Selectividad

#### Identificación del principio activo y del resto de los analitos (metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico y butilhidroxianisol).

Se chequea que tanto el acetato de hidrocortisona materia prima, el metilparahidroxibenzoico materia prima, el propilparahidroxibenzoico materia prima y el butilhidroxianisol materia prima eluyen en el mismo tiempo de retención que una solución preparada con acetato de hidrocortisona de Ph.Eur. referencia estándar, que una solución preparada con metilparahidroxibenzoico de Ph.Eur. referencia estándar, que una solución preparada de propilparahidroxibenzoico de Ph.Eur. referencia estándar, y que una solución preparada de butilhidroxianisol de Ph.Eur. referencia estándar (cuadro 6.5.).

PRINCIPIO ACTIVO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
Hidrocortisona acetato Referencia estándar	17,587
Hidrocortisona acetato materia prima	17,288
Metilparahidroxibenzoico Referencia estándar	2,833
Metilparahidroxibenzoico materia prima	2,835
Propilparahidroxibenzoico Referencia estándar	6,081
Propilparahidroxibenzoico materia prima	6,103
BHA Referencia estándar	10,511
BHA materia prima	10,512

Cuadro 6.5.: Tiempo de retención de los analitos a determinar estándar de referencia y de las materias primas.

En la figura 6.3. se observa que todos los componentes de una muestra inyectada eluyen a diferentes tiempos de retención y por lo tanto no hay interferencia entre ellos, por lo que se trata de un método selectivo.

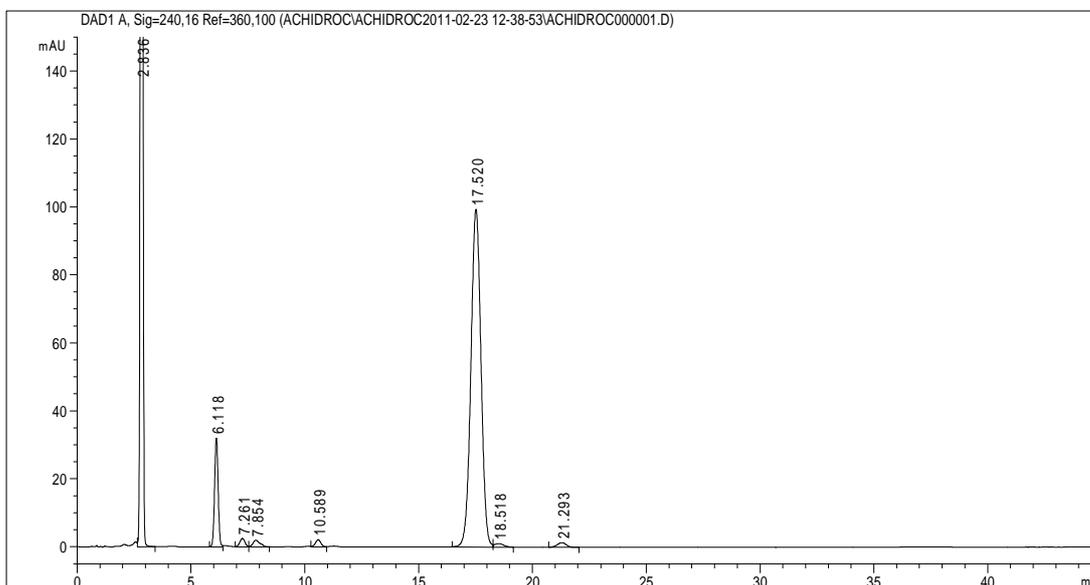


Figura 6.3.: Cromatograma correspondiente a la solución de principio activo, conservantes, antioxidante e impurezas. El acetato de hidrocortisona, el metilparahidroxibenzoico, el propilparahidroxibenzoico, la hidrocortisona, la cortisona, el butilhidroxianisol, la prednisolona acetato y la cortisona acetato, eluyen a 17,520, 2,836, 6,118, 7,261, 7,854, 10,589, 18,518 y 21,293 respectivamente.

### Ausencia de interferencias de los excipientes

El cromatograma del placebo (Figura 6.4.) muestra que no hay interferencia entre los excipientes de la preparación farmacéutica y el acetato de hidrocortisona, los conservantes, el antioxidante y los productos de degradación, por lo que se puede concluir que el método es selectivo con respecto a los excipientes de la formulación.

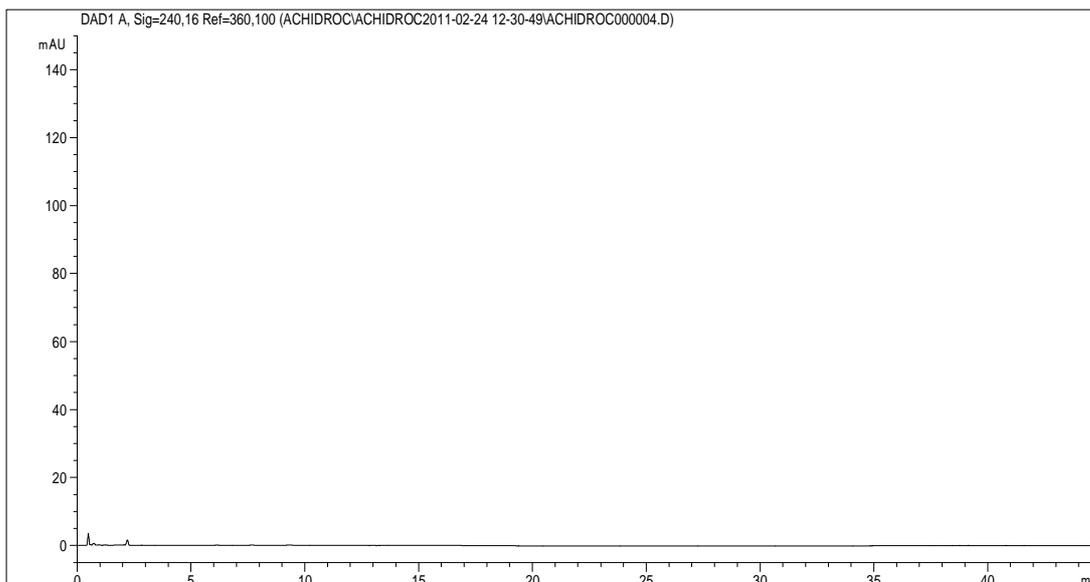


Figura 6.4.: Cromatograma correspondiente al placebo

### **Ausencia de interferencia de impurezas y muestras sometidas a estres**

Al someter el producto terminado a unas condiciones ácidas (figura 6.5.) se observa la aparición de los tres picos de tiempos de retención relativos de 0,42, 0,65 y 1,22 correspondientes a la hidrocortisona, a un producto de degradación desconocido y al acetato de cortisona, que ya aparecen en condiciones normales, y de los cuales sólo aumenta el área de la hidrocortisona [168]. El área del principio activo, de los conservantes y antioxidante no se ve afectada. Por tanto se puede concluir que el producto terminado se degrada moderadamente en condiciones ácidas, tal como sucede en el caso del acetato de hidrocortisona sometido a medio ácido.

Al someter el producto terminado a unas condiciones básicas (Figura 6.6.) se observa que las áreas correspondientes al metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico y BHA no disminuyen de forma significativa, en cambio esto sí que sucede en el caso del acetato de hidrocortisona. El área correspondiente al acetato de hidrocortisona ha disminuido aproximadamente en una quinta parte. El producto de degradación conocido hidrocortisona aumenta su área de forma considerable, de un área de 51 que presenta en el producto terminado sin estresar, a un área de 10517 bajo condiciones de medio básico. También aparece el pico correspondiente al producto de degradación desconocido con un tiempo de retención relativo de 0,66 y que ya aparece en el principio activo en condiciones normales, pero sin que aumente su área respecto a estas

condiciones. En cambio el pico correspondiente al acetato de cortisona no aparece. Se obtienen otros productos de degradación desconocidos que eluyen a 1,1, 1,4 y 2,4 minutos, con unas áreas de 165, 52, y 297 respectivamente, y que ya aparecían en el principio activo sometido a medio básico, si bien las áreas obtenidas en este caso son bastante menores. También aparecen otros picos que eluyen a 11,6 y 13,5 minutos con áreas de 22 y 36 respectivamente. Se puede concluir que el producto terminado se degrada cuando se somete a condiciones básicas, principalmente debido a la degradación del principio activo.

Al someter el producto terminado a 105 °C durante 24 horas (Figura 6.7.) se observan los 3 picos correspondientes al producto de degradación conocido hidrocortisona, al producto de degradación desconocido que tiene un tiempo de retención relativo de 0,65, y al acetato de cortisona. No aumenta el área de ninguno de los tres picos. También aparece un pico correspondiente a un producto de degradación desconocido que eluye a 32,5 minutos ( $t_{RR} = 2,11$ ). El BHA prácticamente desaparece, ya que su punto de fusión es bastante menor a 105 °C. Aparece un pico que eluye a 8,3 minutos que posiblemente sea debido al placebo, y otros dos picos que eluyen a 11,5 y 12,9 minutos de áreas poco significativas. Se puede concluir que el producto terminado se degrada moderadamente en condiciones de temperatura elevada.

Para el estudio de estrés en medio oxidante se utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33% y el KMnO<sub>4</sub>.

En el caso del permanganato potásico (Figura 6.8.), el BHA se ha degradado totalmente, y el acetato de cortisona tampoco aparece. En los picos correspondientes al metilparahidroxibenzoico y propilparahidroxibenzoico no se observa una disminución de su área, mientras que en el caso del acetato de hidrocortisona sí que se observa una disminución significativa, habiendo disminuido el área a aproximadamente la mitad de la obtenida en condiciones normales. Se obtienen los picos correspondientes al producto de degradación conocido hidrocortisona y al producto de degradación desconocido con un tiempo de retención relativo de 0,65, sin que aumente el área de ninguno de los dos picos respecto a condiciones normales.

En el cromatograma obtenido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33% (Figura 6.9.), se observa la presencia de los tres picos que ya aparecen en condiciones normales, el producto de degradación conocido hidrocortisona, el producto de degradación desconocido con un tiempo de

retención relativo de 0,65 y el acetato de cortisona. El área de la hidrocortisona tiene un área bastante mayor [425] de la que presenta en condiciones normales. También son ligeramente menores respecto a condiciones normales los picos correspondientes al principio activo, al metilparahidroxibenzoico y al propilparahidroxibenzoico. Aparecen dos picos que eluyen a 4,5 y a 11,6 minutos. El primero es posiblemente un producto de degradación del BHA.

Se puede concluir que el producto terminado sí se degrada cuando se somete a un medio oxidante.

Al someter el producto terminado a unas condiciones de luz IR (Figura 6.10.) se observa un perfil de formación de picos correspondientes a productos de degradación similar al que aparece al someter el producto terminado a condiciones de temperatura elevada. También aparece el pico correspondiente a un producto de degradación desconocido que eluye a 32,6 minutos ( $t_{RR} = 2,11$ ). El BHA prácticamente desaparece, ya que su punto de fusión es bastante menor a 105 °C, y el metilparahidroxibenzoico y el propilparahidroxibenzoico también ven disminuida su área, posiblemente debido al calor producido por la lámpara de IR. Aparece también un pico que eluye a 8,3 minutos que posiblemente sea debido al placebo, y otros dos picos que eluyen a 11,5 y 12,7 minutos de áreas poco significativas. Se puede concluir que el producto terminado se degrada moderadamente bajo condiciones de luz infrarroja.

En el cromatograma correspondiente a la muestra de producto terminado sometido a luz ultravioleta durante 24 horas (Figura 6.11.), se puede observar un perfil similar al obtenido con temperatura elevada y luz IR, excepto que no se produce la degradación del BHA ni la disminución del metilparahidroxibenzoico y propilparahidroxibenzoico debida a la temperatura elevada. Aparecen también los tres picos correspondientes a la hidrocortisona, al producto de degradación desconocido con un tiempo de retención relativo de 0,65 y al acetato de cortisona, sin que aumente su área respecto a las condiciones normales. También aparece el producto de degradación desconocido que eluye a 32,6 minutos ( $t_{RR} = 2,11$ ), y otro pico que eluye a 11,5 minutos. Se puede concluir que el producto terminado se degrada moderadamente bajo condiciones de luz ultravioleta.

Después de 24 horas bajo condiciones de humedad elevada (Figura 6.12), se observa que no aparece ningún pico de degradación en el producto terminado, ya que aparecen los mismos picos que aparecen en condiciones normales sin que aumente su área. Únicamente aparece el producto de degradación que eluye a 8,3 minutos y que posiblemente sea debido al placebo.

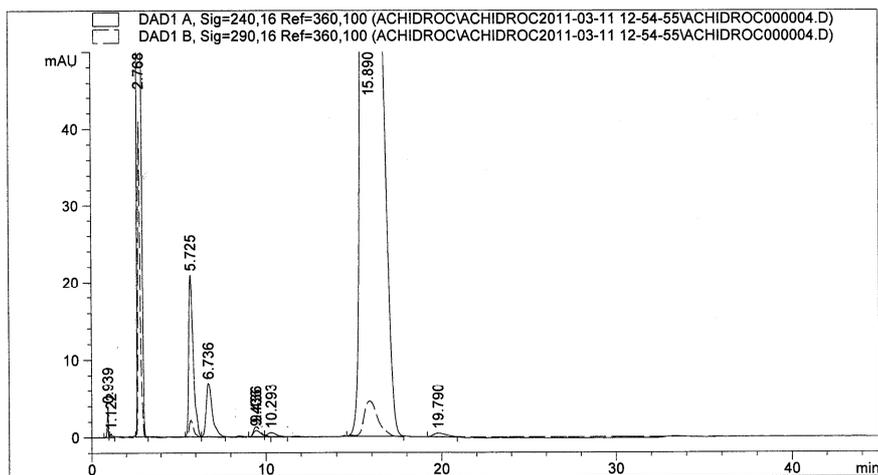


Figura 6.5. Cromatograma correspondiente a la solución del producto terminado sometido a condiciones ácidas

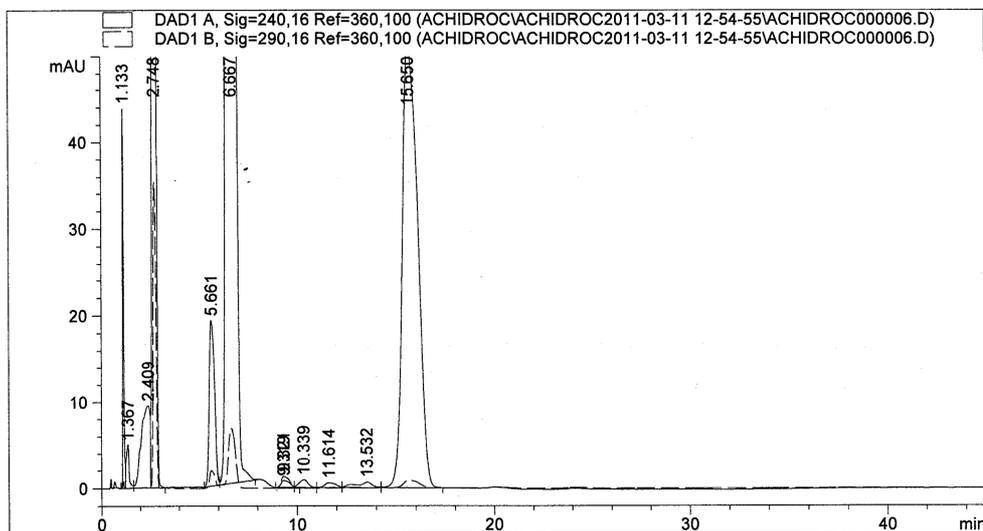


Figura 6.6. Cromatograma correspondiente a la solución del producto terminado sometido a condiciones básicas

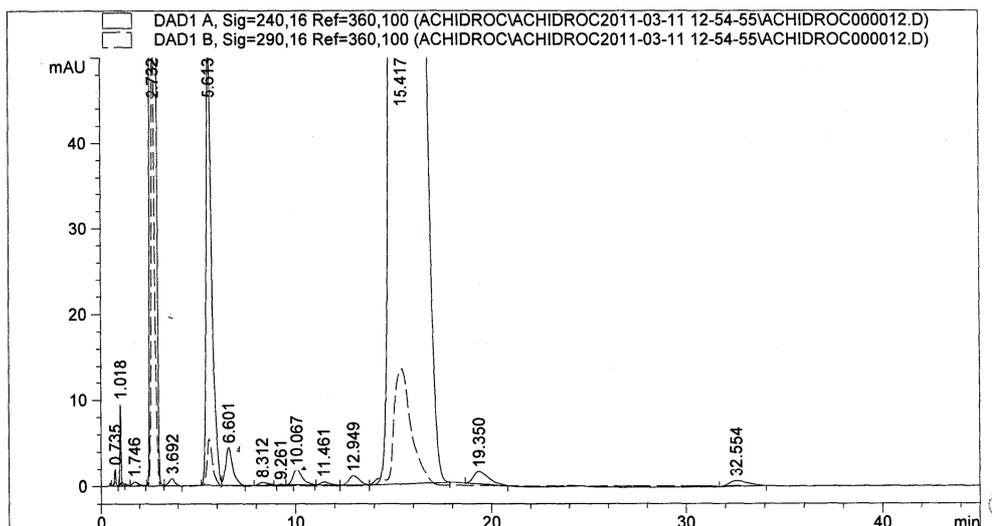


Figura 6.7. Cromatograma correspondiente a la solución del producto terminado sometido a 105 °C durante 24 horas.

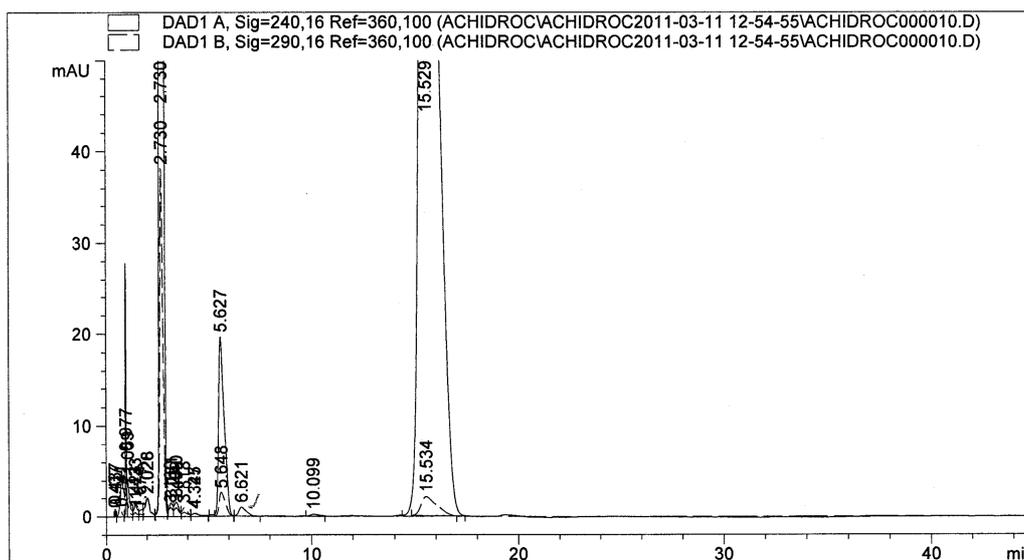


Figura 6.8. Cromatograma correspondiente a la solución del producto terminado sometido a un medio oxidante como el permanganato potasico

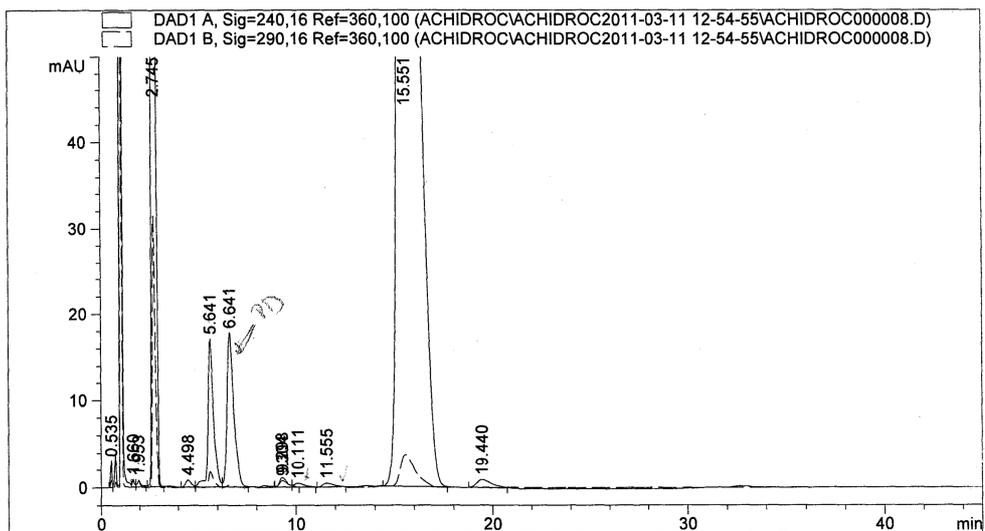


Figura 6.9. Cromatograma correspondiente a la solución del producto terminado sometido a medio oxidante como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33%.

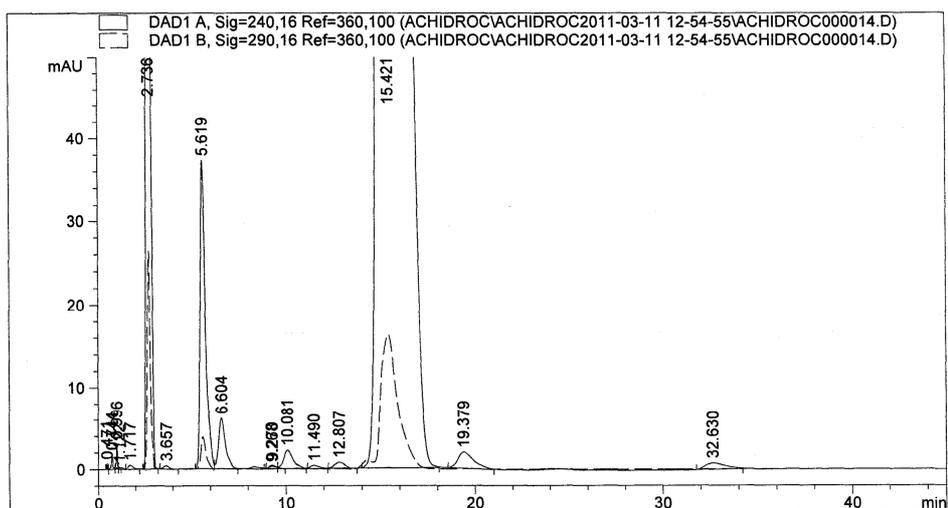


Figura 6.10. Cromatograma correspondiente a la solución del producto terminado sometido a condiciones de luz IR

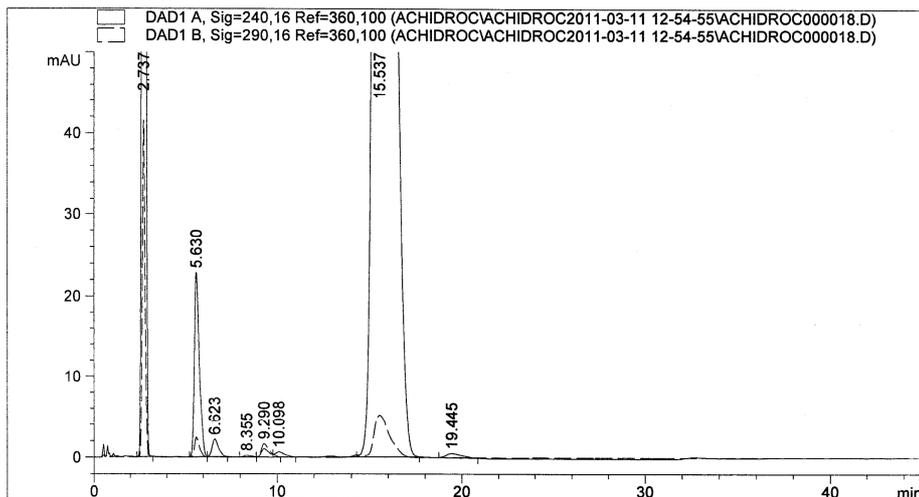


Figura 6.11. Cromatograma correspondiente a la solución del producto terminado sometido a luz UV durante 24 h.

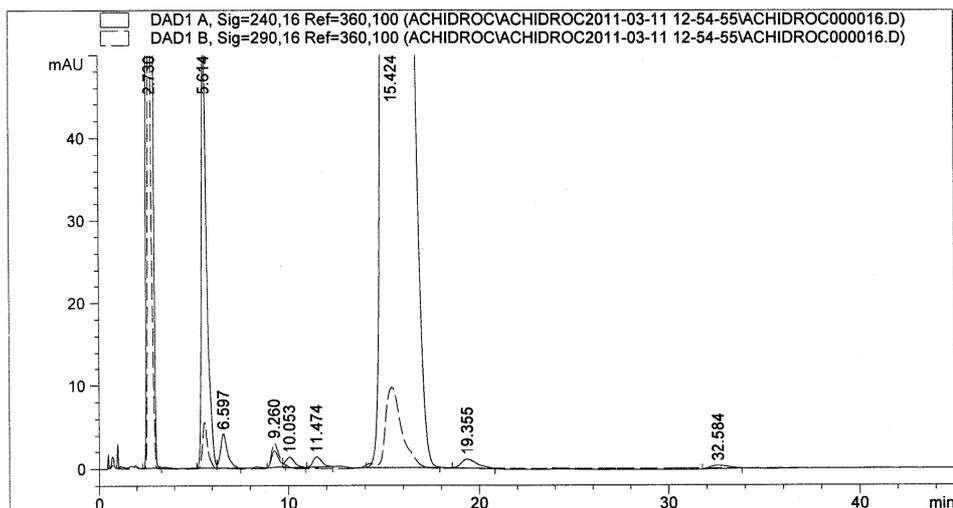


Figura 6.12. Cromatograma correspondiente a la solución del producto terminado sometido a condiciones de humedad elevadas durante 24 horas.

Por lo tanto se concluye que el producto terminado se degrada principalmente en condiciones básicas, y de forma también significativa, en medio oxidante. En condiciones ácidas se degrada sólo moderadamente a hidrocortisona, y en el caso de temperatura elevada, luz infrarroja y luz ultravioleta a un producto de degradación desconocido que eluye a unos 30,0 minutos ( $t_{RR} = 2,11$ ), además de otros picos que eluyen a 11,5 y 12,7 minutos. Bajo condiciones de humedad elevada no se produce degradación.

En los cromatogramas correspondientes al placebo se observa que bajo condiciones de medio básico (Figura 6.14.) y medio oxidante (KMnO4) (Figura 6.16.) no aparecen picos de degradación. En condiciones de medio ácido (Figura 6.13.), medio oxidante (H2O2) (Figura 6.15.), luz infrarroja (Figura 6.18.), luz ultravioleta (Figura 6.19.) y humedad elevada (Figura 6.20.) se observa la formación de un producto de degradación que eluye a 8,3 minutos y con unas áreas de entre 3 y 7. Bajo condiciones de humedad elevada se observa además la formación de un producto de degradación que eluye a 15,5 minutos con un área de 135. En el caso del estrés llevado a cabo con temperatura elevada (Figura 6.17.) se observa la formación de 3 productos de degradación que eluyen a 2,7, 5,6 y 15,6 minutos, y con unas áreas de aproximadamente 250, 17 y 11, respectivamente.

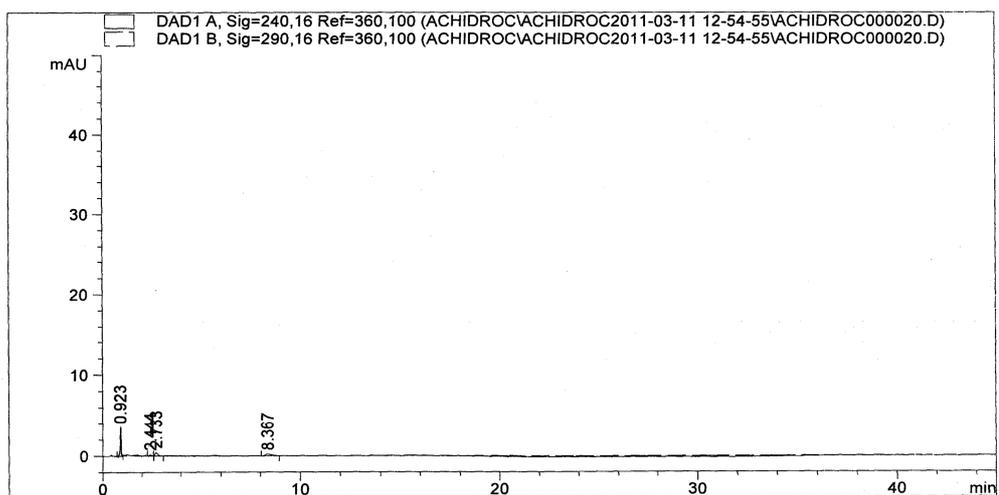


Figura 6.13.: Cromatograma correspondiente a la solución placebo sometida a condiciones ácidas.

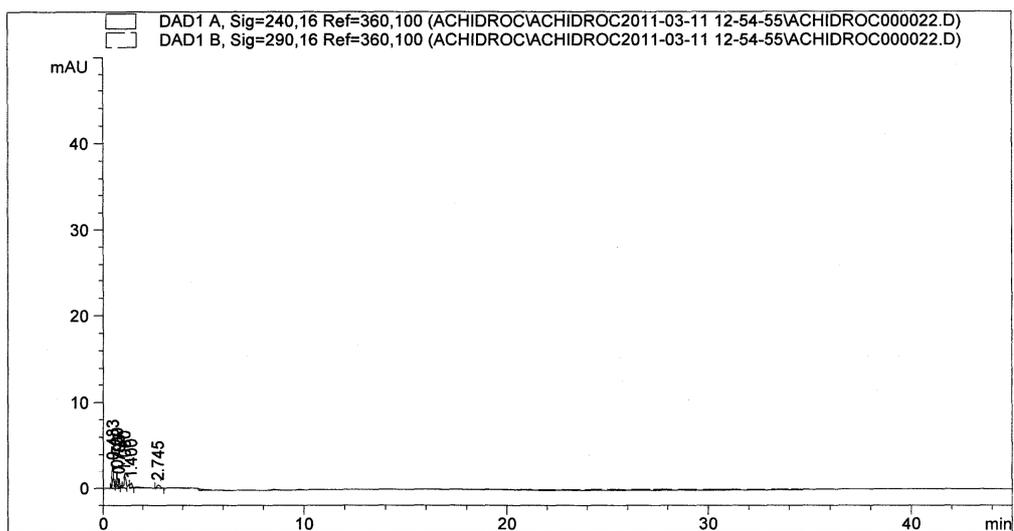


Figura 6.14. Cromatograma correspondiente a la solución placebo sometida a condiciones básicas

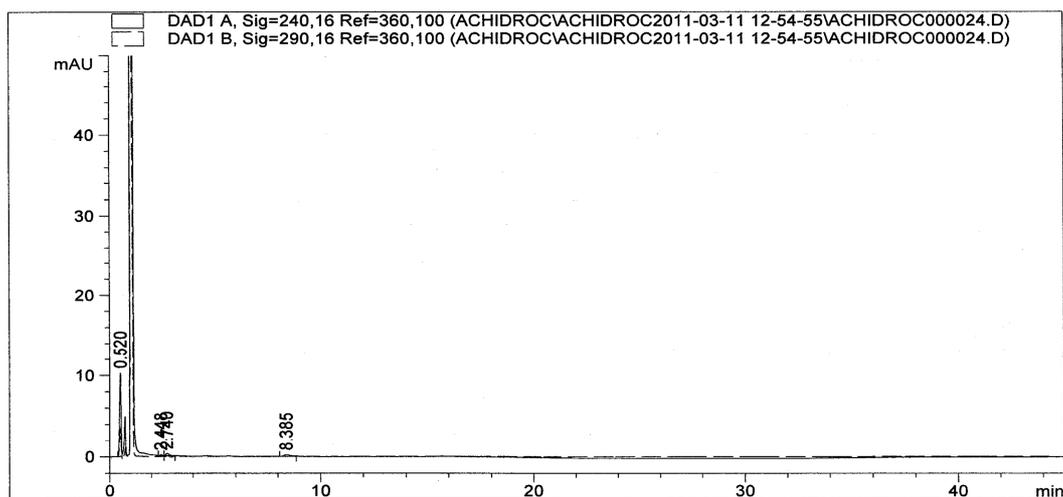


Figura 6.15.: Cromatograma correspondiente a la solución placebo sometida a condiciones oxidantes como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

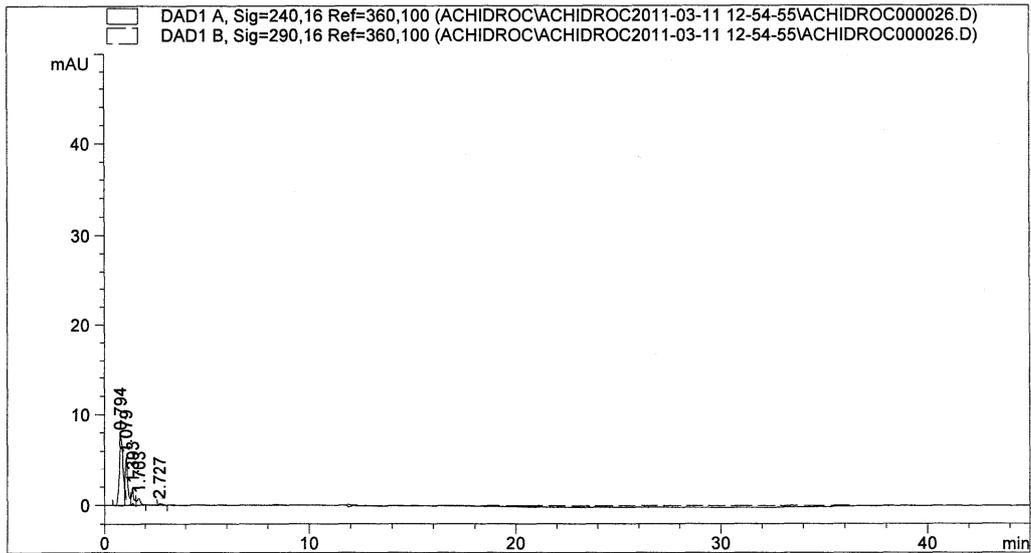


Figura 6.16.: Cromatograma correspondiente a la solución placebo sometida a condiciones oxidantes como el permanganato potásico.

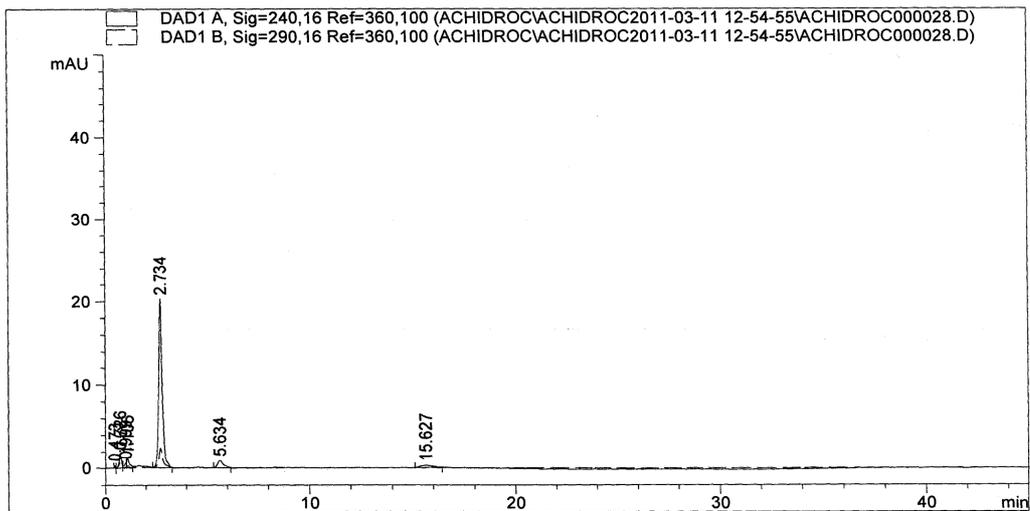


Figura 6.17.: Cromatograma correspondiente a la solución placebo sometida a temperatura elevada.

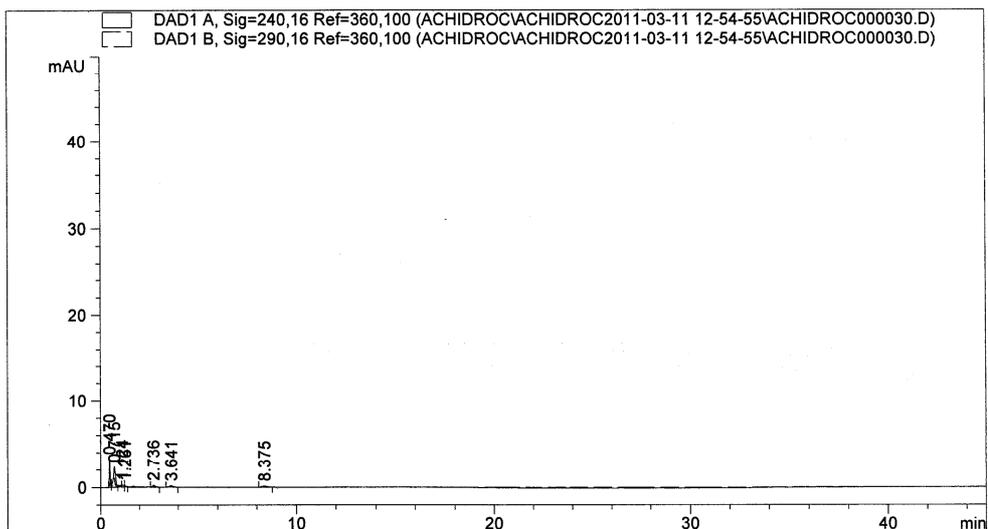


Figura 6.18.: Cromatograma correspondiente a la solución placebo sometida a luz infrarroja.

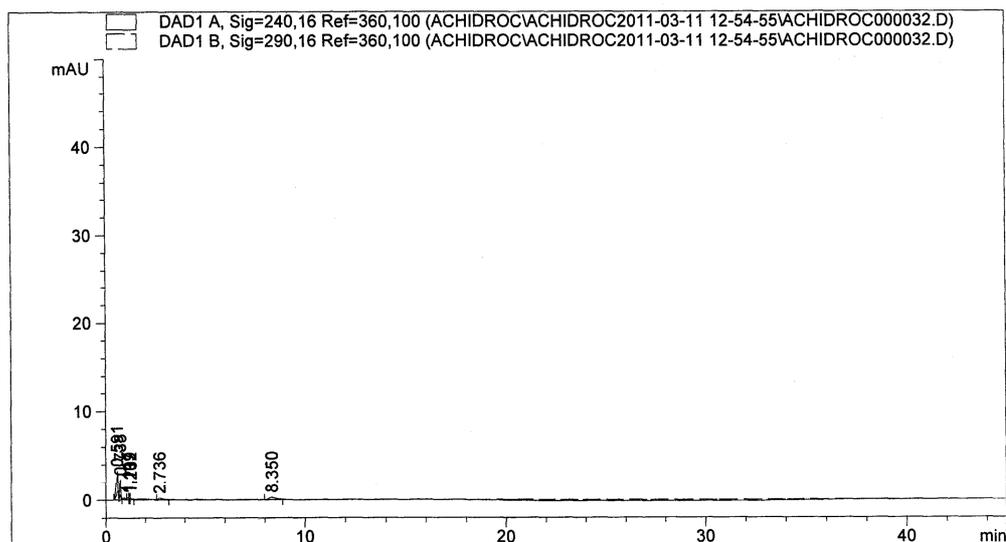


Figura 6.19.: Cromatograma correspondiente a la solución placebo sometida a luz ultravioleta.

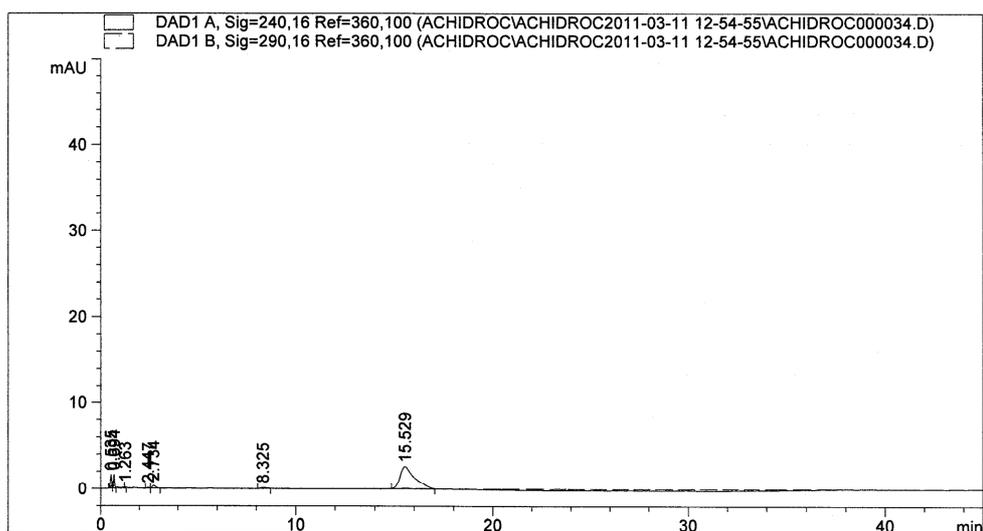


Figura 6.20.: Cromatograma correspondiente a la solución placebo sometida a humedad elevada.

Por lo tanto se concluye que el placebo sí que produce picos de degradación cuando se somete a condiciones de temperatura elevada y de humedad elevada principalmente, y bajo las demás condiciones excepto en medio básico y con  $\text{KMnO}_4$  se produce la aparición de un pico de degradación que eluye a 8,3 minutos, si bien su área no es mayor de 7.

Después de la realización de todo el estudio de estrés llevado a cabo con las diferentes muestras, se puede concluir que los productos de degradación que se forman en el producto terminado a partir del principio activo acetato de hidrocortisona y que se tendrán que tener en cuenta son, el producto de degradación conocido hidrocortisona, con un tiempo de retención relativo de 0,43, y cinco productos de degradación desconocidos que eluyen a unos 2,5 minutos ( $t_{RR} = 0,15$ ), 4,5 minutos ( $t_{RR} = 0,29$ ), 11,5 minutos ( $t_{RR} = 0,74$ ), 13 minutos ( $t_{RR} = 0,86$ ) y 32 minutos ( $t_{RR} = 2,11$ ), a pesar de que ningún de ellos interfiere con los picos correspondientes al principio activo, conservantes y antioxidantes por lo que se trata de un método selectivo y apto para utilizar en rutina.

### 6.3.1.3. Linealidad

La relación de linealidad obtenida entre las áreas de los picos de acetato de hidrocortisona, metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico, y butilhidroxianisol y las concentraciones correspondientes se representan por las ecuaciones de rectas de regresión, así como del estudio estadístico de los valores resultantes mostradas en el cuadro 6.6. El coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y el error estándar (Sx,y) de la línea de regresión son proporcionados a lo largo de las desviaciones estándares de la pendiente y de la ordenada en el origen.

- ACETATO DE HIDROCORTISONA

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
263,70	3621,44	13,73
242,53	3326,75	13,72
220,03	3032,83	13,78
198,03	2716,32	13,72
175,73	2429,43	13,82
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9993	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9985	<b>Media:</b> 13,76
<b>Pendiente</b>	13,5871	<b>S.D:</b> 0,09
<b>Ordenada en origen</b>	36,1056	<b>RSD:</b> 0,63

Cuadro 6.6.: Resultados estadísticos de los valores de la linealidad

La ecuación de la recta que se obtiene es la siguiente:

$$Y = 13,5871 X + 36,1056$$

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 2% y R > 0,9990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

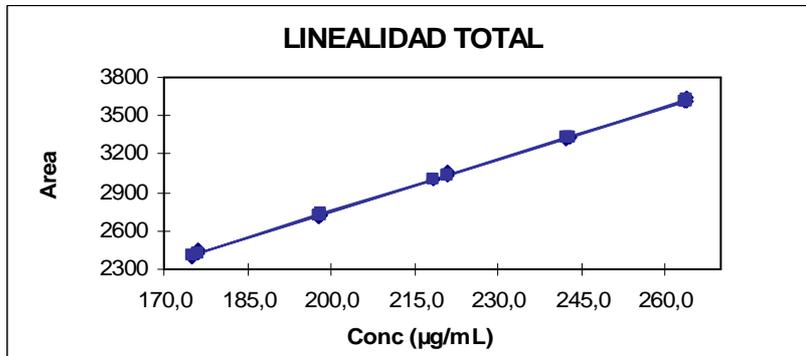


Figura 6.21.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999274438
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,998549403
R <sup>2</sup> ajustado	0,998437819
Error típico	17,34511092
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2692280,506	2692280,506	8948,827645	7,70818E-20
Residuos	13	3911,087348	300,8528729		
Total	14	2696191,594			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	36,10558227	31,91518972	1,131297748	0,278368166	-32,84298	105,054145
Variable X 1	13,58708065	0,143629312	94,59824335	7,70818E-20	13,27678845	13,8973729

Figura 6.22.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza.

## 1ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
263,7	3640,91	13,81
242,1	3319,83	13,71
218,4	2999,52	13,73
198,3	2729,46	13,76
175,1	2400,74	13,71
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9999	
<b>Coef. De determinación R2</b>	0,9997	<b>Media:</b> 13,75
<b>Pendiente</b>	19,9014	<b>S.D:</b> 0,04
<b>Ordenada en origen</b>	-51,8061	<b>RSD:</b> 0,30

Cuadro 6.7.: Resultados estadísticos de los valores de la primera linealidad.

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 2% y R > 0,9990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

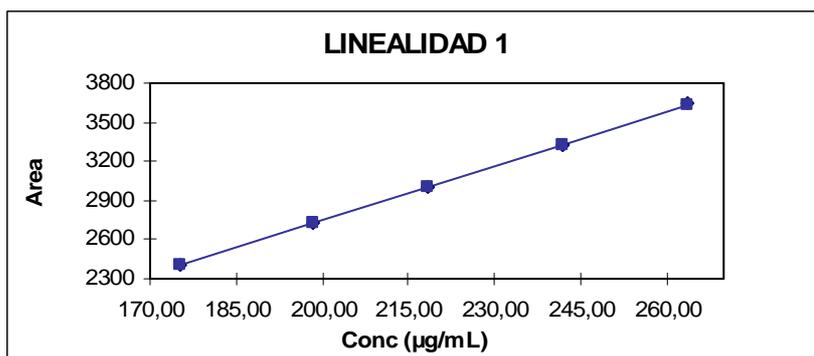


Figura 6.23.: Representación grafica de la curva de regresión ajustada de la primera linealidad.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999855853
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,999711727
R <sup>2</sup> ajustado	0,999615636
Error típico	9,522803631
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	943456,5785	943456,5785	10403,80634	2,07746E-06
Residuos	3	272,051367	90,68378899		
Total	4	943728,6299			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-32,1903677	30,20673475	-1,065668564	0,364729846	-128,321769	63,9410339
Variable X 1	13,89524138	0,136229125	101,9990507	2,07746E-06	13,46169909	14,3287837

Figura 6.24.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la primera linealidad.

2ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
263,6	3618,01	13,73
242,5	3327,87	13,72
220,9	3070,87	13,90
198,0	2720,18	13,74
176,1	2461,95	13,98
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9993	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9986	<b>Media:</b> 13,81
<b>Pendiente</b>	13,3054	<b>S.D:</b> 0,12
<b>Ordenada en origen</b>	109,6644	<b>RSD:</b> 0,87

Cuadro 6.8.: Resultados estadísticos de los valores de la segunda linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 2% y R > 0,9990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

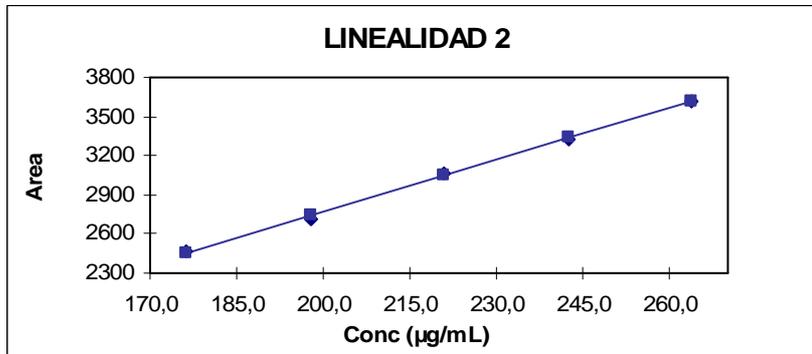


Figura 6.25.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada de la segunda linealidad.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999288396
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,998577298
R <sup>2</sup> ajustado	0,998103064
Error típico	20,12847641
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	853121,176	853121,176	2105,663243	2,27848E-05
Residuos	3	1215,466688	405,1555626		
Total	4	854336,6427			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	109,664408	64,48561896	1,700602549	0,187575772	-95,5578044	314,88662
Variable X 1	13,30538478	0,289956588	45,88750639	2,27848E-05	12,38261265	14,2281569

Figura 6.26.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la segunda linealidad.

### 3ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
263,8	3605,39	13,67
243,0	3332,55	13,71
220,8	3028,10	13,71
197,8	2699,31	13,65
176,0	2425,61	13,78
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9998	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9996	<b>Media: 13,71</b>
<b>Pendiente</b>	13,5569	<b>S.D: 0,05</b>
<b>Ordenada en origen</b>	31,8849	<b>RSD: 0,38</b>

Cuadro 6.9.: Resultados estadísticos de los valores de la tercera linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 2% y R > 0,9990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

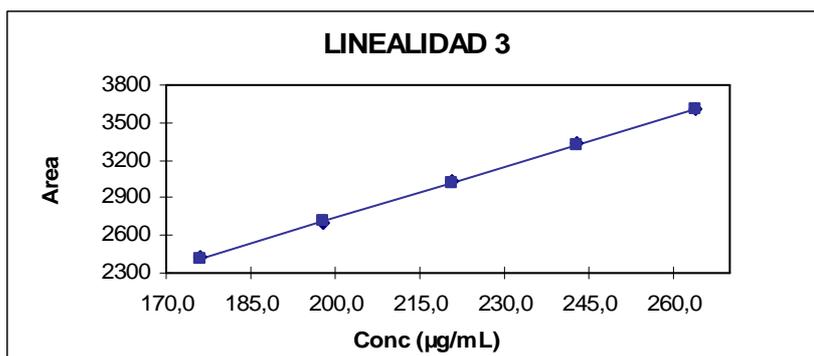


Figura 6.27.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada de la tercera linealidad.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Figura 6.28.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la tercera linealidad.

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999824176
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,999648383
R <sup>2</sup> ajustado	0,999531177
Error típico	10,25098346
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	896251,0196	896251,0196	8529,009475	2,79859E-06
Residuos	3	315,2479859	105,082662		
Total	4	896566,2676			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	31,88486583	32,65927649	0,976288187	0,40092367	-72,0516255	135,821357
Variable X 1	13,55687121	0,146794631	92,35263653	2,79859E-06	13,08970474	14,0240377

- METILPARAHIDROXIBENZOICO

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
215,97	4386,42	20,31
162,03	4022,41	20,23
180,20	3675,96	20,40
198,83	3295,81	20,34
144,07	2958,36	20,54
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9991	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9980	<b>Media: 20,36</b>
<b>Pendiente</b>	19,8329	<b>S.D: 0,16</b>
<b>Ordenada en origen</b>	93,5040	<b>RSD: 0,79</b>

Cuadro 6.10.: Resultados estadísticos de los valores de la linealidad

La ecuación de la recta que se obtiene es la siguiente:

$$Y = 19,8329 X + 93,5040$$

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 2% y R > 0,9990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

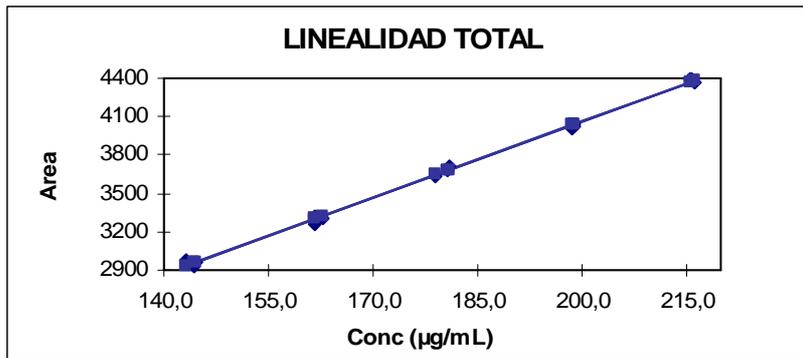


Figura 6.29.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999089506
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,998179841
R <sup>2</sup> ajustado	0,998039828
Error típico	23,24208638
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	3851172,232	3851172,232	7129,23154	3,37038E-19
Residuos	13	7022,529531	540,1945793		
Total	14	3858194,762			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	93,50395167	42,75517456	2,186962224	0,047623507	1,137030455	185,870873
Variable X 1	19,83290837	0,23489028	84,43477684	3,37038E-19	19,32545887	20,3403579

Figura 6.30.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza.

## 1ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
215,8	4385,57	20,32
198,9	4033,26	20,28
181,0	3706,85	20,48
161,7	3256,22	20,14
144,4	2938,12	20,35
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9993	
<b>Coef. De determinación R2</b>	0,9987	<b>Media:</b> 20,31
<b>Pendiente</b>	20,4099	<b>S.D:</b> 0,12
<b>Ordenada en origen</b>	-17,1187	<b>RSD:</b> 0,61

Cuadro 6.11.: Resultados estadísticos de los valores de la primera linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 2% y R > 0,9990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

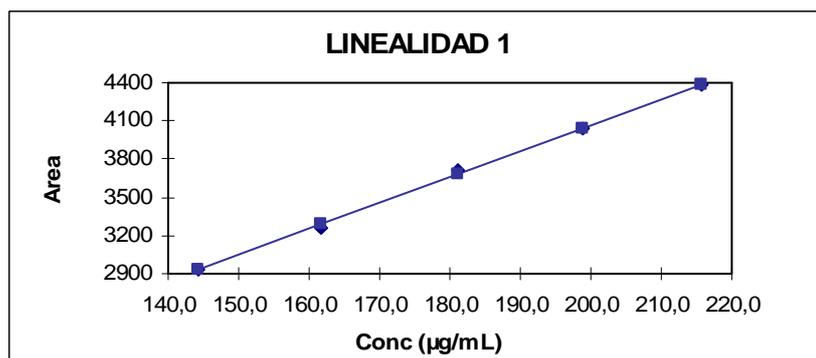


Figura 6.31.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada para la primera linealidad.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9993473
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,998695026
R <sup>2</sup> ajustado	0,998260035
Error típico	24,25123266
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1350268,29	1350268,29	2295,897169	2,00153E-05
Residuos	3	1764,366856	588,1222854		
Total	4	1352032,657			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-17,1187446	77,5870524	-0,220639192	0,839536376	-264,035604	229,798115
Variable X 1	20,40986992	0,425955294	47,91552116	2,00153E-05	19,0542888	21,765451

Figura 6.32.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza para la primera linealidad.

2ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
216,3	4375,43	20,23
198,9	4028,76	20,26
179,0	3635,35	20,31
162,7	3312,37	20,36
144,7	2963,23	20,48
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9999	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9999	<b>Media: 20,33</b>
<b>Pendiente</b>	19,7375	<b>S.D: 0,10</b>
<b>Ordenada en origen</b>	103,9693	<b>RSD: 0,49</b>

Cuadro 6.12.: Resultados estadísticos de los valores de la segunda linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 2% y R > 0,9990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

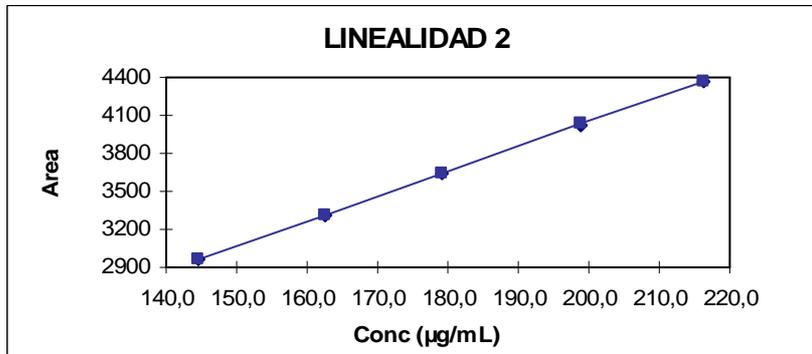


Figura 6.33.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada para la segunda linealidad.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999989014
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,999978029
R <sup>2</sup> ajustado	0,999970705
Error típico	3,03139223
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1254705,431	1254705,431	136539,2496	4,37092E-08
Residuos	3	27,56801656	9,189338853		
Total	4	1254732,999			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	103,9693377	9,726713196	10,68905144	0,001750395	73,01456617	134,924109
Variable X 1	19,73745567	0,053414899	369,5121778	4,37092E-08	19,56746546	19,9074459

Figura 6.34.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza para la segunda linealidad.

### 3ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
215,8	4398,24	20,38
198,7	4005,72	20,16
180,6	3685,68	20,41
161,7	3318,84	20,53
143,1	2973,72	20,78
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9992	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9983	<b>Media: 20,45</b>
<b>Pendiente</b>	19,3705	<b>S.D: 0,23</b>
<b>Ordenada en origen</b>	190,0283	<b>RSD: 1,11</b>

Cuadro 6.13.: Resultados estadísticos de los valores de la tercera linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 2% y R > 0,9990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

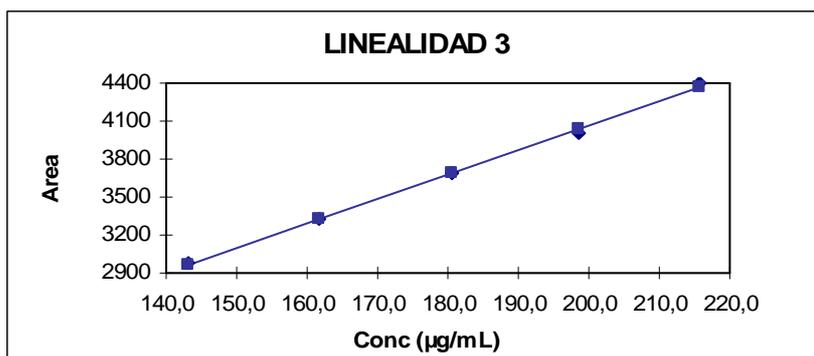


Figura 6.35.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada para la tercera linealidad.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999167335
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,998335363
R <sup>2</sup> ajustado	0,997780484
Error típico	26,34552005
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1248796,359	1248796,359	1799,194324	2,88393E-05
Residuos	3	2082,259279	694,0864265		
Total	4	1250878,618			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	190,0282897	83,03171634	2,288622927	0,106090558	-74,2159371	454,272516
Variable X 1	19,37054708	0,456670387	42,41691083	2,88393E-05	17,91721674	20,8238774

Figura 6.36.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza para la tercera linealidad.

- PROPILPARAHIDROXIBENZOICO

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
24,02	424,63	17,68
21,88	387,81	17,72
19,92	351,31	17,63
18,04	319,17	17,69
16,07	282,02	17,55
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9984	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9967	<b>Media:</b> 17,66
<b>Pendiente</b>	17,9334	<b>S.D:</b> 0,16
<b>Ordenada en origen</b>	-5,4518	<b>RSD:</b> 0,91

Cuadro 6.14: Resultados estadísticos de los valores de la linealidad

La ecuación de la recta que se obtiene es la siguiente:

$$Y = 17,9334 X - 5,4518$$

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 2% y R > 0,9990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

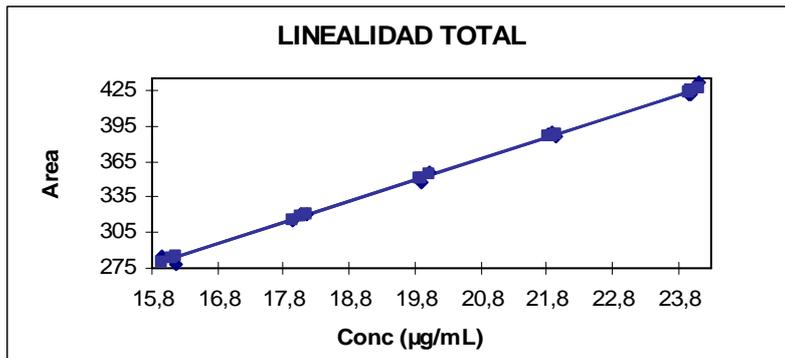


Figura 6.37.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,998361334
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,996725354
R <sup>2</sup> ajustado	0,996473458
Error típico	3,082743197
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	37603,58029	37603,58029	3956,89477	1,5339E-17
Residuos	13	123,542973	9,503305619		
Total	14	37727,12326			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-5,45182513	5,753542002	-0,947559804	0,36063571	-17,881595	6,97794428
Variable X 1	17,93335223	0,285091473	62,90385337	1,5339E-17	17,3174497	18,5492548

Figura 6.38.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza.

## 1ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
23,95	421,28	17,59
21,95	386,82	17,62
19,89	347,35	17,46
17,93	316,12	17,63
16,10	282,76	17,56
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9997	
<b>Coef. De determinación R2</b>	0,9994	<b>Media: 17,57</b>
<b>Pendiente</b>	17,6368	<b>S.D: 0,07</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-1,2388	<b>RSD: 0,38</b>

Cuadro 6.15.: Resultados estadísticos de los valores de la primera linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 2% y  $R > 0,9990$ .

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

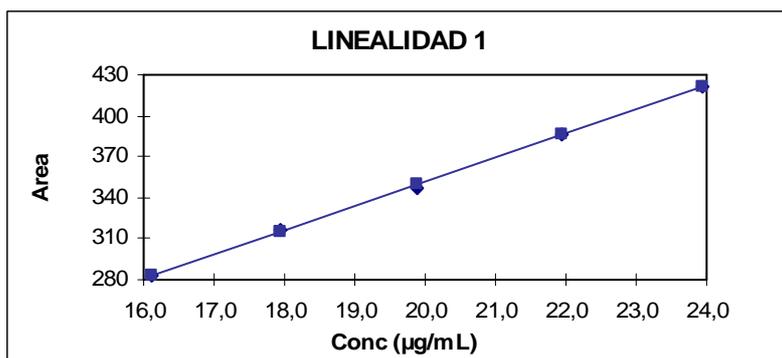


Figura 6.39.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada para la primera linealidad.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999710408
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,999420899
R <sup>2</sup> ajustado	0,999227865
Error típico	1,528863937
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	12101,88747	12101,88747	5177,44432	5,9156E-06
Residuos	3	7,01227481	2,337424937		
Total	4	12108,89974			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-1,23878487	4,940936756	-0,250718624	0,81822236	-16,963066	14,4854958
Variable X 1	17,63684682	0,245111238	71,95446006	5,9156E-06	16,8567927	18,4169009

Figura 6.40.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza para la primera linealidad.

2ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
24,12	431,90	17,91
21,82	0387,73	17,77
20,02	355,02	17,73
18,14	320,89	17,69
15,95	284,29	17,82
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9996	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9993	<b>Media: 17,79</b>
<b>Pendiente</b>	18,0862	<b>S.D: 0,08</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-5,9398	<b>RSD: 0,47</b>

Cuadro 6.16.: Resultados estadísticos de los valores de la segunda linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 2% y R > 0,9990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

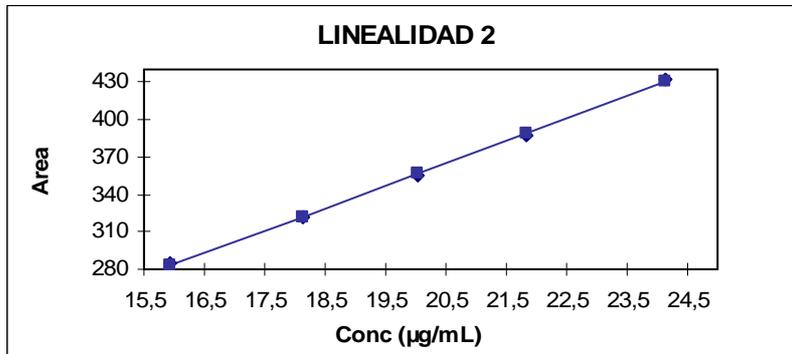


Figura 6.41.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada para la segunda linealidad.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9996417
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,999283529
R <sup>2</sup> ajustado	0,999044705
Error típico	1,771655019
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	13133,17063	13133,17063	4184,18876	8,141E-06
Residuos	3	9,41628452	3,138761507		
Total	4	13142,58691			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-5,93978008	5,650691753	-1,051159812	0,37038415	-23,92282	12,0432599
Variable X 1	18,08624913	0,279603674	64,68530563	8,141E-06	17,1964246	18,9760736

Figura 6.42.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza para la segunda linealidad.

### 3ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
23,98	420,73	17,55
21,88	388,88	17,77
19,86	351,56	17,70
18,05	320,50	17,76
16,17	279,00	17,25
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9980	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9959	<b>Media: 17,61</b>
<b>Pendiente</b>	18,0630	<b>S.D: 0,22</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-8,9085	<b>RSD: 1,23</b>

Cuadro 6.17.: Resultados estadísticos de los valores de la tercera linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 2% y R > 0,9990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

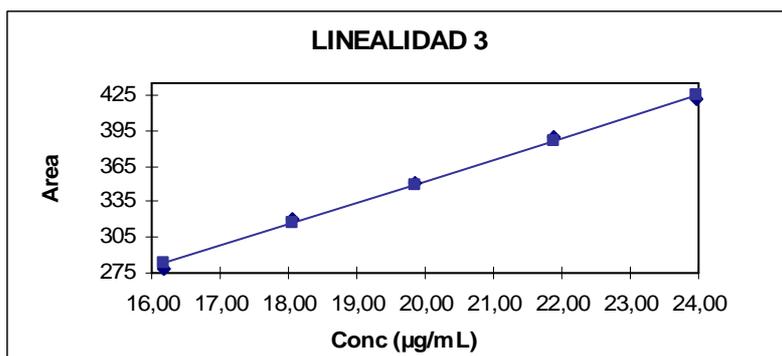


Figura 6.43.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada para la tercera linealidad.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99795219
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,995908573
R <sup>2</sup> ajustado	0,994544763
Error típico	4,113169302
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	12354,32553	12354,32553	730,240421	0,00011121
Residuos	3	50,75448513	16,91816171		
Total	4	12405,08002			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	-8,90850845	13,48664883	-0,660542775	0,55609733	-51,829084	34,0120675
Variable X 1	18,06300828	0,668431867	27,022961	0,00011121	15,9357578	20,1902588

Figura 6.44.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza para la tercera linealidad.

- BHA

<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Respuesta (Y)</b>	<b>Factor respuesta (Y/X)</b>
11,95	72,49	6,07
11,01	66,02	6,00
10,01	60,56	6,05
8,98	53,55	5,96
7,90	46,78	5,92
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9968	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9936	<b>Media: 6,00</b>
<b>Pendiente</b>	6,3207	<b>S.D: 0,10</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-3,1457	<b>RSD: 1,61</b>

Cuadro 6.18.: Resultados estadísticos de los valores de la linealidad

La ecuación de la recta que se obtiene es la siguiente:

$$Y = 6,3207 X - 3,1457$$

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 5% y R > 0,990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

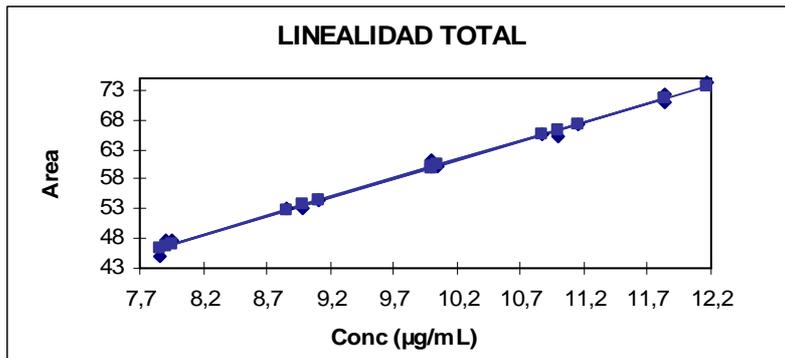


Figura 6.45.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,996802231
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,993614688
R <sup>2</sup> ajustado	0,99312351
Error típico	0,780894767
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1233,571227	1233,571227	2022,92232	1,179E-15
Residuos	13	7,927356277	0,609796637		
Total	14	1241,498583			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-3,14568398	1,415717958	-2,22197081	0,0446565	-6,2041561	-0,08721186
Variable X 1	6,320673361	0,14053152	44,97690874	1,179E-15	6,01707353	6,62427319

Figura 6.46.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza.

## 1ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
11,84	72,35	6,11
10,87	65,60	6,04
10,00	61,03	6,10
8,86	53,26	6,01
7,95	47,69	6,00
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9994	
<b>Coef. De determinación R2</b>	0,9988	<b>Media:</b> 6,05
<b>Pendiente</b>	6,3045	<b>S.D:</b> 0,05
<b>Ordenada en origen</b>	-2,4544	<b>RSD:</b> 0,86

Cuadro 6.19.: Resultados estadísticos de los valores de la primera linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 5% y R > 0,990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

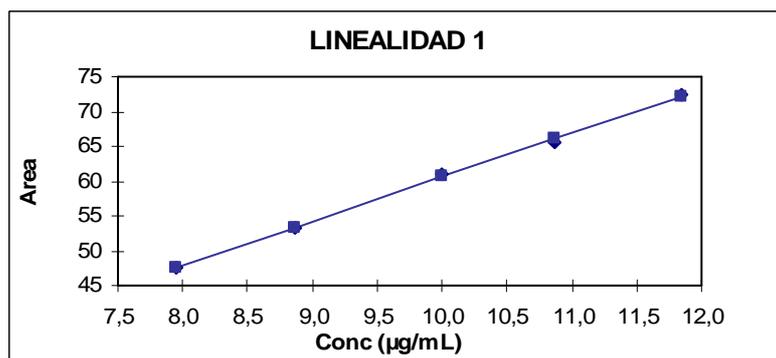


Figura 6.47.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada para la primera linealidad.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999392422
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,998785213
R <sup>2</sup> ajustado	0,998380284
Error típico	0,393286688
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	381,5150035	381,5150035	2466,5682	1,7976E-05
Residuos	3	0,464023257	0,154674419		
Total	4	381,9790267			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	-2,45439287	1,269481798	-1,933381697	0,14867254	-6,4944543	1,58566857
Variable X 1	6,304543909	0,126942518	49,66455679	1,7976E-05	5,90055578	6,70853204

Figura 6.48.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza para la primera linealidad.

2<sup>a</sup> Linealidad

<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Respuesta (Y)</b>	<b>Factor respuesta (Y/X)</b>
11,84	70,81	5,98
11,16	67,34	6,03
10,05	60,32	6,00
8,98	53,02	5,90
7,90	47,65	6,03
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9987	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9974	<b>Media: 5,99</b>
<b>Pendiente</b>	6,0363	<b>S.D: 0,05</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-0,4505	<b>RSD: 0,89</b>

Cuadro 6.20.: Resultados estadísticos de los valores de la segunda linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 5% y R > 0,990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

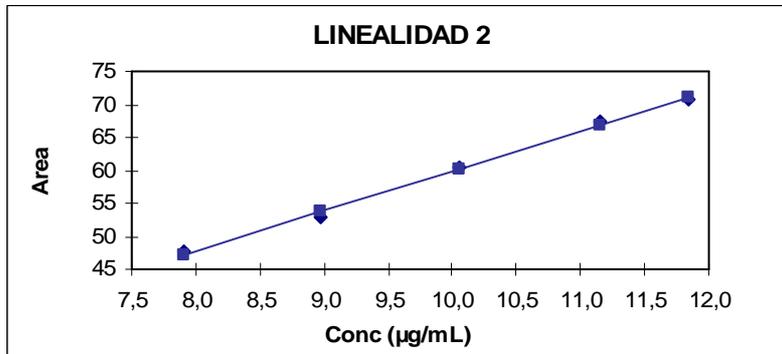


Figura 6.49.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada para la segunda linealidad.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9987236
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,997448829
R <sup>2</sup> ajustado	0,996598439
Error típico	0,562435547
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	371,0375398	371,0375398	1172,93064	5,4731E-05
Residuos	3	0,949001233	0,316333744		
Total	4	371,9865411			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-0,45050269	1,777927688	-0,253386398	0,81634176	-6,1086674	5,20766202
Variable X 1	6,036267744	0,1762513	34,24807492	5,4731E-05	5,47535692	6,59717857

Figura 6.50.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza para la segunda linealidad.

### 3ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
12,17	74,32	6,11
10,99	65,12	5,93
9,99	60,32	6,04
9,11	54,37	5,97
7,86	45,01	5,73
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9975	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9951	<b>Media: 5,95</b>
<b>Pendiente</b>	6,6229	<b>S.D: 0,14</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-6,5622	<b>RSD: 2,42</b>

Cuadro 6.21.: Resultados estadísticos de los valores de la tercera linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD factor respuesta < 5% y R > 0,990.

Por lo tanto el resultado cumple.

En la siguiente figura, se representa la curva de regresión ajustada para la ecuación de la recta obtenida:

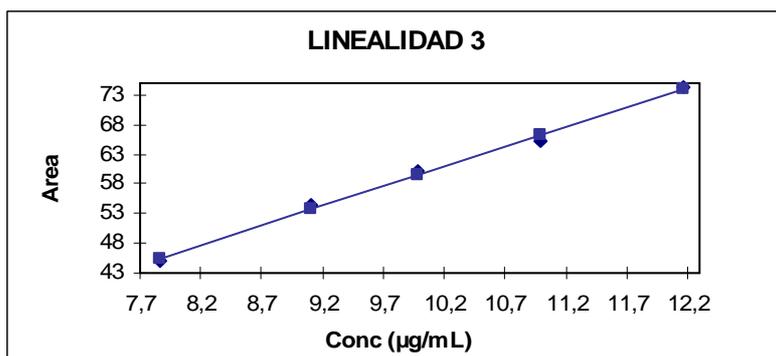


Figura 6.51.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada para la tercera linealidad.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,997522072
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,995050284
R <sup>2</sup> ajustado	0,993400379
Error típico	0,896796739
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	485,0360805	485,0360805	603,095385	0,00014801
Residuos	3	2,412733174	0,804244391		
Total	4	487,4488136			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	-6,56217714	2,732913859	-2,401165011	0,0957741	-15,259537	2,13518264
Variable X 1	6,622932077	0,269685315	24,55800042	0,00014801	5,76467224	7,48119192

Figura 6.52.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza para la tercera linealidad.

El resumen de las curvas de calibración obtenidos para la determinación de acetato de hidrocortisona, metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico y butilhidroxianisol, se presentan en el cuadro 6.22.

Componente	Ecuación	R	r <sup>2</sup>	(Sx,y)	Ordenada en origen	Pendiente
Acetato de hidrocortisona	Y = 13,5871 X + 36,1056	0,9993	0,9985	13,76	36,1056	13,5871
Metilparahidroxibenzoico	Y = 19,8329 X + 93,5040	0,9991	0,9980	20,36	93,5040	19,8329
Propilparahidroxibenzoico	Y = 17,9334 X - 5,4518	0,9984	0,9967	17,66	-5,4518	17,9334
Butilhidroxianisol	Y = 6,3207 X - 3,1457	0,9968	0,9936	6,00	-3,1457	6,3207

Cuadro 6.22.: Curvas de calibración para la determinación de acetato de hidrocortisona, los dos conservantes y el antioxidante por cromatografía líquida de alta resolución.

### 6.3.1.4. Precisión

#### *Repetitibilidad del sistema instrumental*

La precisión del sistema instrumental fue estudiada con datos obtenidos en un día, y con datos obtenidos al día siguiente. La R.S.D obtenida para el factor de respuesta se presenta en los cuadros 6.23., 6.24. y 6.25., tanto para el principio activo, como para los conservantes como para el antioxidante. En todos los casos, la R.S.D. obtenida fue muy por debajo de 1%, el porcentaje límite especificado para el estudio de precisión del sistema instrumental según AEFI (AEFI: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria) (62), y AOAC (2.7% para el acetato de hidrocortisona, 3.7% para el metilparahidroxibenzoico, 5.3% para el propilparahidroxibenzoico y butilhidroxianisol) (AOAC: Association of Official Analytical Chemists) (66), demostrando, por lo tanto, que el equipo utilizado para el estudio funciona correctamente para el método de análisis desarrollado siendo altamente repetitivo.

<b>Día 1</b>				
<b>Inyección</b>	<b>Hidrocortisona acetate</b>	<b>Metilparahidroxibenzoico</b>	<b>Propilparahidroxibenzoico</b>	<b>BHA</b>
1	2985,69	3620,32	350,54	58,84
2	2979,65	3623,35	349,82	58,83
3	2982,83	3621,80	348,97	58,86
4	2980,02	3620,75	349,83	59,22
5	2985,28	3632,10	350,98	59,37
6	2988,87	3629,68	350,25	59,36
<b>Media</b>	2983,72	3624,67	350,07	59,08
<b>SD</b>	3,58	4,99	0,70	0,26
<b>RSD</b>	<b>0,12</b>	<b>0,14</b>	<b>0,20</b>	<b>0,44</b>

Cuadro 6.23.: Resultados obtenidos en el día 1 para la precisión del sistema instrumental

<b>Día 2</b>				
<b>Inyección</b>	<b>Hidrocortisona acetate</b>	<b>Metilparahidroxibenzoico</b>	<b>Propilparahidroxibenzoico</b>	<b>BHA</b>
1	2970,09	3591,34	347,04	58,21
2	2966,86	3595,69	347,43	58,70
3	2972,58	3596,94	347,42	58,67
4	2971,47	3600,41	347,62	58,91
5	2973,35	3603,49	348,02	59,16
6	2977,55	3606,55	348,29	59,30
<b>Media</b>	3599,07	347,64	58,83	2971,98
<b>SD</b>	5,53	0,45	0,39	3,56
<b>RSD</b>	<b>0,15</b>	<b>0,13</b>	<b>0,66</b>	<b>0,12</b>

Cuadro 6.24.: Resultados obtenidos en el día 2 para la precisión del sistema instrumental

<b>Interdía</b>	<b>Hidrocortisona acetate</b>	<b>Metilparahidroxibenzoico</b>	<b>Propilparahidroxibenzoico</b>	<b>BHA</b>
<b>Media entre días</b>	2977,85	3611,87	348,85	58,95
<b>SD entre días</b>	7,01	14,28	1,39	0,34
<b>RSD entre días</b>	0,24	0,40	0,40	0,58

Cuadro 6.25.: Resultados obtenidos para la precisión del sistema instrumental

#### *Repetibilidad de la solución patrón*

Los resultados obtenidos del estudio de precisión de la solución patrón de las 6 muestras estudiadas para el principio activo, así como para los conservantes y el antioxidante están representados en el cuadro 6.26., obteniéndose también valores de RSD inferiores al 1%, excepto para el caso del butilhidroxianisol que es del 2,59%, cumpliendo con las especificaciones establecidas al inicio del estudio (2.7% para el acetato de hidrocortisona, 3.7% para el metilparahidroxibenzoico y 5.3% para el propilparahidroxibenzoico y butilhidroxianisol), por lo que con el método desarrollado, se obtiene una buena repetibilidad y precisión para la solución patrón.

Componente	Acetato de hidrocortisona	Metilparahidroxibenzoico	Propilparahidroxibenzoico	Butilhidroxianisol
Media (*)	13,53	20,08	17,23	5,55
S.D.	0,08	0,08	0,14	0,14
R.S.D.	0,62	0,40	0,80	2,59

(\*) Factor de respuesta

Cuadro 6.46.: Resultados obtenidos para el estudio de precisión de la solución patrón.

#### *Repetibilidad del método (repetibilidad de la solución problema)*

En el estudio de precisión del método (n=6), el valor R.S.D. obtenido para el acetato de hidrocortisona fue de 0.70%, para el metilparahidroxibenzoico fue de 0.51%, para el propilparahidroxibenzoico fue de 0.94% y para el butilhidroxianisol fue de 1.10%.

También en este estudio, los resultados obtenidos para la R.S.D. fueron muy por debajo del límite establecido al inicio del estudio (2.7% para el acetato de hidrocortisona, 3.7% para el metilparahidroxibenzoico, 5.3% para el propilparahidroxibenzoico y butilhidroxianisol) indicando la existencia de una buena repetibilidad en el estudio de la solución problema.

#### *Precisión intermedia*

Para determinar la precisión intermedia del método, se analiza el contenido en acetato de hidrocortisona, metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico y BHA en la misma mezcla de producto final previamente homogeneizada, según procedimiento analítico indicado y bajo diferentes condiciones: diferentes días y diferentes analistas. Se preparan seis muestras de una concentración del 100%, según metodología analítica descrita, que son inyectadas según estas condiciones. Los resultados obtenidos, expresados en forma de factor respuesta (FR) demuestran la precisión intermedia del método.

- Días diferentes, un mismo analista

<b>HIDROCORTISONA ACETATO</b>						
%	DÍA 1			DÍA 2		
	Conc (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	FR (Y/X)
100	226,81	3149,58301	13,886	224,06	3357,06177	14,983
	219,82	3078,92444	14,007	221,17	3268,80762	14,780
	223,63	3138,87293	14,036	231,21	3434,54151	14,855
	226,79	3215,04812	14,177	224,95	3296,46363	14,654
	221,21	3100,62415	14,017	224,06	3226,93494	14,402
	222,02	3105,01636	13,985	219,91	3141,00772	14,283
<b>Media</b>	14,018			14,659		
<b>SD</b>	0,094			0,270		
<b>RSD</b>	0,669			1,844		

Cuadro 6.27.: Resultados obtenidos del contenido de acetato de hidrocortisona en diferentes días y un mismo analista

<b>METILPARAHIDROXIBENZOICO</b>						
%	DÍA 1			DÍA 2		
	Conc (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	FR (Y/X)
100	179,19	3721,67591	20,770	183,32	3798,30261	20,719
	179,88	3710,44092	20,627	180,96	3759,15894	20,774
	181,27	3742,68982	20,648	189,17	3936,51367	20,809
	182,70	3821,71472	20,918	184,05	3841,29810	20,871
	179,35	3725,12158	20,770	182,07	3807,60511	20,913
	184,22	3829,85901	20,790	183,69	3829,31373	20,846
<b>Media</b>	20,754			20,822		
<b>SD</b>	0,106			0,070		
<b>RSD</b>	0,510			0,335		

Cuadro 6.28.: Resultados obtenidos del contenido de metilparahidroibenzoico en diferentes días y un mismo analista

PROPILPARAHIDROXIBENZOICO						
%	DÍA 1			DÍA 2		
	Conc (X) (µg/mL)	Área (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) (µg/mL)	Área (Y)	FR (Y/X)
100	19,91	365,06714	18,336	20,37	374,92266	18,407
	19,99	365,17668	18,271	20,11	372,29866	18,516
	20,14	367,21964	18,233	21,02	391,47002	18,625
	20,30	378,69740	18,655	20,45	382,49819	18,704
	19,93	369,14193	18,524	20,23	379,39678	18,754
	20,47	379,97682	18,564	20,41	382,53589	18,742
<b>Media</b>	18,430			18,625		
<b>SD</b>	0,173			0,139		
<b>RSD</b>	0,941			0,745		

Cuadro 6.29.: Resultados obtenidos del contenido de propilparahidroxibenzoico en diferentes días y un mismo analista

BHA						
%	DÍA 1			DÍA 2		
	Conc (X) (µg/mL)	Área (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) (µg/mL)	Área (Y)	FR (Y/X)
100	9,95	45,28748	4,549	10,18	45,72582	4,490
	9,99	45,47904	4,551	10,05	44,53474	4,430
	10,07	44,85966	4,455	10,51	45,57375	4,336
	10,15	45,05897	4,439	10,22	44,91420	4,393
	9,96	44,41617	4,458	10,12	44,26840	4,377
	10,23	45,90732	4,486	10,21	43,81621	4,294
<b>Media</b>	4,490			4,386		
<b>SD</b>	0,049			0,069		
<b>RSD</b>	1,096			1,574		

Cuadro 6.30.: Resultados obtenidos del contenido de BHA en diferentes días y un mismo analista

<b>Interdía</b>	Hidrocortisona acetato	Metilparahidroxibenzoico	Propilparahidroxibenzoico	BHA
<b>Media interdía</b>	14,339	20,788	18,528	4,438
<b>SD interdía</b>	0,387	0,093	0,181	0,079
<b>RSD interdía</b>	2,696	0,446	0,976	1,769

Cuadro 6.31.: Resumen de la media y desviación estándar para los diferentes analitos estudiados en diferentes días y un mismo analista.

- **Analistas diferentes**

<b>HIDROCORTISONA ACETATO</b>						
%	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	Conc (X) (µg/mL)	Área (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) (µg/mL)	Área (Y)	FR (Y/X)
100	226,81	3149,58301	13,886	223,61	3098,87244	13,858
	219,82	3078,92444	14,007	229,27	3080,79737	13,438
	223,63	3138,87293	14,036	227,65	3189,46705	14,010
	226,79	3215,04812	14,177	225,43	3062,94104	13,587
	221,21	3100,62415	14,017	221,49	3006,17761	13,572
	222,02	3105,01636	13,985	222,21	2970,52954	13,368
<b>Media</b>	14,018			13,639		
<b>SD</b>	0,094			0,248		
<b>RSD</b>	0,669			1,817		

Cuadro 6.32.: Resultados obtenidos del contenido de acetato de hidrocortisona realizado por analistas diferentes.

<b>METILPARAHIDROXIBENZOICO</b>						
%	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	Conc (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	FR (Y/X)
100	179,19	3721,67591	20,770	182,95	3811,74134	20,834
	179,88	3710,44092	20,627	187,58	3888,74536	20,731
	181,27	3742,68982	20,648	186,26	3881,34131	20,838
	182,70	3821,71472	20,918	184,45	3835,95081	20,797
	179,35	3725,12158	20,770	194,11	4040,32557	20,815
	184,22	3829,85901	20,790	181,81	3778,32630	20,782
<b>Media</b>	20,754			20,800		
<b>SD</b>	0,106			0,040		
<b>RSD</b>	0,510			0,192		

Cuadro 6.33.: Resultados obtenidos del contenido de metilparahidroxibenzoico realizado por analistas diferentes.

<b>PROPILPARAHIDROXIBENZOICO</b>						
%	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	Conc (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	FR (Y/X)
100	19,91	365,06714	18,336	20,33	379,40837	18,664
	19,99	365,17668	18,271	20,84	386,47747	18,543
	20,14	367,21964	18,233	20,70	391,57797	18,921
	20,30	378,69740	18,655	20,49	381,29241	18,605
	19,93	369,14193	18,524	21,57	402,75518	18,674
	20,47	379,97682	18,564	20,20	372,87967	18,459
<b>Media</b>	18,430			18,644		
<b>SD</b>	0,173			0,158		
<b>RSD</b>	0,941			0,845		

Cuadro 6.34.: Resultados obtenidos del contenido de propilparahidroxibenzoico realizado por analistas diferentes.

BHA						
%	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	Conc (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	FR (Y/X)
100	9,95	45,28748	4,549	10,16	43,12886	4,243
	9,99	45,47904	4,551	10,42	44,13033	4,235
	10,07	44,85966	4,455	10,35	44,86404	4,336
	10,15	45,05897	4,439	10,25	43,75572	4,270
	9,96	44,41617	4,458	10,78	46,76673	4,337
	10,23	45,90732	4,486	10,10	41,07573	4,067
<b>Media</b>	4,490			4,248		
<b>SD</b>	0,049			0,099		
<b>RSD</b>	1,096			2,333		

Cuadro 6.35.: Resultados obtenidos del contenido de BHA realizado por analistas diferentes.

	Hidrocortisona acetato	Metilparahidroxi- benzoico	Propilparahidroxi- benzoico	BHA
<b>Media interanalista</b>	13,828	20,777	18,537	4,369
<b>SD interanalista</b>	0,267	0,080	0,193	0,147
<b>RSD interanalista</b>	1,928	0,385	1,043	3,356

Cuadro 6.36.: Resumen de la media y desviación estándar para los diferentes analitos analizados por diferentes analistas.

<b>Interdía</b>	Hidrocortisona acetato	Metilparahidroxi- benzoico	Propilparahidroxi- benzoico	BHA
<b>Media interdía</b>	14,339	20,788	18,528	4,438
<b>SD interdía</b>	0,387	0,093	0,181	0,079
<b>RSD interdía</b>	2,696	0,446	0,976	1,769

Cuadro 6.37.: Media de los resultados obtenidos para diferentes días y un mismo analista para la precisión intermedia del método

	Hidrocortisona acetato	Metilparahidroxi -benzoico	Propilparahidroxi -benzoico	BHA
<b>Media interanalista</b>	13,828	20,777	18,537	4,369
<b>SD interanalista</b>	0,267	0,080	0,193	0,147
<b>RSD interanalista</b>	1,928	0,385	1,043	3,356

Cuadro 6.38: Media de los resultados obtenidos para un mismo día, diferentes analistas para la precisión intermedia del método

Para ambos estudios, los resultados obtenidos para la R.S.D. fueron muy por debajo del límite establecido al inicio del estudio (2.7% para el acetato de hidrocortisona, 3.7% para el metilparahidroxibenzoico, 5.3% para el propilparahidroxibenzoico y butilhidroxianisol), mostrando por lo tanto que el método de análisis propuesto posee una buena precisión intermedia.

### 6.3.1.5. Exactitud

<b>HIDROCORTISONA ACETATO</b>				
%	Concentración (µg/mL) añadido	Concentración (µg/mL) hallado	Error relativo en %	% recuperado
80	175,10	176,06	-0,5487	100,55
	177,50	174,77	1,5377	98,46
	175,60	174,02	0,9016	99,10
100	217,50	220,22	-1,2504	101,25
	219,00	221,00	-0,9131	100,91
	218,60	220,47	-0,8534	100,85
120	264,20	265,04	-0,3168	100,32
	263,10	256,30	2,5836	97,42
	262,50	262,75	-0,0965	100,10
<b>N</b>			<b>9</b>	
<b>Recuperación (media)</b>			99,884	
<b>SD</b>			1,288	
<b>RSD</b>			1,289	

Cuadro 6.39.: Resultados obtenidos de acetato de hidrocortisona a diferentes concentraciones.

<b>METILPARAHIDROXIBENZOICO</b>				
<b>%</b>	<b>Concentración (µg/mL) añadido</b>	<b>Concentración (µg/mL) hallado</b>	<b>Error relativo en %</b>	<b>% recuperado</b>
80	144,60	145,56	-0,6672	100,67
	143,20	141,59	1,1214	98,88
	144,20	144,27	-0,0496	100,05
100	181,50	185,05	-1,9546	101,95
	180,00	182,23	-1,2417	101,24
	179,70	182,34	-1,4672	101,47
120	217,00	218,27	-0,5838	100,58
	215,10	206,03	4,2180	95,78
	216,20	216,17	0,0148	99,99
<b>N</b>			9	
<b>Recuperación (media)</b>			100,068	
<b>SD</b>			1,848	
<b>RSD</b>			1,846	

Cuadro 6.40.: Resultados obtenidos de metilparahidroxibenzoico a diferentes concentraciones.

<b>PROPILPARAHIDROXIBENZOICO</b>				
<b>%</b>	<b>Concentración (µg/mL) añadido</b>	<b>Concentración (µg/mL) hallado</b>	<b>Error relativo en %</b>	<b>% recuperado</b>
80	15,95	16,17	-1,3731	101,37
	16,11	15,76	2,1624	97,84
	15,92	15,73	1,1799	98,82
100	19,84	20,10	-1,3267	101,33
	20,02	20,32	-1,5075	101,51
	20,05	20,46	-2,0431	102,04
120	23,88	24,04	-0,6740	100,67
	24,11	23,01	4,5489	95,45
	24,05	23,82	0,9581	99,04
<b>N</b>			9	
<b>Recuperación (media)</b>			99,786	
<b>SD</b>			2,174	
<b>RSD</b>			2,179	

Cuadro 6.41.: Resultados obtenidos de propilparahidroxibenzoico a diferentes concentraciones.

<b>BHA</b>				
<b>%</b>	<b>Concentración (µg/mL) añadido</b>	<b>Concentración (µg/mL) hallado</b>	<b>Error relativo en %</b>	<b>% recuperado</b>
80	7,93	7,96	-0,3552	100,36
	8,24	8,25	-0,1036	100,10
	8,11	8,38	-3,3736	103,37
100	10,28	10,88	-5,8181	105,82
	10,20	10,82	-6,0921	106,09
	10,27	10,81	-5,2908	105,29
120	12,10	12,35	-2,0471	102,05
	11,87	11,77	0,8243	99,18
	12,20	12,78	-4,7196	104,72
<b>N</b>			<b>9</b>	
<b>Recuperación (media)</b>			102,997	
<b>SD</b>			2,664	
<b>RSD</b>			2,586	

Cuadro 6.42.: Resultados obtenidos de BHA a diferentes concentraciones.

A modo de resumen, los resultados obtenidos en el estudio de exactitud (recuperación del método) de las 9 muestras estudiadas (n=3 para 80%, n=3 para 100% y n=3 para 120%) se presentan en el cuadro 6.43. para los cuatro componentes estudiados. Se representa la media, desviación estándar (S.D.) y desviación estándar relativa (R.S.D.).

Componente	Recuperación (%)		
	Media	S.D.	R.S.D.
Acetato de hidrocortisona	99.884	1.288	1.289
Metilparahidroxibenzoico	100.068	1.848	1.846
Propilparahidroxibenzoico	99.786	2.174	2.179
Butilhidroxianisol	102.997	2.664	2.586

Cuadro 6.43: Estudio de exactitud de la determinación de acetato de hidrocortisona, conservantes y antioxidante mediante este sistema cromatográfico.

La recuperación obtenida, individualmente y la media para cada componente estudiado, se encuentra dentro de los límites establecidos al inicio del estudio (entre 97% y 103% para el acetato de hidrocortisona, entre 95% y 105% para el metilparahidroxibenzoico y

entre 90% y 107% para el propilparahidroxibenzoico y el butilhidroxianisol), concluyendo por lo tanto que el estudio de recuperación del principio activo, los conservantes y el antioxidante en la matriz del método desarrollado para la evaluación del principio activo, conservantes y antioxidante en el producto terminado es correcto, y por lo tanto el método de análisis propuesto es suficientemente exacto.

### 6.3.1.6. Robustez

- Modificación de la longitud de onda del detector

*Recuperación Hidrocortisona acetato (%)*

<i>Muestra</i>	<i>237 nm</i>	<i>240 nm</i>	<i>243 nm</i>
1	102,168	102,249	102,234
2	104,739	104,815	104,806
3	102,157	102,236	102,226
<i>Media</i>	103,021	103,100	103,089
<i>SD</i>	1,487	1,485	1,488
<i>RSD</i>	1,444	1,441	1,443

Cuadro 6.44.: Resultados de recuperación de acetato de hidrocortisona medido a diferentes longitudes de onda.

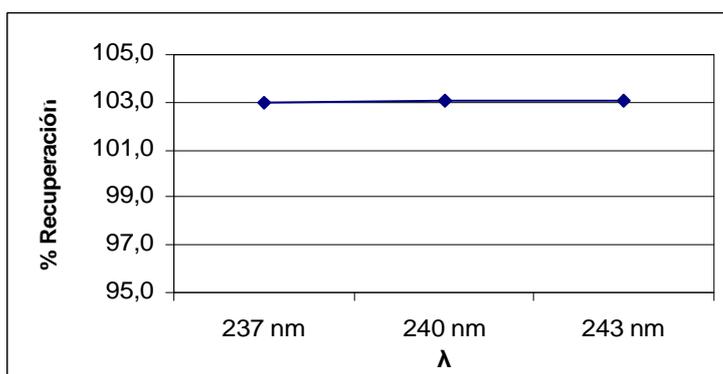


Figura 6.53.: Representación gráfica de la media de la recuperación de acetato de hidrocortisona en función de la longitud de onda a la que ha sido determinada.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.54.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
237 nm	3	309,0637911	103,0212637	2,21241076
240 nm	3	309,3004519	103,1001506	2,2063442
243 nm	3	309,2660622	103,0886874	2,21273091

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,010900512	2	0,005450256	0,00246563	0,99753842	5,14324938
Dentro de los grupos	13,26297174	6	2,21049529			
Total	13,27387225	8				

Figura 6.54.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar la longitud de onda del detector.

Recuperación Metilparahidroxibenzoico (%)

Muestra	237 nm	240 nm	240 nm
1	99,055	99,055	99,05
2	100,860	100,862	100,86
3	99,851	99,858	99,86
Media	99,922	99,925	99,924
SD	0,904	0,906	0,906
RSD	0,905	0,906	0,907

Cuadro 6.45.: Resultados de recuperación de metilparahidroxibenzoico medido a diferentes longitudes de onda.

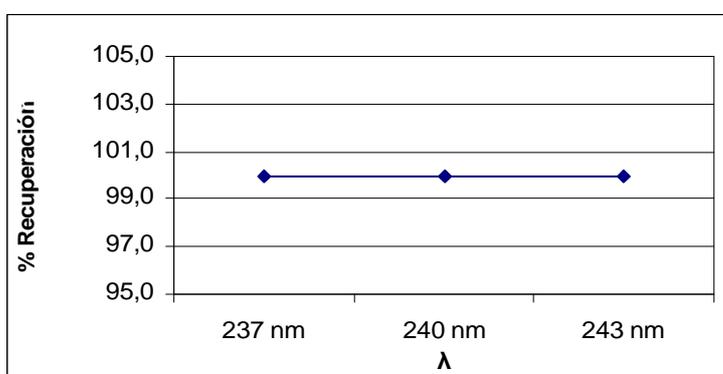


Figura 6.55.: Representación gráfica de la media de la recuperación de metilparahidroxibenzoico en función de la longitud de onda a la que ha sido determinada.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.56.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
237 nm	3	299,7656251	99,92187502	0,81797256
240 nm	3	299,7741943	99,92473142	0,820037
243 nm	3	299,7727131	99,92423768	0,82163358

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,3985E-05	2	6,99249E-06	8,5287E-06	0,99999147	5,14324938
Dentro de los grupos	4,919286292	6	0,819881049			
Total	4,919300277	8				

Figura 6.56.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar la longitud de onda del detector.

*Recuperación Propilparahidroxibenzoico (%)*

Muestra	237 nm	240 nm	243 nm
1	96,751	96,765	96,773
2	98,511	98,572	98,566
3	97,580	97,621	97,633
Media	97,614	97,653	97,657
SD	0,881	0,904	0,897
RSD	0,902	0,926	0,918

Cuadro 6.46.: Resultados de recuperación de propilparahidroxibenzoico medido a diferentes longitudes de onda.

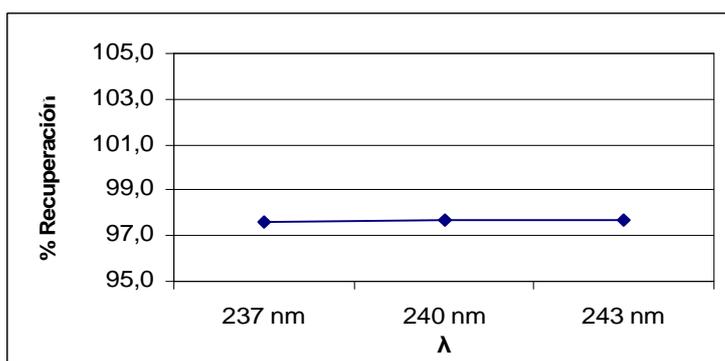


Figura 6.57.: Representación gráfica de la media de la recuperación de propilparahidroxibenzoico en función de la longitud de onda a la que ha sido determinada.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.58.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
237 nm	3	292,8419466	97,61398219	0,77591206
240 nm	3	292,9580443	97,65268142	0,81730541
243 nm	3	292,9721978	97,65739928	0,80442182

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,003404931	2	0,001702466	0,00213018	0,99787284	5,14324938
Dentro de los grupos	4,79527857	6	0,799213095			
Total	4,798683501	8				

Figura 6.58.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar la longitud de onda del detector.

Recuperación BHA (%)

Muestra	287 nm	290 nm	293 nm
1	102,669	102,776	102,602
2	103,714	103,674	104,036
3	104,168	103,935	104,462
Media	103,517	103,462	103,700
SD	0,769	0,608	0,975
RSD	0,743	0,588	0,940

Cuadro 6.47.: Resultados de recuperación de BHA medido a diferentes longitudes de onda.

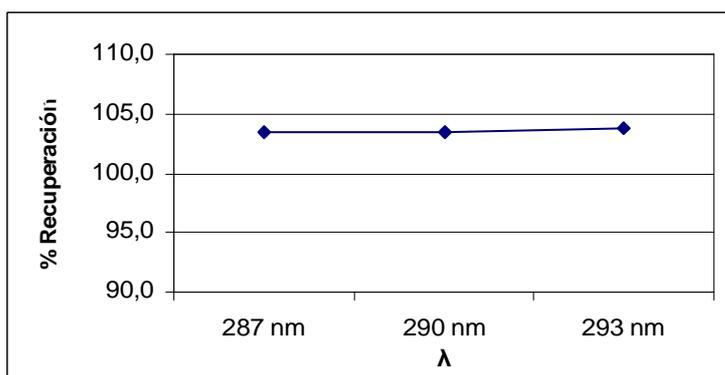


Figura 6.59.: Representación gráfica de la media de la recuperación de BHA en función de la longitud de onda a la que ha sido determinada.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.60.

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
287 nm	3	310,5512164	103,5170721	0,59098157
290 nm	3	310,385426	103,4618087	0,36983389
293 nm	3	311,0990417	103,6996806	0,94969279

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,092982938	2	0,046491469	0,07300382	0,9304102	5,14324938
Dentro de los grupos	3,821016493	6	0,636836082			
Total	3,913999431	8				

Figura 6.60.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar la longitud de onda del detector.

Interpretación de los resultados del estudio estadístico:

Al realizar el estudio estadístico ANOVA, a las recuperaciones halladas, se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los analitos en estudio al realizar pequeñas variaciones en la longitud de onda del detector ( $\pm 3$  nm), según el análisis de la varianza llevada a cabo, por lo que puede concluirse que el método es robusto para este parámetro.

- Modificación de la temperatura de la columna

*Recuperación Hidrocortisona acetato (%)*

<i>Muestra</i>	<i>30 °C</i>	<i>40 °C</i>	<i>45 °C</i>
1	102,894	102,792	103,227
2	104,937	104,958	104,729
3	103,665	103,460	104,009
<i>Media</i>	103,832	103,737	103,988
<i>SD</i>	1,032	1,109	0,751
<i>RSD</i>	0,993	1,069	0,722

Cuadro 6.48.: Resultados de recuperación de acetato de hidrocortisona medido a diferentes temperaturas de la columna.

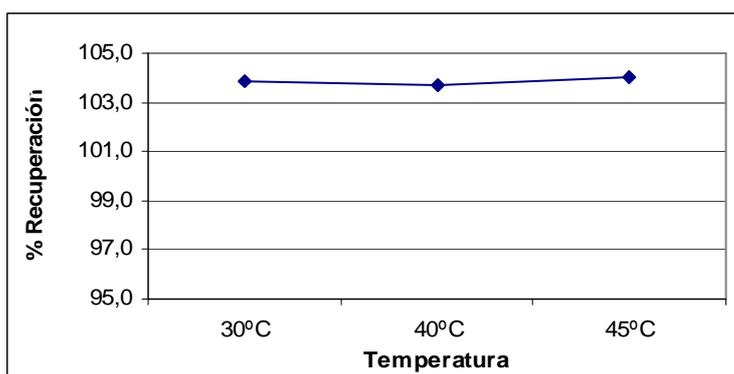


Figura 6.61.: Representación gráfica de la media de la recuperación de acetato de hidrocortisona en función de la temperatura de la columna a la que ha sido determinada.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.62.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
30 °C	3	311,495031	103,831677	1,06402557
40 °C	3	311,209951	103,736665	1,22958456
45 °C	3	311,9641681	103,988056	0,56425141

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,09667911	2	0,048339555	0,05074377	0,95092566	5,14324938
Dentro de los grupos	5,715723095	6	0,952620516			
Total	5,812402205	8				

Figura 6.62.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar la temperatura de la columna.

Recuperación Metilparahidroxibenzoico (%)

Muestra	30 °C	40 °C	45 °C
1	98,910	99,174	98,091
2	99,393	99,588	98,582
3	99,848	100,014	98,976
Media	99,383	99,592	98,550
SD	0,469	0,421	0,443
RSD	0,472	0,422	0,450

Cuadro 6.49.: Resultados de recuperación de metilparahidroxibenzoico medido a diferentes temperaturas de la columna.

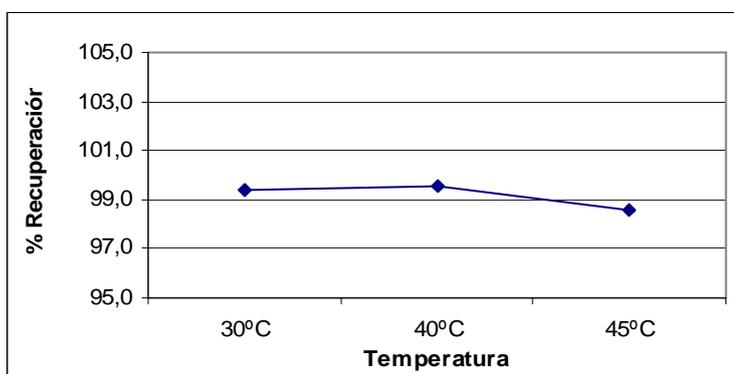


Figura 6.63.: Representación gráfica de la media de la recuperación de metilparahidroxibenzoico en función de la temperatura de la columna a la que ha sido determinada.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.64.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
30 °C	3	298,1502024	99,38340081	0,21989348
40 °C	3	298,7756698	99,59188992	0,1768245
45 °C	3	295,6486986	98,54956619	0,19661829

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,825186644	2	0,912593322	4,61421314	0,06116299	5,14324938
Dentro de los grupos	1,18667252	6	0,197778753			
Total	3,011859164	8				

Figura 6.64.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar la temperatura de la columna.

*Recuperación Propilparahidroxibenzoico (%)*

Muestra	30 °C	40 °C	45 °C
1	98,294	97,707	96,768
2	97,517	97,922	96,920
3	98,724	99,252	97,674
Media	98,178	98,294	97,121
SD	0,612	0,837	0,485
RSD	0,623	0,852	0,500

Cuadro 6.50.: Resultados de recuperación de propilparahidroxibenzoico medido a diferentes temperaturas de la columna.

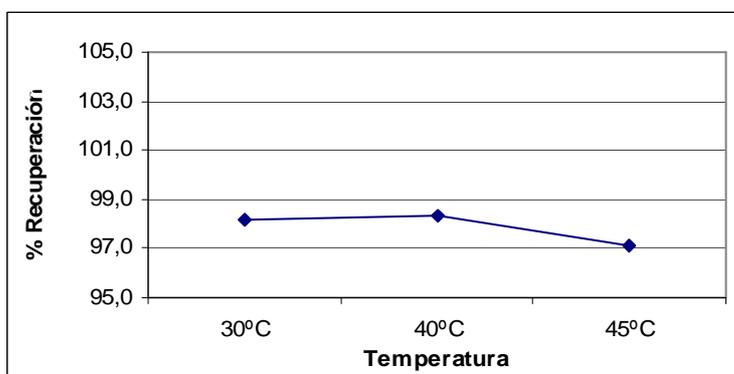


Figura 6.65.: Representación gráfica de la media de la recuperación de propilparahidroxibenzoico en función de la temperatura de la columna a la que ha sido determinada.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.66.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
30 °C	3	294,5350476	98,17834921	0,37449396		
40 °C	3	294,8812387	98,29374624	0,70077583		
45 °C	3	291,3623369	97,12077897	0,23537478		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,507623486	2	1,253811743	2,86991249	0,13349619	5,14324938
Dentro de los grupos	2,621289148	6	0,436881525			
Total	5,128912633	8				

Figura 6.66.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar la temperatura de la columna.

### Recuperación BHA (%)

Muestra	30 °C	40 °C	45 °C
1	102,343	101,763	102,528
2	100,576	101,479	100,812
3	103,352	102,977	102,965
<i>Media</i>	102,090	102,073	102,102
<i>SD</i>	1,405	0,796	1,138
<i>RSD</i>	1,376	0,780	1,115

Cuadro 6.51.: Resultados de recuperación de BHA medido a diferentes temperaturas de la columna.

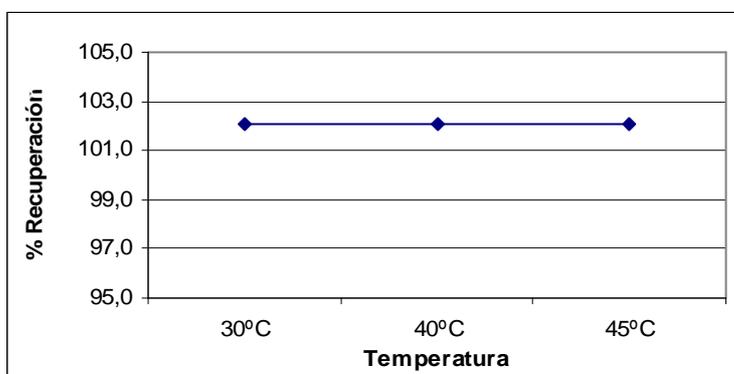


Figura 6.67.: Representación gráfica de la media de la recuperación de BHA en función de la temperatura de la columna a la que ha sido determinada.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.68.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
30 °C	3	306,2714643	102,0904881	1,97378963		
40 °C	3	306,2187572	102,0729191	0,6332157		
45 °C	3	306,3058036	102,1019345	1,29504968		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,001281589	2	0,000640795	0,00049266	0,9995075	5,14324938
Dentro de los grupos	7,804110028	6	1,300685005			
Total	7,805391617	8				

Figura 6.68.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar la temperatura de la columna.

Interpretación de los resultados del estudio estadístico:

Al aplicar el estudio estadístico ANOVA, a las recuperaciones halladas, se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los analitos en estudio al aplicar pequeñas variaciones en la temperatura ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ), según el análisis de la varianza llevada a cabo, por lo que puede concluirse que el método es robusto para este parámetro.

- Modificación del caudal de la bomba

*Recuperación Hidrocortisona acetato (%)*

Muestra	1,2 mL/min	1,5 mL/min	1,8 mL/min
1	99,628	100,093	99,454
2	100,416	100,370	101,197
3	99,341	99,537	99,872
<i>Media</i>	99,795	100,000	100,174
<i>SD</i>	0,557	0,424	0,910
<i>RSD</i>	0,558	0,424	0,909

Cuadro 6.51.: Resultados de recuperación de acetato de hidrocortisona medido a diferentes caudales de bomba.

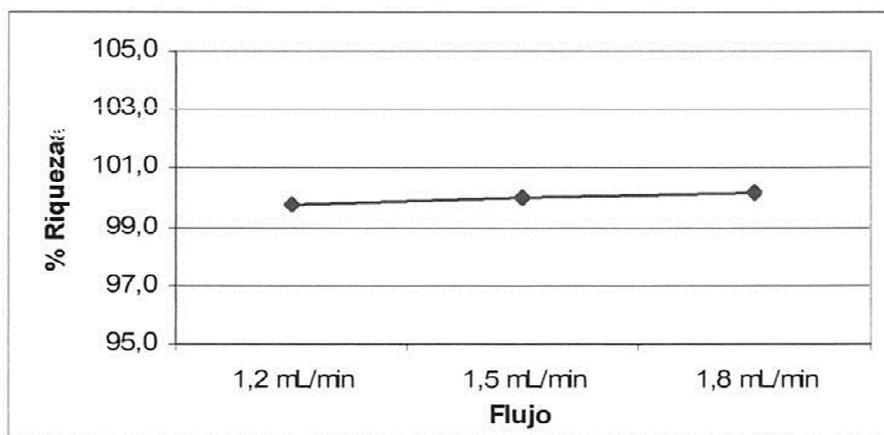


Figura 6.69.: Representación gráfica de la media de la recuperación de acetato de hidrocortisona en función del caudal de bomba al que ha sido determinado.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.70.

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1,2 mL/min	3	299,3844328	99,79481093	0,30991592
1,5 mL/min	3	300	100	0,17994132
1,8 mL/min	3	300,5225338	100,1741779	0,82835331

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,21635984	2	0,10817992	0,24619721	0,78929448	5,14324938
Dentro de los grupos	2,636421109	6	0,439403518			
Total	2,852780949	8				

Figura 6.70.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar el caudal de bomba.

Recuperación Metilparahidroxibenzoico (%)

Muestra	1,2 mL/min	1,5 mL/min	1,8 mL/min
1	104,629	104,993	104,024
2	104,303	104,915	104,016
3	104,784	104,631	104,786
Media	104,572	104,847	104,276
SD	0,246	0,191	0,442
RSD	0,235	0,182	0,424

Cuadro 6.52.: Resultados de recuperación de metilparahidroxibenzoico medido a diferentes caudales de bomba.

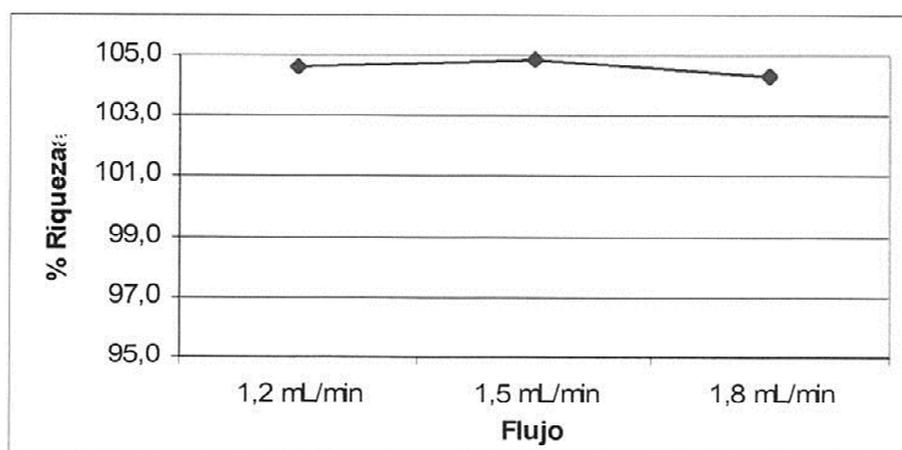


Figura 6.71.: Representación gráfica de la media de la recuperación de metilparahidroxibenzoico en función del caudal de bomba al que ha sido determinado.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.72.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
1,2 mL/min	3	313,7156708	104,5718903	0,06037048		
1,5 mL/min	3	314,5401396	104,8467132	0,0363284		
1,8 mL/min	3	312,8266617	104,2755539	0,19561709		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,489565842	2	0,244782921	2,51217461	0,16121107	5,14324938
Dentro de los grupos	0,584631944	6	0,097438657			
Total	1,074197786	8				

Figura 6.72.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar el caudal de bomba.

*Recuperación Propilparahidroxibenzoico (%)*

Muestra	1,2 mL/min	1,5 mL/min	1,8 mL/min
1	102,873	103,683	102,195
2	102,122	102,901	101,970
3	102,474	102,650	102,845
Media	102,460	103,078	102,337
SD	0,331	0,538	0,455
RSD	0,323	0,522	0,444

Cuadro 6.53.: Resultados de recuperación de propilparahidroxibenzoico medido a diferentes caudales de bomba.

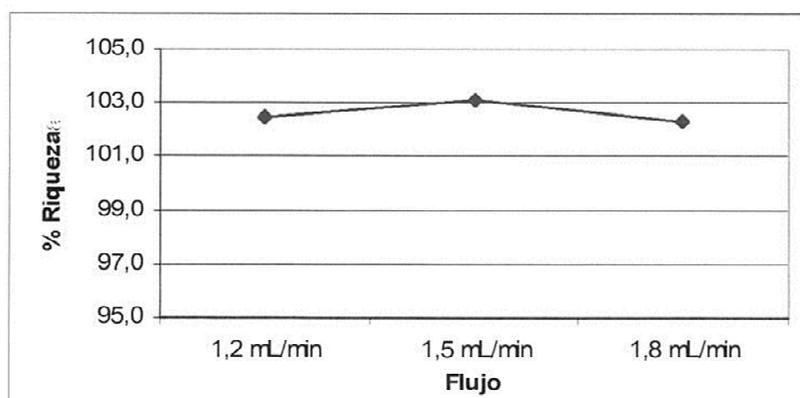


Figura 6.73.: Representación gráfica de la media de la recuperación de propilparahidroxibenzoico en función del caudal de bomba al que ha sido determinado.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.74.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1,2 mL/min	3	307,3787424	102,4595808	0,10943282
1,5 mL/min	3	309,2340306	103,0780102	0,28992962
1,8 mL/min	3	307,0099922	102,3366641	0,20670547

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,947157525	2	0,473578762	2,34418664	0,17689637	5,14324938
Dentro de los grupos	1,212135811	6	0,202022635			
Total	2,159293336	8				

Figura 6.74.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar el caudal de bomba.

Recuperación BHA (%)

Muestra	1,2 mL/min	1,5 mL/min	1,8 mL/min
1	101,983	103,266	100,688
2	101,088	101,604	100,549
3	99,034	100,504	98,625
Media	100,702	101,791	99,954
SD	1,512	1,391	1,153
RSD	1,502	1,366	1,153

Cuadro 6.54.: Resultados de recuperación de BHA medido a diferentes caudales de bomba.

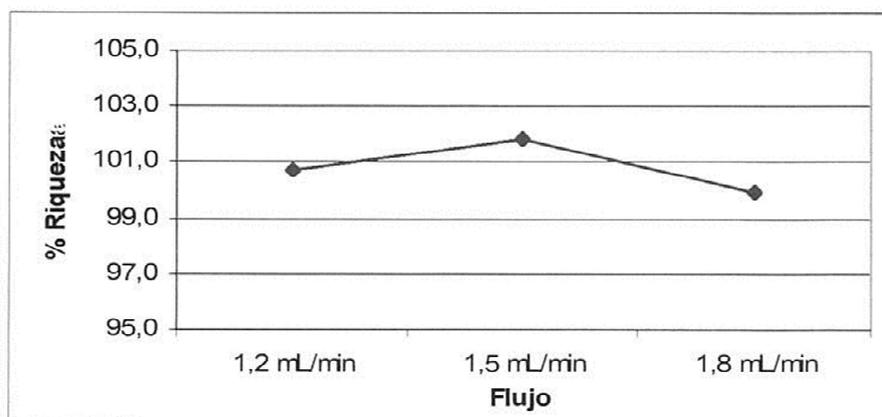


Figura 6.75.: Representación gráfica de la media de la recuperación de BHA en función del caudal de bomba al que ha sido determinado.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.76.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1,2 mL/min	3	302,1051207	100,7017069	2,28660385
1,5 mL/min	3	305,3739887	101,7913296	1,93413663
1,8 mL/min	3	299,8618716	99,95395721	1,32893261

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5,122344395	2	2,561172197	1,38449895	0,3203346	5,14324938
Dentro de los grupos	11,09934618	6	1,849891031			
Total	16,22169058	8				

Figura 6.76.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar el caudal de bomba.

Interpretación de los resultados del estudio estadístico:

Al realizar el estudio estadístico ANOVA, a las recuperaciones halladas, se puede concluir que existen diferencias estadísticamente significativas al realizar pequeñas variaciones en el caudal ( $\pm 0,3$ ), por lo que se puede concluir que el método no es robusto en cuanto a pequeñas variaciones en el caudal de la bomba cromatográfica.

- Modificación del volumen de inyección

*Recuperación Hidrocortisona acetato (%)*

Muestra	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	15 $\mu$ L
1	102,280	102,249	102,186
2	104,730	104,815	104,848
3	102,238	102,236	102,014
<i>Media</i>	103,083	103,100	103,016
<i>SD</i>	1,427	1,485	1,589
<i>RSD</i>	1,384	1,441	1,542

Cuadro 6.55.: Resultados de recuperación de acetato de hidrocortisona medido a diferentes volúmenes de inyección.

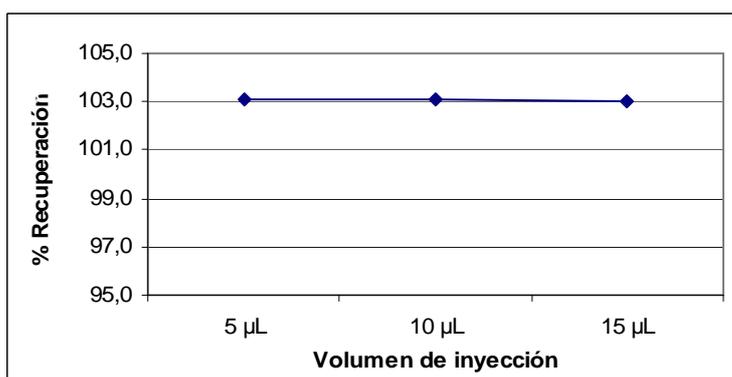


Figura 6.77.: Representación gráfica de la media de la recuperación de acetato de hidrocortisona en función del volumen de inyección.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.78.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 µL	3	309,2486449	103,0828816	2,03549052
10 µL	3	309,3004519	103,1001506	2,2063442
15 µL	3	309,0477376	103,0159125	2,52371927

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,011879137	2	0,005939568	0,00263374	0,99737088	5,14324938
Dentro de los grupos	13,53110797	6	2,255184661			
Total	13,54298711	8				

Figura 6.78.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar el volumen de inyección.

*Recuperación Metilparahidroxibenzoico (%)*

Muestra	5 µL	10 µL	15 µL
1	99,648	99,055	99,32
2	101,357	100,862	101,13
3	100,315	99,858	99,95
Media	100,440	99,925	100,134
SD	0,861	0,906	0,919
RSD	0,858	0,906	0,918

Cuadro 6.56.: Resultados de recuperación de metilparahidroxibenzoico medido a diferentes volúmenes de inyección.

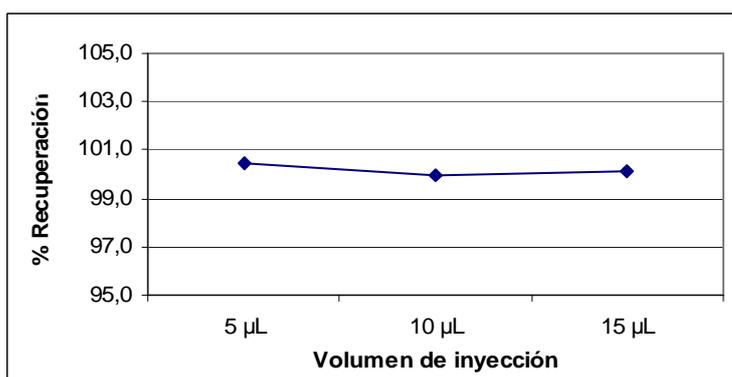


Figura 6.79.: Representación gráfica de la media de la recuperación de metilparahidroxibenzoico en función del volumen de inyección.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.80.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 µL	3	301,3209234	100,4403078	0,74200916
10 µL	3	299,7741943	99,92473142	0,820037
15 µL	3	300,4013142	100,1337714	0,84414949

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,403481271	2	0,201740635	0,25152647	0,78541987	5,14324938
Dentro de los grupos	4,812391309	6	0,802065218			
Total	5,21587258	8				

Figura 6.80.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar el volumen de inyección.

Recuperación Propilparahidroxibenzoico (%)

Muestra	5 µL	10 µL	15 µL
1	97,31	96,765	97,115
2	98,99	98,572	98,907
3	98,00	97,621	97,653
Media	98,101	97,653	97,891
SD	0,844	0,904	0,920
RSD	0,860	0,926	0,940

Cuadro 6.57.: Resultados de recuperación de propilparahidroxibenzoico medido a diferentes volúmenes de inyección.

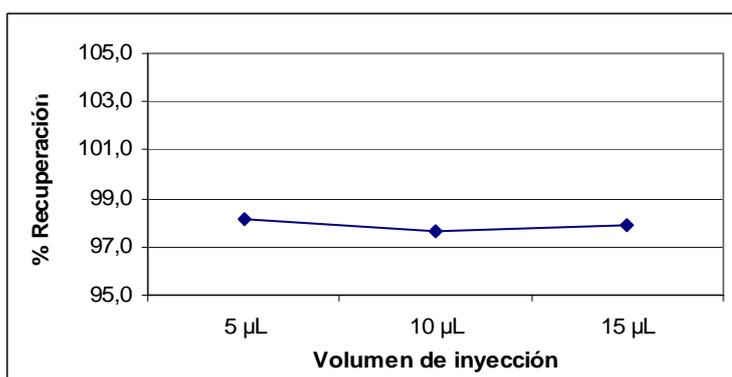


Figura 6.81.: Representación gráfica de la media de la recuperación de propilparahidroxibenzoico en función del volumen de inyección.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.82.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5 µL	3	294,3035877	98,10119591	0,71165825
10 µL	3	292,9580443	97,65268142	0,81730541
15 µL	3	293,6743135	97,89143783	0,84596845

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,302168312	2	0,151084156	0,1908486	0,83108447	5,14324938
Dentro de los grupos	4,749864212	6	0,791644035			
Total	5,052032524	8				

Figura 6.82.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar el volumen de inyección.

Recuperación BHA (%)

Muestra	5 µL	10 µL	15 µL
1	101,474	102,776	100,228
2	101,075	103,674	97,736
3	101,986	103,935	99,845
Media	101,511	103,462	99,270
SD	0,457	0,608	1,342
RSD	0,450	0,588	1,352

Cuadro 6.58.: Resultados de recuperación de BHA medido a diferentes volúmenes de inyección.

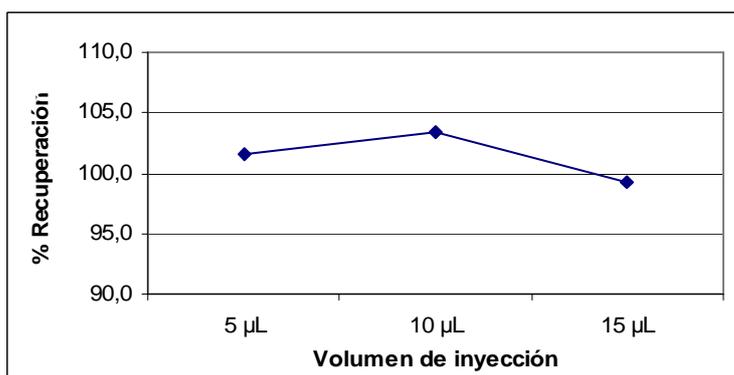


Figura 6.83.: Representación gráfica de la media de la recuperación de BHA en función del volumen de inyección.

El tratamiento estadístico ANOVA se presenta en la Figura 6.84.

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	304,5342977	101,5114326	0,20841676
Columna 2	3	310,385426	103,4618087	0,36983389
Columna 3	3	297,8096277	99,26987591	1,80111786

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	26,40084353	2	13,20042176	16,6436032	0,00356205	5,14324938
Dentro de los grupos	4,758737022	6	0,793122837			
Total	31,15958055	8				

Figura 6.84.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar el volumen de inyección.

Interpretación de los resultados del estudio estadístico:

Al realizar el estudio estadístico ANOVA, a las recuperaciones halladas, se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas al realizar pequeñas variaciones en el volumen de inyección de las muestras ( $\pm 5 \mu\text{L}$ ), excepto en el caso del BHA, si bien todos los resultados obtenidos para el BHA se encuentran dentro de las especificaciones establecidas (95 – 105%), por lo que se puede concluir que el método es robusto en cuanto a pequeñas variaciones en el caudal de la bomba cromatográfica.

- Modificación del lote de la columna

*Recuperación Hidrocortisona acetato (%)*

<i>Muestra</i>	<i>Lote USWU007819</i>	<i>Lote USWU008265</i>
1	102,25	102,792
2	104,82	104,958
3	102,24	103,460
<i>Media</i>	103,100	103,737
<i>SD</i>	1,485	1,109
<i>RSD</i>	1,441	1,069

Cuadro 6.59.: Resultados de recuperación de acetato de hidrocortisona medido con diferentes lotes de columna.

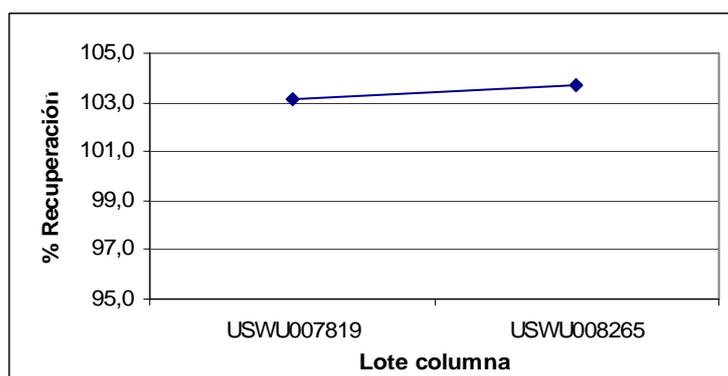


Figura 6.85.: Representación gráfica de la media de la recuperación de acetato de hidrocortisona en función del lote de la columna.

El tratamiento estadístico t de Student se presenta en la Figura 6.86.

	Variable 1	Variable 2
Media	103,1001506	103,736665
Varianza	2,206344198	1,22958456
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	1,717964379	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0,594766896	
P(T<=t) una cola	0,292005489	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846486	
P(T<=t) dos colas	0,584010978	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776450856	

Figura 6.86.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar el lote de la columna.

*Recuperación Metilparahidroxibenzoico (%)*

Muestra	Lote USWU007819	Lote USWU008265
1	99,055	99,174
2	100,862	99,588
3	99,858	100,014
Media	99,925	99,592
SD	0,906	0,421
RSD	0,906	0,422

Cuadro 6.60.: Resultados de recuperación de metilparahidroxibenzoico medido con diferentes lotes de columna.

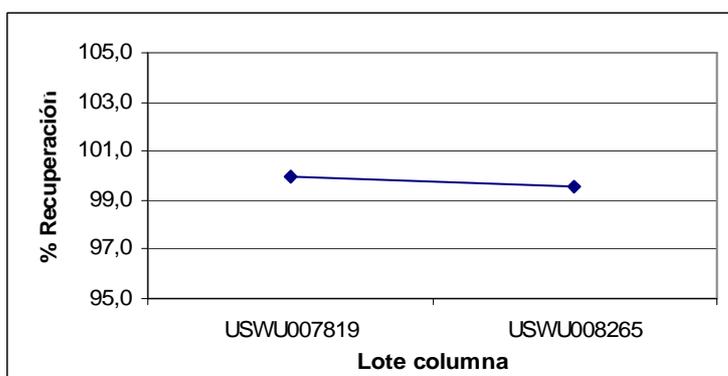


Figura 6.87.: Representación gráfica de la media de la recuperación de metilparahidroxibenzoico en función del lote de la columna.

El tratamiento estadístico t de Student se presenta en la Figura 6.88.

	Variable 1	Variable 2
Media	99,92473142	99,59188992
Varianza	0,820037004	0,176824498
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,498430751	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,577405195	
P(T<=t) una cola	0,297304221	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846486	
P(T<=t) dos colas	0,594608442	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776450856	

Figura 6.88.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar el lote de la columna.

*Recuperación Propilparahidroxibenzoico (%)*

Muestra	Lote USWU007819	Lote USWU008265
1	96,765	97,707
2	98,572	97,922
3	97,621	99,252
Media	97,653	98,294
SD	0,904	0,837
RSD	0,926	0,852

Cuadro 6.61.: Resultados de recuperación de propilparahidroxibenzoico medido con diferentes lotes de columna.

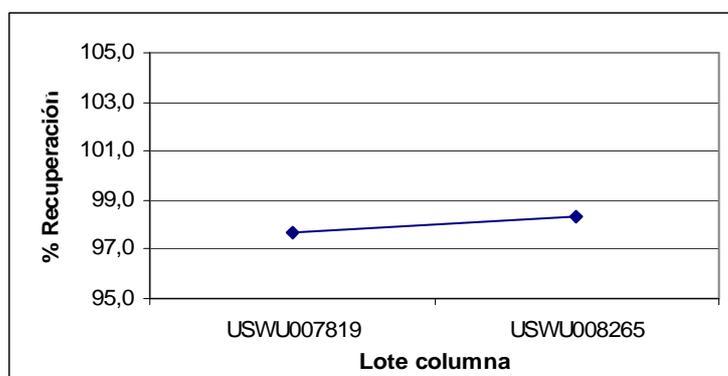


Figura 6.89.: Representación gráfica de la media de la recuperación de propilparahidroxibenzoico en función del lote de la columna.

El tratamiento estadístico t de Student se presenta en la Figura 6.90.

	Variable 1	Variable 2
Media	97,65268142	97,39090463
Varianza	0,817305408	0,702158834
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,759732121	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,367829475	
P(T<=t) una cola	0,36581872	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846486	
P(T<=t) dos colas	0,73163744	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776450856	

Figura 6.90.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar el lote de la columna.

#### Recuperación BHA (%)

Muestra	Lote USWU008265	Lote USWU008260
1	101.763	102.328
2	101.479	102.103
3	102.977	103.203
Media	102.073	102.545
SD	0.796	0.581
RSD	0.780	0.567

Cuadro 6.62.: Resultados de recuperación de BHA medido con diferentes lotes de columna.

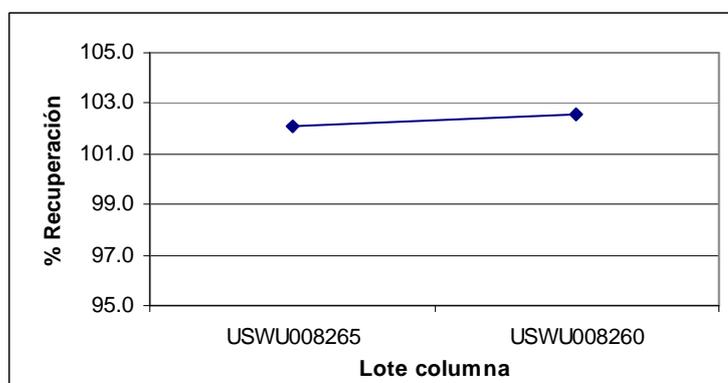


Figura 6.91.: Representación gráfica de la media de la recuperación de BHA en función del lote de la columna.

El tratamiento estadístico t de Student se presenta en la Figura 6.92.

	<i>USWU008265</i>	<i>USWU008260</i>
Media	102.0729191	102.5447326
Varianza	0.633215701	0.337809732
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.485512717	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0.829307806	
P(T<=t) una cola	0.226775891	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846782	
P(T<=t) dos colas	0.453551783	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Figura 6.92.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza de la robustez al modificar el volumen de inyección.

Interpretación de los resultados del estudio estadístico:

El tratamiento estadístico demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos lotes de columnas para ninguno de los analitos en estudio, por lo que se puede concluir que el método es robusto en cuanto al cambio de lote de columna.

A modo de resumen, los resultados obtenidos en este estudio de robustez se presentan en el cuadro 6.63. en donde se indica la media obtenida (n=3) para cada nivel y cada factor estudiado.

Todos los factores seleccionados, no son afectados por pequeñas variaciones en los parámetros dado que la recuperación obtenida se encuentra entre 97% y 103% para el acetato de hidrocortisona, entre 95% y 105% para el metilparahidroxibenzoico y entre 90% y 107% para el propilparahidroxibenzoico y el butilhidroxianisol, según límites establecidos al inicio del estudio.

Por lo tanto se puede concluir que el método es robusto en cuanto a pequeñas variaciones para todos los parámetros estudiados (longitud de onda, temperatura de la columna, volumen de inyección, caudal de bomba y lote de la fase estacionaria o columna).

Cambio cromatográfico	Recuperación (%) / (media ± S.D.)			
Factor	Hidrocortisona acetate	Metilparahidrox i-benzoico	Propilparahidro xi-benzoico	BHA
<b>A: Longitud de onda</b>				
237 nm	103.02 ± 1.49	99.92 ± 0.90	97.61 ± 0.88	103.52 ± 0.77
240 nm	103.10 ± 1.49	99.93 ± 0.91	97.65 ± 0.90	103.46 ± 0.61
243 nm	103.09 ± 1.49	99.92 ± 0.91	97.66 ± 0.90	103.70 ± 0.98
<b>B:</b>				
<b>Temperatura</b>				
30 °C	103.83 ± 1.03	99.38 ± 0.47	98.18 ± 0.61	102.09 ± 1.40
40 °C	103.74 ± 1.11	99.59 ± 0.42	98.30 ± 0.84	102.07 ± 0.80
45 °C	103.99 ± 0.75	98.55 ± 0.44	97.12 ± 0.49	102.10 ± 1.14
<b>C. Caudal de bomba</b>				
1.2 ml min <sup>-1</sup>	99.80 ± 0.56	104.57 ± 0.25	102.46 ± 0.33	100.70 ± 1.51
1.5 ml min <sup>-1</sup>	100.00 ± 0.42	104.85 ± 0.19	103.08 ± 0.54	101.79 ± 1.39
1.8 ml min <sup>-1</sup>	100.17 ± 0.91	104.28 ± 0.44	102.34 ± 0.46	99.95 ± 1.15
<b>D: Volumen de inyección</b>				
5 µl	103.08 ± 1.43	100.44 ± 0.86	98.10 ± 0.84	101.51 ± 0.46
10 µl	103.10 ± 1.49	99.93 ± 0.91	97.65 ± 0.90	103.46 ± 0.61
15 µl	103.02 ± 1.59	100.13 ± 0.92	97.89 ± 0.92	99.27 ± 1.34
<b>E: Lote de la columna</b>				
<i>Lote</i> <i>USWU007819</i>	103.10 ± 1.49	99.93 ± 0.91	97.65 ± 0.90	102.07 ± 0.80
<i>Lote</i> <i>USWU008265</i>	103.74 ± 1.11	99.59 ± 0.42	98.29 ± 0.84	102.55 ± 0.58

Cuadro 6.63.: Evaluación de la robustez del método desarrollado por cromatografía líquida de alta resolución

### **6.3.2. Resultados experimentales del estudio de validación para la determinación de productos de degradación del acetato de hidrocortisona**

#### **6.3.2.1. Idoneidad del sistema**

En el siguiente cuadro se resumen los resultados obtenidos para los diferentes parámetros estudiados:

Producto	Factor capacidad	Factor cola	Platos teóricos	Resolución	T retención
Hidrocortisona	5,991	0,958	16270	2,192	8,885
Cortisona	6,762	0,923	18849	1,338	9,865
Prednisolona acetato	17,433	1,278	40595	1,524	23,428
Cortisona acetato	19,932	0.991	66792	2,839	26,650

Cuadro 6.64.: Resultados obtenidos en el estudio de idoneidad del sistema.

Los resultados obtenidos en el estudio de idoneidad del sistema que se muestran en el cuadro 6.64. en cuanto al factor de capacidad, factor de cola, platos teóricos y resolución entre dos picos consecutivos se consideran correctos ya que los valores obtenidos se encuentran dentro de los intervalos considerados, siendo estos valores los siguientes:

Factor de capacidad:  $\geq 0,5$

Factor de cola:  $0,8 - 2$

Platos teóricos:  $> 2000$

Resolución:  $\geq 1$

#### **6.3.2.2. Estabilidad de la solución**

En el cuadro 6.65. que se presenta a continuación, se refleja tanto el porcentaje de recuperación de hidrocortisona acetato de la solución patrón y de la solución problema, como el porcentaje de recuperación del producto de degradación conocido como hidrocortisona, tomando como 100% el tiempo 0.

<b>Tiempo</b>	<b>Solución patrón</b>	<b>Solución problema</b>	
	<i>Hidrocortisona acetato %</i>	<i>Hidrocortisona acetato %</i>	<i>Hidrocortisona %</i>
0 horas	100,00	100,00	0,310
1 hora	97,05	99,49	0,289
2 horas	98,43	99,74	0,293
3 horas	99,65	100,16	0,297
4 horas	101,78	99,67	0,293
5 horas	100,41	99,74	0,295
6 horas	98,87	99,87	0,296
7 horas	96,59	100,01	0,297
8 horas	100,65	100,09	0,299
9 horas	101,80	100,21	0,300
10 horas	99,12	100,35	0,301
11 horas	101,74	100,49	0,302
12 horas	100,91	101,77	0,321
13 horas	100,35	101,84	0,323
14 horas	99,93	101,89	0,325
15 horas	102,63	101,93	0,327
16 horas	100,23	101,95	0,330
17 horas	101,88	102,05	0,332
18 horas	97,71	102,05	0,334
19 horas	99,70	101,97	0,336
20 horas	97,13	101,20	0,319
21 horas	99,88	101,27	0,321
22 horas	-	101,37	0,322
23 horas	101,31	101,34	0,323
24 horas	100,03	101,38	0,325
48 horas	100,50	101,79	0,355
72 horas	101,06	104,78	0,398
96 horas	99,09	103,98	0,540

Cuadro 6.65.: Resultados del porcentaje de acetato de hidrocortisona de la solución patrón y de la solución problema, así como el porcentaje de recuperación del producto de degradación en la solución problema a lo largo del tiempo.

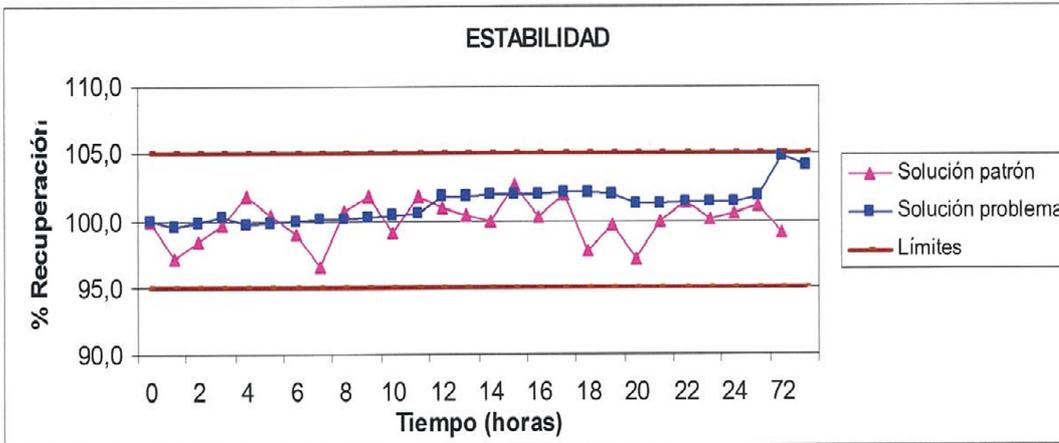


Figura 6.93.: Representación gráfica correspondiente a la evolución de la recuperación de acetato de hidrocortisona en la solución patrón y en la solución problema.

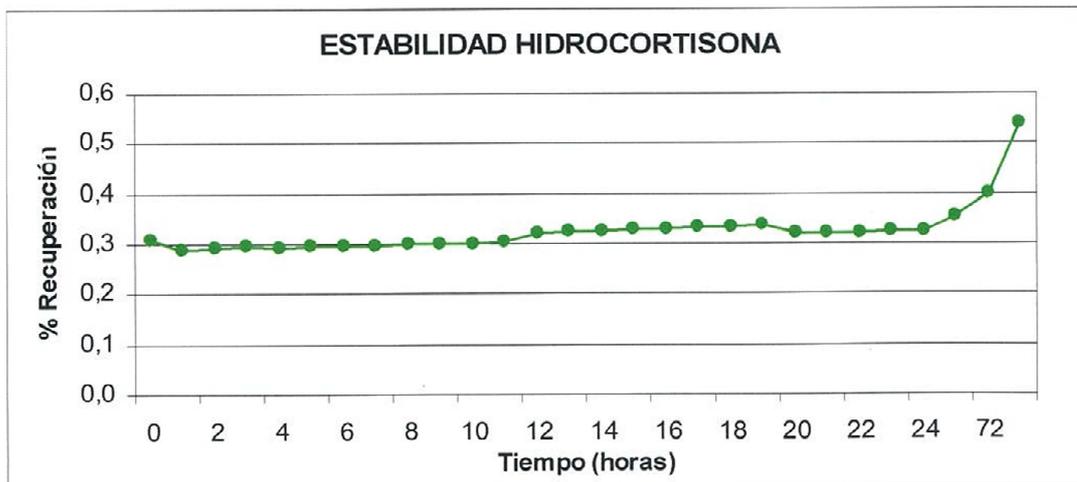


Figura 6.94.: Representación gráfica correspondiente a la evolución de la hidrocortisona en la solución problema.

Según los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad, se puede concluir que la solución patrón es estable por un periodo mínimo de 96 horas mantenida a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), mientras que la solución problema, solo puede conservarse por un periodo máximo de 24 horas mantenida a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), tiempo a partir del cual el producto de degradación hidrocortisona aumenta de forma significativa.

### 6.3.2.3. Selectividad

#### Ausencia de interferencia de los excipientes de la formulación

El primer cromatograma que se adjunta corresponde a la solución placebo y el último corresponde a la solución problema. Los dos cromatogramas están impresos a la misma escala y se observa que no hay interferencia por parte de los excipientes con respecto a los picos correspondientes a hidrocortisona acetato e impurezas.

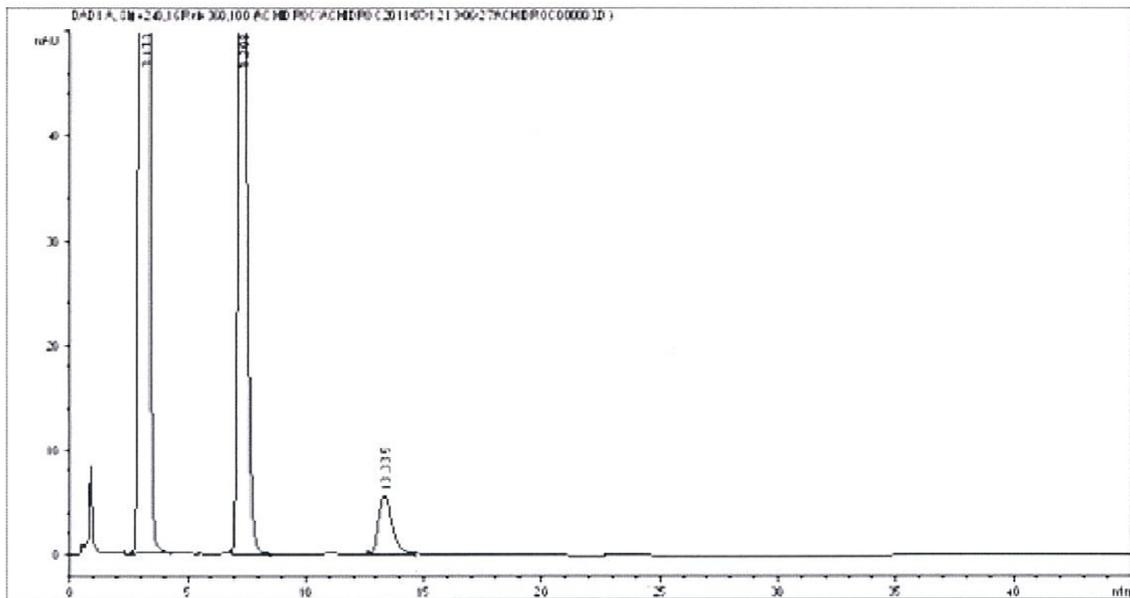


Figura 6.95.: Cromatograma correspondiente al placebo

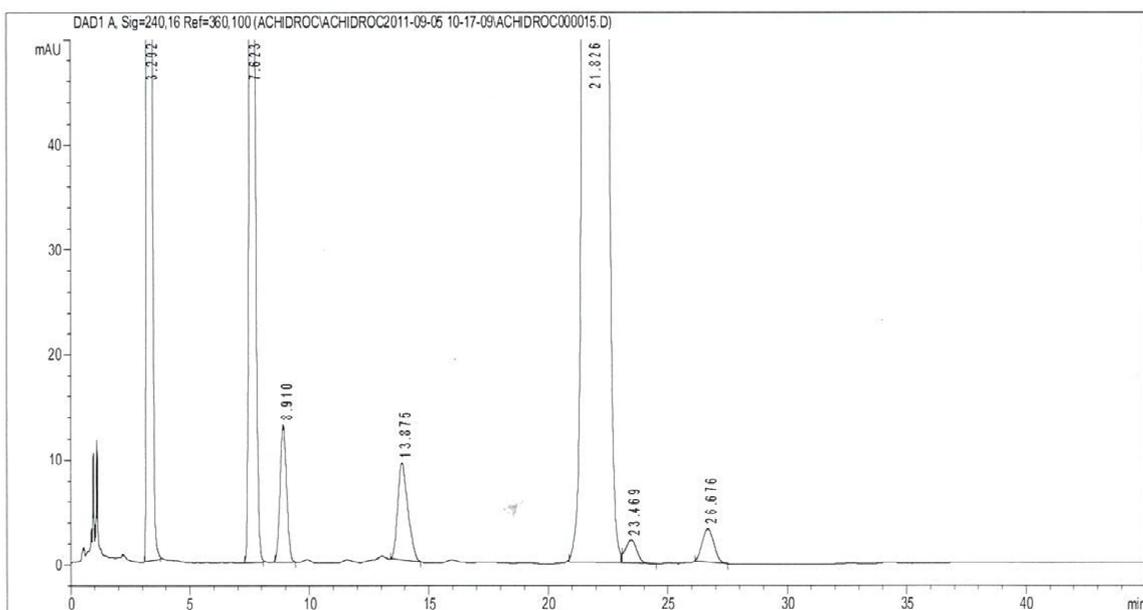


Figura 6.96.: Cromatograma correspondiente al producto terminado

## Ausencia de interferencia de las impurezas

El cromatograma resultante mostrado en la Figura 6.97. refleja que no existen interferencias por parte de las impurezas estudiadas.

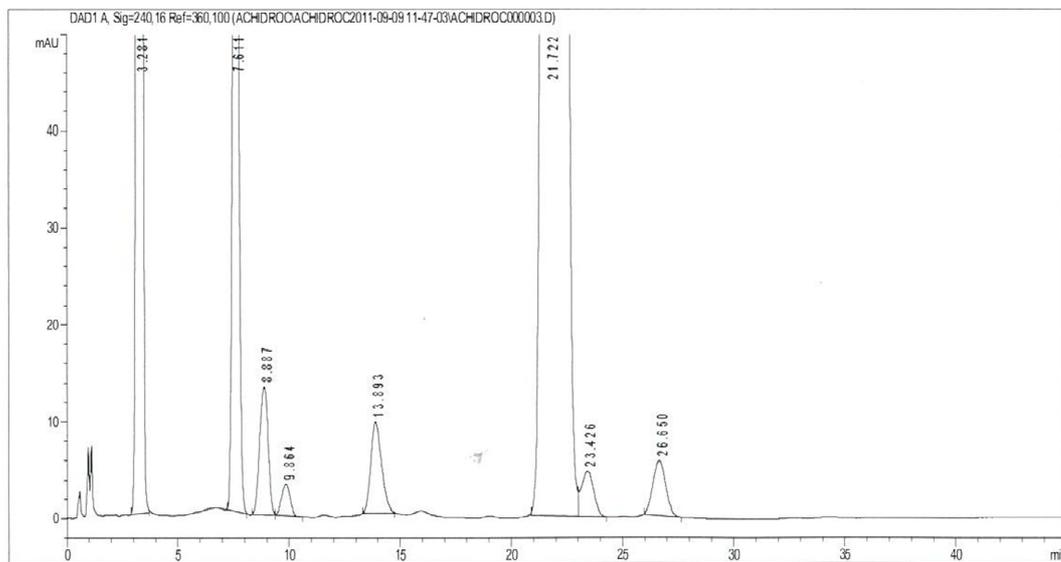


Figura 6.97.: Cromatograma correspondiente a la solución de producto terminado e impurezas

Tiempos de retención obtenidos:

Hidrocortisona acetato	21,722 minutos
Metilparahidroxibenzoico	3,281 minutos
Propilparahidroxibenzoico	7,611 minutos
Hidrocortisona	8,887 minutos
Cortisona	9,864 minutos
BHA	13,893 minutos
Prednisolona acetato	23,426 minutos
Cortisona acetato	26,650 minutos

## Muestras sometidas a stress

### • Producto terminado

Los resultados obtenidos son los siguientes:

A) Producto terminado sometido a un tratamiento en medio ácido.

Al someter el producto terminado a unas condiciones ácidas se observa la aparición de los picos correspondientes a la hidrocortisona y al acetato de cortisona, con unos tiempos de retención relativos de 0,41 y 1,23. El área del pico de la hidrocortisona sí que aumenta en este caso respecto a las condiciones normales. Además de este producto de degradación conocido, se obtienen 5 picos debidos a productos de degradación desconocidos que eluyen a 9,6 minutos, 11,3 minutos, 12,5 minutos, 15,3 minutos y 20,0 minutos, con unos tiempos de retención relativos de 0,46, 0,54, 0,59, 0,73 y 0,94, respectivamente. Las áreas de estos picos son poco significativas. En el caso del pico que eluye a 20,0 minutos, solo absorbe a una longitud de onda de 290 nm, por tanto no interfiere con el pico correspondiente al principio activo. Se puede concluir que el producto terminado se degrada en condiciones ácidas.

B) Producto terminado sometido a un tratamiento en medio alcalino.

A diferencia de lo que ocurre con el principio activo sometido a medio básico, que se degrada totalmente, aquí sí que aparece el pico correspondiente al acetato de hidrocortisona, habiendo disminuido su área solo ligeramente.

El producto de degradación conocido hidrocortisona aumenta su área de forma considerable, de un área de 250 que presenta en el producto terminado sin estresar, a un área de 1730 bajo condiciones de medio básico. También aparece el pico correspondiente a la impureza de síntesis acetato de cortisona (la cual no modifica su área con respecto a las condiciones normales) que en caso del principio activo sometido a condiciones básicas desaparecía.

Se obtienen cuatro productos de degradación desconocidos con tiempos de retención relativos de 0,45, 0,53, 0,72 y 0,94, pero con unas áreas muy pequeñas.

Se puede concluir que el producto terminado se degrada cuando se somete a condiciones básicas.

#### C) Producto terminado sometido a temperatura.

Se somete el producto terminado a 105 °C durante 24 horas, y se observa el pico correspondiente a la hidrocortisona, pero sin que aumente su área. Aparecen dos picos correspondientes a productos de degradación desconocidos que eluyen a 15,2 minutos y 19,9 minutos ( $t_{RR} = 0,72$  y  $0,94$ ), pero de áreas poco significativas. Se puede concluir que el producto terminado se degrada moderadamente en condiciones de temperatura elevada.

#### D) Producto terminado sometido a un tratamiento oxidante

Para el estudio de estrés en medio oxidante se utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33% y el KMnO<sub>4</sub>.

- En el caso del permanganato potásico, el pico correspondiente al principio activo presenta una disminución significativa, habiendo disminuido el área a aproximadamente una quinta parte de la obtenida en condiciones normales. Se obtiene el pico correspondiente al producto de degradación conocido como hidrocortisona, sin que aumente su área respecto a la obtenida en la materia prima, además de cuatro productos de degradación desconocidos que eluyen a 4,0 minutos, 5,3 minutos, 10,9 minutos y 20,2 minutos ( $t_{RR} = 0,19, 0,25, 0,51$  y  $0,94$ ), los dos primeros con una áreas de 189 y 133, respectivamente, mientras que los dos últimos con áreas muy pequeñas. Por tanto se concluye que el acetato de hidrocortisona se degrada en medio oxidante (KMnO<sub>4</sub>).
- En el cromatograma obtenido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33%, se observa la presencia del producto de degradación conocido como hidrocortisona, con un área bastante mayor de la que presenta en condiciones normales. Aparece un pico que eluye a 6,7 minutos, pero ya aparece en el placebo, posiblemente debido a un producto de degradación del BHA. Aparecen también cuatro productos de degradación desconocidos con tiempos de retención relativos de 0,46, 0,54, 0,73 y 0,95.

Se puede concluir que el producto terminado sí se degrada cuando se somete a un medio oxidante.

E) Producto terminado sometido a luz IR.

Al someter el producto terminado a unas condiciones de luz IR se observa un perfil de formación de picos correspondientes a productos de degradación similar al que aparece al someter el producto terminado a condiciones de temperatura elevada. También aparecen los picos correspondientes a productos de degradación desconocidos que eluyen a 15,3 minutos y 19,9 minutos ( $t_{RR} = 0,72$  y  $0,94$ ), con áreas poco significativas. Se puede concluir que el producto terminado se degrada moderadamente bajo condiciones de luz infrarroja.

F) Producto terminado sometido a luz UV.

En el cromatograma correspondiente a la muestra de producto terminado sometido a luz ultravioleta durante 24 horas, se puede observar un perfil similar al obtenido con temperatura elevada y luz IR, excepto que no se produce la degradación del BHA debida a la temperatura elevada. Aparecen también los tres picos correspondientes a la hidrocortisona, que en este caso sí que ve aumentada su área respecto a las condiciones normales, y los cuatro productos de degradación desconocidos que eluyen a 9,6 minutos, 11,3 minutos, 15,3 minutos y 20,0 minutos ( $t_{RR} = 0,46$ ,  $0,54$ ,  $0,73$  y  $0,93$ ). Se puede concluir que el producto terminado se degrada moderadamente bajo condiciones de luz ultravioleta.

G) Producto terminado sometido a humedad elevada.

Después de 24 horas bajo condiciones de humedad elevada, se observa que aparece hidrocortisona, pero sin que aumente su área respecto a condiciones normales, y los cinco productos de degradación desconocidos que eluyen a 9,6 minutos, 11,4 minutos, 12,2 minutos, 15,4 minutos y 20,0 minutos, con unos tiempos de retención relativos de 0,46, 0,54, 0,58, 0,73 y 0,95. Se puede concluir que el producto terminado se degrada ligeramente bajo condiciones de humedad elevada.

Por lo tanto se concluye que el producto terminado se degrada principalmente en condiciones básicas, y en medio oxidante y de forma moderada en todas las demás condiciones estudiadas.

- **Placebo**

Los resultados obtenidos son los siguientes:

A-G) Placebo sometido a las diferentes condiciones de estrés

En los cromatogramas correspondientes al placebo se observa que bajo condiciones de medio ácido aparece un pico de degradación que eluye a 12,2 minutos. Bajo condiciones de medio oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$  33%), aparece un pico de degradación que eluye a 6,7 minutos posiblemente debido al BHA, y con  $\text{KMnO}_4$  no aparecen picos de degradación pero desaparece totalmente el pico correspondiente al BHA.

En condiciones de temperatura elevada aparece un pico de degradación que eluye a 8,3 minutos.

Bajo las demás condiciones estudiadas (medio básico, luz infrarroja, luz ultravioleta y humedad elevada) no se observa la formación de productos de degradación.

- **Acetato de hidrocortisona**

Los resultados obtenidos son los siguientes:

A) Acetato de hidrocortisona sometido a un tratamiento en medio ácido.

Al someter el acetato de hidrocortisona a unas condiciones ácidas se observan 3 picos correspondientes a impurezas que ya se obtienen en la materia prima en condiciones normales. Estos picos tienen unos tiempos de retención relativos de 0,40, 0,64 y 1,23. El primer pico que eluye a 8,7 min corresponde al producto de degradación conocido hidrocortisona, el cual tiene un área de 856. Los otros dos picos corresponden a una impureza de síntesis que eluye a 13,8 minutos y al acetato de hidrocortisona que eluye a 26,5 min, respectivamente, de los cuales no aumenta su área en relación con la solución

patrón sin estresar. Puede concluirse, que el acetato de hidrocortisona se degrada de forma moderada al ser sometido a condiciones ácidas, no interfiriendo el único producto de degradación resultante (hidrocortisona) en su valoración cuantitativa.

B) Acetato de hidrocortisona sometido a un tratamiento en medio alcalino.

Al someter el acetato de hidrocortisona a unas condiciones alcalinas se observa que el pico correspondiente al principio activo desaparece totalmente, aumentando de forma significativa el pico correspondiente al producto de degradación conocido hidrocortisona (área 39500). Aparece el pico correspondiente a la impureza de síntesis que eluye a 13,7 minutos, a diferencia del acetato de cortisona, que no aparece. También se obtienen diversos picos correspondientes a productos de degradación desconocidos que eluyen a 1,8 minutos, 3,3 minutos, 6,2 minutos, 11,0 minutos, 15,5 minutos y a 17,2 minutos, con unas áreas de aproximadamente 25700, 317, 121, 1900, 1570 y 66 respectivamente. Por tanto se concluye que el acetato de hidrocortisona presenta una degradación total cuando se somete a condiciones básicas.

C) Acetato de hidrocortisona sometido a temperatura.

En el cromatograma correspondiente a la materia prima sometida a 105 °C, se puede observar la aparición de los tres picos que ya se obtienen en condiciones normales, con unos tiempos de retención relativos de 0,41, 0,64 y 1,23, y sin que aumente su área. Puede concluirse, que el acetato de hidrocortisona no se degrada al ser sometido a temperatura elevada.

D) Acetato de hidrocortisona sometido a un tratamiento en medio oxidante.

Para el estudio de estrés en medio oxidante se utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33% y KMnO<sub>4</sub>.

- En el caso del permanganato potásico, se observa una reducción significativa del pico correspondiente al principio activo, con un área aproximadamente 20 veces menor de la que presenta en condiciones normales. También aparece el producto de degradación conocido hidrocortisona con un área poco significativa, así como los dos productos de degradación desconocidos que eluyen a 11,3 y 15,3 minutos ( $t_{RR} =$

0,53 y 0,72), también con un área muy pequeña. Por tanto se concluye que el acetato de hidrocortisona se degrada en medio oxidante ( $\text{KMnO}_4$ ).

- En el cromatograma obtenido con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 33%, se observa la presencia de los tres picos que ya aparecen en condiciones normales, el producto de degradación conocido hidrocortisona con un tiempo de retención relativo de 0,41, la impureza de síntesis con un tiempo de retención relativo de 0,64 que eluye a 13,7 minutos, y el acetato de cortisona con un tiempo de retención relativo de 1,23. Los dos últimos corresponden a impurezas de síntesis. Además de aumentar el área del pico correspondiente a la hidrocortisona, aparecen tres picos correspondientes a productos de degradación desconocidos que eluyen a 10,3 minutos ( $t_{\text{RR}} = 0,48$ ), 11,4 minutos ( $t_{\text{RR}} = 0,53$  minutos) y 15,4 minutos ( $t_{\text{RR}} = 0,73$ ). Así se concluye que el acetato de hidrocortisona se degrada ligeramente en medio oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$  al 33%).

#### E) Acetato de hidrocortisona sometido a luz infrarroja.

Para comprobar como le afecta la luz infrarroja al acetato de hidrocortisona se somete al principio activo a IR durante 24 horas. Se observa la presencia de 5 picos con unos tiempos de retención relativos de 0,41, 0,53, 0,64, 0,72 y 1,23, siendo el primero la hidrocortisona, el segundo un producto de degradación desconocido que eluye a 11,3 minutos, el tercero la impureza de síntesis que eluye a 13,6 minutos, el cuarto un producto de degradación desconocido que eluye a 15,3 minutos y el último el acetato de cortisona. El pico de la hidrocortisona no aumenta su área respecto a condiciones normales. Los picos correspondientes a productos de degradación desconocidos presentan unas áreas de 182 y 11, respectivamente. Con los resultados obtenidos se puede concluir que el principio activo sometido a luz infrarroja se degrada de forma moderada, no interfiriendo los dos únicos productos de degradación resultantes en su valoración cuantitativa.

#### F) Acetato de hidrocortisona sometido a luz ultravioleta.

En el cromatograma correspondiente al principio activo sometido a luz ultravioleta, se puede observar la aparición de los 4 picos con tiempos de retención relativos de 0,41, 0,64, 0,72 y 1,23. El tercer pico, que eluye a 15,3 minutos corresponde a un producto de degradación desconocido, y presenta un área de 62. El producto de degradación

conocido hidrocortisona no aumenta respecto a condiciones normales. Se puede concluir que el acetato de hidrocortisona sometido a luz ultravioleta se degrada de forma moderada dando lugar a un producto de degradación desconocido.

G) Acetato de hidrocortisona sometido a humedad elevada.

Para comprobar como le afecta la humedad elevada al acetato de hidrocortisona se somete al principio activo a 79% HR durante 24 horas. En el cromatograma obtenido se observan únicamente los picos que ya aparecen en la materia prima en condiciones normales y sin que aumente su área, correspondientes al producto de degradación conocido hidrocortisona, y a las dos impurezas de síntesis, el acetato de cortisona y la correspondiente al pico que eluye a 13,5 minutos. Se concluye que el principio activo sometido a humedad elevada no se degrada.

Por lo tanto se concluye que el acetato de hidrocortisona se degrada totalmente en condiciones básicas, y prácticamente también de forma total en presencia de  $\text{KMnO}_4$ . En el resto de condiciones estudiadas se degrada sólo moderadamente a hidrocortisona, y aparecen también dos productos de degradación desconocidos que eluyen a 11,4 minutos y a 15,4 minutos.

### • Conclusiones finales

Después de la realización de todo el estudio de estrés llevado a cabo con las diferentes muestras, se puede concluir que los productos de degradación que se forman en el producto terminado a partir del principio activo acetato de hidrocortisona y que se tendrán que tener en cuenta son, el producto de degradación conocido hidrocortisona, con un tiempo de retención relativo de 0,43, y cinco productos de degradación desconocidos que eluyen a unos 9,6 minutos ( $t_{RR} = 0,46$ ), 11,3 minutos ( $t_{RR} = 0,54$ ), 12,2 minutos ( $t_{RR} = 0,58$ ), 15,3 minutos ( $t_{RR} = 0,73$ ) y 20,0 minutos ( $t_{RR} = 0,94$ ). Este último pico no interfiere en la valoración cuantitativa del principio activo puesto que solo absorbe a 290 nm. Además aparecen otros dos picos que solo se obtienen bajo condiciones en medio oxidante ( $\text{KMnO}_4$ ) que eluyen a 4,0 minutos ( $t_{RR} = 0,19$ ) y 5,3 minutos ( $t_{RR} = 0,25$ ).

#### 6.3.2.4. Límite de detección y cuantificación

Los resultados del estudio del límite de detección y límite de cuantificación se presentan en el cuadro 6.66.:

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área media	Factor respuesta
0,109	4,65212	42,837
0,217	6,42635	29,642
0,337	21,88127	65,026
0,442	15,87503	35,949
0,564	21,10406	37,419
0,654	22,46664	34,353
0,882	29,63388	33,598
1,306	44,75529	34,269
1,760	58,14532	33,037
2,160	79,72986	36,912
2,692	101,80928	37,819
3,056	113,67697	37,198
3,480	122,53921	35,212
<b>Media</b>	35,820	
<b>SD</b>	1,477	
<b>RSD</b>	4,125	
<b>90% pendiente:</b>	32,40403	
<b>Pendiente:</b>	36,00448	
<b>110% pendiente</b>	39,60493	

Cuadro 6.66.: Resultados del estudio del límite de detección y límite de cuantificación

Dados los resultados se observa que las concentraciones de 0,109  $\mu\text{g/mL}$ , 0,217  $\mu\text{g/mL}$  y 0,337  $\mu\text{g/mL}$  no presentan un comportamiento lineal.

A partir del último punto incluido en la linealidad (0,442  $\mu\text{g/mL}$ ) será con el que se va empezar a trabajar para poder determinar “a posteriori” los límites de detección y cuantificación, mediante el estudio de los RSD de las diferentes linealidades. Se

considerará como límite de detección aquel primer punto en el que se puede detectar el analito pero que resulta no ser lineal, preciso y exacto y se considera como límite de cuantificación el siguiente punto considerado en la linealidad que cumple con el RSD establecido. Para demostrar este atributo se preparan dos rectas más con diez soluciones para la sustancia patrón, desde la concentración 3,52 µg/mL hasta 0,44 µg/mL, de tal manera que la concentración de trabajo descrita para los productos de degradación sea de 2,2 µg/mL.

Los resultados se adjuntan en el cuadro 6.67., y se representan en la figura 6.98.

	20			25			30			40		
	Conc	Área	FR	Conc	Área	FR	Conc	Área	FR	Conc	Área	FR
Recta 1	0,4416	15,875	35,949	0,5640	21,104	37,419	0,654	22,467	34,353	0,8820	29,63388	33,598
Recta 2	0,4448	14,809	33,294	0,5520	19,483	35,296	0,663	22,096	33,327	0,8760	29,88193	34,112
Recta 3	0,4408	16,045	36,400	0,5580	19,037	34,117	0,6470	23,963	37,038	0,8620	29,90483	34,692
Media	0,442	15,576	35,214	0,558	19,875	35,610	0,655	22,842	34,906	0,873	29,807	34,134
SD	0,002	0,670	1,678	0,006	1,088	1,673	0,008	0,989	1,916	0,010	0,150	0,547
RSD	0,478	4,301	<b>4,766</b>	1,075	5,473	<b>4,699</b>	1,225	4,329	<b>5,490</b>	1,175	0,504	<b>1,603</b>

	60			80			100			120		
	Conc	Área	FR	Conc	Área	FR	Conc	Área	FR	Conc	Área	FR
Recta 1	1,3060	44,75529	34,269	1,7600	58,14532	33,037	2,1600	79,72986	36,912	2,6920	101,80928	37,819
Recta 2	1,3080	44,25296	33,833	1,7740	59,15751	33,347	2,1680	76,86130	35,453	2,6200	95,52978	36,462
Recta 3	1,3200	46,13963	34,954	1,7480	60,87395	34,825	2,1960	77,45566	35,271	2,6320	96,35028	36,607
Media	1,311	45,049	34,352	1,761	59,392	33,736	2,175	78,016	35,879	2,648	97,896	36,963
SD	0,008	0,977	0,565	0,013	1,379	0,955	0,019	1,514	0,899	0,039	3,413	0,745
RSD	0,577	2,169	<b>1,646</b>	0,739	2,322	<b>2,832</b>	0,869	1,941	<b>2,507</b>	1,457	3,487	<b>2,016</b>

	140			160		
	Conc	Área	FR	Conc	Área	FR
Recta 1	3,0560	113,67697	37,198	3,4800	122,53921	35,212
Recta 2	3,0920	111,79676	36,157	3,4800	123,99280	35,630
Recta 3	3,0640	112,01899	36,560	3,5040	123,75054	35,317
Media	3,071	112,498	36,638	3,488	123,428	35,386
SD	0,019	1,027	0,525	0,014	0,779	0,217
RSD	0,616	0,913	<b>1,433</b>	0,397	0,631	<b>0,614</b>

Cuadro 6.67.: Resultados obtenidos para el estudio del límite de detección y cuantificación.

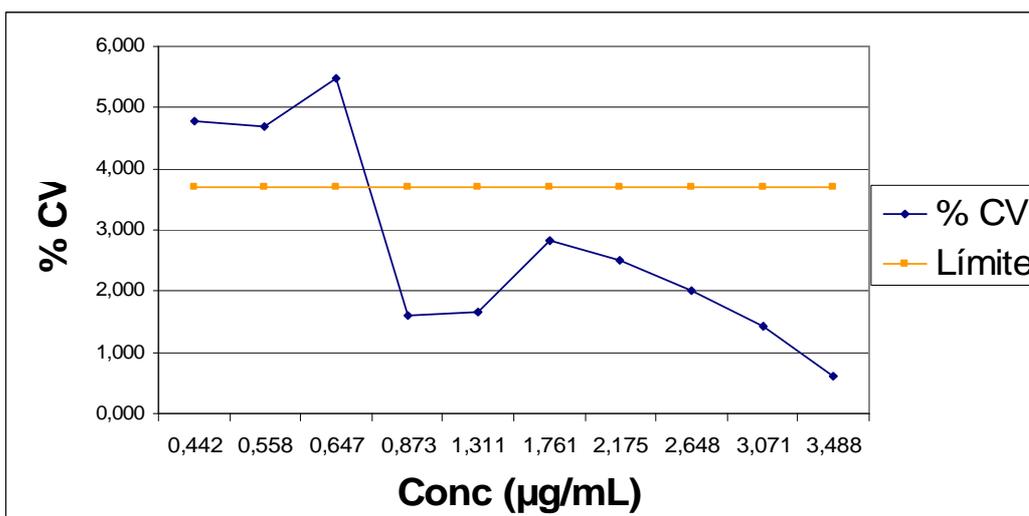


Figura 6.98.: Representación gráfica del RSD frente a concentración media

Se considera como límite de detección la concentración de 0,647 µg/mL que corresponde al 30% de la concentración de trabajo, puesto que esta concentración ha resultado ser ni preciso ni exacto. Esta concentración a su vez corresponde al 0,03% de la concentración correspondiente al producto terminado (2200 µg/mL).

El límite de cuantificación es la concentración de 0,873 µg/mL, que corresponde a 40% de la concentración de trabajo de los productos de degradación, puesto que es el primer punto cuyo RSD no supera 3,7%. A su vez esta concentración corresponde al 0,04% de la concentración de trabajo del producto terminado (2200 µg/mL).

Este porcentaje se encuentra muy por debajo del límite considerado para los productos de degradación (0,1%).

### 6.3.2.5. Linealidad

Los resultados correspondientes al estudio de linealidad son los siguientes:

Conc. µg/mL (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
0,8733	29,80688	34,13422
1,3113	45,04929	34,35193
1,7607	60,81881	34,54687
2,1747	78,01560	35,87861
2,6480	97,89644	36,96273
3,0707	112,49757	36,63815
3,4880	123,42752	35,38649
<b>Coef. De correlación R</b>	0,99856	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,99711	<b>Media:</b> 35,414
<b>Pendiente</b>	36,983	<b>S.D:</b> 1,222
<b>Ordenada en origen</b>	-2,759	<b>RSD:</b> 3,451

Cuadro 6.68.: Resultados correspondientes al estudio de la linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: CV factor respuesta  $\leq 5.0\%$  y  $R > 0,990$ .

Por lo tanto el resultado cumple.

La linealidad de la respuesta se estudia por regresión lineal del área del pico de hidrocortisona acetato frente a la concentración del mismo.

La ecuación de la recta que se obtiene y la representación grafica de la curva de regresión ajustada, es la siguiente:

$$Y = 36,983 X - 2,759$$

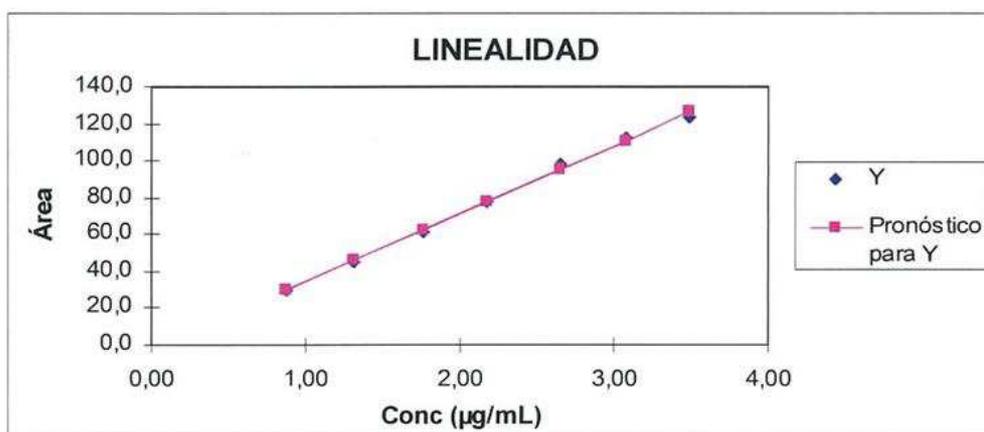


Figura 6.99.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,996751551
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,993513654
R <sup>2</sup> ajustado	0,992216384
Error típico	3,119850888
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	7454,37745	7454,377455	765,8499784	1,15316E-06
Residuos	5	48,6673478	9,733469563		
Total	6	7503,0448			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	-2,59955049	3,18317183	-0,816654152	0,451266878	-10,7821408	5,583039819
Variable X 1	37,34782886	1,34956407	27,67399462	1,15316E-06	33,87866964	40,81698808

Figura 6.100.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza.

### 1ª Linealidad

<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Respuesta (Y)</b>	<b>Factor respuesta (Y/X)</b>
0,882	29,63388	33,598
1,306	44,75529	34,269
1,760	62,42498	35,469
2,160	79,72986	36,912
2,692	101,80928	37,819
3,056	113,67697	37,198
3,480	122,53921	35,212
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9968	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9935	<b>Media: 35,783</b>
<b>Pendiente</b>	37,348	<b>S.D: 1,576</b>
<b>Ordenada en origen</b>	- 2,600	<b>RSD: 4,406</b>

Cuadro 6.69.: Resultados correspondientes al estudio de la primera linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: CV factor respuesta  $\leq 5.0\%$  y  $R > 0,990$ .

Por lo tanto el resultado cumple.

La Curva de regresion ajustada que se obtiene es la siguiente:

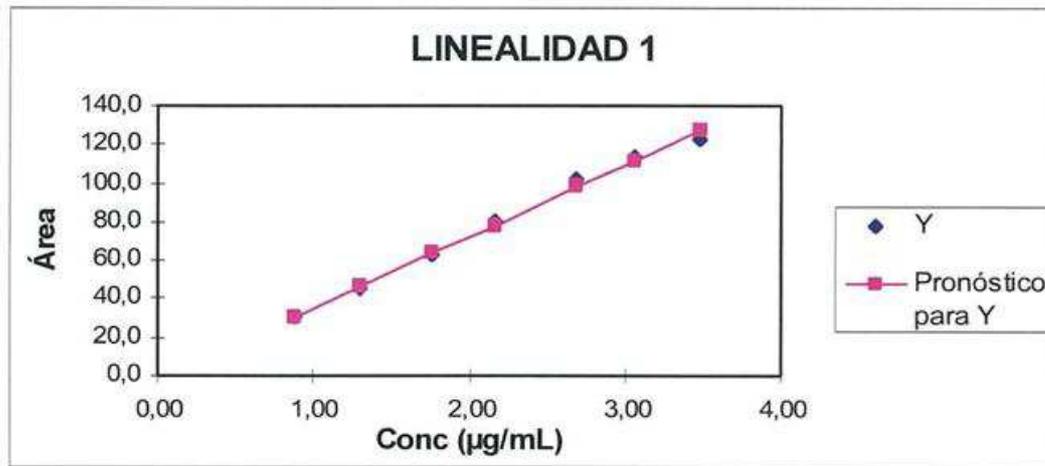


Figura 6.101.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,996751551
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,993513654
R <sup>2</sup> ajustado	0,992216384
Error típico	3,119850888
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	7454,37745	7454,377455	765,8499784	1,15316E-06
Residuos	5	48,6673478	9,733469563		
Total	6	7503,0448			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-2,59955049	3,18317183	-0,816654152	0,451266878	-10,7821408	5,583039819
Variable X 1	37,34782886	1,34956407	27,67399462	1,15316E-06	33,87866964	40,81698808

Figura 6.102.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza.

2ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
0,876	29,88193	34,112
1,308	44,25296	33,833
1,774	59,15751	33,347
2,168	76,86130	35,453
2,620	95,52978	36,462
3,092	111,79676	36,157
3,480	123,99280	35,630
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9989	
<b>Coef. De determinación R2</b>	0,9977	<b>Media:</b> 34,999
<b>Pendiente</b>	37,112	<b>S.D:</b> 1,222
<b>Ordenada en origen</b>	- 3,858	<b>RSD:</b> 3,492

Cuadro 6.70.: Resultados correspondientes al estudio de la segunda linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: CV factor respuesta  $\leq 5.0\%$  y  $R > 0,990$ .

Por lo tanto el resultado cumple.

La Curva de regresion ajustada que se obtiene es la siguiente:

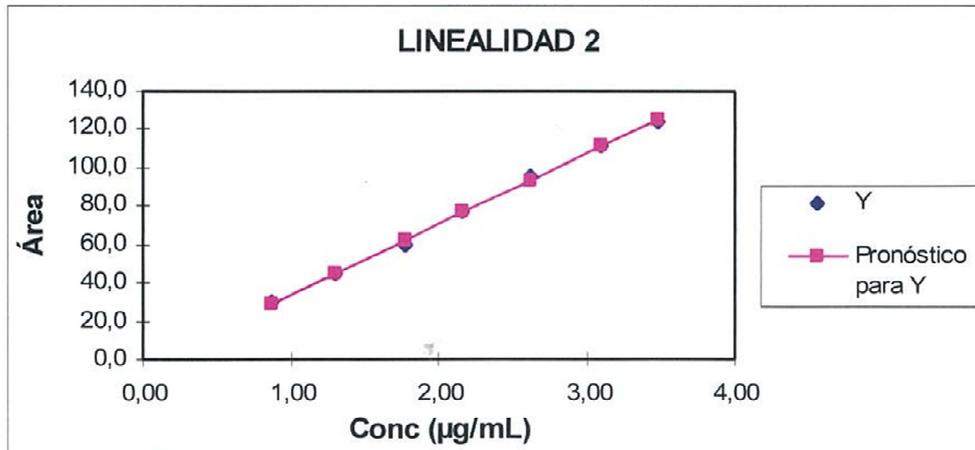


Figura 6.103.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coefficiente de correlación múltiple	0,99885508					
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99771147					
R <sup>2</sup> ajustado	0,99725377					
Error típico	1,83695902					
Observaciones	7					

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	7355,59953	7355,599532	2179,812507	8,5138E-08
Residuos	5	16,8720922	3,374418446		
Total	6	7372,47162			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-3,85797578	1,87287826	-2,05991808	0,094443055	-8,6723547	0,956403177
Variable X 1	37,1118195	0,79488203	46,68846225	8,51381E-08	35,0685135	39,15512542

Figura 6.104.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza.

### 3ª Linealidad

Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
0,862	29,90483	34,692
1,320	46,13963	34,954
1,748	60,87395	34,825
2,196	77,45566	35,271
2,632	96,35028	36,607
3,064	112,01899	36,560
3,504	123,75054	35,317
<b>Coef. De correlación R</b>	0,9989	
<b>Coef. De determinación R<sup>2</sup></b>	0,9978	<b>Media:</b> 35,461
<b>Pendiente</b>	36,491	<b>S.D:</b> 0,799
<b>Ordenada en origen</b>	- 1,824	<b>RSD:</b> 2,253

Cuadro 6.71.: Resultados correspondientes al estudio de la segunda linealidad

El criterio de aceptación es el siguiente: CV factor respuesta  $\leq 5.0\%$  y  $R > 0,990$ .

Por lo tanto el resultado cumple.

La Curva de regresion ajustada que se obtiene es la siguiente:

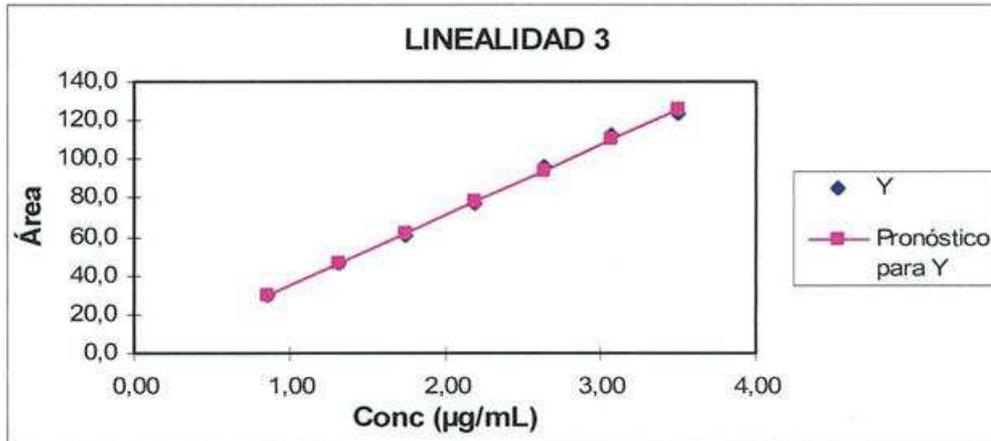


Figura 6.105.: Representación gráfica de la curva de regresión ajustada.

En la siguiente figura, se muestra el tratamiento estadístico aplicado:

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,998893022
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99778727
R <sup>2</sup> ajustado	0,997344724
Error típico	1,786135956
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	7192,9761	7192,976111	2254,65238	7,82606E-08
Residuos	5	15,951408	3,190281654		
Total	6	7208,9275			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-1,82436375	1,8129747	-1,00628196	0,36046609	-6,484755989	2,836028499
Variable X 1	36,4912186	0,7685083	47,48317992	7,8261E-08	34,51570831	38,46672888

Figura 6.106.: Tratamiento estadístico mediante el análisis de la varianza.

### 6.3.2.6. Precisión

- **Repetibilidad y precisión intermedia del sistema instrumental**

Los resultados de la precisión del sistema instrumental son los siguientes:

<b>160%</b>	<b>Día 1</b>		<b>Día 2</b>	
Inyección	Área	t <sub>R</sub>	Área	t <sub>R</sub>
1	118,12175	21,649	118,33562	21,034
2	117,47684	21,710	117,24326	21,048
3	119,72150	21,776	117,20917	21,026
4	118,99217	21,759	117,94959	21,069
5	117,49678	21,880	117,80344	21,069
6	117,18736	22,005	117,91418	21,057
<b>Media</b>	77,851	21,797	117,743	21,051
<b>SD</b>	0,57	0,13	0,44	0,02
<b>RSD</b>	<b>0,74</b>	<b>0,59</b>	<b>0,37</b>	<b>0,09</b>

	Área	t <sub>R</sub>
<b>Media entre días</b>	117,954	21,424
<b>SD entre días</b>	0,77	0,40
<b>RSD entre días</b>	<b>0,65</b>	<b>1,86</b>

Cuadro 6.72.: Resultados correspondientes al estudio de precisión del sistema instrumental para una concentración de acetato de hidrocortisona de 160%.

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD día  $\leq$  1.0% y RSD interdía  $\leq$  2.0%.

Por lo tanto el resultado cumple.

<b>100%</b>	<b>Día 1</b>		<b>Día 2</b>	
Inyección	Área	t <sub>R</sub>	Área	t <sub>R</sub>
1	77,87759	21,500	75,75828	21,118
2	77,43806	21,471	74,97116	21,035
3	77,61708	21,469	76,20052	21,091
4	77,41312	21,470	76,86324	21,064
5	78,95964	21,511	75,75349	21,038
6	77,79749	21,542	74,91096	21,020
<b>Media</b>	77,8501	21,494	75,743	21,061
<b>SD</b>	0,57	0,03	0,74	0,04
<b>RSD</b>	<b>0,74</b>	<b>0,14</b>	<b>0,98</b>	<b>0,18</b>

	Área	t <sub>R</sub>
<b>Media entre días</b>	76,797	21,277
<b>SD entre días</b>	1,27	0,23
<b>RSD entre días</b>	<b>1,65</b>	<b>1,07</b>

Cuadro 6.73.: Resultados correspondientes al estudio de precisión del sistema instrumental para una concentración de acetato de hidrocortisona de 100%.

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD día  $\leq$  1.0% y RSD interdía  $\leq$  2.0%.

Por lo tanto el resultado cumple.

<b>40%</b>	<b>Día 1</b>		<b>Día 2</b>	
Inyección	Área	t <sub>R</sub>	Área	t <sub>R</sub>
1	32,51996	21,038	31,74038	21,138
2	32,49082	21,026	32,14087	21,027
3	32,19997	20,996	32,33331	21,047
4	32,39324	20,863	32,35389	21,021
5	32,38302	21,056	32,63239	21,000
6	32,36100	21,036	32,42932	20,969
<b>Media</b>	32,391	21,003	32,373	21,034
<b>SD</b>	0,11	0,07	0,30	0,06
<b>RSD</b>	<b>0,35</b>	<b>0,34</b>	<b>0,94</b>	<b>0,27</b>

	Área	t <sub>R</sub>
<b>Media entre días</b>	32,332	21,018
<b>SD entre días</b>	0,23	0,06
<b>RSD entre días</b>	<b>0,71</b>	<b>0,30</b>

Cuadro 6.74.: Resultados correspondientes al estudio de precisión del sistema instrumental para una concentración de acetato de hidrocortisona de 40%.

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD día  $\leq$  1.0% y RSD interdía  $\leq$  2.0%.

Por lo tanto el resultado cumple.

• **Repetibilidad del método para la solución patrón**

Los resultados de la repetibilidad del método para la solución patrón son los siguientes:

%	Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
40	0,882	29,63388	33,598
40	0,876	29,88193	34,112
40	0,862	29,90483	34,692
100	2,160	79,72986	36,912
100	2,168	76,86130	35,453
100	2,196	77,45566	35,271
160	3,480	122,53921	35,212
160	3,480	123,99280	35,630
160	3,504	123,75054	35,317
<b>N</b>	9		
<b>Media</b>	35,133		
<b>SD</b>	0,946		
<b>RSD</b>	2,694		

Cuadro 6.75.: Resultados correspondientes al estudio de la repetibilidad del método para la solución patrón.

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD día  $\leq$  3.7%.

Por lo tanto el resultado cumple.

• **Repetibilidad del método para la solución problema**

Los resultados de la repetibilidad del método para la solución problema son los siguientes:

%	Conc. µg/ml (X)	Respuesta (Y)	Factor respuesta (Y/X)
100	2,288	81,49874	35,620
100	2,1520	79,11357	36,763
100	2,2080	78,38141	35,499
100	2,1840	80,53659	36,876
100	2,2520	80,47281	35,734
100	2,2360	82,59491	36,939
<b>N</b>	6		
<b>Media</b>	36,238		
<b>SD</b>	0,686		
<b>RSD</b>	1,894		

Cuadro 6.76.: Resultados correspondientes al estudio de la repetibilidad del método para la solución problema.

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD día  $\leq$  3.7%.

Por lo tanto el resultado cumple.

• **Precisión intermedia del método**

Los resultados de la precisión intermedia del método en días diferentes, un mismo analista son los siguientes:

%	DÍA 1			DÍA 2		
	Conc (X) (µg/mL)	Área (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) (µg/mL)	Área (Y)	FR (Y/X)
100	2,288	81,49874	35,620	2,256	78,75795	34,910
	2,152	79,11357	36,763	2,188	78,54806	35,899
	2,208	78,38141	35,499	2,164	77,09804	35,628
	2,184	80,53659	36,876	2,204	78,52095	35,627
	2,252	80,47281	35,734	2,216	81,24893	36,665
	2,236	82,59491	36,939	2,156	77,69017	36,034
<b>Media</b>	36,238			35,794		
<b>SD</b>	0,686			0,577		
<b>RSD</b>	1,894			1,611		

<b>Media interdía</b>	36,016
<b>SD interdía</b>	0,647
<b>RSD interdía</b>	1,798

Cuadro 6.77.: Resultados correspondientes al estudio de la precisión intermedia del método en diferentes días y un mismo analista.

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD individual  $\leq 3.7\%$  y RSD interdía  $\leq 3.7\%$ .

Por lo tanto el resultado cumple.

Los resultados de la precisión intermedia del método para analistas diferentes son los siguientes:

%	DÍA 1			DÍA 2		
	Conc (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (Y)	FR (Y/X)
100	2,288	81,49874	35,620	2,224	77,82437	34,993
	2,152	79,11357	36,763	2,280	79,09437	34,691
	2,208	78,38141	35,499	2,240	77,52784	34,611
	2,184	80,53659	36,876	2,292	81,07432	35,373
	2,252	80,47281	35,734	2,232	77,84660	34,716
	2,236	82,59491	36,939	2,208	76,42667	34,614
<b>Media</b>			36,238			34,833
<b>SD</b>			0,686			0,299
<b>RSD</b>			1,894			0,860

<b>Media interdía</b>	35,536
<b>SD interdía</b>	0,891
<b>RSD interdía</b>	2,507

Cuadro 6.78.: Resultados correspondientes al estudio de la precisión intermedia del método para diferentes analistas.

El criterio de aceptación es el siguiente: RSD individual  $\leq 3.7\%$  y RSD interdía  $\leq 3.7\%$ .

Por lo tanto el resultado cumple.

### 6.3.2.7. Exactitud

Los resultados de la precisión del sistema instrumental son los siguientes:

%	Concentración (µg/mL) añadido	Concentración (µg/mL) hallado	Error relativo en %	% recuperado
40	0,889	0,889	-0,0305	100,03
	0,872	0,872	-0,0329	100,03
	0,891	0,889	0,2582	99,74
100	2,220	2,249	-1,2938	101,29
	2,220	2,246	-1,1596	101,16
	2,268	2,300	-1,4242	101,42
160	3,480	3,529	-1,3969	101,40
	3,524	3,504	0,5691	99,43
	3,512	3,449	1,7891	98,21
N			9	
Recuperación (media)			100,302	
SD			1,105	
RSD			1,102	

Cuadro 6.79.: Resultados correspondientes al estudio de la exactitud.

El criterio de aceptación es el siguiente: Recuperación entre 95 y 105%.

Por lo tanto el resultado cumple.

### 6.3.2.8. Robustez

Los resultados de la robustez del método según las diferentes modificaciones realizadas en el método de análisis son los siguientes:

- **Modificación de la longitud de onda del detector**

Los resultados de % de acetato de hidrocortisona analizados a diferentes longitudes de onda, se muestran en el cuadro 6.80. y se representan en la Figura 6.107.

Muestra	237 nm	240 nm	243 nm
1	100,348	99,783	100,670
2	99,186	98,982	99,367
3	100,305	98,041	100,854
Media	100,007	98,935	100,297
SD	0,659	0,872	0,811
RSD	0,659	0,881	0,808

Cuadro 6.80.: Resultados correspondientes al % de acetato de hidrocortisona analizado a diferentes longitudes de onda del detector.

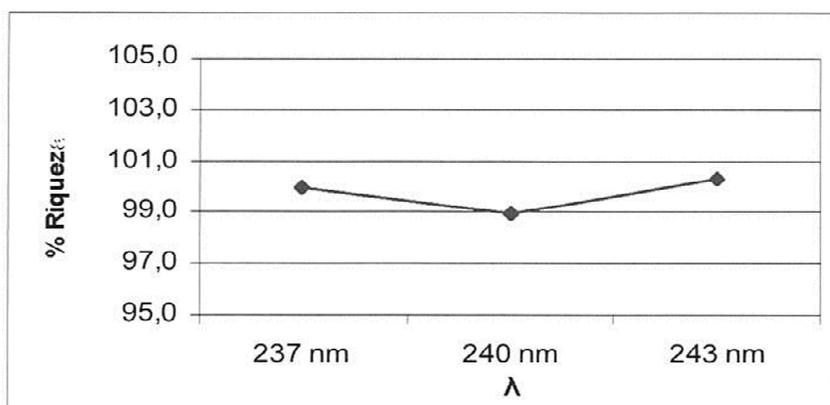


Figura 6.107.: Representación gráfica del % de acetato de hidrocortisona analizado a diferentes longitudes de onda del detector.

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
237 nm	3	299,839005	99,94633501	0,43413062
240 nm	3	296,8056882	98,9352294	0,76056061
243 nm	3	300,8902882	100,2967627	0,65741531

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,998907203	2	1,499453601	2,42878079	0,16875508	5,14325285
Dentro de los grupos	3,704213089	6	0,617368848			
Total	6,703120291	8				

Figura 6.108.: Tratamiento estadístico mediante ANOVA de las riquezas analizadas de acetato de hidrocortisona a diferentes longitudes de onda.

Al realizar el estudio estadístico ANOVA, a las riquezas halladas, se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas al realizar pequeñas variaciones en la longitud de onda del detector ( $\pm 3$  nm), según el análisis de la varianza llevada a cabo, por lo que puede concluirse que el método es robusto para este parámetro.

• **Modificación de la temperatura de la columna**

Los resultados de % de acetato de hidrocortisona analizados a diferentes temperaturas de la columna, se muestran en el cuadro 6.81. y se representan en la Figura 6.109.

Muestra	30 °C	40 °C	45°C
1	99,838	99,783	99,275
2	100,744	98,982	98,432
3	99,069	98,041	96,670
<i>Media</i>	99,817	98,935	98,125
<i>SD</i>	0,562	0,872	1,329
<i>RSD</i>	0,566	0,881	1,355

Cuadro 6.81.: Resultados correspondientes al % de acetato de hidrocortisona analizado a diferentes temperaturas de columna.

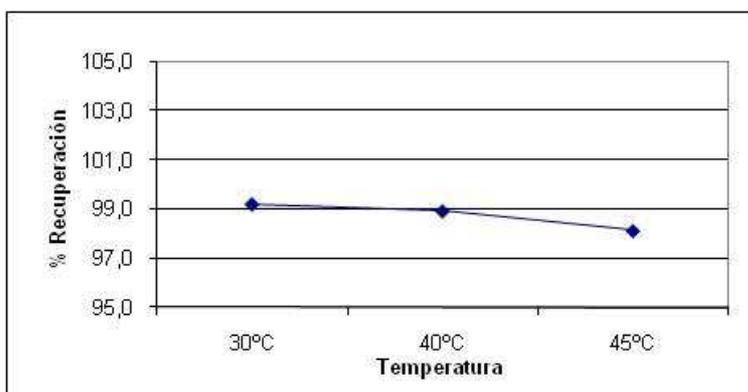


Figura 6.109.: Representación gráfica del % de acetato de hidrocortisona analizado a diferentes temperaturas de la columna.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
30 °C	3	297,6502397	99,21674656	0,31569645			
40 °C	3	296,8056882	98,9352294	0,76056061			
45 °C	3	294,3761443	98,12538142	1,76717874			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	1,926183533	2	0,963091767	1,01612117	0,416815	5,14324938	
Dentro de los grupos	5,686871599	6	0,947811933				
Total	7,613055132	8					

Figura 6.110.: Tratamiento estadístico mediante ANOVA de las riquezas analizadas de acetato de hidrocortisona a diferentes temperaturas de la columna.

Al realizar el estudio estadístico ANOVA, a las riquezas halladas, se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas al realizar pequeñas variaciones en

la temperatura de la columna ( $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), según el análisis de la varianza llevada a cabo, por lo que puede concluirse que el método es robusto para este parámetro.

• **Modificación del caudal de la bomba**

Los resultados de % de acetato de hidrocortisona analizados a diferentes caudales de bomba, se muestran en el cuadro 6.82. y se representan en la Figura 6.111.

Muestra	1,2 mL/min	1,5 mL/min	1,8 mL/min
1	100,759	99,783	99,282
2	99,391	98,982	97,722
3	98,516	98,041	99,692
<i>Media</i>	99,555	98,935	98,899
<i>SD</i>	1,130	0,872	1,039
<i>RSD</i>	1,135	0,881	1,051

Cuadro 6.81.: Resultados correspondientes al % de acetato de hidrocortisona analizado a diferentes caudales de bomba.

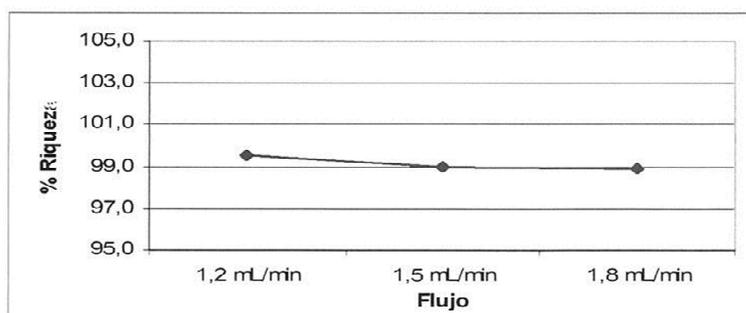


Figura 6.111.: Representación gráfica del % de acetato de hidrocortisona analizado a diferentes caudales de bomba.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1,2 mL/min	3	298,6659101	99,55530336	1,2775257
1,5 mL/min	3	296,8056882	98,9352294	0,76056061
1,8 mL/min	3	296,6967065	98,89890217	1,08020822

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,816673898	2	0,408336949	0,39284642	0,69130733	5,14324938
Dentro de los grupos	6,23658907	6	1,039431512			
Total	7,053262969	8				

Figura 6.112.: Tratamiento estadístico mediante ANOVA de las riquezas analizadas de acetato de hidrocortisona a diferentes caudales de bomba.

Al realizar el estudio estadístico ANOVA, a las riquezas halladas, se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas al realizar pequeñas variaciones en el caudal ( $\pm 0,3$ ), según el análisis de la varianza llevada a cabo, por lo que puede concluirse que el método es robusto para este parámetro.

• **Modificación del volumen de inyección**

Los resultados de % de acetato de hidrocortisona analizados a diferentes volúmenes de inyección, se muestran en el cuadro 6.83. y se representan en la Figura 6.113.

<i>Muestra</i>	<i>5 <math>\mu</math>L</i>	<i>10 <math>\mu</math>L</i>	<i>15 <math>\mu</math>L</i>
1	101,814	99,783	99,589
2	99,515	98,982	97,558
3	99,012	98,041	97,582
<i>Media</i>	100,114	98,935	98,243
<i>SD</i>	1,494	0,872	1,166
<i>RSD</i>	1,492	0,881	1,187

Cuadro 6.83.: Resultados correspondientes al % de acetato de hidrocortisona analizado a diferentes volúmenes de inyección.

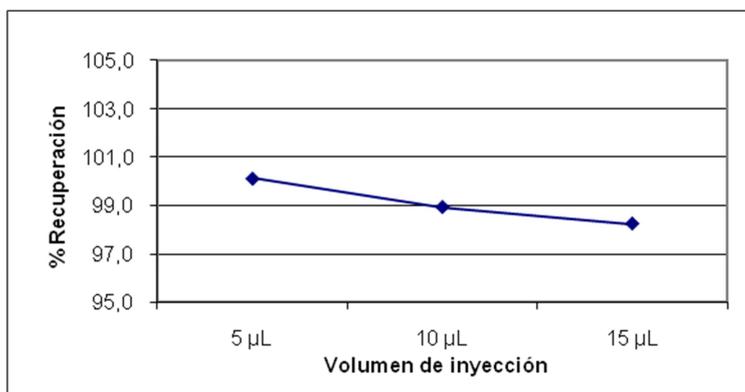


Figura 6.113: Representación gráfica del % de acetato de hidrocortisona analizado a diferentes volúmenes de inyección.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
5 µL	3	300,340545	100,113515	2,23249217		
10µL	3	296,8056882	98,9352294	0,76056061		
15 µL	3	294,7293103	98,24310342	1,35906926		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5,365834813	2	2,682917407	1,84938569	0,23675741	5,14325285
Dentro de los grupos	8,70424409	6	1,450707348			
Total	14,0700789	8				

Figura 6.114.: Tratamiento estadístico mediante ANOVA de las riquezas analizadas de acetato de hidrocortisona a diferentes volúmenes de inyección.

Al realizar el estudio estadístico ANOVA, a las riquezas halladas, se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas al realizar pequeñas variaciones en el volumen de inyección de las muestras ( $\pm 5 \mu\text{L}$ ), según el análisis de la varianza llevada a cabo, por lo que puede concluirse que el método es robusto para este parámetro.

- **Modificación del lote de la columna**

Los resultados de % de acetato de hidrocortisona analizados con diferentes lotes de columna, se muestran en el cuadro 6.84. y se representan en la Figura 6.115.

Muestra	Lote USWU007819	Lote USWU008265
1	99,783	99,885
2	98,982	98,623
3	98,041	102,315
<i>Media</i>	98,935	100,575
<i>SD</i>	0,872	1,877
<i>RSD</i>	0,881	1,872

Cuadro 6.84.: Resultados correspondientes al % de acetato de hidrocortisona analizado con diferentes lotes de columna.

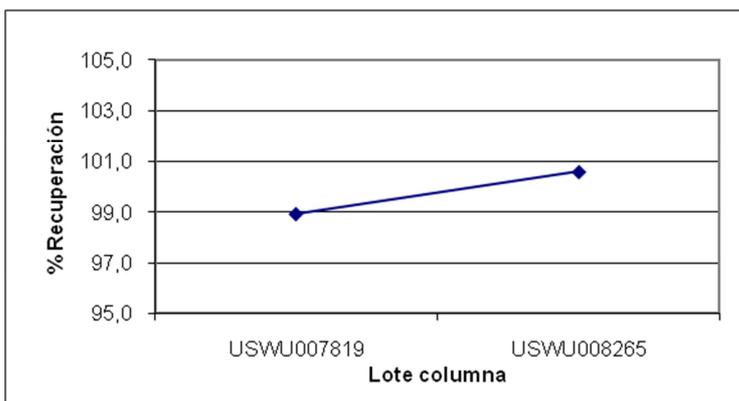


Figura 6.115: Representación gráfica del % de acetato de hidrocortisona analizado con diferentes lotes de columna.

	<i>USWU008260</i>	<i>USWU008673</i>
Media	98,9352294	100,2745093
Varianza	0,760560611	3,52189921
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	2,14122991	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-1,120947613	
P(T<=t) una cola	0,16252935	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846486	
P(T<=t) dos colas	0,3250587	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776450856	

Figura 6.116.: Tratamiento estadístico mediante t de Student de las riquezas analizadas de acetato de hidrocortisona con diferentes lotes de columna.

El tratamiento estadístico demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos lotes de columnas, por lo que se puede concluir que el método es robusto en cuanto al cambio de lote de columna.

### 6.3.2.9. Cálculo Factor de Corrección

Se propone la utilización de un factor de corrección para el cálculo del producto de degradación conocido hidrocortisona, debido a la imposibilidad de disponer de patrón del mismo. Para ello se realizará una solución de dicho producto de degradación conocido por triplicado al tanto por ciento correspondiente al límite establecido (2,2 µg/mL). Posteriormente se relacionará el factor de respuesta medio obtenido en la repetibilidad de la solución patrón para el principio activo con respecto al factor

respuesta obtenido para el producto de degradación conocido en estudio, según se indica en la siguiente ecuación:

$$F_x = FR_{pa} / FR_{PD}$$

En el cuadro 6.85. se muestran los resultados obtenidos para los tres replicados llevados a cabo para el producto de degradación conocido hidrocortisona.

<i>Replicado</i>	<i>Conc (µg/mL)</i>	<i>Área</i>	<i>FR</i>
1	2,000	68,01014	34,005
2	2,032	72,66432	35,760
3	2,008	71,08898	35,403
<i>Media</i>	2,01	70,588	35,056
<i>SD</i>	0,02	2,367	0,927
<i>RSD</i>	0,83	3,354	2,646

Cuadro 6.85.: Resultados correspondientes a los tres replicados llevados a cabo para el producto de degradación hidrocortisona.

Aplicando la formula anterior se obtiene el siguiente valor de Fx (factor de corrección para el producto de degradación), el cual se utilizará en rutina para el cálculo de dicho producto de degradación (cuadro 6.86.).

<i>Productos de degradación conocido</i>	<i>Factor de corrección</i>
Hidrocortisona	1,0022

Cuadro 6.86.: Valor del factor de corrección obtenido

## **CAPÍTULO 7: CONTROL DEL PRODUCTO ACABADO**

### **7.1. INTRODUCCIÓN**

Una vez obtenida la forma farmacéutica semisólida, la posibilidad de variaciones existentes dentro de un mismo lote y entre lotes se reduce al mínimo gracias a los controles que se han ido generando a lo largo de todo el proceso de fabricación como ya se ha explicado en el capítulo 4. Esto lleva a que la producción a gran escala de comprimidos satisfactorios exija una evaluación continua de las materias primas, instalaciones, personal, procesos y equipos en todas las fases de la fabricación de los comprimidos, garantizando así la calidad del producto final (aplicación NCF) (68).

Los controles que se realizan son múltiples y de diferente naturaleza, ya que se trata de controles que tienen en cuenta características físicas del producto, características químicas y también características microbiológicas.

Una vez obtenido el producto acabado, este debe permanecer en cuarentena hasta que control de calidad, con los controles necesarios, de la aprobación final de que ese producto cumple (calidad de conformidad) con las especificaciones con las que se inició el estudio (calidad de diseño). Todos los ensayos realizados sobre el producto terminado han de quedar bien documentados al igual que los resultados obtenidos, de esta forma se evitarán posibles errores a la hora de dar la aprobación final a un producto acabado.

Cuando se habla de especificación, ésta se define como una lista de ensayos, con referencia a los procedimientos analíticos y criterios de aceptación. Los criterios de aceptación pueden ser numéricos, un intervalo u otro tipo de criterio. Estas especificaciones se fijan para definir la calidad, en este caso del producto acabado y de esta forma establecer la seguridad y eficacia del producto. Estas especificaciones, a la liberación del lote, no siempre han de coincidir con las establecidas para el período de validez o para una estudio de estabilidad, pudiendo ser estas últimas menos restrictivas, manteniendo siempre una lógica en cuanto a la especificación establecida.

Estas especificaciones han de cubrir como mínimo los siguientes ensayos:

- Descripción y características físicas y físico-químicas de la forma farmacéutica en estudio.
- Identificación del principio activo y en el caso de que se trate de una forma farmacéutica que incluye conservantes o antioxidantes se procederá a la identificación de los mismos.
- Valoración cuantitativa del principio activo y de los conservantes y antioxidantes si estos se encuentran incluidos en la forma farmacéutica en estudio.
- Valoración tanto cualitativa como cuantitativa de los productos de degradación que se pudieran generar.
- Ensayos farmacotécnicos como por ejemplo viscosidad, extensibilidad del gel, si procede, etc.

Se ha desarrollado y validado un método de análisis por HPLC (ver capítulo 6), que fue utilizado durante el control de calidad del gel de acetato de hidrocortisona, con el fin de cuantificar el principio activo (acetato de hidrocortisona), conservantes (propilparahidroxibenzoico (4-hidroxybenzoic acid propyl ester, nipasol®) y metilparahidroxibenzoico (4-hidroxybenzoic acid methyl ester, nipagin®)), antioxidante (BHA) y productos de degradación.

Dicho método, ha sido probado para ser adecuado como método de control de calidad rápido y fiable.

En esta etapa se realizan cada uno de los ensayos necesarios para considerar que el gel se ha fabricado con la calidad esperada y, a partir de los resultados obtenidos, generar unos certificados de análisis que certifiquen que el producto fabricado y ensayado cumplen con lo especificado al inicio del estudio.

A continuación se presenta un cuadro resumen (cuadro 7.1) con los ensayos que para el producto diseñado se proponen realizar, el método de análisis empleado y las especificaciones establecidas para cada uno de los ensayos.

ENSAYO	MÉTODO DE ANÁLISIS	ESPECIFICACIONES
Características organolépticas: Aspecto	Método organoléptico	Gel opaco blanco
pH	Procedimiento interno	5.0 – 6.0
Viscosidad	Procedimiento interno	> 9000 cps dependiendo de la temperatura
Extensibilidad	Procedimiento interno	> 900 mm <sup>2</sup>
Identificación principio activo y productos degradación	HPLC (método propio, ver capítulo 6)	Tiempo de retención similar sustancia referencia.
Valoración principio activo	HPLC (método propio, ver capítulo 6)	95,0 – 105,0%
Valoración de los productos degradación		
Hidrocortisona .....		≤ 1%
Cortisona .....	HPLC (método propio, ver capítulo 6)	≤ 1%
Cortisona-21- acetato .....		≤ 1%
Acetato prednisolona .....		≤ 1%
PDD individuales .....		≤ 1%
PDD totales .....		≤ 2%
Valoración del metilparahidroxibenzoico	HPLC (método propio, ver capítulo 6)	90,0 – 110,0%
Valoración del propilparahidroxibenzoico	HPLC (método propio, ver capítulo 6)	90,0 – 110,0%
Valoración del butilhidroxianisol	HPLC (método propio, ver capítulo 6)	90,0 – 110,0%

Control microbiológico		-Recuento de microorganismos aerobios viables totales: <math>10^3</math> ufc/g -Bacterias <math>10^2</math> ufc/g -Hongos filamentosos y levaduras <math>10^1</math> ufc/g -Enterobacterias (y otras bacterias gran-negativas): ausencia / g - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : ausencia / g - <i>Staphylococcus aureus</i> : ausencia / g
------------------------	--	--

Cuadro 7.1.: Cuadro correspondiente a los ensayos a realizar en el producto acabado, junto con los métodos de análisis y especificaciones correspondientes.

## 7.2. METODOLOGÍA

En este apartado sólo se detallan los ensayos para realizar el control de producto acabado.

### 7.2.1. Características organolépticas: aspecto

En este apartado se comprueba que se trata de un gel translucido con ausencia de partículas solidas. Además en observación visual, se comprueba que el gel presenta las siguientes características:

- Ausencia de burbujas o aire en su interior.
- Ausencia de cuerpos extraños.

### 7.2.2. pH

Para la realización de este ensayo se sigue una especificación y unos procedimientos internos propios, debido a que ni la Real Farmacopea Española, ni la Farmacopea Europea 7ª edición no indica nada al respecto, al igual que ocurre con la farmacopea americana (USP 36) y con la farmacopea británica (BP 2014).

Para realizar este ensayo se utiliza un pH-metro previamente calibrado según la Farmacopea Europea 7ª edición [2.2.3.] directamente sobre el preparado farmacéutico en un vaso de precipitados. Poner cantidad suficiente en un vaso de precipitados para cubrir el electrodo. El pH obtenido debe encontrarse entre 5.0 y 6.0.

### **7.2.3. Identificación del principio activo y productos de degradación**

La identificación del acetato de hidrocortisona y sus productos de degradación (hidrocortisona, cortisona, prednisolona acetato y cortisona acetato), se lleva a cabo mediante la comparación del tiempo de retención del pico correspondiente a estas sustancias en la muestra problema respecto al tiempo de retención obtenido con las muestras patrón (sustancias de referencia), utilizando como técnica de identificación la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizada también para la valoración de los comprimidos de acetato de hidrocortisona y que se describe en el capítulo 5. La identificación del acetato de hidrocortisona se realiza por los tiempos de retención obtenidos tanto con las muestras patrón como con las muestras problema, tiempos de retención que han de ser equivalentes para que se de cómo positiva la identificación del principio activo y sus productos de degradación.

### **7.2.4. Valoración del principio activo**

La valoración del principio activo se realizará por HPLC, según criterio de la Farmacopea Europea 7ª edición [2.2.29.].

El método de valoración se llevará a cabo mediante un método nuevo y original puesta a punto específicamente para este producto y sus sustancias relacionadas, siguiendo las pautas descritas en el capítulo 6.

Para ello, se pesa aproximadamente la cantidad de 10 g del producto acabado. Dicha cantidad se transfiere a un matraz de 100 ml y se disuelve mediante sonicación durante 15 minutos en unos 80 ml de fase móvil para muestras, a continuación agitación magnética durante 45 minutos. Se enrasa con más fase móvil. Se toma una proporción de la solución preparada y se filtra por filtros de membrana de PVDF de 0.45 µm. La solución filtrada se transfiere a un vial para HPLC. Cada una de las soluciones

preparadas se inyecta por duplicado en el cromatógrafo y se registran los correspondientes gráficos.

La concentración teórica final de los siguientes componentes a analizar es de 180 µg/ml de propilparahidroxibenzoico, 20 µg/ml de metilparahidroxibenzoico y 10 µg/ml de BHA.

De esta solución, se toman 2 ml y se diluyen hasta 10 ml con más fase móvil para muestras. Se toma un proporción de la solución preparada y se filtra por filtros de membrana de PVDF de 0.45 µm. La solución filtrada se transfiere a un vial para HPLC. Cada una de las soluciones preparadas se inyecta por duplicado en el cromatógrafo. La concentración teórica final de acetato de hidrocortisona en esta solución es de 220 µg/ml.

#### **7.2.5. Valoración de los productos de degradación**

Para la realización de este ensayo se utiliza la misma técnica de cromatografía líquida de alta resolución descrita en el apartado 7.2.4. y a su vez descrita en el capítulo 6.

#### **7.2.6. Valoración del metilparahidroxibenzoico**

Para la realización de este ensayo se utiliza la misma técnica de cromatografía líquida de alta resolución descrita en el apartado 7.2.4. y a su vez descrita en el capítulo 6.

#### **7.2.7. Valoración del propilparahidroxibenzoico**

Para la realización de este ensayo se utiliza la misma técnica de cromatografía líquida de alta resolución descrita en el apartado 7.2.4. y a su vez descrita en el capítulo 6.

#### **7.2.8. Valoración del butilhidroxianisol**

Para la realización de este ensayo se utiliza la misma técnica de cromatografía líquida de alta resolución descrita en el apartado 7.2.4. y a su vez descrita en el capítulo 6.

### **7.2.9. Control microbiológico**

Se sigue la Farmacopea Europea 7ª Edición [2.6.12.]. El producto acabado deberá de cumplir los siguientes requisitos:

- Recuento de microorganismos aerobios viables totales:  $<10^3$  ufc/g
- Bacterias  $<10^2$  ufc/g
- Hongos filamentosos y levaduras  $<10^1$  ufc/g
- Enterobacterias (y otras bacterias gran-negativas): ausencia / g
- Pseudomonas aeruginosa*: ausencia / g
- Staphylococcus aureus*: ausencia / g

### **7.2.10. Determinación de la viscosidad**

La determinación de la viscosidad se realiza con un viscosímetro método Brookfield. El Spindle utilizado es el nº6 y la velocidad es 50 r.p.m.

El procedimiento para realizar el ensayo es el siguiente: se vierte en un vaso de precipitados de 75 ml de capacidad el contenido del envase. Se comprueba que la temperatura del gel sea de  $20 \pm 1$  °C. Se sumerge la aguja 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 del viscosímetro. Las cuadros 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 cps.

Viscosidad = valor viscosímetro x factor = viscosidad (cps)

### **7.2.11. Determinación de la extensibilidad**

Se utiliza el extensómetro diseñado por el Dr. Alfonso del Pozo Ojeda y el Dr. Josep María Suñe Arbussà.

Se utiliza la cantidad suficiente de gel para enrasar el cilindro del extensómetro utilizado (capacidad aproximada  $1 \text{ cm}^3$ ). El cilindro tiene dos posiciones. Cuando se introduce la muestra el cilindro se mantiene en la posición mínima. Una vez introducida

la muestra, se protege con la tapa de plástico duro, se pone encima un peso de 100 g y se gira la base hasta que el cilindro sube a la posición máxima manteniéndose así durante el tiempo de un minuto. Transcurrido este tiempo, se mide el diámetro de la circunferencia descrita por la muestra mediante un pie de rey.

Sabiendo el diámetro se calcula el radio y el área de la circunferencia con la fórmula siguiente:

$$\text{Área circunferencia} = \pi \times r^2$$

### 7.3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Los resultados obtenidos en el primero lote piloto elaborado se presentan en el cuadro 7.2.:

ENSAYO	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Características organolépticas: Aspecto	Gel opaco blanco	Cumple
pH	5.0 – 6.0	5,25
Viscosidad	> 9000 cps dependiendo de la temperatura	11933 cps
Extensibilidad	> 900 mm <sup>2</sup>	1688,2 mm <sup>2</sup>
Identificación principio activo y productos degradación	Tiempo de retención similar sustancia referencia.	Cumple
Valoración principio activo	95,0 – 105,0%	99,1%
Valoración de los productos degradación		
Hidrocortisona .....	≤ 1%	< Límite de detección
Cortisona .....	≤ 1%	< Límite de detección
Cortisona-21- acetato .....	≤ 1%	< Límite de detección
Acetato prednisolona .....	≤ 1%	< Límite de detección
PDD individuales .....	≤ 1%	< Límite de detección
PDD totales .....	≤ 2%	< Límite de detección

Valoración del metil parahidroxibenzoico	90,0 – 110,0%	98,6%
Valoración del propil parahidroxibenzoico	90,0 – 110,0%	93,9%
Valoración del butilhidroxianisol	90,0 – 110,0%	91,3%
Control microbiológico	-Recuento de microorganismos aerobios viables totales: <math>10^3</math> ufc/g	Cumple
	-Bacterias <math>10^2</math> ufc/g	Cumple
	-Hongos filamentosos y levaduras <math>10^1</math> ufc/g	Cumple
	-Enterobacterias (y otras bacterias gran-negativas): ausencia / g	Cumple
	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : ausencia / g	Cumple
	- <i>Staphylococcus aureus</i> : ausencia / g	Cumple

Cuadro 7.2.: Resultados obtenidos en el primer lote piloto elaborado

Los resultados obtenidos en el segundo lote piloto elaborado se presentan en el cuadro 7.3.:

ENSAYO	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Características organolépticas: Aspecto	Gel opaco blanco	Cumple
pH	5.0 – 7.0	5,20
Viscosidad	> 9000 cps dependiendo de la temperatura	11467 cps
Extensibilidad	> 900 mm <sup>2</sup>	1869,3 mm <sup>2</sup>
Identificación principio activo y productos degradación	Tiempo de retención similar sustancia referencia.	Cumple
Valoración principio activo	95,0 – 105,0%	102,9%

Valoración de los productos degradación		
Hidrocortisona .....	≤ 1%	< Límite de detección
Cortisona .....	≤ 1%	< Límite de detección
Cortisona-21- acetato .....	≤ 1%	< Límite de detección
Acetato prednisolona .....	≤ 1%	< Límite de detección
PDD individuales .....	≤ 1%	< Límite de detección
PDD totales .....	≤ 2%	< Límite de detección
Valoración del metilparahidroxibenzoico	90,0 – 110,0%	98,0%
Valoración del propilparahidroxibenzoico	90,0 – 110,0%	103,6%
Valoración del butilhidroxianisol	90,0 – 110,0%	94,0%
Control microbiológico	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Recuento de microorganismos aerobios viables totales: &lt;10<sup>3</sup> ufc/g</li> <li>-Bacterias &lt;10<sup>2</sup> ufc/g</li> <li>-Hongos filamentosos y levaduras &lt;10<sup>1</sup> ufc/g</li> <li>-Enterobacterias (y otras bacterias gran-negativas): ausencia / g</li> <li>-<i>Pseudomonas aeruginosa</i>: ausencia / g</li> <li>-<i>Staphylococcus aureus</i>: ausencia / g</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cumple</li> <li>Cumple</li> <li>Cumple</li> <li>Cumple</li> <li>Cumple</li> <li>Cumple</li> </ul>

Cuadro 7.3.: Resultados obtenidos en el segundo lote piloto elaborado

## **CAPÍTULO 8: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL PRODUCTO ACABADO**

### **8.1. INTRODUCCIÓN**

Según las normas de correcta fabricación (68), se define la estabilidad de un medicamento como la cualidad de mantener en el tiempo las características originales.

Su predicción se realiza mediante técnicas y ensayos en períodos cortos, que permiten por extrapolación saber su estado al cabo de un tiempo mayor. Esto se refiere a la duración de vida del principio activo, la que determina su fecha de caducidad.

Todo estudio de estabilidad, tiene como propósito obtener datos sobre la calidad del producto a lo largo del tiempo y, de esta manera, poder establecer una fecha de caducidad y unas condiciones de almacenamiento del producto si fuera necesario (69).

Durante el estudio de estabilidad se extrae información relacionada bien con los posibles productos de degradación (tóxicos o no), de las posibles interacciones entre el producto y el contenedor, etc. Para los registros de los medicamentos, estos estudios se llevan a cabo para demostrar que el medicamento que se presenta a registro es lo suficientemente estable, que mantiene la calidad adecuada y que se mantendrá seguro y eficaz durante el tiempo de caducidad solicitado por el fabricante.

Un estudio de estabilidad implica realizar o fabricar una serie de lotes de medicamento a estudiar, someter estos lotes a una serie de condiciones ambientales en cuanto a temperatura y humedad se refiere, condiciones que se escogerán según la zona climática donde vaya a ser comercializado dicho medicamento y también de las propias características del producto. Por otro lado, para continuar con el estudio de estabilidad se han de establecer parámetros que se pueden ver afectados por el tiempo y que a la larga pueden afectar tanto a la calidad como a la seguridad y eficacia del medicamento. A partir de aquí se redactarán unos protocolos en donde se definirán los diferentes ensayos a realizar para determinar los parámetros establecidos como críticos. La frecuencia en que se realicen los ensayos dependerá del tipo de estudio que se trate.

Según la recomendación ICH Q1A (69), se pueden hablar de tres tipos diferentes de estudio. Define un estudio a largo plazo en el cual la frecuencia de análisis debe ser suficiente para establecer la estabilidad final del producto acabado. Para productos en los cuales se espera una vida media de al menos 12 meses o más, la ICH recomiendan realizar ensayos cada 3 meses, en el primer año de estabilidad, cada 6 meses durante el segundo año de estabilidad y a partir de este segundo año, los análisis se realizan cada año hasta alcanzar el tiempo de vida medio propuesto para aquel producto o medicamento.

Define también un estudio a corto plazo en que se recomienda como mínimo el análisis de los lotes en estudio cada 3 meses hasta el sexto mes de estudio, incluyendo el tiempo inicial y final; sin embargo un aumento en el número de análisis durante los primeros tres meses del estudio resulta importante con el fin de obtener una mayor información sobre los posibles cambios que se pudieran generar en el producto acabado fabricado.

Por último, existe un estudio llamado de plazo intermedio que consisten en realizar análisis cada 3 meses hasta el primer año de estudio, en las condiciones de estabilidad acelerada.

Estos tres estudios no sólo se basan en la realización de los ensayos a cada uno de los tiempos mencionados anteriormente, sino que también están basados en las condiciones de almacenamiento en cuanto a temperatura y humedad se refiere. En el cuadro 8.1. se recoge un resumen de las condiciones y tiempos más frecuentes a realizar en cada uno de los estudios, considerando la zona climática II (clima templado), dado que es de aplicación para la mayor parte de la Unión Europea.

ESTUDIO	CONDICIÓN DE ALMACENAMIENTO	TIEMPO MÍNIMO DE ENSAYO
LARGO PLAZO (Long term)	25 °C ± 2 °C/60% HR ± 5% HR	12 meses
PLAZO INTERMEDIO (Intermediate term)	30 °C ± 2 °C/65% HR ± 5% HR	6 meses
ACELERADAS (Accelerated)	40 °C ± 2 °C/75% HR ± 5% HR	6 meses

Cuadro 8.1.: Resumen de los tipos de estudio, condición de almacenamiento y tiempo mínimo de ensayo para realizar el estudio de estabilidad según la zona climática II.

En cuanto al estudio intermedio que se realiza este se prologará hasta 12 meses, como se ha comentado anteriormente, si durante el estudio realizado a corto plazo en los seis meses de estudio se produjera algún cambio significativo en los lotes estudiados (69). Por norma general un cambio significativo en el producto acabado abarca los siguientes aspectos:

1. Una disminución del 5% en el ensayo de riqueza respecto al valor obtenido al inicio del estudio.
2. Algún producto de degradación excede el límite establecido al inicio del estudio.
3. Fallo respecto a los criterios iniciales establecidos en cuanto al aspecto del producto acabado, fallo en las características físicas y galénicas (viscosidad, etc).
4. No cumplimiento de las especificaciones en cuanto al ensayo de disolución se refiere (este apartado no aplica en el caso del producto a desarrollar en forma de enema en la presente tesis).

En cuanto a los lotes necesarios para realizar el estudio de estabilidad y presentarlo a registro como mínimo han de ser tres, fabricados como mínimo a escala piloto, y para cuya fabricación se hayan utilizado los mismos métodos y procedimientos que se apliquen al fabricar lotes a escala industrial, es decir, aquellos lotes que serán liberados al mercado. Se ha de tener en cuenta que la materia prima utilizada para la fabricación de estos lotes piloto ha de ser la misma que la utilizada en los ensayos clínicos y la que se utilizará en la fabricación de lotes industriales. Por otro lado, también es importante

tener en cuenta que se deberán realizar los estudios a largo plazo con los tres primeros lotes fabricados a escala industrial, resultados que se habrán de presentar o aportar al registro de dicho medicamento.

De esta forma, se conoce la estabilidad de la formulación del enema de Hidrocortisona al 1% desarrollado.

A pesar de que se han elaborado lotes a escala industrial de las formulaciones en crema y en gel según está descrito en el capítulo 5, tan solo se escoge la formulación en gel para realizar los estudios de estabilidad puesto que es la que proporciona mejores resultados en el estudio de estabilidad preliminar según descrito en el apartado 4.4. así como un menor grado de dificultad en el proceso tecnológico de su elaboración.

## **8.2. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se diseña un estudio de estabilidad a largo plazo (ELP) en tres condiciones diferentes de humedad y temperatura relativa durante un periodo de 36 meses.

El principio activo utilizado en dicho estudio es el acetato de hidrocortisona dado que es el más estable según demostrado en el apartado 4.4. de la presnete tesis.

Se estudian dos lotes fabricados de la formulación en gel (Lote 1 y Lote 2) a escala industrial (ver capítulo 5) según la fórmula numero 3 en base gel descrita en el cuadro 4.30. y con el proceso de fabricación descrito en la figura 4.4., ámbos del capitulo 4. Ambos lotes se acondicionan en su envase definitivo botellas de plástico LDPE opaco con cánula transparente.

Los preparados se disponen en tres cámaras climáticas, cada una de ellas en las siguientes condiciones de temperatura y humedad relativa:

- Cámara de estabilidad A:  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  y  $60\% \pm 5\%$  Humedad relativa
- Cámara de estabilidad B:  $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  y  $75\% \pm 5\%$  Humedad relativa
- Cámara de estabilidad C:  $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  y  $65\% \pm 5\%$  Humedad relativa

Los parámetros de humedad y temperatura de las cámaras se controlarán durante todo el período del estudio, obteniéndose un registro en papel de dichos parámetros.

En cada cámara climática se introduce una cantidad suficiente de unidades de cada lote para cubrir cada uno de los tiempos a evaluar, así como realizar los ensayos previsto a cada tiempo.

Los tiempos en los que se realizan los ensayos establecidos para determinar la validez de los preparados se detalle en el cuadro 8.2.

TIEMPO	CONDICIÓN CLIMÁTICA		
	Cámara A	Cámara B	Cámara C
Inicial	SI		
3 meses	SI	SI	SI
6 meses	SI	SI	SI
9 meses	SI	NO	SI
12 meses	SI	NO	SI
18 meses	SI	NO	SI
24 meses	SI	NO	SI
36 meses	SI	NO	SI

Cuadro 8.2.: Cuadro resumen de los tiempos de análisis para el estudio de estabilidad preliminar a largo plazo

En caso de que los resultados de los preparados en alguna de las condiciones sean no conformes, se suspenderá el estudio de estabilidad a esa condición y se estudiará la estabilidad en la condición siguiente inferior menos agresiva.

### **8.3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **8.3.1. Material**

Para la realización de los estudios de estabilidad se fabrican dos lotes a escala piloto de 20 kg cada uno de ellos. En concreto se fabrica el lote 1 y el lote 2 los cuales se

acondicionan en envase de plástico transparente con cánula y en envase de plástico opaco para comenzar el estudio de estabilidad.

La fecha de fabricación es el 11/05/2006.

### **8.3.2. Métodos**

El estudio de estabilidad se realiza en base a la determinación de los siguientes parámetros, considerados como críticos, cuyos ensayos se realizarán en todos los tiempos establecidos y comentados anteriormente:

1. Aspecto del gel y del material de acondicionamiento
2. Determinación de la viscosidad
3. Determinación del pH del gel
4. Determinación de la extensibilidad
5. Valoración del contenido de principio activo (acetato de hidrocortisona)
6. Valoración del contenido de conservantes y antioxidantes (metilhidroxibenzoico, propilhidroxibenzoico y butilhidroxianisol).
7. Valoración del contenido de productos de degradación
8. Control microbiológico

Los métodos de cada uno de los ensayos se han descrito en el capítulo 7 correspondiente al control de producto acabado, por lo que en este capítulo no se describen.

### **8.4. 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 que por tanto será el marcador de la calidad o no calidad del producto durante todo el periodo en que dura dicho estudio.

En el siguiente cuadro se resumen los ensayos a realizar, junto con los métodos utilizados y las especificaciones establecidas para llevar a cabo este estudio.

ENSAYO	MÉTODO DE ANÁLISIS	ESPECIFICACIONES
Características organolépticas: Aspecto	Método organoléptico	Gel opaco blanco
pH	Procedimiento interno	5.0 – 6.0
Viscosidad	Procedimiento interno	> 9000 cps dependiendo de la temperatura
Extensibilidad	Procedimiento interno	> 900 mm <sup>2</sup>
Identificación principio activo y productos degradación	HPLC (método propio, ver capítulo 6)	Tiempo de retención similar sustancia referencia.
Valoración principio activo	HPLC (método propio, ver capítulo 6)	95,0 – 105,0%
Valoración de los productos degradación		
Hidrocortisona .....		≤ 1%
Cortisona .....	HPLC (método propio, ver capítulo 6)	≤ 1%
Cortisona-21- acetato .....		≤ 1%
Acetato prednisolona .....		≤ 1%
PDD individuales .....		≤ 1%
PDD totales .....		≤ 2%
Valoración del metilparahidroxibenzoico	HPLC (método propio, ver capítulo 6)	90,0 – 110,0%
Valoración del propilparahidroxibenzoico	HPLC (método propio, ver capítulo 6)	90,0 – 110,0%
Valoración del butilhidroxianisol	HPLC (método propio, ver capítulo 6)	90,0 – 110,0%

Control microbiológico		-Recuento de microorganismos aerobios viables totales: $<10^3$ ufc/g -Bacterias $<10^2$ ufc/g -Hongos filamentosos y levaduras $<10^1$ ufc/g -Enterobacterias (y otras bacterias gran-negativas): ausencia / g - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : ausencia / g - <i>Staphylococcus aureus</i> : ausencia / g
------------------------	--	--

Cuadro 8.3.: Resumen de los métodos y especificaciones establecidos para el estudio de estabilidad.

## **8.5. EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ESTUDIO**

### **8.5.1. Aspecto**

Los resultados obtenidos en el estudio, permiten observar las posibles variaciones habidas en el transcurso del almacenamiento, reflejo de la existencia de posibles alteraciones físicas, químicas y/o galénicas del producto.

### **8.5.2. Control del pH del gel**

Los resultados obtenidos de la determinación del pH del gel 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.

### **8.5.3. Control de la viscosidad del gel**

Los resultados obtenidos de la determinación de la viscosidad del gel permiten conocer las buenas características reológicas del mismo y que éstas no varíen durante el transcurso del almacenamiento en las condiciones específicas.

### **8.5.4. Control de la extensibilidad del gel**

Los resultados obtenidos de la determinación de la extensibilidad del gel permiten conocer las buenas características reológicas del mismo y que éstas no varíen durante el transcurso del almacenamiento en las condiciones específicas.

### **8.5.5. Valoración del principio activo y productos de degradación**

Los resultados obtenidos junto con el resto de características analizadas, deberán permitir evaluar la idoneidad del principio activo en la formulación en las condiciones del ensayo, así como la posible disminución significativa de su riqueza a lo largo del tiempo de almacenamiento y la aparición de posibles productos de degradación.

### **8.5.6. Control microbiológico**

Los resultados obtenidos demostraran la calidad microbiológica del producto y del proceso de fabricación.

## **8.6. RESULTADOS EXPERIMENTALES**

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los lotes estudiados, tiempos estudiados y diferentes temperaturas. Estos resultados se resumen en los cuadros que a continuación se adjuntan.

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN		Tiempos estudiados							
			T=0	3 m	6m	9 m	12m	18 m	24 m	36 m
ASPECTO	Gel blanco opaco		Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
VISCOSIDAD	> 9000 cps dependiendo de la temperatura		11933 cps	9766 cps	10800 cps	10000 cps	12933 cps	11300 cps	11400 cps	10647 cps
pH	5-6		5,25	5,16	5,17	5,26	5,53	5,1	5,27	5,31
EXTENSIBILIDAD	>900 mm <sup>2</sup>		1668,2	947,1	1084,9	1085	1141,09	1128,1	984	938,29
VALORACIÓN (HPLC)	Ac.hidrocortisona	95,0-105,0%	99,1	101,3	100,3	103,1	95,2	101,3	100,3	106,1
	Nipagin		98,6	97,7	98,4	96,6	92,4	92,3	74,0	100,6
	Nipasol		93,9	—	—	89,9	85,6	82,3	66,8	84,0
	BHA		91,3	94,2	98,0	74,6	56,1	48,6	27,8	< LD
PRODUCTOS DEGRADACIÓN (HPLC)	hidrocortisona	≤ 1%	< LD	0,45	0,5	0,26	0,37	< LD	0,16	0,17
	cortisona	≤ 1%	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Acet.prednisolona	≤ 1%	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Acet.cortisona	≤ 1%	< LD	< LD	0,22	< LD	0,21	< LD	< LD	< LD
	PDD individuales	≤ 1%	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Totales	≤ 5%	< LD	0,45	0,72	0,26	0,58	< LD	0,16	0,17
CONTROL MICROBIOLÓGICO	aerobios (bacterias,hongos y levaduras)	10 <sup>2</sup> ufc/g	Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto
	Enterobacterias:	ausencia/g	Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto
	Staphylococcus aureus:	ausencia/g	Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto
	Pseudomonas aeruginosa:	ausencia/g	Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto

— Valor errático, no se considera

Cuadro 8.4.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para el primer lote (Lote 1) de la formulación en gel con acetato de hidrocortisona a las condiciones climáticas **25 °C/60% HR** acondicionado en enema opaco.

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN		Tiempos estudiados							
			T=0	3 m	6m	9 m	12m	18 m	24 m	36 m
ASPECTO	Gel blanco opaco		Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
VISCOSIDAD	> 9000 cps dependiendo de la temperatura		11467 cps	10200 cps	11066 cps	9633 cps	—	11500 cps	11300 cps	10533 cps
pH	5-6		5,20	5,20	4,96	5,22	5,49	5,2	5,19	5,24
EXTENSIBILIDAD	>900 mm <sup>2</sup>		1869,3	1038,0	1095,0	1124,2	1167,1	1115,5	988	851,70
VALORACIÓN (HPLC)	Ac.hidro cortisona	95,0-105,0%	102,9	97,6	99,4	101,8	98,9	102,6	102,5	106,2
	Nipagin		98,0	97,7	98,8	93,3	95,2	98,0	81,1	96,0
	Nipasol		103,6	100,4	101,2	92,5	94,8	93,3	75,9	86,9
	BHA		94,0	90,9	101,1	39,6	56,4	54,8	14,9	< LD
PRODUCTOS DEGRADACIÓN (HPLC)	hidrocortisona	≤ 1%	< LD	0,37	0,55	0,22	0,44	< LD	0,17	0,17
	cortisona	≤ 1%	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Acet.prednisolona	≤ 1%	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Acet.cortisona	≤ 1%	< LD	< LD	0,24	< LD	0,21	< LD	0,13	0,12
	PDD individuales	≤ 1%	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Totales	≤ 5%	< LD	0,37	0,79	0,22	0,65	< LD	0,30	0,29
CONTROL MICROBIOLÓGICO	aerobios (bacterias,hongos y levaduras) 10 <sup>2</sup> ufc/g		Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto
	Enterobacterias: ausencia/g		Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto
	Staphylococcus aureus: ausencia/g		Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto
	Pseudomonas aeruginosa: ausencia/g		Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto

— Valor errático, no se considera

Cuadro 8.5.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para el segundo lote (Lote 2) de la formulación en gel con acetato de hidrocortisona a las condiciones climáticas **25 °C/60% HR** acondicionado en enema opaco.

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN		Tiempos estudiados		
			T=0	3° mes	6°mes
ASPECTO	Gel blanco opaco		Cumple	Cumple	Cumple
VISCOSIDAD	> 9000 cps dependiendo de la temperatura		11933 cps	10833 cps	10266 cps
pH	5-6		5,25	5,12	5,41
EXTENSIBILIDAD	>900 mm <sup>2</sup>		1668,2 mm <sup>2</sup>	1094,8 mm <sup>2</sup>	1050,0 mm <sup>2</sup>
VALORACIÓN (HPLC)	Ac.hidrocortisona	95,0-105,0%	99,1	97,8	98,5
	Nipagin		98,6	86,9	87,3
	Nipasol		93,9	82,6	68,7
	BHA		91,3	12,05	< LD
PRODUCTOS DEGRADACIÓN (HPLC)	Hidrocortisona	≤ 1%	< LD	0,34	0,33
	Cortisona	≤ 1%	< LD	< LD	< LD
	Acet.prednisolona	≤ 1%	< LD	< LD	< LD
	Acet.cortisona	≤ 1%	< LD	< LD	0,10
	PDD individuales	≤ 1%	< LD	< LD	< LD
	Totales	≤ 5%	< LD	0,34	0,43
CONTROL MICROBIOLÓGICO	aerobios (bacterias,hongos y levaduras) 10 <sup>2</sup> ufc/g		Correcto	-----	Correcto
	Enterobacterias: ausencia/g		Correcto	-----	Correcto
	Staphylococcus aureus: ausencia/g		Correcto	-----	Correcto
	Pseudomonas aeruginosa: ausencia/g		Correcto	-----	Correcto

\_\_\_\_ Valor errático, no se considera

Cuadro 8.6.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para el primer lote (Lote 1) de la formulación en gel con acetato de hidrocortisona a las condiciones climáticas **40 °C/75% HR** acondicionado en enema opaco.

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN		Tiempos estudiados		
			T=0	3 mes	6mes
ASPECTO	Gel blanco opaco		Cumple	Cumple	Cumple
VISCOSIDAD	> 9000 cps dependiendo de la temperatura		11467 cps	11000 cps	9433 cps
pH	5-6		5,20	5,11	5,31
EXTENSIBILIDAD	>900 mm <sup>2</sup>		1869,3 mm <sup>2</sup>	1038 mm <sup>2</sup>	946 mm <sup>2</sup>
VALORACIÓN (HPLC)	Ac.hidro cortisona	95,0-105,0%	102,9	100,3	93,6
	Nipagin		98,0	98,6	84,8
	Nipasol		103,6	97,0	78,1
	BHA		94,0	34,9	40,9
PRODUCTOS DEGRADACIÓN (HPLC)	hidrocortisona	≤ 1%	< LD	0,55	0,37
	cortisona	≤ 1%	< LD	< LD	< LD
	Acet.prednisolona	≤ 1%	< LD	< LD	< LD
	Acet.cortisona	≤ 1%	< LD	< LD	0,15
	PDD individuals	≤ 1%	< LD	< LD	< LD
	Totales	≤ 5%	< LD	0,55	0,52
CONTROL MICROBIOLÓGICO	aerobios (bacterias,hongos y levaduras) 10 <sup>2</sup> ufc/g		Correcto	-----	Correcto
	Enterobacterias: ausencia/g		Correcto	-----	Correcto
	Staphylococcus aureus: ausencia/g		Correcto	-----	Correcto
	Pseudomonas aeruginosa: ausencia/g		Correcto	-----	Correcto

\_\_\_\_ Valor errático, no se considera

Cuadro 8.7.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para el segundo lote (Lote 2) de la formulación en gel con acetato de hidrocortisona a las condiciones climáticas **40 °C/75% HR** acondicionado en enema opaco.

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN		Tiempos de estudio							
			T=0	3 m	6m	9 m	12m	18 m	24 m	36 m
ASPECTO	Gel blanco opaco		Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
VISCOSIDAD	> 9000 cps dependiendo de la temperatura		11933 cps	10466 cps	11433 cps	10933 cps	10867 cps	10833 cps	10833 cps	11067 cps
pH	5-6		5,25	5,21	4,94	5,23	5,14	5,0	5,14	5,13
EXTENSIBILIDAD	>900 mm <sup>2</sup>		1668,2	1018,3	1065,9	1037	794,33	993,8	1214	828,74
VALORACIÓN (HPLC)	Ac.hidro cortisona	95,0-105,0%	99,1	99,7	97,8	101,9	98,3	103,4	101,3	108,3
	Nipagin		98,6	100,1	91,9	93,2	95,7	87,8	92,1	92,8
	Nipasol		93,9	95,2	—	83,9	80,8	70,3	84,9	45,4
	BHA		91,3	86,4	56,9	20,1	32,3	< LD	< LD	< LD
PRODUCTOS DEGRADACIÓN (HPLC)	hidrocortisona	≤ 1%	< LD	0,43	0,24	0,22	0,25	0,17	0,17	0,19
	cortisona	≤ 1%	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Acet.prednisolona	≤ 1%	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Acet.cortisona	≤ 1%	< LD	< LD	0,15	< LD	0,20	< LD	< LD	< LD
	PDD individuales	≤ 1%	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Totales	≤ 5%	< LD	0,43	0,39	0,22	0,45	0,17	0,17	0,17
CONTROL MICROBIOLÓGICO	aerobios (bacterias, hongos y levaduras) 10 <sup>2</sup> ufc/g		Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto
	Enterobacterias: ausencia/g		Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto
	Staphylococcus aureus: ausencia/g		Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto
	Pseudomonas aeruginosa: ausencia/g		Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto

— Valor errático, no se considera

Cuadro 8.8.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para el primer lote (Lote 1) de la formulación en gel con acetato de hidrocortisona a las condiciones climáticas **30 °C/65% HR** acondicionado en enema opaco.

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN		Tiempos de estudio							
			T=0	3 m	6m	9 m	12m	18 m	24 m	36 m
ASPECTO	Gel blanco opaco		Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
VISCOSIDAD	> 9000 cps dependiendo de la temperatura		11467 cps	11000 cps	10966 cps	10800 cps	10567 cps	9500 cps	11233 cps	11033 cps
pH	5-6		5,20	5,24	4,93	5,23	5,05	4,9	5,1	5,06
EXTENSIBILIDAD	>900 mm <sup>2</sup>		1869,3	1075,7	1037,0	1056,1	—	1185,8	1385,8	825,93
VALORACIÓN (HPLC)	Ac.hidrocloruro de hidrocortisona	95,0-105,0 %	102,9	100,4	90,3	101,8	95,7	102,2	101,3	108,3
	Nipagin		98,0	100,6	89,1	78,6	86,8	83,5	65,9	91,4
	Nipasol		103,6	100,6	83,7	81,8	78,5	73,2	58,3	74,0
	BHA		94,0	79,7	59,7	39,9	28,9	< LD	13,0	< LD
PRODUCTOS DEGRADACIÓN (HPLC)	hidrocortisona	≤ 1%	< LD	0,50	0,25	0,22	0,34	0,18	0,13	0,20
	cortisona	≤ 1%	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Acet.prednisona	≤ 1%	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Acet.cortisona	≤ 1%	< LD	< LD	0,16	< LD	0,34	< LD	< LD	< LD
	PDD individuales	≤ 1%	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Totales	≤ 5%	< LD	0,50	0,41	0,22	0,68	0,18	0,13	0,20
CONTROL MICROBIOLÓGICO	aerobios (bacterias, hongos y levaduras) 10 <sup>2</sup> ufc/g		Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto
	Enterobacterias: ausencia/g		Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto
	Staphylococcus aureus: ausencia/g		Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto
	Pseudomonas aeruginosa: ausencia/g		Correcto	-	-	-	-	-	-	Correcto

— Valor errático, no se considera

Cuadro 8.9.: Cuadro correspondiente al estudio de estabilidad para el segundo lote (Lote 2) de la formulación en gel con acetato de hidrocortisona a las condiciones climáticas **30 °C/65% HR** acondicionado en enema opaco.

## 8.7. DISCUSIÓN

### 8.7.1. Aspecto

Para los dos lotes estudiados (lote 1 y Lote 2), todos los tiempos de toma de muestra y condiciones de estabilidad estudiadas, el aspecto del gel es correcto, acorde con las especificaciones establecidas para el producto acabado, es decir, gel blanco opaco.

Por lo tanto puede concluirse que el producto mantiene las características relativas al aspecto intactas a lo largo del tiempo según condiciones ICH en su envase primario definitivo de botellas de plástico LDPE opaco con cánula transparente.

### 8.7.2. pH del gel

Como se puede apreciar en la Figura 8.1., el valor del pH de los dos lotes elaborados y almacenado en diferentes condiciones de estabilidad, se encuentra dentro de especificaciones establecidas (5-6), excepto para la condición 30 °C / 65% HR en donde puntualmente se encuentran valores de pH de alrededor de 4.9.

A pesar de estos valores puntuales de pH por debajo de 5.0, se considera que el preparado farmacéutico mantiene sus condiciones de estabilidad a nivel de pH puesto que la disminución del mismo es muy ligera teniendo en cuenta de que partimos de un pH de alrededor 5.2.

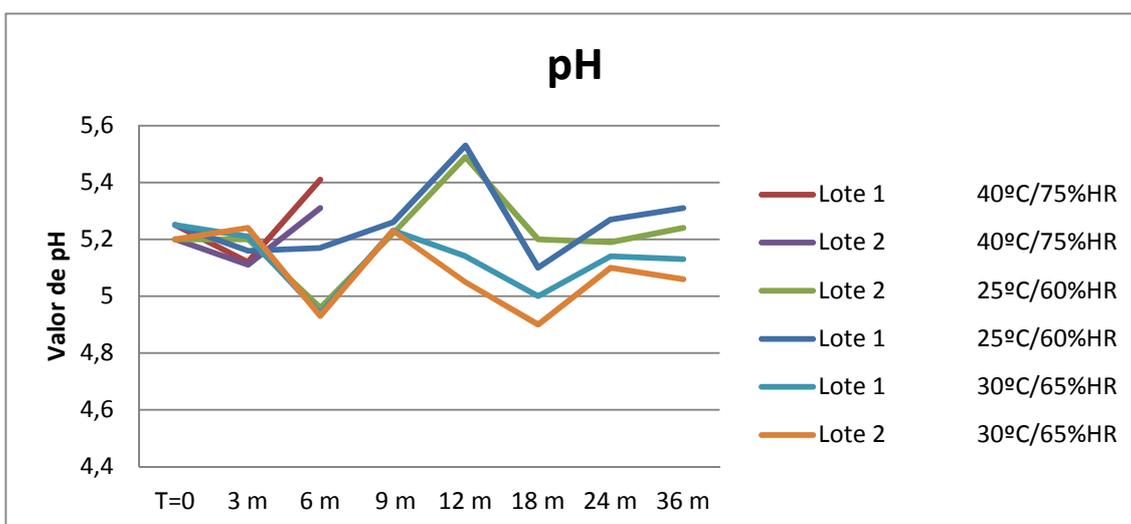


Figura 8.1.: Valor de pH a lo largo del tiempo de los dos lotes fabricados y almacenados en diferentes condiciones de humedad y temperatura controlada.

### 8.7.3. Viscosidad del gel

Como se puede apreciar en la Figura 8.2., el valor de la viscosidad de los dos lotes elaborados y almacenados en diferentes condiciones de estabilidad, se encuentra dentro de especificaciones establecidas (> 9000 cps).

A pesar de ello, se aprecia una ligera disminución de la viscosidad del gel a lo largo del tiempo y a en todas las condiciones de almacenamiento establecidas.

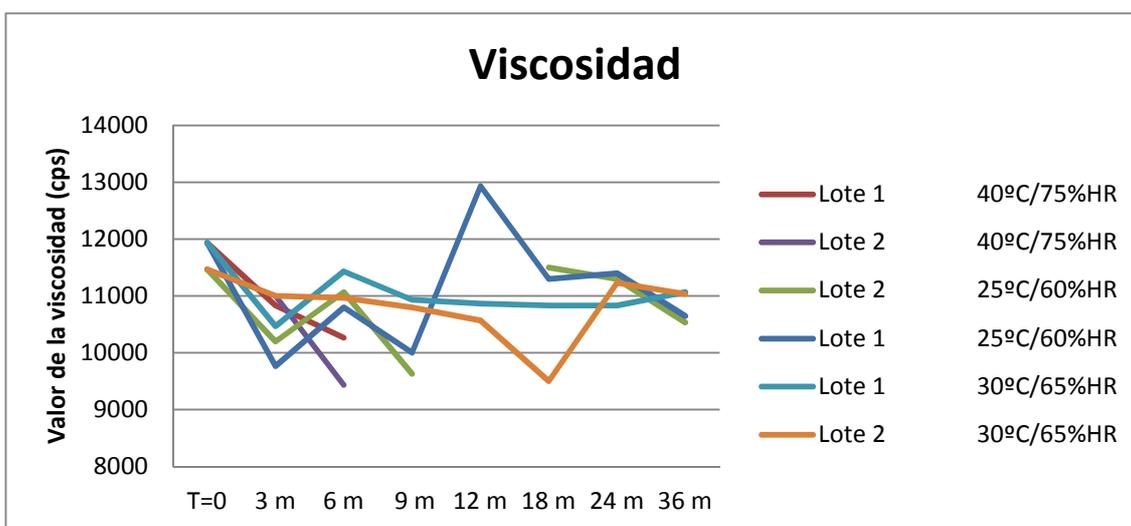


Figura 8.2.: Valor de la viscosidad a lo largo del tiempo de los dos lotes fabricados y almacenados en diferentes condiciones de humedad y temperatura controlada.

### 8.7.4. Extensibilidad del gel

Como se puede apreciar en la Figura 8.3., el valor de la extensibilidad de los dos lotes elaborados y almacenados en diferentes condiciones de estabilidad, se encuentra dentro de especificaciones establecidas (> 900 mm<sup>2</sup>), excepto en el último punto de estabilidad establecidos para las condiciones 25 °C/60% HR y 30 °C/65% HR (36 meses) y en un punto en concreto para la condición 30 °C / 65% HR en donde se encuentran valores por debajo de 900 mm<sup>2</sup>, pero muy cercanos al mismo.

Por lo tanto, a pesar de estos valores puntuales de extensibilidad por debajo de 900 mm<sup>2</sup>, se considera que el preparado farmacéutico mantiene sus condiciones de estabilidad a nivel de extensibilidad.

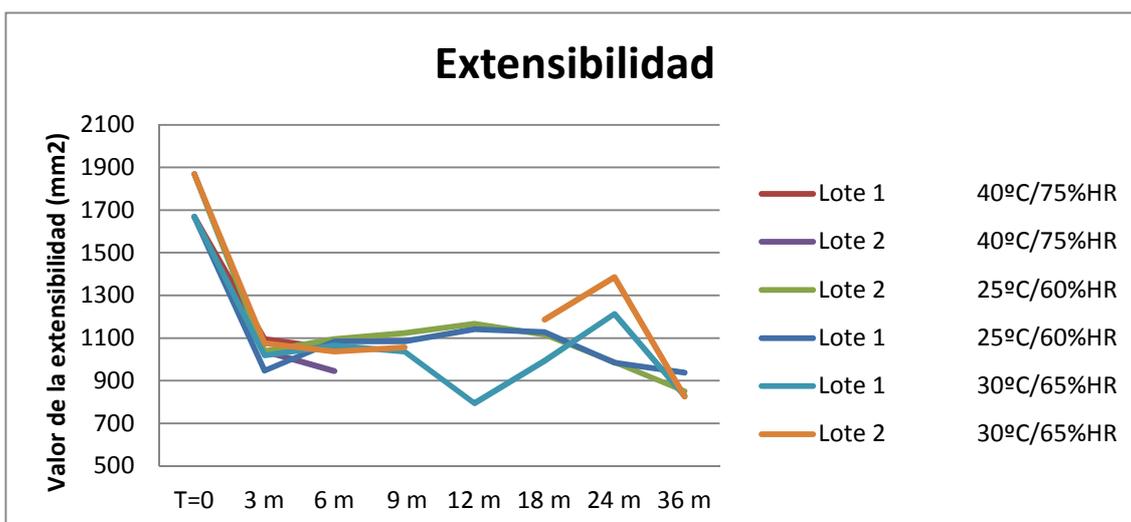


Figura 8.3.: Valor de la extensibilidad a lo largo del tiempo de los dos lotes fabricados y almacenados en diferentes condiciones de humedad y temperatura controlada.

### **8.7.5. Estudio de la riqueza / valoración de acetato de hidrocortisona**

Como se puede apreciar en la Figura 8.4., el valor del acetato de hidrocortisona de los dos lotes elaborados y almacenados en diferentes condiciones de estabilidad, se encuentra dentro de especificaciones establecidas (95% – 105%), excepto en el último punto de estabilidad establecidos para las condiciones 25 °C/60% HR y 30 °C/65% HR (36 meses), en donde la cantidad de acetato de hidrocortisona supera el 105% y en un punto en concreto para la condición 30 °C / 65% HR en donde se encuentra un valor de alrededor del 90%.

Estos resultados indican que la cantidad de acetato de hidrocortisona, no disminuye en el tiempo, puesto que al final del estudio de estabilidad, los valores de acetato de hidrocortisona que se obtienen son superiores al 105%. Estos datos, a su vez son confirmados en el apartado 8.7.9., estudio de los productos de degradación, al no obtener productos de degradación del acetato de hidrocortisona a lo largo del tiempo.

Por lo tanto, es correcto indicar que las variaciones en la cantidad de acetato de hidrocortisona a lo largo del tiempo, son reflejo de las lógicas variaciones interindividuales dentro de un mismo lote, pudiéndose considerar que los resultados obtenidos son satisfactorios.

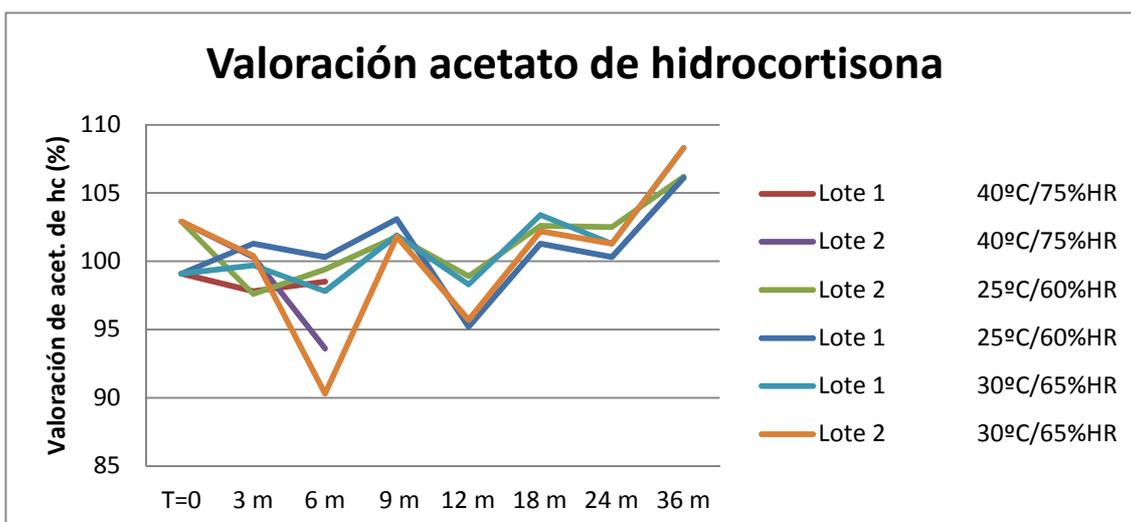


Figura 8.4.: Valor del acetato de hidrocortisona a lo largo del tiempo de los dos lotes fabricados y almacenados en diferentes condiciones de humedad y temperatura controlada.

### **8.7.6. Estudio de la valoración de metilhidroxibenzoico (Nipagin)**

Como se puede apreciar en la Figura 8.5., el valor de metilhidroxibenzoico (Nipagin) de los dos lotes elaborados y almacenados en la condición de almacenamiento 25 °C/60% HR, se encuentra dentro de las especificaciones establecidas (90% – 110%) excepto en el punto de estabilidad de 24 meses, en donde se produce una bajada significativa.

Para la condición de almacenamiento 30 °C/65% HR, el Lote 1 se encuentra casi todo el estudio de estabilidad dentro de especificaciones (excepto para el punto de estabilidad a 18 meses en donde se encuentra por debajo del 90% aunque muy cercano a éste), mientras que el Lote 2 se encuentra a partir de los 6 meses ya por debajo de especificaciones (<90%) excepto en el último punto de estabilidad (36 meses) en donde recupera valores por encima del 90%.

Para la condición de almacenamiento 40 °C/75% HR, el Lote 1 se encuentra fuera de especificación (<90%) a partir de los 3 meses de estabilidad, mientras que el Lote 2 se encuentra fuera de especificación (<90%) a partir de los 6 meses de estabilidad (último punto de muestreo).

Que la cantidad de conservante disminuya a lo largo del tiempo, es un hecho aceptable puesto que indica que la acción antimicrobiana del mismo va teniendo su efecto, eliminando cualquier tipo de contaminación microbiológica (como se puede observar en el apartado 8.7.10. en donde la calidad microbiológica del preparado a lo largo del tiempo es correcta).

Sin embargo, se puede observar que en algunos lotes existe un aumento inesperado de la cantidad de conservante, sobre todo al final del estudio de estabilidad.

Esto puede ser debido a que en algunas muestras, la cantidad de conservante no ha tenido que ser utilizada para eliminar la carga microbiológica.

Por lo tanto, a pesar de los valores de Nipagin por debajo de las especificaciones de producto a lo largo del tiempo, se considera que el preparado farmacéutico mantiene sus condiciones de estabilidad puesto que no se observa contaminación microbiológica a lo largo del tiempo.

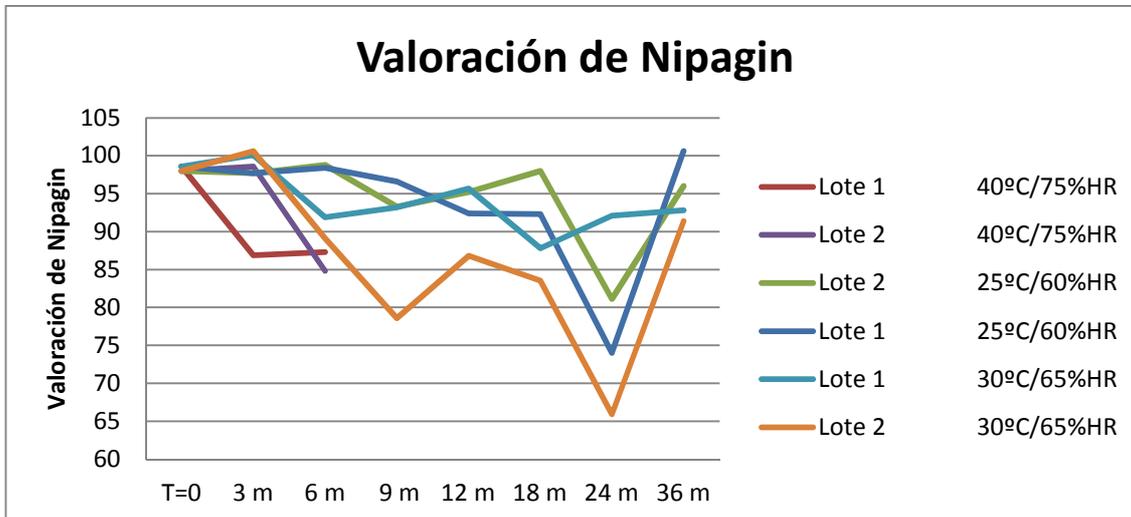


Figura 8.5.: Valor de metilhidroxibenzoico (Nipagin) a lo largo del tiempo de los dos lotes fabricados y almacenados en diferentes condiciones de humedad y temperatura controlada.

### **8.7.7. Estudio de la valoración de propilhidroxibenzoico (Nipasol)**

Como se puede apreciar en la Figura 8.6., la forma de las curvas para el valor de propilhidroxibenzoico (Nipasol) de los dos lotes elaborados y almacenados en la condición de almacenamiento 25 °C/60% HR, es muy parecida entre ambos, presentando disminuciones de conservante en el tiempo iguales entre ambos. De todas formas, dado que en el lote 1 partimos de un valor de propilhidroxibenzoico de 93,9%, el valor de propilhidroxibenzoico por debajo del 90% se presenta a partir de los 9 meses, y dado que en el lote 2 partimos de un valor de propilhidroxibenzoico de 103,6%, el valor de propilhidroxibenzoico por debajo del 90% se presenta a partir de los 24 meses.

Para la condición de almacenamiento 30 °C/65% HR, en ambos lotes se produce una disminución brusca de la cantidad de propilhidroxibenzoico, presentado unos valores por debajo del 90% ya a partir del sexto mes de estabilidad, y finalizando con unos valores 45% y 74% para el Lote 1 y Lote 2 respectivamente.

Para la condición de almacenamiento 40 °C/75% HR, el Lote 1 se encuentra fuera de especificación (<90%) a partir de los 3 meses de estabilidad, mientras que el Lote 2 se encuentra fuera de especificación (<90%) a partir de los 6 meses de estabilidad (último punto de muestreo), a pesar de que de nuevo la forma de las curvas en ambos lotes es muy parecida puesto que se parte de valores iniciales de propilhidroxibenzoico diferentes en ambos lotes.

Que la cantidad de conservante disminuya a lo largo del tiempo, es un hecho aceptable puesto que indica que la acción antimicrobiana del mismo va teniendo su efecto, eliminando cualquier tipo de contaminación microbiológica (como se puede observar en el apartado 8.7.10. en donde la calidad microbiológica del preparado a lo largo del tiempo es correcta).

Por lo tanto, a pesar de los valores de Nipasol por debajo de las especificaciones de producto a lo largo del tiempo, se considera que el preparado farmacéutico mantiene sus condiciones de estabilidad puesto que no se observa contaminación microbiológica a lo largo del tiempo.

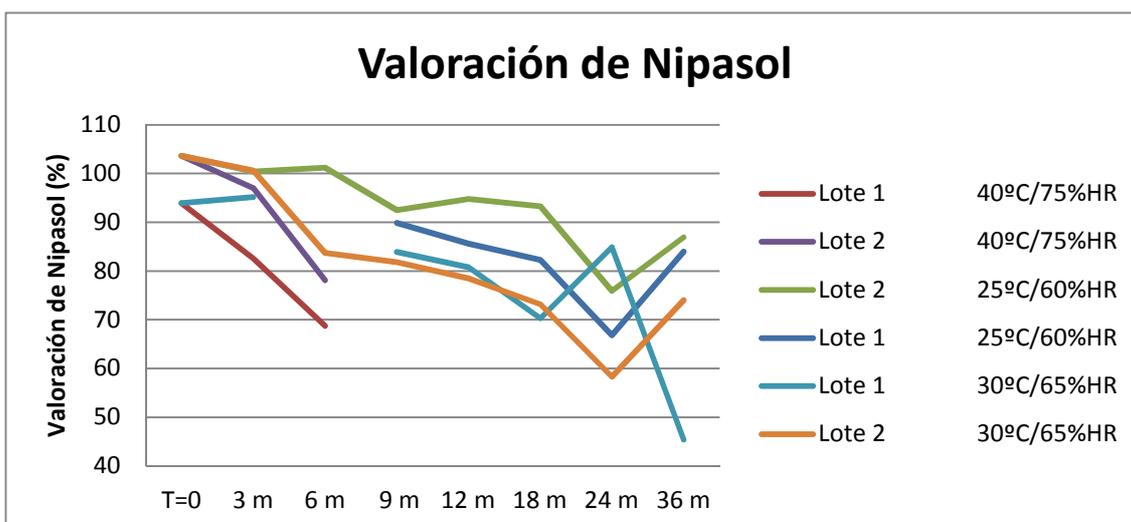


Figura 8.6.: Valor de propilhidroxibenzoico (Nipasol) a lo largo del tiempo de los dos lotes fabricados y almacenados en diferentes condiciones de humedad y temperatura controlada.

### **8.7.8. Estudio de la valoración de butilhidroxianisol (BHA)**

Como se puede apreciar en la Figura 8.7., el valor de butilhidroxianisol (BHA) de los dos lotes elaborados y almacenados en diferentes condiciones de almacenamiento, presenta una disminución muy brusca, obteniéndose valores a final del estudio de estabilidad, según las diferentes condiciones estudiadas, por debajo del límite de detección del método.

Que la cantidad de antioxidante disminuya a lo largo del tiempo, es un hecho aceptable puesto que indica que la acción antioxidante del mismo va teniendo su efecto, como se puede observar en el apartado 8.7.1. en donde el aspecto del preparado a lo largo del tiempo es correcto, sin presentar ningún tipo de amarilleamiento, propio de las oxidaciones de los componentes.

Por lo tanto, a pesar de los valores de BHA por debajo de las especificaciones de producto a lo largo del tiempo, se considera que el preparado farmacéutico mantiene sus condiciones de estabilidad puesto que el aspecto del mismo es el correcto a lo largo del tiempo.

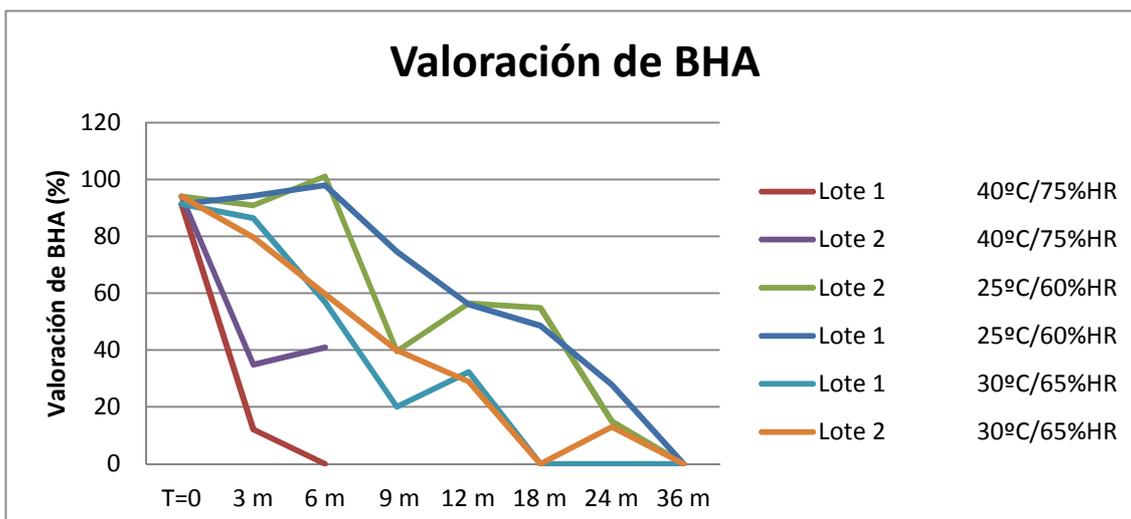


Figura 8.7.: Valor de butilhidroxianisol (BHA) a lo largo del tiempo de los dos lotes fabricados y almacenados en diferentes condiciones de humedad y temperatura controlada.

**8.7.9. Estudio de los productos de degradación (hidrocortisona, cortisona, acetato de prednisolona, acetato de cortisona, productos de degradación individuales y productos de degradación totales)**

Como se puede apreciar en los cuadros 8.4. – 8.9., los valores de los diferentes productos de degradación del acetato de hidrocortisona estudiados, se encuentra muy por debajo de las especificaciones de cada uno de ellos.

Esto confirma que el principio activo medicamentoso no sufre degradación significativa cuando se encuentra almacenado en las diferentes condiciones de estabilidad según ICH.

Por lo tanto, se considera que el preparado farmacéutico mantiene sus condiciones de calidad adecuadas en el tiempo y se puede establecer el tiempo de 36 meses, como el tiempo de caducidad para dicho preparado.

**8.7.10. Estudio de la calidad microbiológica (aerobios (bacterias, hongos y levaduras), enterobacterias, Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa).**

Como se puede apreciar en los cuadros 8.4. – 8.9., el control microbiológico realizado se encuentra dentro de las especificaciones de producto.

Por lo tanto, se considera que el preparado farmacéutico mantiene sus condiciones de calidad microbiológica adecuada en el tiempo.

## **CAPÍTULO 9: EVALUACIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA TOXICOLOGÍA DEL ACETATO DE HIDROCORTISONA EN APLICACIÓN DE LA DIRECTIVA 2004/27/EC (ARTÍCULO 10ª, ANEXO I)**

Con el objetivo de aplicar y cumplir el artículo 10º, anexo I, de la Directiva 2004/27/EC del Parlamento europeo y del Consejo del 31 de Marzo de 2004 (70), que modifica la Directiva 2001/83/EC del código comunitario sobre productos medicinales para dosificación en humanos (71), se ha elaborado una evaluación bibliográfica sobre las propiedades toxicológicas del acetato de hidrocortisona y las preparaciones con dicho componente.

En este sentido, en este capítulo se demuestra que el componente Acetato de hidrocortisona tiene un uso medicinal bien establecido y por lo tanto los tests y resultados de las pruebas podrían ser sustituidos por la literatura científica apropiada para poder presentar una solicitud de registro. Para establecer esta condición se ha revisado la información disponible sobre: características generales farmacológicas, tiempo durante el cual la sustancia ha tenido un uso medicinal, toxicología experimental y reacciones adversas en humano.

### **9.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES FARMACOLÓGICAS**

El acetato de hidrocortisona es un corticoesteroide sintético. Su compuesto de origen es la hidrocortisona y fue el primer principio activo de su clase. La introducción del acetato en la posición 21 del sistema de anillos de los esterodios mejoró la actividad tópica cinco veces.

Desde el primer uso de la hidrocortisona en 1948, ninguna clase de agentes terapéuticos ha tenido un mayor impacto en la gestión de las enfermedades de la piel que los corticoesteroides tópicos. Durante las 6 últimas décadas, numerosas modificaciones en la molécula original C21 han resultado en agentes con incluso un aumento en la potencia y riesgo de efectos adversos (72).

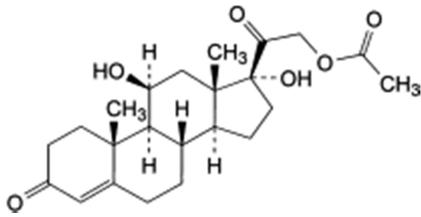


Figura 9.1.: Estructura química del acetato de hidrocortisona.

El acetato de hidrocortisona es metabolizado rápidamente a hidrocortisona, el cual es el componente activo. Por lo tanto, la mayoría de los efectos adversos del acetato de hidrocortisona, especialmente efectos sistémicos tras la aplicación tópica, son provocados por la hidrocortisona por ella misma. La hidrocortisona es un corticoesteroide que se crea naturalmente, en concreto por la corteza adrenal. La producción diaria de hidrocortisona en humanos normales ha sido investigada en numerosos estudios y estaba en el intervalo de 17 a 30 mg por persona/día.

En los seres humanos la hidrocortisona ha demostrado ser interconvertible con la cortisona metabolito inactivo manteniendo un equilibrio a favor de hidrocortisona. La cortisona es metabolizada a 20-hidroxycortisona y posteriormente a cortolona y tetrahidrocortisona. La principal vía metabólica implica la  $5\beta$ -reducción a tetrahidrocortisol. Los principales metabolitos no retienen ninguna actividad corticoesteroide. Después de la administración intravenosa, la hidrocortisona es eliminada con un aclaramiento corporal total de 18 l/h presentando una vida media de 1,7 horas.

Los corticoesteroides se difunden en las células y se unen a receptores de esteroides dentro del citoplasma dando un complejo receptor esteroide. El complejo receptor esteroide activado se une a secuencias específicas de DNA para modificar la transcripción genética, afectando al final a la síntesis de los mediadores de la inflamación. La dilatación capilar, el edema intercelular y la infiltración en los tejidos es reducida. La proliferación capilar se suprime.

El proceso actual para medir la potencia corticoesteroide tópica es la prueba de vasoconstricción. Fue introducida en 1962 como un medio de evaluar la absorción percutánea. Se propone que este ensayo también se correlaciona con el resultado clínico

y eficacia y es la base para los actualmente aceptados siete clases de corticosteroides tópicos (cuadro 9.1.). La hidrocortisona está clasificada en la categoría de potencia más baja. Los efectos adversos sistémicos y locales se encuentran más frecuentemente y han llegado a tener más prevalencia con la introducción de corticoesteroides tópicos de alta potencia.

1.- Halobetasol propionate: ointment, cream Clobetasol propionate: ointment, cream, gel Augmented betamethasone dipropionate: ointment Diflorasone diacetate: ointment Flurandrenolide tape	4.- Flurandrenolide: ointment Mometasone furoate: cream Triamcinolone acetonide: cream Fluocinolone acetonide: ointment Hydrocortisone valerate: ointment
2.- Amcinonide: ointment Betamethasone dipropionate: ointment Mometasone furoate: ointment Fluocinonide: ointment, cream, gel, solution Halcinonide: ointment, cream Desoximetasone: ointment, cream	5.- Flurandrenolide: cream, lotion Fluticasone dipropionate: cream Prednicarbate: cream Hydrocortisone butyrate: cream Betamethasone dipropionate: lotion Fluocinolone acetonide: cream Betamethasone valerate: cream Hydrocortisone valerate: cream
3.- Triamcinolone acetonide: ointment Fluticasone propionate: ointment Amcinonide: cream, lotion Betamethasone dipropionate: cream Diflorasone acetate: cream Betamethasone valerate: ointment	6.- Alclometasone dipropionate: ointment, cream Desonide: cream Betamethasone valerate: lotion
	7.- Topicals with hydrocortisone, dexamethasone flumethasone, prednisolone, and methylprednisolone

Cuadro 9.1.: Corticoesteroides tópicos disponibles basados en las clases.

## **9.2.- EXPERIENCIA EN EL USO MEDICINAL DEL ACETATO DE HIDROCORTISONA.**

Los corticoesteroides se han usado extensivamente por todo el mundo como antiinflamatorios en aplicaciones tópicas y sistémicas. La hidrocortisona fue el primero en aplicarse. El acetato de hidrocortisona fue introducido posteriormente con el objetivo de mejorar las propiedades farmacocinéticas en la administración tópica. Las primeras revisiones sobre el uso tópico de la hidrocortisona y del acetato de hidrocortisona en el tratamiento de diferentes enfermedades de la piel, fue publicado en 1955 (73-74)).

El acetato de hidrocortisona está indicado para el alivio de la inflamación y de las manifestaciones pruriginosas en las dermatosis sensibles a corticoesteroides. Las formas

farmacéuticas para la administración sistémica del acetato de hidrocortisona incluyen supositorios rectales, mientras que las inyecciones intra articulares son usadas para el alivio temporal bajo ciertas condiciones.

Actualmente hay disponibles comercialmente bastantes productos que contienen acetato de hidrocortisona para uso tópico sobre la piel (75). La FDA ha aprobado 23 medicamentos diferentes que contienen acetato de hidrocortisona (76). En el registro español hay 20 medicamentos autorizados que contienen acetato de hidrocortisona (77). Las formulaciones para aplicación tópica deben permitir la liberación adecuada del principio activo, siendo no alergenicar, no irritantes, cosméticamente aceptables, y lo más importante, evitar que el principio activo penetre transdermicamente. Las formulaciones tópicar con corticoesteroides son normalmente administradas en las siguientes formas farmacéuticas: ungüentos, cremas, lociones, geles, aerosoles en spray, polvos y espumas (75).

El tipo de vehículo de administración o formulación de excipientes, puede marcadamente afectar las propiedades de penetración y absorción del principio activo y por lo tanto afectar a la potencia y efectividad del mismo, así como los efectos adversos asociados (78).

Alrededor del 60% de las preparaciones antihemorroidales tópicar contienen corticoesteroides debido a sus propiedades antiinflamatorias, antialérgicas y antipruriginosas. Algunas de ellas (e.g. Proctofoam HC ©, aprobado por la FDA en 1978, Hemorrane Pomada © or Antihemorroidal Cinfa ©, autorizadas en España en 1957 y 1970 respectivamente) contienen acetato de hidrocortisona. Las preparaciones que contienen acetato de hidrocortisona autorizadas por la Agencia Española del medicamento se presentan en el cuadro 9.2. (79).

Los corticoesteroides tópicos y anestésicos locales se han usado durante muchos años para aliviar los síntomas de las enfermedades anorectales como dolor, prurito y sangrado. Existen muy pocos ensayos clínicos publicados que comparen diferentes formulaciones, principalmente porque muchos de estos productos provienen del mercado antes de que la evaluación de dichos ensayos clínicos fuera un prerrequisito para poder registrar un medicamento.

REF.	NAME	ACTIVE COMPONENT	Authorization date
37453	ANGINOVAG	ENOXOLONA, TIROTRICINA, LIDOCAINA HIDROCLORURO, HIDROCORTISONA ACETATO, DECUALINIO CLORURO	02/01/1962
48992	ANTIHEMORROIDAL CINFA	TÁNICO ACIDO, HIDROCORTISONA ACETATO, NEOMICINA SULFATO, BENZOCAINA	06/01/1970
26230	CORTISON CHEMICETINA pomada 1%	CLORANFENICOL, HIDROCORTISONA ACETATO	07/01/1956
26231	CORTISON CHEMICETINA pomada 2 %	CLORANFENICOL, HIDROCORTISONA ACETATO	07/01/1956
25490	DERMO HUBBER pomada	HIDROCORTISONA ACETATO, BACITRACINA, NEOMICINA SULFATO	03/01/1956
21428	DERMOSA HIDROCORTISONA al 1% pomada	HIDROCORTISONA ACETATO	06/01/1954
43593	EDIFARINGEN	POTASIO CLORATO, BACITRACINA-ZINC, HIDROCORTISONA ACETATO, NEOMICINA SULFATO, BENZOCAINA	11/01/1966
62403	FUCIDINE H, 20 mg/g + 10 mg/g Crema	FUSIDICO ACIDO, HIDROCORTISONA ACETATO	03/01/1999
932665	GARROYD POMADA	PROMETAZINA HIDROCLORURO, HIDROCORTISONA ACETATO, NEOMICINA SULFATO, RETINOL	10/01/1959
929907	HALIBUT HIDROCORTISONA POMADA	ZINC OXIDO, BENCETONIO CLORURO, HIDROCORTISONA ACETATO, RETINOL	10/01/1958
27941	HEMORRANE Pomada	HIDROCORTISONA ACETATO	09/01/1957
28267	LEUCO-HUBBER ovulos vaginales	LACTOSA, HIDROCORTISONA ACETATO, NEOMICINA SULFATO	11/01/1957
60845	MITOCORTYL	HIDROCORTISONA ACETATO	09/01/1995
32892	NEO BACITRIN HIDROCORTISONA 2,5% pomada	ZINC OXIDO, HIDROCORTISONA ACETATO, BACITRACINA, NEOMICINA SULFATO	11/01/1959
29432	NEO BACITRIN HIDROCORTISONA POMADA	ZINC OXIDO, HIDROCORTISONA ACETATO, BACITRACINA, NEOMICINA SULFATO	06/01/1958
25489	NEO-HUBBER gotas	HIDROCORTISONA ACETATO, NEOMICINA SULFATO	03/01/1956
921989	OFTALMOLOSA CUSI HIDROCORT POMADA	HIDROCORTISONA ACETATO	10/01/1954
50226	ROBERFARIN AEROSOL	ENOXOLONA, OXETACAINA, TIROTRICINA, HIDROCORTISONA ACETATO, DECUALINIO CLORURO	06/01/1972
934053	TERRACORTRIL pomada esteril oftico-ofthalmica	OXITETRACICLINA HIDROCLORURO, HIDROCORTISONA ACETATO, POLIMIXINA B SULFATO	06/01/1960
47968	HISUDERMA 2,5%	HIDROCORTISONA ACETATO, NEOMICINA SULFATO	06/01/1969

Cuadro 9.2.: Preparaciones que contienen acetato de hidrocortisona autorizadas por la Agencia Española del Medicamento

### **9.3.- EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD**

#### **9.3.1. Toxicidad General**

Debido a su rápida metabolización, la toxicidad sistémica del acetato de hidrocortisona está principalmente relacionada con la toxicidad de la hidrocortisona, principal metabolito activo.

Los estudios de toxicidad dosis única de la hidrocortisona se llevaron a cabo en ratas y ratones. LD<sub>50</sub> agudo intraperitoneal en ratas fue de 150 mg/kg de peso. LD<sub>50</sub> agudo subcutáneo en ratones fue mayor de 1800 mg/kg de peso continuando con un periodo de 7 días en observación. De todas formas, muchas ratas murieron tras la segunda semana de dosificación debido a infecciones, posiblemente relacionadas con el efecto inmunosupresivo. Los efectos observados en estudios agudos en ratas y ratones

incluyeron reducción del peso adrenal, daño en el hígado, pulmon y efectos gastrointestinales (80-81).

Los estudios de toxicidad dosis repetidas se llevaron a cabo en conejos suministrándoles inyecciones intramusculares de 10 o 15 mg/animal de hidrocortisona o 25 mg/animal de acetato de hidrocortisona por día hasta los 8 días.

Se observó hepatotoxicidad en todos los grupos tratados con un incremento del peso del hígado y necrosis focal hepática. Consecuentemente, no se estableció NOAEL.

Con el objetivo de evaluar la reversibilidad del efecto hepatotóxico, en algunos animales se discontinuó el tratamiento durante 20 días antes de la necropsia. El peso de sus hígados fue estadísticamente comparable con los controles respectivos.

### 9.3.2. Reacciones locales adversas del uso tópico

Las siguientes reacciones locales adversas (ADRs) han sido reportadas después de la administración tópica de la hidrocortisona o derivados de la hidrocortisona (81):

>10%: Dermatológicas: Eczema (12,5%)

1% a 10%: Dermatológicas: Prurito (6%), escozor (2%), piel seca (2%)

<1%: Dermatitis de contacto alérgica, ardor, atrofia dérmica, foliculitis, estrías.

Los efectos secundarios locales de la administración tópica de corticoesteroides, a diferencia de los sistémicos son relativamente frecuentes (Cuadro 9.3.) e incluso llegar a ser más elevados con la introducción de corticoesteroides tópicos de alta potencia.

<b>Cutaneous</b>	<b>Systemic</b>
<b>Common:</b>	<b>Hypertension</b>
Atrophy	Diabetes
Striae	HPA axis suppression
Acne	
Telangiectasis	
<b>Less common:</b>	
Hypertrichosis	
Hyperpigmentation	
Allergic contact dermatitis	
Glaucoma	

Cuadro 9.3.: Efectos adversos asociados al uso de corticoesteroides tópicos

Estos efectos incluyen atrofia epidérmica y dérmica, estrías, telangiectasia, erupciones acneiformes y la rosácea. Hipertrichosis local e hipopigmentación, puede también ocurrir. Aunque los efectos adversos cutáneos son generalmente reversibles cuando se discontinúa el tratamiento, las estrías atróficas pueden quedar permanentes.

La susceptibilidad a estos efectos es influenciada por muchos factores, incluyendo la edad del paciente (niños y personas mayores son los de un riesgo más elevado), lugar de la aplicación, potencia del agente, porcentaje de la superficie del cuerpo cubierta, calidad de la piel (piel más fina o dañada es más susceptible) y frecuencia de uso.

La atrofia cutánea es uno de los efectos adversos más comunes del uso de los corticosteroides tópicos. La atrofia se correlaciona con la potencia. Elementos dérmicos, epidérmicos y vasculares son afectados. Los efectos dentro de la dermis resultado de la acción antiproliferativa de los corticosteroides en los fibroblastos, resulta en una disminución en los tejidos conectivos, incluyendo el colágeno, sustancia fundamental, y otros. Estos cambios se manifiestan clínicamente como arrugas finas, fragilidad y vasos telangiectáticos.

Los cambios epidérmicos que se pueden presentar clínicamente como una dermatitis irritante superficial dentro de varios días después del uso de un corticosteroide tópico potente han sido paralizados. La teoría es que esto ocurre como resultado de los efectos antiproliferativos sobre los queratinocitos. Esto resulta en una función de la barrera alterada y por lo tanto irritación. Cualquier respuesta antiinflamatoria sobre esta función de la barrera alterada es enmascarada durante el uso de corticosteroides y vuelve a encenderse una vez la administración del agente ha parado.

Hay varias formas de evitar estas complicaciones tan serias. La educación del paciente, el seguimiento regular y las recargas limitadas de los agentes corticosteroides potentes son importantes. El uso de una dosificación regular (por ejemplo, aplicando los corticosteroides potentes dos veces al día durante solo los fines de semana) puede también ser beneficioso sobre todo para la reducción del riesgo de la atrofia cutánea. El uso concomitante de una loción de lactato amónico al 12%, puede también reducir el riesgo de atrofia.

El uso prolongado de corticoesteroides tópicos puede también resultar en acné esteroideo, que se presenta en forma de papulas eritematosas y una predominancia de pustulas distribuidas por la cara, pecho y espalda. Los pacientes con la rosácea o dermatitis perioral pueden tener rebotes severos después de la mejora inicial de corticoesteroides tópicos. Por esta razón, los esteroides no deben usarse en estas condiciones.

La frecuencia e intensidad de los efectos adversos dependen del área de la piel tratada, de la oclusión y potencia de los corticoesteroides. Un ensayo realizado en voluntarios humanos usando el test de la cámara Duhring, mostró que el acetato de hidrocortisona tiene una potencia baja para inducir atrofia en la piel (82-83).

Por lo tanto, el uso de preparaciones con corticoesteroides de alta potencia en áreas delicadas como la cara, deberían ser evitadas debido al alto riesgo de reacciones locales. La dermatitis de contacto alérgica a los corticosteroides tópicos también se puede desarrollarse y debería de tenerse en cuenta en pacientes con dermatitis que son resistentes a esta terapia. Existen varios componentes de las formulaciones (por ejemplo propilenglicol y alcohol bencílico), que son comúnmente sensibilizadores. La hipersensibilidad a la parte del esteroide activo, es habitual que se reconozca como tal (82). Se puede desarrollar estrias de distensión, especialmente en las axilas y en las ingles, incluso con la aplicación prolongada de corticoesteroides de potencia media. Se ha reportado que los corticoesteroides tópicos pueden causar glaucoma cuando se aplican sobre los párpados. Por lo tanto el uso prolongado de los corticosteroides sobre los párpados o alrededor de los ojos debe de ser evitado.

En productos para uso rectal o perianal, se prefiere por lo tanto el uso de corticosteroides y anestésicos locales con biodisponibilidad limitada y administración rectal. Para evitar efectos adversos locales y sistémicos de los corticosteroides, se suelen usar preparaciones de corticosteroides leves o medios en preparaciones antihemorroidales para uso crónico. Por el contrario, se recomiendan preparaciones con corticoesteroides potentes en el uso a corto plazo cuando se requiere un inicio de la acción rápida y una eficacia fuerte (82).

El uso de productos tópicos combinando corticoesteroides y anestésicos locales para enfermedades anorrectales, incluyendo afecciones hemorroidales, está firmemente establecida basada en décadas de experiencia demostrando alivio sintomático y excelente tolerancia. Además, aunque esta combinación no constituye una cura de la enfermedad primaria, si que los pacientes se aprovechan de una mejor calidad de vida al tener un alivio rápido y efectivo de los síntomas (82).

### 9.3.3. Reacciones adversas sistémicas

Los efectos secundarios sistémicos en los corticoesteroides tópicos son raros pero pueden ocurrir (ver cuadro 9.4.), especialmente en niños y pacientes de edad avanzada.

<b>Endocrine</b>	Cushing disease, moon face, centripetal obesity, buffalo hump, striae distensae
<b>Metabolic</b>	Glucose intolerance (hyperglycemia), osteopathy (fractures of aseptic necroses such as those of the femoral head), adrenocortical suppression, decreased growth rate
<b>Electrolyte balance</b>	Edema, hypocalcemia, hypertension
<b>Ocular</b>	Posterior subcapsular cataract, glaucoma

Cuadro 9.4.: Efectos adversos sistémicos poco frecuentes de los corticoesteroides tópicos.

Posiblemente, los efectos secundarios sistémicos están directamente relacionados a factores como el lugar de aplicación, duración de la aplicación, potencia y oclusión de la medicación.

La aplicación de corticoesteroides de alta potencia debería de ser limitada, cuando fuera posible, a una base de dos veces por día durante tres o cuatro semanas. Una aplicación de dichos corticoesteroides tópicos con duración más larga y frecuente provoca riesgo de supresión del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) e incluso desarrollo del síndrome de Cushing, especialmente en pacientes muy jóvenes. Cantidades tan pequeñas de corticoesteroides como 2g/día de propionato de clobetasol al 0,05%, puede disminuir el cortisol segregado por la mañana. En la mayoría de las ocasiones en las que se produce supresión del eje HPA como resultado del uso de los corticoesteroides tópicos, no hay clínica significativa. Habitualmente, la supresión con del eje con clínica

significativa ocurre con el uso prolongado de cantidades diarias elevadas de corticoesteroides potentes, especialmente en niños con dermatitis atópica.

Evidentemente, los efectos secundarios adversos sistémicos ocurren más comúnmente cuando se administran sistémicamente para el tratamiento de enfermedades no localizadas, así como procesos reumáticos (84).

En los siguientes párrafos, se describen posibles efectos adversos sistémicos, problemas relacionados con la enfermedad y población especial en el tratamiento con Hidrocortisona:

Supresión adrenal: altas dosis de hidrocortisona en periodos prolongados puede causar supresión del eje HPA, particularmente en niños. La supresión del eje HPA puede desencadenar en una crisis adrenal. La retirada y discontinuación de los corticoesteroides debería de realizarse lentamente y con cuidado. En concreto se requiere un cuidado especial cuando a los pacientes se les transfiere de corticoesteroides sistémicos a productos inhalados, ya que pueden desarrollar insuficiencia adrenal o un aumento de los síntomas alérgicos. Pacientes que reciben más de 20 mg/día de prednisona (o equivalente) pueden ser más susceptibles. En alguna ocasión, ha habido incluso muertes debido a insuficiencia adrenal en pacientes asmáticos durante y después de la transferencia de corticoesteroides sistémicos a esteroides en aerosol.

Inmunosupresión: El uso prolongado de corticoesteroides puede aumentar la incidencia de infecciones secundarias, enmascarar las infecciones agudas (incluyendo infecciones fúngicas), prolongar o exacerbar las infecciones virales o limitar la respuesta a las vacunas. La exposición a la varicela debe ser evitada; los corticoesteroides no deben ser usados para tratar el herpes ocular simple. Los corticoesteroides no deberían usarse para la malaria cerebral o hepatitis vírica. En los pacientes con tuberculosis latente y/o reactividad TB, se requiere una observación más cercana.

Sarcoma de Kaposi: El tratamiento prolongado con corticoesteroides se ha asociado al desarrollo del sarcoma de Kaposi. En estos casos, se debe evaluar y considerar la discontinuación del tratamiento con corticoesteroides.

Miopatía: Se ha reportado miopatía aguda en pacientes tratados con altas dosis de corticoesteroides y desordenes de transmisión neuromuscular. Incluye musculos oculares y/o respiratorios

Perturbaciones psiquiátricas: Los corticoesteroides pueden causar perturbaciones psiquiátricas, incluyendo depresión, euforia, insomnio, cambios de humor y alteraciones en la personalidad. Pacientes con condiciones psiquiátricas preexistentes pueden verse exacerbadas por el uso de corticoesteroides.

Enfermedades cardiovasculares: Los corticoesteroides deben usarse con precaución en pacientes con insuficiencia cardíaca o hipertensión. El uso a largo plazo se ha asociado con retención de fluidos e hipertensión.

Diabetes: Los corticoesteroides pueden alterar la producción o regulación de glucosa en pacientes con diabetes mellitus, provocando hiperglucemia.

Enfermedades gastrointestinales: Los corticoesteroides deben usarse con precaución en pacientes con desordenes gastrointestinales (diverticulitis, úlcera péptica, colitis ulcerosa) debido al riesgo de perforación.

Lesiones en la cabeza: Se ha observado un incremento de la mortalidad en pacientes que recibieron alta dosis de metilprednisolona intravenosa.

Insuficiencia hepática: Los corticoesteroides deben usarse con precaución en pacientes con insuficiencia hepática, incluyendo cirrosis. El uso a largo plazo se ha asociado a retención de fluidos.

Miastenia gravis: Los corticoesteroides deben usarse con precaución en pacientes con miastenia gravis; los síntomas pueden verse exacerbados especialmente durante el tratamiento inicial con corticoesteroides.

Infarto de miocardio: Los corticoesteroides deben usarse con precaución en pacientes con Infarto de miocardio agudo; los corticoesteroides se han asociado con ruptura del miocardio.

Enfermedad ocular: Los corticoesteroides deben usarse con precaución en pacientes con cataratas y/o glaucoma; ha ocurrido aumento de la presión intraocular, glaucoma de ángulo abierto y cataratas con el uso prolongado de corticoesteroides. Se debe de considerar exámenes rutinarios oculares en pacientes crónicos.

Osteoporosis: Los corticoesteroides deben usarse con precaución en pacientes con osteoporosis; altas dosis y/o uso a largo plazo de corticoesteroides se ha asociado con una pérdida de hueso y fracturas osteoporosas.

Insuficiente renal: Los corticoesteroides deben usarse con precaución en pacientes con insuficiencia renal ya que puede ocurrir retención de fluidos.

Trastornos convulsivos: Los corticoesteroides deben usarse con precaución en pacientes con histórico de trastornos convulsivos, ya que hay riesgo de que ocurran ataques con crisis adrenales.

Enfermedad de las tiroides: Cambios en el estado de las tiroides puede necesitar ajustes de dosificación: el aclaramiento metabólico de los corticoesteroides aumenta en pacientes con hipertiroidismo y disminuye en pacientes con hipotiroidismo.

Se debe de tener un cuidado especial en la población con alta sensibilidad como niños o ancianos. Debido al riesgo de los efectos adversos, los corticoesteroides sistémicos deberían de usarse con precaución en ancianos, usando las dosis efectiva posible más baja durante un tiempo corto. En la población pediátrica, puede también afectar a la velocidad de crecimiento y por lo tanto el crecimiento se debería monitorizar rutinariamente en la población pediátrica.

Los efectos sistémicos del acetato de hidrocortisona están limitados por su biodisponibilidad. La farmacocinética y biodisponibilidad de la hidrocortisona tras la administración rectal de una espuma con acetato de hidrocortisona fueron determinados por Tromm A et al, después de una dosificación unitaria y múltiple en pacientes sanos así como en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (86). La hidrocortisona endógena fue suprimida tras la administración de dexametasona. Los niveles

plasmáticos se compararon con aquellos observados tras la administración intravenosa de hidrocortisona. Tan solo una pequeña parte de la dosis rectal (100 mg) fue absorbida. La biodisponibilidad absoluta media fue de 3,1% en voluntarios sanos y 4,5% en pacientes. Se observó una sustancial variabilidad entre sujetos. Aunque los niveles máximos de hidrocortisona después de una o múltiples dosis fueron muy altos (alrededor del 70%) en el grupo de pacientes, la biodisponibilidad sistémica es muy baja y por lo tanto el riesgo de efectos secundarios sistémicos en la administración rectal de la espuma de acetato de hidrocortisona se han considerados muy bajos.

Las concentraciones plasmáticas observadas tras la administración múltiple son consistentes con las concentraciones observadas tras la administración de varias dosis únicas. Debido al tiempo de vida medio tan corto de la hidrocortisona, se espera muy poca acumulación sistémica. La extremadamente baja biodisponibilidad, en combinación con los informes positivos clínicos sobre la efectividad terapéutica, hace que la forma farmacéutica en espuma de acetato de hidrocortisona se considere un medicamento y forma de administración muy segura y adecuada para el tratamiento local de las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas (85).

#### **9.3.4. Genotoxicidad y carcinogénesis**

Hay muy pocas publicaciones sobre genotoxicidad de los corticoesteroides (86).

Se realizó el test de Ames y se encontró negativa la Dexametasona (87). Asimismo, la hidrocortisona no causó síntesis de ADN no programada en hepatocitos de ratas (88). La dexametasona mejoró la frecuencia del intercambio de cromosomas hermanos en linfocitos humanos y en células in vivo de la médula ósea de ratones.

Los test de dexametasona de clastogenicidad in vitro e in vivo fueron positivos (87).

La hidrocortisona no fue mutagénica en un ensayo Ames in vitro en *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 o TA 1535, tanto en presencia como en ausencia de la activación metabólica (79).

Algunos de los resultados positivos sobre genotoxicidad se han reportado por la EMEA\_CMVP en 1998 (79). Estos resultados positivos fueron obtenidos en un ensayo de aberración cromosómica in vitro en linfocitos humanos, aunque no hubo ninguna relación entre la dosis-respuesta. Hubo un aumento del número de eritrocitos policromados micronucleados relacionado con la dosis, en un test in vivo en donde a varias ratas se les administró una inyección intraperitoneal única de 1, 10 o 100 mg/kg de hidrocortisona. Resultados positivos se obtuvieron también en un test de intercambio de cromosomas hermanos in vivo de médula ósea de ratas, a las que se les había administrado una inyección única de 0,1, 1 o 10 mg/kg de hidrocortisona.

Estos resultados positivos están en conflicto con resultados negativos de estudios de mutagenicidad llevados a cabo en algunos corticoesteroides sintéticos.

No hay ningún estudio bien diseñado reportado sobre carcinogénesis para los corticoides. Los estudios de carcinogénesis con el corticoesteroide prednisolona sintético y su metabolito prednisona, proporcionaron ninguna indicación de potencial carcinogénico. De todas formas, hay algunos estudios de finales de los años 70 reportados por Schmal y Habs (89-90), que sugieren que la hidrocortisona no tiene potencial carcinogénico por sí misma ni tampoco tiene efecto co-carcinogénico cuando se ha ensayado en combinación con un iniciador carcinogénico como la ciclofosfamida.

### **9.3.5. Embriotoxicidad y teratogénesis**

#### **9.3.5.1. Datos en animales**

En experimentos realizados en animales, se ha demostrado que la cortisona puede causar retardo general en el desarrollo embrionario y específicamente causar paladar hendido (91).

En lo que se refiere a la hidrocortisona, es indudablemente un medicamento muy potente embriotóxicamente hablando, aunque es relativamente no tóxico para adultos, incluyendo mujeres embarazadas. La alta embriotoxicidad de la hidrocortisona se enfatiza debido al efecto de la barrera parcial de la placenta. El valor medio de la concentración de hidrocortisona en la sangre humana es de 11 µg/100 ml, mientras en el

fluido amniótico solo es de 2µg/100 ml. En otras palabras, aunque la concentración de hidrocortisona en la placenta es baja, el embrión llega a estar mucho más afectado que las madres (92).

En conjunto, el efecto embriotoxicico de la hidrocortisona en ratas (92) es muy similar al efecto de la cortisona en ratas embarazadas, como está descrito by Courier R & cologne A (93) y por DeCosta EJ & ABelman MA a principios de los años 50 (94).

En los artículos mencionados anteriormente está descrito los efectos tras una inyección subcutánea de acetato de hidrocortisona en ratas (25 mg/kg) a los 10, 11 y 12 días de embarazo. Dichos efectos consisten en una dilatación de los senos venosos marginales en las yemas de las extremidades (efecto primario) (14,4%), necrosis mesoblastica distal extensiva (7-9%), hemorragias distales (10,7%), y centros necróticos frecuentes en las blastemas de las extremidades (efecto secundario). Efectos parecidos se encontraron en la punta de la cola. Otras malformaciones visibles macroscópicamente incluyen: micromelia en alrededor 9,4% de los embriones y necrosis de los maxilares con fisuras faciales (1,8%). Además los embriones afectados mostraron ampollas subpidermicas en la piel alrededor de la cabeza y en la espalda. En alrededor 52,7% de los embriones se encontró también paladar hendido. Estos resultados sugieren que el mesoblasto de la extremidad, particularmente la porción distal, es mucho más sensible a la actividad de la hidrocortisona que es en el epiblasto, que permanece inalterada.

El efecto del desarrollo de un hámster tras la administración de dosis únicas intramusculares de hidrocortisona administradas durante varias veces durante la gestación fue estudiado por Shah RM and Travill AA en 1976 (95).

Tanto la frecuencia del paladar hendido como la resorción dependen de la dosis de hidrocortisona y las veces de su administración. Los principales resultados se muestran en el cuadro 9.5. Se observó una asociación cercana entre la frecuencia del paladar hendido y el retardo en el crecimiento fetal, y entre la última dosis y tiempo de administración del medicamento. La fisiología materna y la barrera placentaria podrán jugar un papel crítico en la inducción del paladar hendido.

Gestation period (day:h)	Dose (mg)	No. of animals	No. of live fetuses	Resorption* (%)	No. of cleft palate (%)
10:12	15	3	37	3	0
	20	3	28	10	0
	25	5	52	2	37
	30	6	54	37	56
	40	6	43	40	93
10:16	50	3	7	79	100
	15	3	33	3	3
	20	4	40	13	13
	25	6	58	9	48
	30	5	49	9	73
10:20	40	5	54	11	96
	50	6	56	19	97
	15	8	94	1	5
	20	8	90	7	35
	25	8	82	12	59
11:00	30	8	71	28	85
	40	7	61	28	99
	50	4	20	59	100
	15	8	94	2	49
	20	11	127	5	79
11:04	25	9	107	4	95
	30	12	133	9	96
	40	7	69	11	100
	50	7	70	10	100
	15	7	84	0	24
11:08	20	7	76	6	66
	25	8	85	9	74
	30	8	82	6	97
	40	7	76	3	100
	50	7	75	11	100
11:12	15	5	53	5	40
	20	8	86	4	88
	25	8	84	7	89
	30	8	68	15	96
	40	6	55	18	100
11:12	50	6	51	20	99
	15	3	30	7	14
	20	5	40	22	58
	25	5	51	7	69
	30	6	61	10	90
11:12	40	6	68	4	100
	50	7	78	7	100

\* Frequency of resorption in control animals: 6-10 %.

Cuadro 9.5.: Incidencia de la inducción del paladar hendido y los sitios de resorción tras la administración de diferentes dosis de hidrocortisona a hamsters embarazadas durante varios periodos en la gestación.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar las diferentes respuestas de varias cepas de ratas a la acción teratogénica de los glucocorticoides. La mayoría de las pruebas sugieren que la teratogenicidad de los corticoides es debida a la acción directa sobre el embrión. La unión total de los corticoides al paladar y a otras proteínas del tejido embrionario, varía en las diferentes cepas de ratas y se correlacionaron con la sensibilidad teratológica de las cepas a los corticoides. Los niveles fetales endógenos de corticoesteroides son mucho más bajos que los niveles maternos, de forma que un intercambio mínimo de la madre al feto puede tener un impacto sustancial en los niveles fetales.

### 9.3.5.2. Datos en humanos

La experiencia clínica sugiere que el uso de corticoesteroides tópicos a dosis moderadas durante el embarazo es relativamente seguro (96).

From Chi CC et al. en el 2010, podemos encontrar una revisión excelente sistemática sobre la seguridad de los corticoesteroides tópicos durante el embarazo. Incluye siete estudios epidemiológicos, dos cohortes y cinco estudios caso-control (97). La mayoría de estos estudios no encontraron asociaciones significativas entre los corticoesteroides tópicos y las anomalías congénitas, muertes fetales por partos prematuros y el tipo de parto. Un estudio encontró una asociación significativa entre el uso de corticoesteroides durante el primer trimestre y hendidura orofacial. Otro estudio encontró una asociación significativa entre el uso de corticoesteroides tópicos potentes y el bajo peso al nacer.

En los siguientes párrafos, se resumen los aspectos más relevantes de la revisión del artículo de Chi y los artículos originales. Los datos están agrupados en relación a los efectos estudiados.

Anomalía congénita: El estudio de cohorte de Mygind H et al (2002) (98) no encontró ninguna diferencia significativa en el riesgo de anomalías congénitas entre grupos expuestos y grupos no expuestos (RR 0,82 (95% CI 0,34-1,96)). El análisis estratificado según la potencia del corticoesteroide no encontró diferencias significativas en el riesgo de anomalías congénitas en mujeres que recibieron corticoesteroides tópicos de potencia media o moderada y mujeres que recibieron corticoesteroides tópicos de potencia alta o muy alta cuando se comparó con mujeres no expuestas (RR 0,93 (95% CI 0,23-3,80) y 0,56 (95% CI 0,14-2,28), respectivamente). El otro estudio de cohorte de Mahe A et al (2007) (99), no encontró niños con anomalías congénitas en los grupos expuestos y no expuestos. Un estudio de caso control de Creizel AE et al (1997) (100) no encontró diferencias significativas en el uso de corticoesteroides tópicos por parte de madres embarazadas durante el primer trimestre de gestación entre niños con 14 grupos de anomalías congénitas y los sujetos control (OR 1,07 (95% CI 0,71-1,60)).

Hendidura orofacial: El estudio caso-control de Edwards MJ et al. (2003) (101) demuestra asociaciones significativas en el primer trimestre de embarazo entre el uso de corticoesteroides tópicos y la hendiduras orofaciales, labio leporino y paladar hendido (OR 13,15 (95% CI 1,60-108,04), 13,57 (96% CI 1,50-123,04) y 12,67 (95% CI 1,33-120,72), respectivamente). De todas formas, en los otros estudios caso control incluidos en la revisión de Chi no se encontraron asociaciones similares.

Crecimiento fetal: Los dos estudios cohorte usaron el bajo peso al nacimiento (< 2500 g) como resultado relacionado con el crecimiento fetal (98-99). El estudio de Mahe demostró un aumento significativo del riesgo de un nacimiento fetal con bajo peso en mujeres que había usado corticoesteroides tópicos de alta potencia durante el embarazo (RR 2,84 (95% CI 1,07-7,54)). El estudio de Mygind no encontró un riesgo incrementado en mujeres que había recibido corticoesteroides tópicos 30 días antes del parto y/o durante el embarazo (RR 1,07 (95% CI 0,70-1,63)). Un análisis estratificado por potencia de corticoesteroides mostró que al comparar con mujeres no expuestas, las diferencias significativas en el riesgo de tener un nacimiento fetal con bajo peso se encontraban en aquellas que recibieron corticoesteroides tópicos leves o moderados y corticoesteroides tópicos potentes o muy potentes (RR 0,70 (95% CI 0,17-2,85) y 1,23 (95% CI 0,45-3,37), respectivamente).

Parto prematuro: Los dos estudios cohorte no mostraron diferencias significativas en el riesgo de parto prematuro entre grupos expuesto a corticoides y grupos no expuestos a corticoides (RR 1,03 (95% CI 0,70-1,53) y 0,47 (95% CI 0,02-9,53), respectivamente) (98-99). Un análisis estratificado por potencia de corticoesteroides mostró que no hay diferencias significativas en el riesgo de tener un parto prematuro al comparar grupos con administración de corticoesteroides tópicos medios o moderados y corticoesteroides tópicos potentes o muy potentes (RR 1,04 (95% CI 0,56-1,92) y 0,99 (95% CI 0,53-1,84), respectivamente).

Muerte fetal: No se encontraron diferencias significativas en el riesgo de muerte fetal entre mujeres expuestas y mujeres no expuestas en un estudio de cohorte (RR 2,64 (95% CI 0,81-8,63)) (99). No hubo ninguna muerte fetal en mujeres que usaron corticoesteroides tópicos muy potentes (99).

Test de Apgar con baja puntuación: No se encontró ningún niño con baja puntuación en el test de Apgar que usara corticoesteroides tópicos de alta potencia (99).

Tipo de parto: Un estudio de cohorte investigó el tipo de parto y no encontró diferencias significativas entre mujeres que usaron corticoesteroides tópicos potentes y mujeres que no usaron. No se presentó estudios estadísticos (99).

La vasta base de datos MADRE, es una recopilación de información sobre los bebés con malformaciones que provienen de madres con exposición a medicamentos durante el primer trimestre de embarazo en diferentes partes del mundo. En 2003 Pradat et al. publicaron un estudio sobre la exposición a corticoesteroides en el primer trimestre de embarazo usando la base de datos MADRE (102). Nueve registros de malformaciones participaron en la recopilación de la base de datos. Tras 12 años de recopilación, la base de datos incluye información sobre 11.150 bebés con malformaciones. Los casos se definieron como niños que presentaron paladar hendido o labio leporino, y la exposición se definió por el uso de corticoesteroides durante el primer trimestre de embarazo. Se observó una asociación muy leve entre la exposición a corticoides para uso sistémico y la aparición de labio leporino con o sin paladar hendido (OR, 2,59; 95% CI, 1,18-5,67). Los principales datos se muestran en el cuadro 9.6.

**Odds Ratios With 95% Confidence Intervals for Each Combination of Oral Cleft and Corticosteroid Exposure<sup>1</sup>**

ATC code	Type of malformation <sup>2</sup>								
	Group I, cleft palate or cleft lip (n = 982)			Group II, cleft palate (n = 304)			Group III, cleft lip or cleft lip with cleft palate (n = 645)		
	N <sup>b</sup>	OR <sup>c</sup>	95% CI	N	OR	95% CI	N	OR	95% CI
All corticoids <sup>4</sup> (n = 387)	37	1.05 <sup>e</sup>	0.74-1.49	6	0.64	0.28-1.45	30	1.31 <sup>e</sup>	0.90-1.92
A07EA <sup>4</sup> (n = 14); intestinal antiinflammatory agents/corticosteroids for local use	2	0.63	0.14-2.87	2	2.98	0.68-13.13	0	0	0.00-5.96
D07 <sup>4</sup> (n = 53); corticosteroids, dermatological preparations	3	0.52	0.16-1.64	0	0	0.00-3.41	3	0.73	0.23-2.37
H02A <sup>4</sup> (n = 155); corticosteroids for systemic use, plain	15	1.25	0.72-2.15	1	0.25	0.04-1.53	13	1.75 <sup>e</sup>	0.98-3.11
H02B <sup>4</sup> (n = 61); corticosteroids for systemic use, combinations	9	<b>2.10</b>	<b>1.03-4.26</b>	2	1.17	0.28-4.92	7	2.59	<b>1.18-5.67</b>
R01AD <sup>4</sup> (n = 30); decongestants and other nasal prep. for topical use/corticosteroids	5	1.66	0.64-4.31	0	0	0.00-5.88	5	2.48	<b>0.98-6.26</b>
R03BA <sup>4</sup> (n = 68); other anti-asthmatics, inhalants/glucocorticoids	4	0.60	0.21-1.67	1	0.64	0.08-5.06	3	0.69	0.22-2.22

<sup>1</sup>Total number of records; n = 11,150; group I may be greater than the sum of group II and group III, since some infants may have an unspecified cleft lip or cleft palate without belonging to group II or III, e.g., code 749.

<sup>2</sup>Group I: ICD code 749 (cleft palate or cleft lip); group II: code 749.0 (cleft palate); and group III: code 749.1 or 749.2 (cleft lip or cleft lip with cleft palate).

<sup>3</sup>Note that the sum of the number of cases exposed to the different steroid categories is greater than the total reported for "all corticoids" since one fetus may be exposed to more than one preparation.

<sup>4</sup>OR, Mantel-Haenszel odds ratio after stratification by Registry.

<sup>5</sup>Heterogeneity between registries.

<sup>6</sup>Including all subcategories in the hierarchical classification.

Significantly increased odd ratios are indicated in bold.

Cuadro 9.6.: Asociaciones epidemiológicas entre corticoesteroides administrados durante el primer trimestre de embarazo y el paladar hendido o labio leporino.

### 9.3.6. Efectos en el comportamiento

La exposición elevada prologanda a corticoesteroides podría causar déficits en la cognición, particularmente en el aprendizaje y en la memoria, que puede ser mediada en

parte por los efectos sobre las neuronas del hipocampo. La mayoría de la evidencia de los datos viene derivada de los experimentos en animales; por ejemplo, la administración crónica de corticoesterona en ratas ha demostrado que deteriora la adquisición de tareas para la orientación (103). Además los corticoesteroides han demostrado también una afectación de la potenciación del hipocampo a largo plazo (104), lo que se cree estar electrofísicamente correlacionado con la plasticidad sináptica y al mismo tiempo parece estar sumamente relacionado con los estadios iniciales de la formación de la memoria.

Young et al (105) examinaron los efectos de la hidrocortisona en el aprendizaje, memoria y función ejecutiva. 20 mg de hidrocortisona se administraron dos veces al día durante 10 días a voluntarios masculinos en un diseño de estudio randomizado con placebo control. El aprendizaje, la memoria y la función ejecutiva fueron determinadas usando tests seleccionados del Test neuropsicológico de Cambridge. La hidrocortisona causó alteraciones de la memoria espacial visual. Estas alteraciones incluyeron el aumento en los errores de búsqueda y uso de la alteración de las estrategias en el subtest de memoria de trabajo espacial. Además, la administración de hidrocortisona se asoció a más errores en el subtest de aprendizaje de pares asociados. La hidrocortisona acelera las latencias de respuesta en determinadas pruebas. Estos resultados indicaron que la administración crónica de hidrocortisona conduce a déficits en ciertas pruebas de la función cognitiva sensible a la disfunción del lóbulo frontal y puede contribuir al deterioro cognitivo reportado en ciertos trastornos neuropsiquiátricos

## **CAPÍTULO 10: DISCUSIÓN GLOBAL**

En este capítulo se pretende realizar una discusión de los aspectos tratados en los diferentes capítulos.

Se han desarrollado dos formulaciones en crema que contienen acetato de hidrocortisona o hidrocortisona base, así como sus procesos de fabricación. Las características de la crema obtenida con ambas formulaciones son adecuadas desde el punto de vista galénico y desde el punto de vista de fabricación industrial. Así mismo, se considera que la administración de estas cremas también es la adecuada ya que se han obtenido las características adecuadas en cuanto a pH, viscosidad y extensibilidad adecuadas (35).

También se ha desarrollado una formulación en espuma obtenida a partir de la emulsión con la formulación 1. A dicha emulsión se le añade el agente espumante lauril sarcosinato de sodio y el gas propelente líquido obteniendo una espuma adecuada desde el punto de vista galénico. Asimismo, se considera que la administración de esta espuma también es la adecuada ya que se han obtenido las características adecuadas en cuanto a pH, viscosidad y extensibilidad adecuadas (44).

Por último, también se ha desarrollado una formulación en gel que presenta un aspecto translucido, sin grumos y con poco aire. La administración de este gel es el adecuado ya que se han obtenido las características adecuadas en cuanto a pH y viscosidad adecuadas (35).

Todas las formulaciones desarrolladas, a excepción de la formulación en espuma, se proponen como posibles preparados semisólidos para contener hidrocortisona como principio activo. La formulación se descarta en esta fase del desarrollo debido a que se considera más costosa y menos común desde el punto de vista de tecnología de fabricación.

Los estudios de estabilidad preliminar y estudios de estabilidad según Normativa ICH Q1A R (69) son los que diferencian que formulación es la más adecuada desde el punto de vista de estabilidad como formulación definitiva.

A tal efecto, se realizan los estudios de estabilidad preliminar en donde se observa que todas las formulaciones desarrolladas y evaluadas (formulación 1 en base crema, formulación 2 en base crema y formulación 3 en base gel), son muy estables, ya que incluso en condiciones de estabilidad aceleradas (40 °C / 75% HR) durante tiempos más largos de estabilidad de los que la normativa ICH Q1A R (69) recomienda, la concentración de principio activo permanece poco inalterada. Aun así, cabe resaltar que la Formulación 2 en base crema, necesita más conservante porque se contamina microbiológicamente en el tiempo.

La formulación 1 en base crema con hidrocortisona base y la formulación 3 en base gel con ambas principios activos (acetato de hidrocortisona e hidrocortisona base), presentan un valor de pH más estable en el tiempo.

En general, las formulaciones a pH 5.5 son más estables que las formulaciones a pH 3.5, puesto que la concentración de principio activo es más estable en el tiempo a las diferentes condiciones de temperatura y humedad evaluadas.

En general, las formulaciones con acetato de hidrocortisona son más estables que las formulaciones con hidrocortisona base, puesto la concentración de principio activo es más estable en el tiempo a las diferentes condiciones de temperatura y humedad evaluadas.

La formulación 1 en base crema con acetato de hidrocortisona y a pH 5.5 y la formulación 3 en base gel con acetato de hidrocortisona a pH 5.5 se pueden considerar las más estables de las formulaciones estudiadas. De estas dos formulaciones, se escogerá la formulación 3 en base gel con acetato de hidrocortisona para realizar los estudios de estabilidad según Normativa ICH Q1A R (69) puesto que es la que presenta un menor grado de dificultad en el proceso tecnológico de su elaboración.

La estabilidad según condiciones ICH llevado a cabo en los dos lotes elaborados según la formulación 3 en base gel con acetato de hidrocortisona revela que dichos preparados mantienen todas sus características físicas, galénicas, químicas y microbiológicas intactas con respecto a los valores iniciales (tiempo cero), después de 36 meses de estar almacenados a 25 °C/60% HR y 30 °C/65%HR y 6 meses de estar almacenados a 40 °C/75%HR. Los buenos parámetros del producto que pueden considerarse críticos (aspecto, pH, viscosidad, riqueza y sustancias relacionadas), hacen suponer la existencia de una buena formulación y de una tecnología de fabricación adecuada.

Asimismo, los preparados en gel de los lotes 1 y 2 de acetato de de hidrocortisona, presentan unos valores de conservantes y antioxidante que van disminuyendo a lo largo del tiempo, hecho que denota que sus funciones como antimicrobiano y antioxidante, van haciendo efecto. De tal forma, y gracias a los dichos componentes introducidos (conservantes y antioxidante), se obtiene un preparado a lo largo del tiempo de calidad química y microbiológica adecuada.

A pesar de los adecuados resultados obtenidos en las condiciones de 40 °C/75%HR en que todos los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites especificados, se ha realizado el estudio intermedio analizando los lotes en las condiciones de 30 °C/65%HR hasta la toma de muestra de 36 meses, confirmando dichos valores.

En función de los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad a largo plazo para el preparado en gel con acetato de hidrocortisona en botellas de plástico LDPE opaco con cánula transparente como envase primario definitivo, se establece un tiempo de caducidad del preparado de tres años.

Se ha puesto a punto y validado un método de análisis para la determinación simultánea de acetato de hidrocortisona, propilparahidroxibenzoico, metilparahidroxibenzoico, BHA y sus productos de degradación (61-64).

Mediante la comprobación de los apartados de la validación del método analítico para la valoración de hidrocortisona acetato, conservantes y antioxidante en producto terminado, se llega a la conclusión de que el método utilizado es adecuado.

Se ha comprobado que el método es selectivo para la hidrocortisona acetato, metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico y BHA, siendo además lineal en el intervalo establecido (80% y 120%), repetitivo, reproducible y exacto.

Se ha comprobado también que el sistema instrumental utilizado es el adecuado para la valoración de hidrocortisona acetato, metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico y BHA en la forma farmacéutica propuesta.

Se ha comprobado la capacidad del método para dar resultados directamente proporcionales a la concentración de los analitos en la muestra.

Se establece un intervalo de concentraciones en el que el método es exacto y preciso (80% y 120%).

Se ha comprobado la robustez del sistema para los analitos en estudio con respecto a la longitud de onda del detector, temperatura de la columna, caudal de la bomba cromatográfica, volumen de inyección y lote de la fase estacionaria. Se concluye que la recuperación del método no se ve afectada por pequeñas variaciones de ninguna de las variables estudiadas.

Las soluciones patrón y problema preparadas para cromatografía pueden conservarse durante un mínimo de 72 horas después de su preparación, ya que se ha estudiado su estabilidad transcurrido este período de tiempo a temperatura ambiente ( $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ) y se mantiene alrededor del 100% transcurridas 72 horas.

Mediante la comprobación de los apartados de la validación del método analítico para la cuantificación de los productos de degradación en producto terminado, se llega a la conclusión de que el método utilizado es adecuado.

Se ha comprobado que el método es selectivo, siendo además lineal en el intervalo establecido (40% y 160%), repetitivo, reproducible y exacto.

Se ha comprobado también que el sistema instrumental utilizado es el adecuado para la valoración de los productos de degradación en la forma farmacéutica propuesta.

Se ha comprobado la capacidad del método para dar resultados directamente proporcionales a la concentración de productos de degradación en la muestra.

El límite de detección del método corresponde al 0,03% de la concentración de trabajo, mientras que el límite de cuantificación corresponde al 0,04% de la concentración de trabajo.

Se establece un intervalo de concentraciones en el que el método es exacto y preciso (40% y 160%).

Se ha comprobado la robustez del sistema con respecto a la longitud de onda del detector, temperatura de la columna, caudal de la bomba cromatográfica, volumen de inyección y lote de la fase estacionaria. Se concluye que la recuperación del método no se ve afectada por pequeñas variaciones de ninguna de las variables estudiadas.

La solución patrón puede conservarse durante un mínimo de 96 horas después de su preparación, ya que se ha estudiado su estabilidad transcurrido este período de tiempo a temperatura ambiente ( $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ) y se mantiene alrededor del 100% transcurridas 96 horas.

En cuanto a la solución problema, ésta solo puede conservarse por un periodo máximo de 24 horas, a partir del cual incrementa de forma significativa el producto de degradación hidrocortisona.

A partir de la validación llevada a cabo se establece el factor de corrección para el producto de degradación conocido hidrocortisona, para de esta forma poder utilizar la solución de hidrocortisona acetato a la concentración de  $2,2\text{ }\mu\text{g/mL}$  como solución patrón para de este producto de degradación. Dicho factor de corrección es 1,0022.

Por último, la evaluación bibliográfica de la toxicología del acetato de hidrocortisona tras la aplicación y cumplimiento del artículo 10º, anexo I, de la Directiva 2004/27/EC del Parlamento europeo y del Consejo del 31 de Marzo de 2004 (70), que modifica la Directiva 2001/83/EC del código comunitario sobre productos medicinales para dosificación en humanos (71), muestra que el uso terapéutico de la hidrocortisona y del

acetato de hidrocortisona es conocido desde hace mucho tiempo. El primer uso de la hidrocortisona está fechado en 1948 y las primeras revisiones sobre el uso tópico de la hidrocortisona y el acetato de hidrocortisona en el tratamiento de diferentes enfermedades de la piel fueron publicadas en 1955.

Asimismo, la FDA ha aprobado 23 medicamentos diferentes conteniendo acetato de hidrocortisona. En el registro español, hay 20 medicamentos autorizados con acetato de hidrocortisona. Algunos de ellos son usados como antihemorroidales (76).

La hidrocortisona es un corticoesteroide clasificado en la categoría de potencia más baja. Con la entrada de corticosteroides tópicos de alta potencia, los efectos secundarios locales y sistémicos se han encontrado más frecuentemente y con más prevalencia.

Se han reportado algunas reacciones adversas locales tras la administración tópica de hidrocortisona y acetato de hidrocortisona o derivados. Principalmente: Eccema (12,5%), prurito (6%), escozor (2%), piel seca (2%) y (<1%) dermatitis de contacto alérgicas, ardor, atrofia dérmica, foliculitis y estrias.

Los efectos secundarios sistémicos de los corticosteroides tópicos son raros, pero podrían ocurrir (cuadro 9.3. y 9.4.), especialmente en niños y ancianos. Posiblemente, los efectos secundarios sistémicos están directamente relacionados a factores como el lugar de aplicación, duración de la aplicación, potencia del corticoide y oclusión de la medicación.

Los experimentos con cortisona en animales han demostrado provocar un retardo general en el desarrollo del embrión y de producir paladar hendido. En lo que se refiere a la hidrocortisona, es indudablemente un medicamento muy potente embriotoxico, aunque relativamente no toxico para animales adultos, incluyendo mujeres embarazadas.

Experimentos clínicos sugieren que el uso de corticoesteroides tópicos a dosis moderadas durante el embarazo es relativamente seguro.

Algunos estudios epidemiológicos fueron incapaces de demostrar ninguna asociación significativa entre los corticoesteroides tópicos y las anomalías congénitas, partos prematuros o muerte fetal.

La administración crónica de hidrocortisona puede llevar a cabo déficits en ciertas pruebas de la función cognitiva sensibles a la disfunción del lóbulo frontal.



## **CONCLUSIONES**



1.- La investigación desarrollada ha hecho posible la obtención de un nuevo medicamento estable y de calidad de administración tópica rectal en forma de enema, para el tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

2.- Se propone como formulación óptima la correspondiente a un gel. La referencia correspondiente a esta formulación en gel es la mostrada en el cuadro 4.32. que contiene un 1,11% de acetato de hidrocortisona como principio activo.

3.- Se concluye que la técnica de elaboración óptima para la obtención del nuevo gel medicamentoso, consta de las siguientes fases de fabricación; una primera fase que consiste en la preparación de la base gelificada y conservada, una segunda fase que consiste en la adición de EDTA, una tercera fase que consiste en la adición de BHA y Polisorbato 80 y una cuarta y última fase que consiste en la dispersión del principio activo.

4.- Se establecen unas especificaciones de calidad para el medicamento propuesto en función de las características fisicoquímicas, galénicas y microbiológicas del estudio preliminar.

En concreto se proponen los ensayos siguientes: características organolépticas, pH, viscosidad, extensibilidad, identificación del principio activo y productos de degradación, valoración del principio activo, valoración de los productos degradación (hidrocortisona, cortisona, cortisona-21- acetato y acetato prednisolona), valoración del metilparahidroxibenzoico, valoración del propilparahidroxibenzoico, valoración del butilhidroxianisol y el control microbiológico (recuento de microorganismos aerobios viables totales, bacterias, hongos filamentosos y levaduras, Enterobacterias y otras bacterias gran-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*).

5.- Las formulaciones semisólidas con acetato de hidrocortisona son más estables en el tiempo que las formulaciones con hidrocortisona base, por lo que para este tipo de medicamentos es aconsejable el uso de la sal de hidrocortisona.

6.- Las formulaciones semisólidas con acetato de hidrocortisona o con hidrocortisona base, son más estables cuando la forma farmacéutica presenta un pH de 5.5, siendo más inestables a pH más ácidos (3.5).

7.- Los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad a corto plazo (6 meses a 40 °C/75% HR) y a largo plazo (36 meses a 25 °C/60% HR y a 30 °C/65% HR) sobre el gel de acetato de hidrocortisona envasado en frascos de plástico LPDE opaco, permiten concluir que el producto es estable durante 3 años, estableciéndose en dicho periodo su tiempo de caducidad.

8.- El envase primario del producto terminado, constituido por un frasco de plástico polietileno de baja densidad, se demuestra suficientemente válido para proteger el medicamento durante su tiempo de caducidad.

9.- Se propone una nueva metodología RP-HPLC para el análisis cuantitativo simultáneo de acetato de hidrocortisona, metilparahidroxibenzoico, propilparahidroxibenzoico, butilhidroxianisol y sus respectivos productos de degradación, en el producto terminado gel de administración tópica rectal.

10.- La metodología analítica por RP-HPLC propuesta se ha validado concluyéndose que es selectiva, lineal, repetitiva, reproducible, exacta y robusta.

# **BIBLIOGRAFÍA**



1. Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios (BOE nº 178, de 27 de julio de 2006).
2. ICH Q8 (R2) Pharmaceutical Development. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. November 2009. Revision 2.
3. The Merck Manual Online. 17 ed. Whitehouse Station, N.J., U.S.A.
4. Farup PG, Hovde O, Halvorsen FA, Raknerud N, Brodin U. Mesalazine suppositories versus hydrocortisone foam in patients with distal ulcerative colitis. A comparison of the efficacy and practicality of two topical treatment regimens. *Scand J Gastroenterol.* 1995; 30(2):164-70.
5. Lucidarme D, Marteau P, Foucault M, Vautrin B, Filoche B. Efficacy and tolerance of mesalazine suppositories vs. hydrocortisone foam in proctitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997; 11(2):335-40.
6. Lakatos PL, Lakatos L. Ulcerative proctitis: a review of pharmacotherapy and management. *Expert Opin Pharmacother.* 2008; 9(5):741-9.
7. Levine E, Brandt LJ. A rectal concretion of hydrocortisone acetate. *Gastrointest Endosc.* 1993; 39(3):472-3.
8. Dahlerup J. Colifoam--hydrocortisone rectal foam. *Sygeplejersken,* 1986; 86(11):19.
9. Neumann G, Niv Y, Bat L, Abramowich D, Shemesh E. Effectiveness and absorption of rectal hydrocortisone acetate foam in nonspecific proctocolitis. *Isr J Med Sci.* 1989; 25(4): 189-92.
10. Lennard-Jones Je, Baron JH, Connell AM, Jones Fa. A double blind controlled trial of prednisolone-21-phosphate suppositories in the treatment of idiopathic proctitis. *Gut.* 1962; 3: 207-10.
11. Bar-Meir S, Fidler HH, Faszczyk M, Bianchi Porro G, Sturniolo GC, Mickisch O, Müller R, Greinwald R, Chowers Y, Grobeta V. Budesonide foam vs. hydrocortisone acetate foam in the treatment of active ulcerative proctosigmoiditis. *Dis Colon Rectum.* 2003; 46(7):929-36.;
12. Lindgren S, Lofberg R, Bergholm L, Hellblom M, Carling L, Ung KA, Schioler R, Unge P, Wallin C, Strom M, Persson T, Suhr OB. Effect of budesonide enema on remission and relapse rate in distal ulcerative colitis and proctitis. *Scand J Gastroenterol.* 2002; 37(6):705-10.
13. Vibeke Binder, Stig Bondesen, Olaf Bonnevie, Knud Christian Christensen Lisbeth Ambrosius Christensen, Poul Danø, Hans Draminsky Petersen, Troels Havelund,

- Eigill F, Hvidberg, Oli Jacobsen, Karin Ladefoged, Karsten Lauritsen, Laurits Stærk Laursen, Jørgen Rask-Madsen, Sten Nørby Rasmussen, German Sanchez, Poul Schlichting, Ulrik Tage-Jensen, Mogens Vilien, Johann Wandall. Topical 5-aminosalicylic acid versus prednisolone in ulcerative proctosigmoiditis. A randomized, double-blind multicenter trial. *Dig Dis Sci.* 1987; 32(6):598-602.
14. Cavčić J, Turčić J, Martinac P, Jelincić Z, Zupancić B, Panijan-Pezerović R, Unusić J. Metronidazole in the treatment of chronic radiation proctitis: clinical trial. *Croat Med J.* 2000; 41(3):314-8.
  15. Katz, S, Sachar D.B., Achkar E. Inflammatory bowel disease: keys to diagnosis, treatment of inflammatory bowel disease. A physician reference guide. American College of Gastroenterology. Arlington, VA. 1997; I: 120-123
  16. Remington. Farmacia. 17<sup>a</sup> edición. Editorial medica panamericana. Buenos Aires, 1987: 1321-1322
  17. Flórez J. Farmacología humana. 3<sup>a</sup> edición. Ed. Masson. Barcelona, 1997: 901-915
  18. Manufacturing procedure Hydrocortisone Flow chart. Información facilitada por Sanofi Aventis. Marzo 2006.
  19. Manufacturing procedure Hydrocortisone acetate. Sanofi Aventis SYA-0243-09-B-1-03. Marzo 2006
  20. Martindale: The Complete drug Reference on line 2014. Consultado en abril 2014. <https://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/1060-a1-g.htm>.
  21. Vila Jato JL. Tecnología Farmaceutica. Ed Síntesis. Madrid, 1997; II: 265-267.
  22. Florez J, Amado JA. Farmacología humana. Esteroides corticales y antiinflamatorios esteroideos. 3<sup>a</sup> ed. Barcelona, Masson, 2000: 901-915
  23. Müller-Goymann CC, Alberg U. Modified water containing hydrophilic ointment with suspended hydrocortisone-21-acetate – the influence of the microstructure of the cream on the in vitro drug release and in vitro percutaneous penetration. *Eur J Pharm Biopharm.* 1999; 47 (2): 139-43
  24. Fardet L, Kassar A, Cabane J, Flahault A. Corticosteroid-induced adverse events in adults: frequency, screening and prevention. *Drug Safety,* 2007; 30: 861–881.
  25. Giurgea R, Rosioru C, Roman I, Gabos M. The effects of hydrocortisone-acetate on some biochemical parametres in the liver, thymus, thymocytes and adrenals of white Wistar rats. *Rom J Physiol.* 1993; 30 (3-4): 249-252.
  26. Howard C Ansel. Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms. Lea & Febiger. Philadelphia, 1969: 232-238.

27. European Pharmacopeia 7th edition on line. 2091-2092 (Hydrocortisone Acetate). Consultado en Diciembre 2013.
28. USP 36, NF 31 through second supplement. On line. United States Pharmacopeia Convention; Inc. US Monographs. 2572 (Hidrocortisona), 2577 (Acetato de hidrocortisona), 2581 (Hemisuccinato de hidrocortisona). Consultado en Diciembre 2013.
29. British Pharmacopoeia 2014 on line. Volumen I & II. Monographs: Medicinal and pharmaceutical substances. Consultado en Julio 2014.
30. ICH Stability study referenced CMC-NU-2006-02245 EN 2.0 March 2006 Sanofi Aventis
31. European Pharmacopeia 7th edition on line. 2196-2197 (Hydrocortisone). Consultado en Diciembre 2013.
32. Moffat, Anthony C; Osselton, M David; Widdop, Brian. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Third edition. Ed. Pharmaceutical Press. London, 2004; I: 134-146
33. ICH Stability study referenced CMC-NU-2009-29323 EN 2.0 December 2009 Sanofi Aventis
34. Faulí Trillo, C. Tratado de Farmacia Galénica. Primera edición. Ed. Luzán. Madrid, 1993: 635-647.
35. European Pharmacopeia 7th edition on line. 734-735 (Semisolid preparations for cutaneous applications). Consultado en Diciembre 2013.
36. Denoël A. Jaminet Fr. Pharmacie Galénique. Préparations dermatologiques. Les presses universitaires de Liège. París, 1971; V: 290-296.
37. Del Pozo A. Farmacia Galénica especial. Barcelona, 1978; 2: 259-263.
38. Aulton M E. Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmaceuticas. Elsevier. Segunda edición. Madrid, 2004. 534-543.
39. Herbert A. Lieberman, Martin M. Rieger and Gilbert S. Banker. Pharmaceutical Dosage forms: Disperse systems. 2ª Edición. Marcel Dekker INC. New York and Base. 1988; I: (225-232).
40. Herbert A. Lieberman, Martin M. Rieger and Gilbert S. Banker. Pharmaceutical Dosage forms: Disperse systems. 2ª Edición. Marcel Dekker INC. New York and Base. 1988; I: (232-236).
41. Herbert A. Lieberman, Martin M. Rieger and Gilbert S. Banker. Pharmaceutical Dosage forms: Disperse systems. 2ª Edición. Marcel Dekker INC. New York and Base. 1988; I: (236-241).

42. P. Becher, *Emulsions Theory and Practice*, 2nd ed. Reinhold, New York, 1965
43. Real Farmacopea Española, 3ª Edición. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid, 2005.
44. European Pharmacopeia 7th edition on line. 2200-2201 Espumas medicamentosas. Consultado en Diciembre 2013.
45. Herbert A. Lieberman, Martin M. Rieger and Gilbert S. Banker. *Pharmaceutical Dosage forms: Disperse systems*. 2ª Edición. Marcel Dekker INC. New York and Base. 1988; II: (453-460).
46. USP 36, NF 31 through second supplement. On line. United States Pharmacopeia Convention; Inc. US Physical Tests and Determinations <601> Aerosol 242 – 244. Consultado en Marzo 2014.
47. Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey, Siân C. Owen. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5ª Ed. Pharmaceutical Press. London, 2006.
48. Allen LV. Featured excipient: oleaginous vehicles. *Int J Pharm Compound* 2000; 4(6): 470–473, 484–485.
49. Garcia Del Pozo JA, Alvarez Martinez MO. Olive oil: attainment, composition and properties. *Farm (El Farmaceutico)* 2000; 241: 94, 96, 98–100, 102, 104–105.
50. Banker GS, Rhodes ChT. *Modern Pharmaceutics*, 2ª Ed. Marcel Dekker INC. New York, 1990.
51. Gennaro AR. *Remington's Pharmaceutical Science*. 19th Ed. Mack Publishing Co. Pennsylvania, 1995.
52. Salazar R. *Análisis y control de medicamentos*. Romagraf S.A. Barcelona, 2005.
53. Salazar R. *Gestión de la calidad en el desarrollo y fabricación industrial de medicamentos*. Romagraf S.A. Barcelona, 2001.
54. Morimoto K, Morisaka K. In vitro release and rectal absorption of barbital and aminopyrine from aqueous polyacrylic acid gel. *Drug Dev Ind Pharm* 1987; 13(7): 1293–1305.
55. Green JT, Rhodes J, Thomas GA, Evans BK, Feyerabend C, Russell MA, Sandborn WJ. Nicotine carbomer enemas—pharmacokinetics of a revised formulation. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30: 260–265.
56. Charman WN, Christy DP, Geunin EP, Monkhouse DC. Interaction between calcium, a model divalent cation, and a range of poly(acrylic acid) resins as a function of solution pH. *Drug Dev Ind Pharm* 1991; 17(2): 271–280.

57. Nema S, Washkuhn RJ, Brendel JL. Excipients and their use in injectable products.. PDA J Pharm Sci Tech 1997; 51: 166–171.
58. Yalkowski SH. Solubility and Solubilization in Aqueous Media. New York, NY: Oxford University Press, 1999; 310–312.
59. Guidelines on General principles of process validation. Food & Drug Administration. May 1987
60. Definición del término validación. O.M. de 19-IV-1985, BOE nº 103 de 30-IV-1985.
61. Pérez Cuadrado JA, Pujol Forn M. Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacueticos de la Industria. Girona, Marzo 2001.
62. USP 36, NF 31 through second supplement. On line. United States Pharmacopeia Convention; Inc. US. General information <1225> Validation of Compendial Procedures 983 - 988. Consultado en Marzo 2014.
63. CPMP/ICH/381/95. Note for guidance on validation of analytical methods: definition and terminology. ICH Topic Q2A Validation of Analytical Methods: definitions and terminology. Step 5 (CPMP adopted Nov. 94).
64. CPMP/ICH/281/95. Note for guidance on validation of analytical procedures: methodology. ICH Topic Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. Step 4 (CPMP adopted December 96).
65. Analisis instrumental: cualificación de equipos; validación de métodos de análisis. Curso impartido en el Instituto Quimico de Sarriá (IQS). 14-15 de febrero de 2000.
66. Peer Verified methods Program (1993) AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD.
67. Perez-Lozano, P., Garcia-Montoya, E., Orriols, A., Minarro, M., Tico, JR., Sune-Negre, JM. (2005) J. Pharm. Biomed. Anal. 39, 920-927.
68. Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos. Medicamentos de uso humano y medicamentos veterinarios. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid 2010
69. CPMP/ICH/2736/99. Note for guidance on stability testing: stability testing of new drug substances and products. ICH Q1A R: Stability Testing Guidelines: stability Testing of New Drug Substances and Products. ICH Step 5. Junio 2001. London, 16 november 2000,
70. European Parlamient and of the Council. Directive 2004/27/EC of 31 March 2004 ameding directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal productos for human use. Article 10a.

71. European Parliament and of the Council. Directive 2001/83/EC of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use.
72. Burkholder, B. Topical Corticosteroids: An update current. *Problems in Dermatology*, 2000; 12 (5): 222-5.
73. Kalz, F., Mc Corrison L.R., Prichard, H. An evaluation of hydrocortisone acetate ointment in various skin diseases. *Canadian Medical Association Journal*, 1955; 72 (1): 7-12.
74. Jackson, R. The Topical use of hydrocortisone Acetate. *Canadian Medical Association Journal*, 1955; 72 (12): 931-12.
75. Refai H., Müller-Goymann, C.C. (January 01, 2002). The influence of dilution of topical semisolid preparations on hydrocortisone permeation through excised human stratum corneum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik E.V*, 2002; 54 (2): 143-50.
76. Food and Drug Administration. USA <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>
77. AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios). <https://sinaem4.agemed.es/consaem/pestanias.do?metodo=presentacionInicial> (April 2011).
78. Fini, A., Bergamante, V., Ceschel, G.C., Ronchi, C., De Moraes, C.A. Control of transdermal permeation of hydrocortisone acetate from hydrophilic and lipophilic formulations. *Aaps Pharmscitech*, 2008; 9 (3): 762-8.
79. EMEA-CMVP (1998) Hydrocortisone. Summary report. Downloaded from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_residue\\_Limits\\_Report/2009/11/WC500014421.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_residue_Limits_Report/2009/11/WC500014421.pdf) (March 2011).
80. Tonelli, G. Acute toxicity of corticosteroids in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1966; 8 (2): 250-8.
81. Hydrocortisone. Drug Information Provided by Lexi-Comp. Merck Manual Professional <http://www.merckmanuals.com/professional/print/lexicomp>. (March 2011).
82. Havlickova, B. Topical corticosteroid therapy in proctology indications. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2010; 31: 19-32

83. Frosch, P.J., Bherenbeck, E.M., Frosch, K., Macher, E. The Duhring chamber assay for corticosteroid atrophy. *The British Journal of Dermatology*, 1981; 104 (1): 57-65.
84. Hoes, J.N., Jacobs, J.W., Boers, M., Boumpas, D., Buttgereit, F., Caeyers, N., Choy, E.H., Bijlsma, J.W. EULAR evidence-based recommendation on the management of systemic glucocorticoid therapy in rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic diseases*, 2007; 66 (12): 1560-7.
85. Tromm A., Möllmann, H. Barth, J., Hochhaus, G., Krieg, M., Bigalke, C., Möllmann, A., Derendor, H. Pharmacokinetics and rectal bioavailability of hydrocortisone acetate after single and multiple administration in healthy subjects and patients. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2001; 41 (5): 536-41.
86. Joosten, H. F., Van Acker, F. A., van den Dobbelen, D. J., Horbach, G. J., Kranjnc, E. I. Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicology Letters*, 2004; 151 (1): 113-34.
87. Singh, H., Singh, J. R., Dhillon, V. S., Bali, D., Paul, H. In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of hormonal drugs. II. Dexamethasone. *Mutation Research*, 1994; 308 (1): 89-97.
88. Oshiro, Y., Balwierz, P.S., Piper, C. E. Absence of a genotoxic response from steroids in the rat primary hepatocyte unscheduled DNA synthesis assay. *Environmental Mutagenesis*, 1986; 8 (3): 461-5.
89. Schmäl, D. Carcinogenic action of anticancer drugs with special reference to immunosuppression. *Cancer*, 1977; 40 (4): 1927-9.
90. Schmäl, D, Habs, M. Life-span investigations for carcinogenicity of some immunestimulating, immunodepressive and neurotropic substances in Sprague-Dawley-rats. *Zeitschrift Für Krebsforschung Und Klinische* 1976; 1: 77-84.
91. Walker, B. E. Fraser F. C. The embryology of cortisone-induced cleft palate. *Journal of embryology and Experimental Morphology*, 1957; 5: 201-9.
92. Jurand, A. The effect of hydrocortisone acetate on the development of mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 1968; 20 (3): 355-66.
93. Courrier, R. Cologne, A. Cortisone et gestation chez la Lapine. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances De L'académie Des Sciences.*, 1951; 232: 1164-6.

94. DeCosta E. J., Abelman, M. A. Cortisone and pregnancy; an experimental and clinical study of the effects of cortisone on gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1952; 64 (4): 746-67.
95. Shah, R. M., Travill, A. A. The teratogenic effects of hydrocortisone on palatal development in the hamster. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 1976; 35 (1): 213-24.
96. Reed, B. R. Dermatologic drugs, pregnancy, and lactation. A conservative guide. *Archives of Dermatology*, 1997; 133 (7): 894-8.
97. Chi, C.-C., Wang, S.-H., Wojnarowska, F., Kirtsching, G. Systematic review of the safety of topical corticosteroids in pregnancy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2010; 62 (4): 694-705.
98. Mygind, H., Thulstrup, A. M., Pedersen, L., Larsen, H. Risk of intrauterine growth retardation, malformations and other birth outcomes in children after topical use of corticosteroid in pregnancy. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 2002; 81 (3): 234-9.
99. Mahé, A., Perret, J.L., Ly, F., Fall, F., Rault, J.P., Dumont, A. The cosmetics use of skin-lightening products during pregnancy in Dakar, Senegal: a common and potentially hazardous practice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2007; 101 (2): 183-7.
100. Czeizel, A. E., Rockenbauer, M. Population-based case control study of teratogenic potential of corticosteroids. *Teratology*, 1997; 56 (5): 335-40.
101. Edwards, M. J., Agho, K., Attia, J., Diaz, P., Hayes, T., Illingworth, A., Roddick, L. G. Case-control study of cleft lip or palate after maternal use of topical corticosteroids during pregnancy. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 2003; 4: 459-63.
102. Pradat, P., Robert-Gnansia, E., Di, T. G. L., Rosano, A., Lisi, A., Mastroiacovo, P., Contributors to the MADRE database. First trimester exposure to corticosteroids and oral clefts. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 2003; 67 (12): 968-70.
103. Bodnoff, S.F., Humphreys, A. G., Lehman, J.C., Diamond, D. M., Rose, G.M., Meaney, M.J. Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 1995; 15 (1): 61-9.

104. Diamond, D.M., Bennett, M.C., Fleshner, M., Rose, G.M. Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus*, 1992; 2 (4): 421-30.
105. Young, A. H., Shakian, B.J., Robbins, T. W., Cowen, P.J. The effects of chronic administration of hydrocortisone on cognitive function in normal male volunteers. *Psychopharmacology*, 1999; 145 (3): 260-6.



# **ANEXOS**