

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**



**PROPUESTA DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO INDICATIVO DE  
ESTABILIDAD PARA EVALUAR ACICLOVIR EN CREMA**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:**

**RICARDO ALFREDO VALLE LÓPEZ  
MIGUEL IVÁN VÁSQUEZ DÍAZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA**

**ABRIL 2008**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA.**

## **UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

### **Rector**

Msc. Rufino Antonio Quezada Sánchez

### **Secretario General**

Lic. Douglas Vladimir Alfaro Chávez

## **FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

### **Decano**

Lic. Salvador Castillo Arévalo

### **Secretaria**

Lic. Morena Lizette Martínez de Díaz

## **COMITÉ DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN**

### **Coordinadora General**

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

### **Asesora de Área de Control de Calidad de Productos**

#### **Farmacéuticos, Cosméticos y Veterinarios**

Lic. Zenia Ivonne de Márquez

### **Asesora de Área de Industria Farmacéutica, Cosmética y Veterinaria**

Lic. Rossana Brito Mendoza

### **Docente director**

Dra. Lucía Elizabeth Banegas de Salazar

## **AGRADECIMIENTOS**

**A LA DOCTORA LUCÍA ELIZABETH DE SALAZAR**, por todo el tiempo y esfuerzo dedicado a la asesoría de este trabajo, gracias.

**AL LICENCIADO OSCAR GUZMÁN**, por su gran aporte a este trabajo y por todos sus consejos.

**A LA LICENCIADA JANETH MINA**, por todo el apoyo desinteresado que brindó a la realización de éste trabajo.

A todas las personas que durante este camino nos orientaron y nos tendieron su mano, apoyo que nos sirvió para llegar al término de éste trabajo.

¡Gracias, a todos sin su ayuda no hubiera sido posible!

## **DEDICATORIA RICARDO VALLE**

**A DIOS TODO PODEROSO:** por ser La Luz que me guía a cada instante por el camino correcto y por ser la fuente de mi vida, que me llena de fé, fuerza y un inmenso Amor.

Gracias porque en estos años, los más intensos, viví tristezas y alegrías, fracasos y penas, temores e ilusiones, y se que en toas ellas estuviste presente y me has permitido llegar al cumplimiento de este Triunfo como persona y como profesional.

Gracias por todo, Diosito, sigamos caminando juntos por la vida y me pongo en tus manos con una confianza infinita, porque se que eres mi Amigo y que me amas.

**A MI MADRECITA QUERIDA:** que con su sacrificio hizo posible que yo estudiara. Por su amor, dedicación y apoyo incondicional, que me ha brindado fuerza y fe en todo momento. Gracias por tus oraciones y consejos, para ver claro mi camino, mi futuro, mis posibilidades y mis limitaciones para no perderme. Gracias por darme fuerzas.

Dios te bendiga madrecita.

**A MIS HERMANOS:** Mauricio, Juan Carlos y Lucía Patricia, por ser parte de mi vida, gracias por todo su apoyo.

**A MI SOBRINA:** Andrea Fernanda, por darme su amor y su cariño cuando lo necesito y ser una luz para ver claro el camino del presente y del futuro.

**A MIS FAMILIARES:** Tíos y Tías, por brindarme consejos e impulsarme a lograr mis metas. Por todo su apoyo y por tenerme siempre presente en sus oraciones.

**A MI AMIGO Y COMPAÑERO DE TESIS:** Miguel Iván, con quien compartí momentos de tristezas y alegrías, fracasos y penas, pero siempre con una meta.

**Ricardo Alfredo Valle López**

## **DEDICATORIA IVÁN VÁSQUEZ**

**A NUESTRO DIOS:** que nos da el entendimiento para descubrir todo lo por Él creado. A Él, que nos da la capacidad de descubrir el por qué de las cosas: la verdad, lo que nos hace libres!

**A MIS PADRES:** Ejemplo de lucha y sacrificio, de entrega para alcanzar las metas. A mis padre, a quienes debo todo lo que soy. Gracias!  
Su sueño se cumplió.

**A MI QUERIDA YOLI:** mi esposa, mi motivación para seguir luchando, mi compañera, con quien camino de la mano por los senderos de la vida.

**A RICARDO VALLE:** no fue fácil, amigo, pero lo logramos.

**Iván Vásquez**

## RESUMEN

Esta investigación consistió en desarrollar un método cromatográfico indicativo de estabilidad, que evidencie y cuantifique la degradación experimentada por Aciclovir en crema cuando es expuesto a condiciones drásticas, como las que podría sufrir durante el tiempo que es almacenado para su comercialización, y que además permita detectar y cuantificar la presencia de productos de degradación de la molécula del activo.

Para este trabajo se seleccionó al Aciclovir en la forma farmacéutica de crema, debido a su gran demanda en nuestro medio.

Puesto que el Aciclovir en crema no es un producto oficial, se desarrolló la metodología propuesta en base a la consulta de bibliografías y al ensayo de diversas condiciones.

Para tener una mayor certeza de que el método propuesto cumple con las expectativas trazadas, se llevó a cabo una aproximación a Validación, en la que se evaluó la Linealidad, Exactitud y la Precisión del mismo.

Cabe señalar la importancia de que la Industria Farmacéutica cuente con métodos indicativos de Estabilidad, sencillos y de bajo costo, para evaluar sus productos, como el que aquí se propone.

En este trabajo, se propone precisamente, un método de fácil aplicación y en el cual se emplean reactivos de bajo costo, además de una técnica sencilla.

Es por ello que se recomienda su empleo en la Industria Farmacéutica para evaluar la Estabilidad, no solo del Aciclovir, sino también la de otros productos farmacéuticos.

## INDICE

Resumen	
Capítulo	
I. Introducción	xiii
II. Objetivos	
1.0 Objetivo General	15
2.0 Objetivos Específicos	15
III. Marco Teórico	
3.1 Generalidades de Aciclovir	16
3.2 Cremas	19
3.2.1 Características de calidad	22
3.3 Estabilidad	24
3.3.1 Método Indicativo de Estabilidad	26
3.4 Validación de Técnicas analíticas	28
3.4.1 Linealidad	29
3.4.2 Exactitud	31
3.4.3 Precisión	32
3.4.4 Rango o intervalo	33
3.4.5 Especificidad	33
3.4.6 Robustez	34
3.4.7 Límite de detección	34

3.4.8 Límite de cuantificación	34
3.5 Cromatografía	34
3.5.1 Cromatografía en Capa Fina	36
3.5.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	43
IV. Diseño Metodológico	
4.1 Tipo de Estudio	46
4.2 Metodología	46
4.2.1 Investigación Bibliográfica	46
4.2.2 Investigación de Campo	47
4.2.2.1 Universo y Muestra	48
4.2.3 Investigación de Laboratorio	49
4.2.3.1 Cromatografía en Capa Fina	49
4.2.3.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución	51
V. Resultados	
5.1 Cromatografía en Capa Fina	64
5.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución	65
VI. Discusión de Resultados	
6.1 Cromatografía en Capa Fina	68
6.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución	68

Aproximación a la Validación	
6.2.1 Linealidad	70
6.2.2 Exactitud	73
6.2.3 Precisión	76
VII. Conclusiones	79
VIII. Recomendaciones	83
Bibliografía	
Anexos	

## INTRODUCCIÓN

La estabilidad de un producto farmacéutico es la capacidad de éste para mantener las mismas propiedades que poseía al momento de su fabricación, en un sistema específico de envase y cierre, los cuales aseguran su identidad, potencia, calidad, eficacia, inocuidad y pureza.

De ahí la necesidad de contar con un método que garantice las propiedades de calidad de los productos farmacéuticos.

Con ésta investigación se pretende proponer un método cromatográfico indicativo de estabilidad para evaluar la calidad de Aciclovir en crema.

Un método indicativo de estabilidad es aquel que puede distinguir entre la molécula intacta y sus productos de degradación, sin que éstos interfieran en la misma.

El Aciclovir es un fármaco antiviral aprobado por el FDA en 1982. Es el prototipo de un grupo de compuestos antivirales utilizados en el tratamiento del virus del herpes simple tipo 1 y 2, así como el de la varicela-zoster.

En el país, el Aciclovir en crema es un medicamento con mucha demanda, y esta recae mayormente en las farmacias privadas. En las

farmacias institucionales no se cuenta con el producto bajo esa forma farmacéutica, ya que no está incluido en el cuadro básico de medicamentos.

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

- Proponer un método cromatografico indicativo de estabilidad para evaluar Aciclovir en crema.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

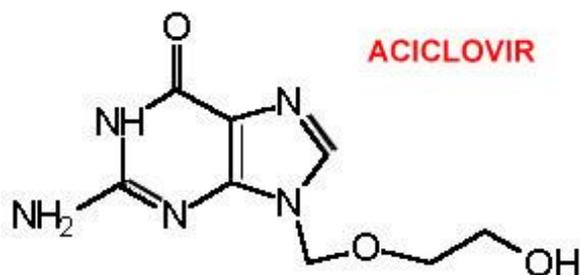
- 2.2.1 Determinar las condiciones que evidencien la degradación del Aciclovir por un método cromatografico: cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución.
- 2.2.2 Demostrar que el método cromatográfico de capa fina, es capaz de detectar la degradación que experimente el fármaco.
- 2.2.3 Determinar por cromatografía en capa fina, la posibilidad de efectuar una cuantificación del Aciclovir.
- 2.2.4 Aplicar cromatografía líquida de alta resolución para determinar si las condición drástica en cuanto a temperatura, permiten evidencia la degradación en el activo
- 2.2.5 Verificar que el método indicativo de estabilidad propuesto es capaz de cumplir con los resultados de él esperados, a través de la evaluación de su linealidad, exactitud y precisión.

### 3.0 MARCO TEÓRICO

#### 3.1 GENERALIDADES DE ACICLOVIR

El Aciclovir es un fármaco antiviral que de acuerdo a su mecanismo de acción se clasifica como un Inhibidor de la transcripción del genoma viral. Específicamente actúa como Inhibidor de la DNA polimerasa viral.

El Aciclovir es un análogo sintético del nucleósido purina 9-[(2hidroxietoxi)metil]guanina, en el cual se ha sustituido el azúcar cíclico de la molécula de guanosina natural por una cadena lateral lineal.



(5)

Se prepara alquilando guanina con benzoato de 2-(clorometoxi)etilo y el éster resultante se hidroliza para obtener el producto final, en forma de cristales blancos que se funden aproximadamente a 257°C. El Aciclovir es soluble en agua en proporción de 1.3 mg/mL. (4)

El Aciclovir se comercializa en diferentes formas farmacéuticas como cápsulas, inyectables, tabletas, gel, ungüento oftálmico y crema. (5)

## **Espectro**

La actividad antiviral del Aciclovir se aplica esencialmente a herpes virus, en especial al herpes simple tipo 1 y 2. El virus de la varicela-zoster es menos sensible.

Los virus del Epstein-Barr y el Citomegalovirus pueden ser inhibidos, pero solo a concentraciones muy altas del medicamento. (4)

## **Mecanismo de Acción**

El Aciclovir inhibe la replicación mediante la inhibición de la síntesis de DNA. La selectividad en esta acción proviene de dos interacciones diferentes del fármaco con las proteínas virales:

1. Para inhibir el DNA el Aciclovir debe ser primero fosforilado por la timidina quinasa viral. La afinidad de Aciclovir por la timidina quinasa codificada por el virus del herpes es 200 veces mayor que por la enzima de los mamíferos.
2. Después de la síntesis de Aciclovir monofosfato (aciclo-GMP), las enzimas de la célula huésped sintetizan aciclo-GDP y aciclo-GTP. Esta aciclo-GTP inhibe la DNA polimerasa viral y se incorpora en el DNA viral en formación finalizando su replicación (5)

## **Resistencia**

La resistencia se produce por alteraciones en la Timidina Quinasa o en la DNA polimerasa. Estas cepas resistentes requieren concentraciones mayores y se presentan principalmente en los pacientes con SIDA. (5)

## **Farmacocinética**

Después de la administración tópica se presenta una mínima absorción percutánea y no se detecta el medicamento en la sangre o en la orina.

El Aciclovir sufre un metabolismo mínimo. Las células infectadas transforman el Aciclovir en su metabolito activo el trifosfato, aunque una parte del medicamento puede ser metabolizada extracelularmente. (7)

## **Toxicidad**

El Aciclovir es muy poco tóxico según se ha demostrado en estudios en animales por varias vías de administración, incluyendo la administración tópica.

En el hombre se han reportado sobredosis de hasta 20 g (100 cápsulas) sin efectos adversos inesperados.

Puede producir encefalopatía en el 1% de los pacientes cuando se administra por vía sistémica, aunque generalmente se da en pacientes

con función renal comprometida. También puede producir flebitis, irritación local, hematuria e hipotensión.

El Aciclovir en forma tópica, en una base de polietilenglicol, puede irritar la mucosa y ocasionar ardor transitorio si se aplica en lesiones genitales. Por vía oral prácticamente no presenta efectos adversos (si acaso náuseas y cefalea ocasionales). <sup>(4)</sup>

### **Usos**

El uso clínico del Aciclovir está limitado al tratamiento de las infecciones por herpes simple, herpes genital y herpes zoster. La administración por vía parenteral es de primera elección en pacientes inmunocomprometidos con lesiones cutáneas y en las mucosas.

El Aciclovir por vía oral está indicado en el tratamiento del primer episodio y los episodios recurrentes de herpes labial y cutáneo, el tratamiento agudo del herpes zoster y la varicela. Cuando el herpes es recurrente se requieren tratamientos prolongados por 1 a 2 meses. <sup>(7)</sup>

### **3.2 CREMAS**

LA USP define a las cremas como formas farmacéuticas semisólidas cuya base consiste en una emulsión aceite en agua (O/W) o dispersiones acuosas microcristalinas de ácidos grasos de alto peso molecular o

alcoholes, que son lavables con agua y que estética y cosméticamente son más aceptables. <sup>(12)</sup>

Las cremas dérmicas son de consistencia blanda y de flujo típico newtoniano. Al aplicarse por masaje presentan escasa resistencia y fluyen con facilidad y de modo uniforme. Su contenido acuoso y su blandura las distinguen de las otras formas tópicas semejantes. <sup>(6)</sup>

Las bases emulsionadas O/W, poseen un alto contenido acuoso, esta agua forma la fase continua de la emulsión, lo que permite que las cremas obtenidas sean lavables solamente con agua y se eliminen fácilmente de la piel o la ropa. Otra ventaja es que pueden ser diluidas con agua y por lo tanto favorecen la absorción en los tejidos afectados. Estas bases representan el tipo más común de bases para pomas. En la actualidad casi todos los productos dermatológicos comerciales están formulados en una base de emulsión o crema.

La base emulsionada de las cremas, puede ser subdividida en tres componentes: fase oleosa, fase emulsiva o emulsionante, y fase acuosa. Gracias a ello el ingrediente farmacéuticamente activo puede ser incluido, a conveniencia, en una de éstas fases o agregado a la emulsión ya formada.

La fase oleosa, también llamada fase interna, está formada generalmente por vaselina junto con uno o más de los alcoholes de más alto peso molecular.

La fase acuosa, casi siempre se encuentra en mayor volumen que la oleosa, y contiene los ingredientes conservadores, el emulsionante, o una parte del sistema emulsionante y humectante. Contienen además estabilizadores, antioxidantes, búferes, u otros ingredientes que pueden ser necesarios para la estabilidad del sistema, controles de pH u otras consideraciones relacionadas con los sistemas acuosos.

El emulsionante o sistema emulsionante en la fórmula de una crema juega un papel muy importante y puede ser no iónico, aniónico, catiónico o anfótero.

El más representativo de los emulsionantes aniónicos es el laurilsulfato de sodio, que junto con otros agentes tenso activos aniónicos son más estables frente a los ácidos y permiten ajustar el pH de la emulsión al rango ideal de 4.5 – 6.5. Debido a su composición química los tenso activos aniónicos pueden resultar irritantes en algunas situaciones.

Entre los emulsionantes catiónicos por lo general la parte catiónica de la molécula es una sal de amonio cuaternario con un derivado de un ácido graso. Éstos tenso activos pueden resultar irritantes para la piel y los ojos, e incompatibles con muchos compuestos, incluyendo los aniónicos.

Los emulsionantes no iónicos poseen la ventaja de permitir la formación de emulsiones con un pH óptimo, debido a que no tienden a ionizarse en solución, además son muy compatibles con los electrolitos en las emulsiones. Estos tenso activos varían desde los lipófilos a los hidrófilos. El sistema emulsionante formado puede incluir un emulsionante lipófilo y uno hidrófilo para producir el llamado balance hidrófilo-lipófilo (HLB).<sup>(4)</sup>

### **3.2.1 CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD**

#### **- Físicas.**

##### **a. Homogeneidad**

Observación visual o manual de una capa delgada de la pomada o crema extendida sobre una superficie plana, con la finalidad de examinar la uniformidad del producto tanto en tamaño, distribución, y forma de los

cristales de los ingredientes insolubles, si los posee o de otras partículas no dispersas. Puede realizarse este examen microscópicamente.

#### **b. Penetrabilidad**

La consistencia se mide con un penetrómetro o cono de Mahler. Éste cono en su vértice posee un ángulo de  $90^\circ$  y pesa 45 g. La dureza se obtiene de la penetración del cono en la crema y se expresa en grados Mahler. La medición se hace a los 3 minutos anotando también la temperatura.

#### **c. pH**

El pH de una crema es factor con mucha influencia sobre la estabilidad de la misma, sobre la viscosidad, la compatibilidad de los conservadores y el pH de piel. Para una crema del tipo O / W , se diluye diez veces con agua y se toma el pH directamente.

#### **- Químicas**

Se realizan los ensayos específicos para cada ingrediente activo.

Además se pueden determinar los valores de los siguientes índices:

- a) Índice de acidez: valores elevados conllevan a hidrólisis con liberación de ácidos grasos.
- b) Índice de saponificación: su valor aumenta con el envejecimiento del producto.

- c) Índice de ésteres: representa la diferencia entre el índice de saponificación y el de acidez. Disminuye con el envejecimiento.
- d) Índice de hidroxilo: proporciona información sobre los grupos hidroxilos liberados durante el envejecimiento.
- e) Índice de yodo: su valor cambia ligeramente con el tiempo.

### - Biológicas

Se realizan para determinar si se producen reacciones indeseables para la piel y la absorción percutánea. Se realizan sobre conejos. (6)

### 3.3 ESTABILIDAD

La estabilidad de un producto farmacéutico puede definirse como la capacidad de una formulación particular, en un sistema de envase/cierre específico, para mantenerse dentro de sus especificaciones físicas, químicas, microbiológicas, terapéuticas y toxicológicas. (4)

La estabilidad se conoce también como el tiempo desde la fecha de fabricación y envasado de la fórmula, hasta que su actividad química o biológica no es menor que un nivel predeterminado de potencia rotulada y sus características físicas no han cambiado en forma apreciable.

El conocimiento de la estabilidad física de una fórmula es muy importante por diferentes razones. Por ejemplo, un producto farmacéutico

puede parecer fresco, elegante y profesional mientras se mantenga en el estante, pero cualquier cambio en el aspecto físico, como desaparición del color o turbidez, etc., puede modificar las propiedades del medicamento.

Además, el principio activo debe poseer intacta su potencia durante toda la vida de almacenamiento esperada de la preparación. Una alteración en el sistema físico puede llevar a la no efectividad del medicamento para el paciente.

Las causas químicas de deterioro de los medicamentos se clasifican en incompatibilidad, oxidación, reducción, hidrólisis, racemización, descarboxilación y otras, que también pueden conducir a modificación de las propiedades del medicamento. (10)

Muchos factores inciden sobre la estabilidad de un producto farmacéutico, como la actividad del o los principios activos, la interacción potencial entre los principios activos y excipientes, el proceso de elaboración, la forma posológica, el sistema de recipiente, revestimiento y cierre, las condiciones ambientales durante el transporte, almacenamiento y manipulación, y el tiempo transcurrido desde la elaboración hasta el uso del producto. (4)

Los principales problemas de estabilidad que se presentan en las cremas son alteraciones físicas de bases y los cambios de consistencia

debidos al envejecimiento o variaciones de temperatura. Las alteraciones físicas de bases consisten en la separación de los componentes líquidos, y se puede observar a simple vista.

La consistencia de una crema es una característica muy importante, pues si es demasiado blanda es incómoda y si es muy dura, su extracción y aplicación resultan difíciles. La consistencia puede verse afectada por variaciones leves de temperatura ( $1^{\circ}\text{C}$  o  $2^{\circ}\text{C}$ ), por lo que los estudios reológicos deben realizarse solamente a temperaturas constantes y controladas.

Otras aspectos que pueden variar durante un estudio de estabilidad son las características organolépticas como color, olor, además del rango de ablandamiento, homogeneidad, distribución del tamaño de las partículas. (4)

### **3.3.1 MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDAD**

Un método indicativo de estabilidad es un procedimiento analítico capaz de distinguir el ingrediente farmacéuticamente activo intacto, de cualquier producto de degradación formado bajo condiciones definidas de almacenamiento durante el período de evaluación de la estabilidad. Además debe ser lo suficientemente sensible para detectar y cuantificar uno o más productos de degradación.

Los métodos indicativos de estabilidad se basan en las características estructurales, químicas o propiedades biológicas de del o de los principios activos del medicamento a analizar.

El objetivo de un método indicativo de estabilidad es generar datos confiables y exactos que proporcionen la información necesaria sobre la aceptación, liberación y estabilidad de un fármaco o medicamento o sobre los estudios farmacocinéticos.

El desarrollo de un método indicativo de estabilidad debe ser precedido de una planificación, así como de la selección de una adecuada técnica diseñada para fijar los requerimientos de estabilidad del ingrediente farmacéuticamente activo. El objeto de la planificación de la aplicación de un método indicativo de estabilidad es vigilar la estabilidad de una droga determinada en un producto terminado, y debe establecer los requerimientos del método indicativo de estabilidad.

Entre ejemplos de técnicas analíticas utilizadas como método indicativo de estabilidad puede mencionarse los métodos cromatográficos de separación, tales como cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución y electroforesis capilar.

Los métodos analíticos indicativos de estabilidad deben ser validados y esta validación debe cumplir con las características de linealidad, exactitud, precisión, reproducibilidad y/o repetibilidad y especificidad.

### **3.4 Validación de Técnicas analíticas**

La validación es el procedimiento a través del cual se establecen, por medio de estudios en el laboratorio, pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un proceso de fabricación o método de control es lo bastante confiable para producir los resultado que de él se esperan, dentro de intervalos definidos.

En la edición número 30 de la Farmacopea de los Estados Unidos de América se define que las características de desempeño que deben evaluarse en el proceso de validación son los siguientes:

- Linealidad
- Exactitud
- Precisión
- Rango o Intervalo
- Límite de cuantificación
- Especificidad
- Límite de detección
- Robustez

### 3.4.1 Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración del analito, o que sean proporcionales a través de una transformación matemática bien definida.

Para el ensayo de linealidad, inicialmente analiza visualmente la curva de calibración que relaciona la respuesta (que puede ser área, altura, absorbancia, etc), con la concentración o cantidad de analito. Si se observa una relación lineal a simple vista, se confirman los resultados de la prueba a través de métodos estadísticos adecuados como la recta de regresión calculada por el método de ajuste de los mínimos cuadrados. Mediante el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales se pueden sacar valiosas conclusiones. Así:

- Si la recta no pasa por el origen de coordenadas, el método evaluado sufre de un error sistemático.
  
- Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta, significa que la linealidad no es buena o que el error experimental es importante y los límites de confianza serán amplios

- El coeficiente de correlación expresa el grado de relación o cercanía entre las variables (concentración), y (respuesta). Su valor máximo es 1.
- Si el valor del coeficiente de correlación es cercano a la unidad, significa que existe correlación con una probabilidad elevada.

Fórmula para calcular el coeficiente de correlación (  $r$  ):

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left( \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left( \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right)}}$$

En donde  $n$  es el número de mediciones,  $x$  la concentración, e  $y$  el valor medido en el ensayo.

Fórmula de la curva de regresión:

$$Y = bX + a$$

En donde:

a es la ordenada al origen, y se calcula con

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

b es la pendiente y se calcula con:

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}$$

### 3.4.2. Exactitud

A la exactitud también se le conoce con el nombre de error sistemático o tendencia y expresa la capacidad de un método analítico para proveer resultados lo más próximos posibles al valor verdadero.

Una diferencia pequeña entre el valor obtenido y el valor verdadero indica una buena exactitud, mientras que si la diferencia es grande la exactitud será inadecuada.

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

### 3.4.3 Precisión

Se refiere al grado de correlación o proximidad entre los resultados individuales obtenidos al aplicar repetidamente el método a varias muestras.

La precisión de un procedimiento analítico generalmente se expresa como la desviación estándar o como el coeficiente de variación de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación.

Cálculos necesarios:

- Media de los resultados ( $\bar{X}$ ):

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

- Desviación estándar de los resultados ( S ):

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

- Coeficiente de variación (Cv):

$$Cv = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

#### **3.4.4. Rango o Intervalo**

Corresponde a la amplitud entre las concentraciones superior e inferior, incluyéndolos, del analito, en que se cumplen los parámetros de linealidad, precisión y exactitud del método. El intervalo se expresa en las mismas unidades que los resultados de la prueba, como porcentaje, partes por millón, etc. obtenidos a través del procedimiento analítico.

#### **3.4.5. Especificidad**

Especificidad es la capacidad de un método analítico para medir específica y exactamente un analito, sin que interfieran impurezas, productos de degradación o excipientes que pudieran estar presentes en el compuesto analizado.

#### **3.4.6. Robustez**

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no resultar afectado por posibles variaciones menores o variaciones significativas en los resultados obtenidos por el método y que puedan impedir la confiabilidad de éste.

#### **3.4.7. Límite de Detección**

Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones en que se desarrolla el método. Generalmente se expresa en forma de concentración de analito en la muestra.

#### **3.4.8. Límite de Cuantificación**

El límite de cuantificación es la cantidad mínima de analito presente en la muestra que se puede determinar con precisión y exactitud en las condiciones experimentales del método. Por lo general el límite de cuantificación se expresa en forma de concentración de analito en la muestra.

### **3.5 CROMATOGRAFÍA**

La Farmacopea de los Estados Unidos define la cromatografía como un procedimiento por el cual disolventes pueden ser separados a través de un proceso de migración dinámica diferencial en un sistemas

consistente de dos o más fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada y en la cual la sustancia individual presenta diferentes movilidades por razón de diferencias en adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular, o densidad de carga iónica. Las sustancias individuales así obtenidas pueden ser identificadas o determinadas por métodos analíticos. (12)

La técnica general cromatográfica requiere que un soluto experimente distribución entre dos fases, una de ellas fija (fase estacionaria), la otra en movimiento (fase móvil). El soluto es transferido por la fase móvil a través del medio hasta que emerge eventualmente separado de los otros solutos que son eluidos tarde o temprano. Generalmente, el soluto es transportado a través del medio de separación por un flujo de corriente de un disolvente líquido o gaseosos conocido como el “eluyente”. La fase estacionaria puede actuar a través de adsorción, como en el caso de adsorbentes tales como alúmina activada, resinas de intercambio iónico y sílica gel, o puede actuar por disolución del soluto, separando éste último entre las fases estacionaria y móvil. En el último proceso, una capa líquida retenida en un soporte inerte sirve como la fase estacionaria. Partición es el mecanismo predominante de separación en cromatografía gas-líquido, las cromatografías en papel y las formas de cromatografía en columna son designadas como cromatografía líquido-líquido. En la

práctica, la separación frecuentemente resulta de una combinación de efectos de adsorción y partición.

Los tipos de cromatografía útiles en análisis cualitativos y cuantitativos son Cromatografía de Columna, Cromatografía de Gas, Cromatografía de Papel, Cromatografía de Capa Fina y Cromatografía Líquida Presurizada (común mente llamada de alta presión o cromatografía líquida de alta resolución). Las Cromatografías en papel y en capa fina, son ordinariamente más usadas para propósitos de identificación, debido a su conveniencia y simplicidad. La Cromatografía en columna ofrece una amplia posibilidad de elección de fases estacionarias y es utilizada para la separación de compuestos individuales, en cantidad de mezclas. Tanto la Cromatografía de gases como la Cromatografía líquida de alta resolución requieren aparatos más sofisticados y casi siempre proveen métodos de alta precisión que pueden identificar y cuantificar muy pequeñas cantidades de material. (12)

### **3.5.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA**

A pesar de la introducción de otras técnicas cromatográficas, hoy en día, la utilización de la cromatografía en capa fina no ha disminuido, por el contrario parece resurgir, gracias al uso de nuevas fase estacionarias e instrumentación muy perfeccionada.

En la cromatografía en capa fina, el adsorbente es una capa relativamente delgada y uniforme, de material seco, finamente pulverizado, aplicado sobre una hoja o plato de cristal, plástico o metal; el cristal es el más comúnmente empleado. La cubierta sobre plato puede ser considerada como una “columna cromatográfica abierta” y la separación que se lleva a cabo puede basarse en absorción, partición, o una combinación de ambos efectos, dependiendo del tipo de soporte.

El fenómeno de adsorción en capa fina puede considerarse como una técnica para separar compuestos de una mezcla. Se puede clasificar dentro de los métodos de cromatografía en fase líquida.

Los resultados de la separación obtenida mediante un método cromatográfico están en un cromatograma. Para poder evaluar la calidad de la separación entre diversos sistemas cromatográficos por una parte y entre diversos métodos cromatográficos por otra, es necesario medir una separación según ciertos parámetros; estos parámetros pueden modificarse respectivamente para obtener una mejor separación. (9)

Cada cromatograma que se obtiene para un mismo adsorbente, un mismo eluyente y en condiciones experimentales idénticas presenta un mismo aspecto: cada compuesto se transporta de la misma manera.

Para un sistema cromatográfico dado es posible caracterizar un soluto por la distancia que recorre con respecto al frente del disolvente.

Así, para distancias del frente del disolvente variables se caracteriza la migración de un soluto por la relación (rate factor, Rf o relación frontal).

$$R_f = \frac{\text{distancia que recorre el soluto}}{\text{distancia que recorre el disolvente}} = \frac{X_i}{L}$$

(9)

### **Mecanismo**

Si se pone en contacto un líquido con una superficie sólida, se forma una capa monomolecular en la interfase que se origina por la adsorción de las moléculas de disolventes o solutos: las interacciones intermoleculares sólido-líquido son más intensas que las interacciones intermoleculares líquido-líquido para una molécula, ésta se adsorbe y se estabiliza el sistema. Este proceso continúa hasta que se establece un equilibrio.

En cromatografía en capa fina intervienen enlaces intermoleculares de poca energía que pueden ser de tres tipos:

- fuerzas de Van der Waals
- enlaces por puentes de hidrógeno
- complejos de transferencia de carga.

En este proceso sólo interviene la fisisorción. Una molécula fisisorbida no pierde su identidad.

Estas interacciones originan equilibrios reversibles, sin embargo pueden existir otras fuerzas en el caso de soluciones específicas como fuerzas electrostáticas, fuerzas entrópicas, fuerzas estructurales, que tienen que ser tomadas en cuenta.

Los solutos de naturaleza química diferente no tienen las mismas energías de adsorción y se adsorben por un eluyente de energía de adsorción conveniente y por un depósito de una mezcla de solutos sobre un sólido poroso llamado adsorbente.

La migración por capilaridad del eluyente a través del adsorbente arrastra selectivamente estos solutos según su naturaleza química. Los compuestos con una gran energía de adsorción se fijan fuertemente, el

coeficiente de distribución es bajo, el eluyente los arrastra poco y migran poco.

En cromatografía en capa fina los solutos se separan por migración del eluyente en el adsorbente, fenómeno que ocurre solamente para solutos de poca energía de adsorción.

Si el adsorbente es el mismo, la migración de un compuesto depende exclusivamente de la naturaleza del eluyente.

La fase fija o adsorbente que generalmente se escoge es un gel de sílice. Los enlaces que se establecen se deben a los grupos silanoles libres. También se utilizan para este fin aluminio, celulosa, carbón activado, entre otros.

En el caso de la gel de sílice, los grupos silanoles polares pueden, interactuar con compuestos moleculares que poseen grupos químicos del tipo Carboxilo (COOH), Oxidrilo (OH), Amino (NH<sub>2</sub>), Aminas terciarias (NR'R'R''), Sulfonamidas (SO<sub>2</sub>NHR).

La fase móvil o eluyente es generalmente un disolvente común o una mezcla de ellos.

En cromatografía en capa fina las placas listas para usar pueden conseguirse con diversos proveedores. Constan de un soporte rígido o suave (placa de vidrio, hoja de aluminio, de poliamida, etc.) sobre la que se deposita la fase estacionaria en la forma de una capa delgada (espesor de 200 a 250  $\mu\text{m}$ ).

Capas de partículas sólidas son aglomeradas por un ligante orgánico o mineral que sirve también para asegurar la adhesión sobre el soporte inerte. Con las placas listas para usar sólo se pueden realizar cromatografías líquido/sólido.

Las dimensiones comunes de la superficie de la placa son:

20 x 20 cm

10 x 5 cm (l x a)

10 x 20 cm (l x a)

10 x 10 cm

Las placas cromatográficas pueden fabricarse artesanalmente utilizando soportes cromatográficos a granel, por parte de quien las usa. El protocolo experimental para preparar las capas finas de la fase estacionaria se encuentra en obras especializadas (como la Farmacopea de los Estados Unidos). Pero la reproducibilidad depende mucho de la habilidad del experimentador y no puede compararse con las de las placas listas para usar disponibles con los proveedores. <sup>(9)</sup>

En la cromatografía en capa fina común, la solución de la muestra de la sustancia a analizar se deposita con un capilar o una jeringa a corta distancia (1 cm en general) del extremo de la capa. El volumen que se deposita es muy pequeño (1 a 5  $\mu\text{l}$ ) y se debe cuidar no deteriorar la capa de la fase estacionaria con la punta de la jeringa o del capilar.

La mancha que se obtiene también debe ser circular y lo más pequeña posible. El depósito ideal es el más pequeño posible: de 0.5 a 5.0  $\mu\text{l}$ . Debe evitarse dañar la superficie de la placa con la punta de la jeringa o del capilar.

El depósito de la muestra debe hacerse en solución en un disolvente cuya fuerza eluyente sea mucho menor que la del disolvente de revelado, es decir, si la fase estacionaria es polar, el depósito debe efectuarse en el disolvente menos polar posible compatible con la solución. (9)

Ventajas de la Cromatografía en capa fina:

- Versátil
- Reproducible
- Rápido
- Sencillo
- Bajo costo
- Detección de compuestos no coloreados naturalmente

- Detección e identificación de mezclas complejas
- Excelente para detectar impurezas

### **3.5.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

La cromatografía líquida de alta resolución, es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y en una fase móvil líquida. La separación se lleva a cabo por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, dependiendo del tipo de fase estacionaria empleada. Los compuestos a ser analizados deben disolverse en un disolvente adecuado y la separación se lleva a cabo a temperatura controlada. Debido a esto muchas drogas no volátiles o térmicamente inestables pueden ser cromatografiadas sin sufrir descomposición o necesitar de tratamiento previo para formar derivados volátiles.

A partir de la década de 1990 la cromatografía líquida de alta resolución se convirtió en uno de los métodos de análisis más empleados, debido a su capacidad de separación en un amplio rango de tipos de muestras, por su alto poder de resolución, velocidad y su capacidad de detección a nivel nanomolecular. En la actualidad se emplea a nivel de investigaciones farmacéutica en:

- Purificación de productos naturales y/o sintéticos

- Caracterización de metabolitos
- En ensayos de ingredientes activos, impurezas, productos de degradación y en ensayos de disolución
- En estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos (8)

El equipo que forma un sistema de HPLC incluye un sistema de bombeo, un inyector, una columna cromatográfica, un detector y un impresor o procesador de datos. La parte principal del sistema es la columna, en la cual ocurre la separación. Puesto que la fase estacionaria esta formada por micropartículas, se necesita una bomba de alta presión para hacer fluir la fase móvil a través de la columna. El proceso cromatográfico inicia con la inyección del soluto en la columna. La separación de los compuestos ocurre al ser bombeados el analito y la fase móvil a través de la columna. Cada componente eluido de la columna es registrado como un pico por el procesador de datos o el impresor. (9)

Entre las ventajas de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución se pueden mencionar:

- empleo de disolventes orgánicos y acuosos
- el fármaco no se descompone en la columna
- empleo de detectores no destructivos, lo que permite aislar, identificar y cuantificar el analito
- se utiliza pequeñas cantidades de muestra

- rapidez de análisis
- se pueden realizar estudios detallados y profundos de sistemas cinéticos complejos
- Obtención de productos de degradación que permite identificar y elucidar su estructura
- Con una sola columna es posible separar sustancias polares, iónicas, ionizables y no polares, solamente modificando la composición de la fase móvil.

## **4. DISEÑO METODOLÓGICO**

### **4.1 Tipo de estudio**

Experimental-analítico:

Experimental porque parte de la investigación se realizó en instalaciones de laboratorio, haciendo uso de diferentes equipos instrumentos y cristalería.

Analítico, ya que cuantifica a la molécula de Aciclovir, a la degradación que sufre bajo condiciones drásticas, así como también cuantifica al principal producto de degradación del Aciclovir, la Guanina.

### **4.2 Metodología**

La metodología se desarrolló en tres etapas:

4.2.1 Investigación Bibliográfica

4.2.2 Investigación de Campo

4.2.3 Investigación de Laboratorio

#### **4.2.1 Investigación Bibliográfica**

Esta se efectuó a través de la consulta en diferentes bibliotecas ubicadas en:

- Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador
- Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador
- Laboratorios Especializados en Control de Calidad, LECC.

- A demás se consultó documentos electrónicos.

#### 4.2.2 Investigación de Campo

Entre los meses de mayo y junio de 2005 se realizó una investigación en farmacias del centro de San Salvador para conocer sobre las marcas de Aciclovir en crema existentes en el mercado, para ello se utilizó una guía de entrevista en la que se investiga sobre los tipos de formas farmacéuticas en que se comercializa el Aciclovir, los laboratorios, nacionales o extranjeros que lo fabrican, el precio de las distintas presentaciones del producto (Ver Anexo 1).

En ésta investigación se comprobó la existencia en el mercado de siete marcas diferentes de Aciclovir en crema, las cuales se enlistan en la tabla No 1. Con esta investigación se comprobó la demanda que éste producto posee en el tratamiento del herpes, razón por la cual se decidió trabajar con Aciclovir en la forma farmacéutica de crema.

**Tabla N° 1: Marcas de Aciclovir en crema existentes en el mercado**

Fabricante	Presentación	Concentración	Precio
1	Tubo de 10 g	5%	\$ 8.55
2	Tubo de 15 g	5%	\$ 8.00
3	Tubo de 15 g	5%	\$ 22.00
4	Tubo de 10 g	5%	\$ 4.42
5	Tubo de 5 g	5%	\$ 9.70

**Tabla N° 1: Continuación**

Fabricante	Presentación	Concentración	Precio
6	Tubo de 15 g	5%	\$ 9.80
7	Tubo de 10 g	5%	\$ 12.85

**4.2.2.1 Universo y Muestra**

**Universo:** siete marcas de Aciclovir crema.

**Muestra:**

$$N^{\circ} \text{ mx} = P \sqrt{\text{Universo}}$$

En donde:

P = Probabilidad

7mx = Número de muestras de marcas de cremas conocidas

$$N^{\circ} \text{ mx} = 0.5 \sqrt{7 \text{ mx}}$$

$$N^{\circ} \text{ mx} = 1.32 \text{ marcas}$$

El cálculo anterior nos dice que se deben analizar 1.32 muestras comercializadas, lo que equivale a un fabricante que elabora el producto.

El producto fue adquirido por compra del mismo en farmacia.

### **4.2.3 Investigación de Laboratorio**

#### **4.2.3.1 Cromatografía en Capa Fina**

Para determinar si existía la posibilidad de obtener una separación del Aciclovir a través de la técnica de cromatografía en capa fina se inició tratando al estándar de referencia de Aciclovir con esta técnica, procediéndose de la de la siguiente manera:

##### **a) Preparación de la cámara cromatográfica:**

Se colocó dentro del tanque cromatográfico 50.0 mL de la fase móvil, la cual consistía del sistema de solventes siguiente: ciclohexano: tolueno: dietilamina (75:15:10). Se tapó la cámara y se dejó saturar durante una hora.

##### **b) Preparación del estándar de trabajo de Aciclovir:**

Se pesó 25.0 mg de estándar de trabajo, se transfirió a un frasco volumétrico de 100.0 mL y se le adicionó 50.0 mL de dimetil sulfóxido

y se agitó hasta disolver por completo. Luego se aforó con el mismo solvente.

c) Siembra de las placas:

Para este trabajo se utilizó cromatofolios de aluminio de dimensiones 5 x 10 cm, y sílica gel 60 f<sub>254</sub> como fase estacionaria.

- Con una micro jeringa se midió 1.0 µL de la solución del estándar de referencia, que equivale a 0.25 µg, y sobre la marca que indica el punto de siembra, se dejó caer gota a gota esta solución, teniendo el cuidado de dejar secar cada gota antes de aplicar la siguiente gota.

d) Desarrollo del cromatograma:

Luego de que la solución del estándar de trabajo, sembrada en el cromatofolio, estuvo seca, se colocó el cromatofolio dentro de la cámara cromatográfica. Se cubrió el sistema y se dejó que el solvente ascendiera hasta que su frente alcanzara la línea horizontal que señalaba la altura límite y que además indicaba el fin del desarrollo del cromatograma.

Se extrajo el cromatofolio del tanque y se dejó secar a temperatura ambiente.

e) Determinación final:

Se observó el cromatofolio bajo la luz de una lámpara Ultra Violeta de onda corta (254 nm), comprobando que la solución del estándar de Aciclovir no se había desplazado del punto de siembra, lo que indicaba que no se separó el activo por medio de este método cromatográfico.

Se aplicó diferentes cantidades en el cromatofolio en un rango de 1.0  $\mu\text{L}$  a 2.0  $\mu\text{L}$ , en distintas concentraciones y en ninguno de los casos observó desplazamiento.

Por ello se consideró que la técnica de cromatografía en capa fina no era el método más conveniente para efectuar separación de Aciclovir y por ende no podía ser aplicado como método indicativo de estabilidad.

#### **4.2.3.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución**

Al no obtener resultados positivos con la técnica de cromatografía en capa fina, se ensayó con distintas condiciones cromatográficas para la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, con la finalidad de establecer la posibilidad de desarrollarlas en el análisis de Aciclovir en crema.

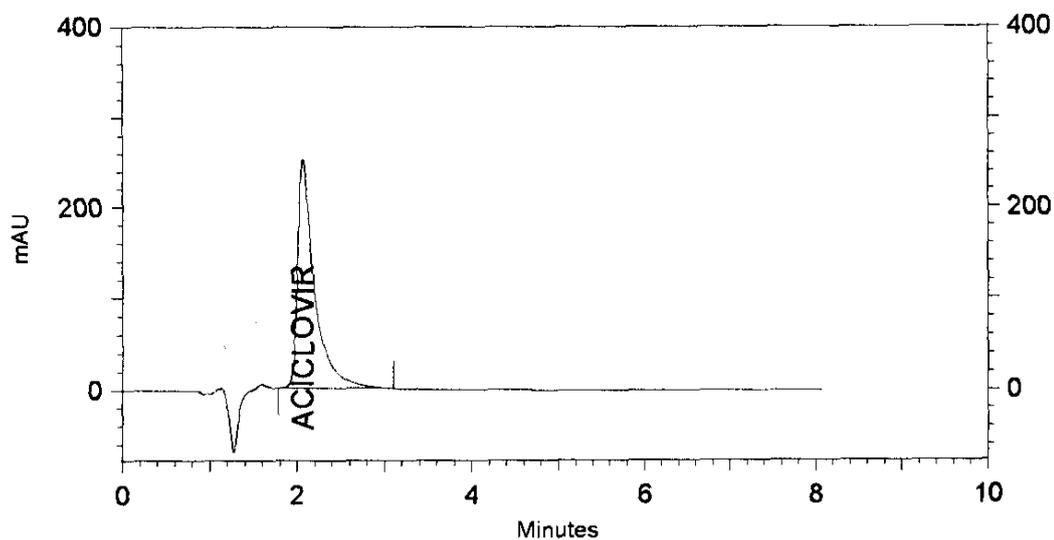
Se utilizó estándar de referencia USP de Aciclovir, se inyectó en el equipo, al observar el cromatograma se observa una señal que presenta un tiempo de retención de 2.10 minutos.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos tras la inyección por triplicado de dos pesadas independientes del estándar sin degradar.

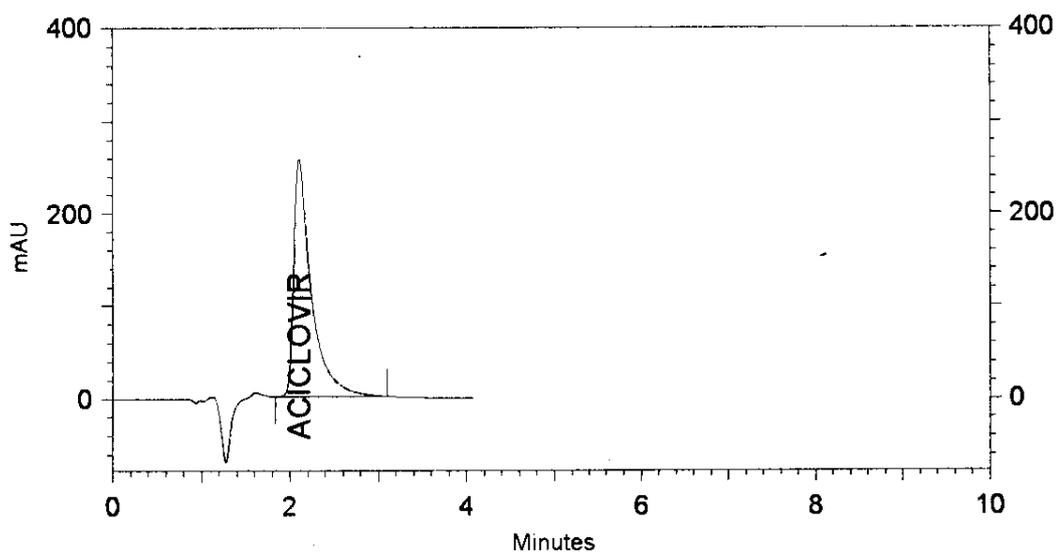
**Tabla Nº 2: Resultados del Estándar de Referencia de Aciclovir.**

	Estándar de Referencia 1 No degradado		Estándar de Referencia 2 No degradado	
	%	Área	%	Área
3	99.24	13377008	100.08	13641871
2	99.53	13416729	99.93	13620479
1	99.68	13437105	99.73	13594070

A continuación se presenta el cromatograma obtenido para cada una de las pesadas del estándar sin degradar.



**Figura N° 1: Cromatograma de Estándar de Referencia 1, no degradado**



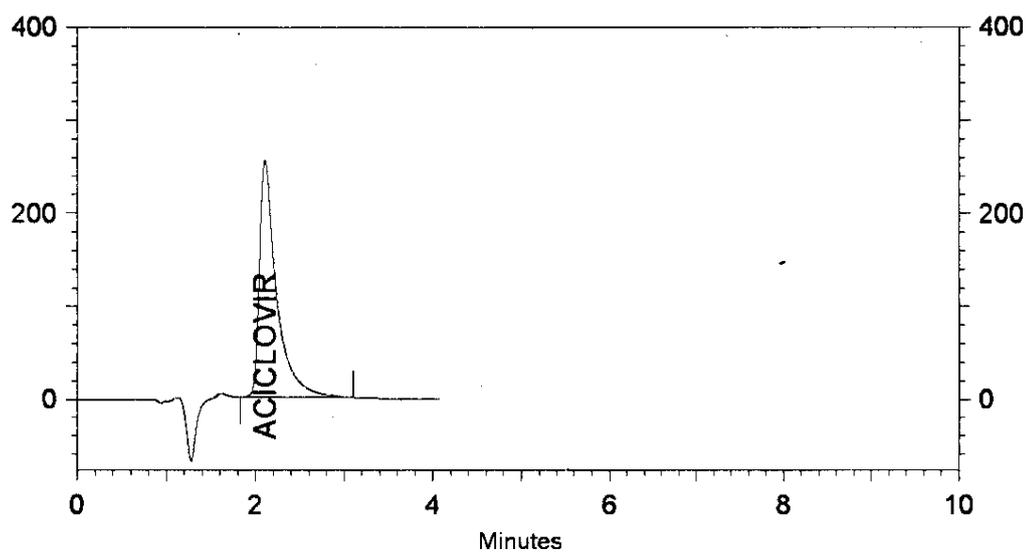
**Figura N° 2: Cromatograma de Estándar de Referencia 2 no degradado**

Se analizó, por triplicado, una muestra de Aciclovir en crema marca "X", que al igual que el estándar, se llevo en dos pesadas independientes e inyectada por triplicado, obteniéndose en el cromatograma una señal con tiempo de retención de 2.11 y 2.14 minutos respectivamente en cada muestra.

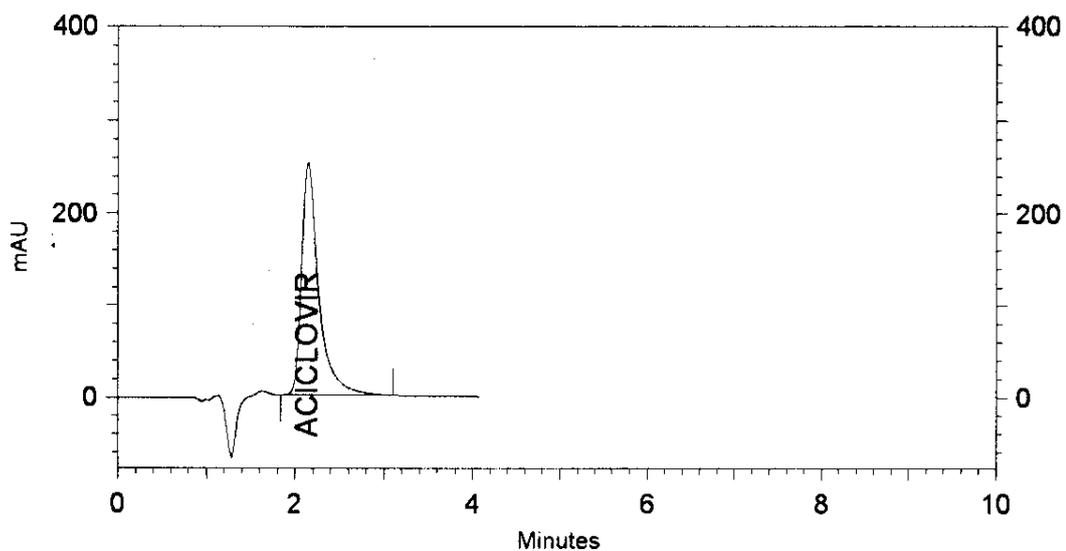
**Tabla Nº 3: Resultados de muestras de Aciclovir en crema, no degradadas**

	Muestra 1		Muestra 2	
	No degradada		No degradada	
	%	Área	%	Área
1	100.71	13727098	92.22	13524300
2	100.64	13717042	99.37	13544577
3	100.29	13670555	99.50	13561830

A continuación se presenta el cromatograma obtenido para cada una de las pesadas independiente de la muestra sin degradar.



**Figura N° 3: Cromatograma de la muestra 1 en crema sin degradar**



**Figura N° 4: Cromatograma de la muestra 2 en crema sin degradar**

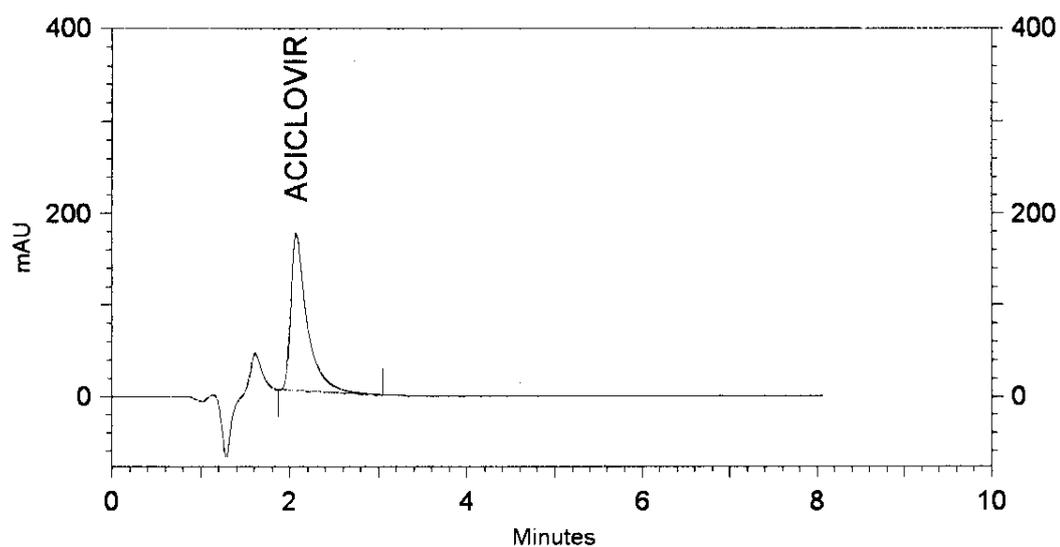
Los resultados anteriores evidenciaban la capacidad del método de detectar a la molécula de Aciclovir, pero para que éste pudiera ser considerado un método indicativo de estabilidad, era necesario comprobar su capacidad de detectar a la molécula del activo sin que interfieran otros componentes de la fórmula o sus productos de degradación.

Para comprobarlo, se sometió tanto al estándar de referencia y a la muestra de producto terminado a un proceso de degradación,

Para el Aciclovir, la literatura reporta que su principal producto de degradación es la Guanina, la cual ve reflejada en los cromatogramas obtenidos para el estándar de referencia y la muestra de crema que experimentaron degradación, una vez sometidos a condiciones drásticas.

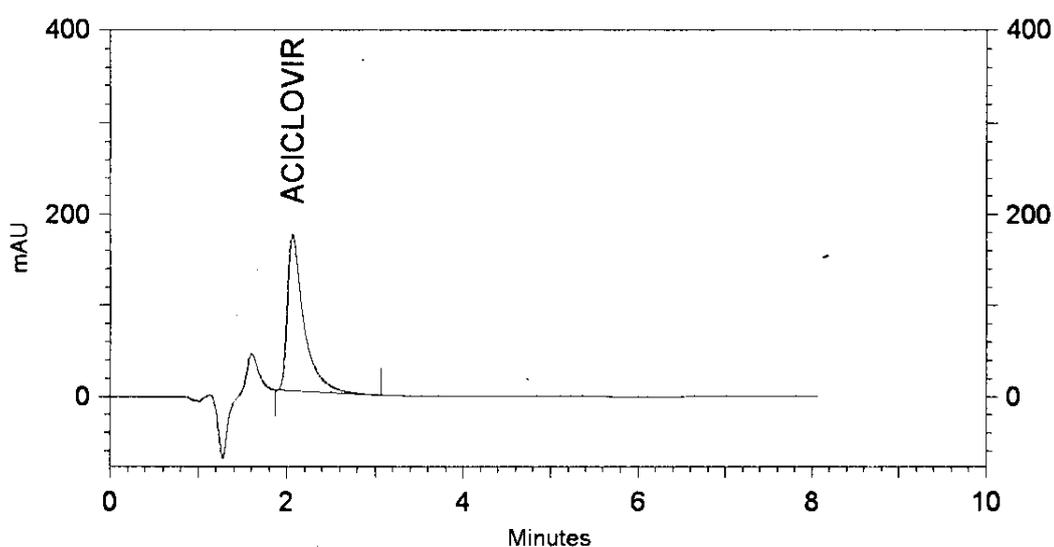
Se procedió a inyectar por triplicado al estándar de referencia y la crema degradados. En los cromatogramas se observó dos picos.

Los picos obtenidos corresponden a la molécula de Aciclovir con un tiempo de retención de 2.10 minutos y su producto de degradación, la Guanina, con tiempo de retención de 1.64 minutos.



**Figura N° 5: Cromatograma de Estándar de Referencia degradado, en que se observa la formación del producto de degradación.**

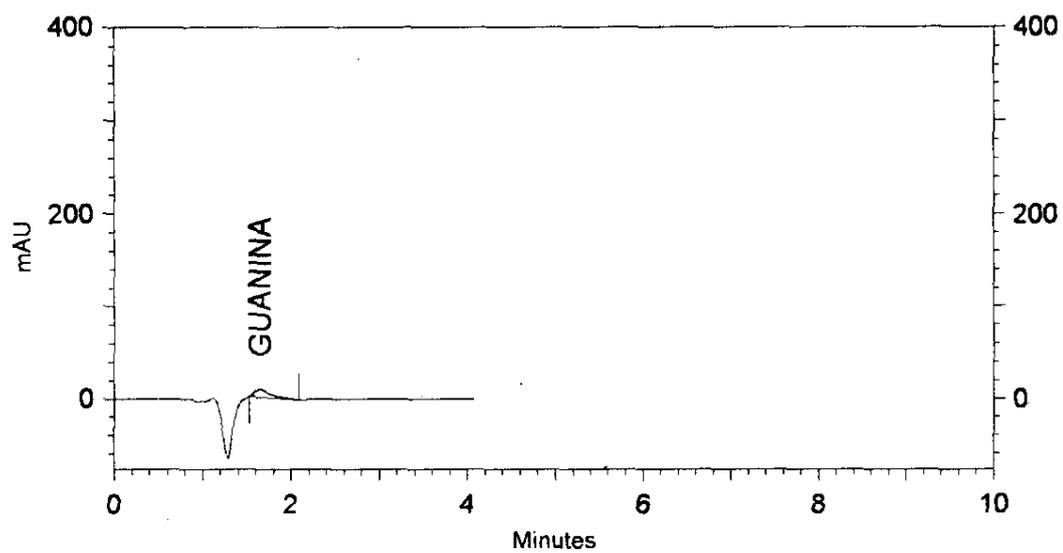
Se presenta a continuación el cromatograma obtenido para la muestra degradada, en que se visualiza en el mismo la formación del pico secundario que corresponde a su producto de degradación.



**Figura N° 6: Cromatograma de la muestra de crema degradada en que se observa la formación del producto de degradación.**

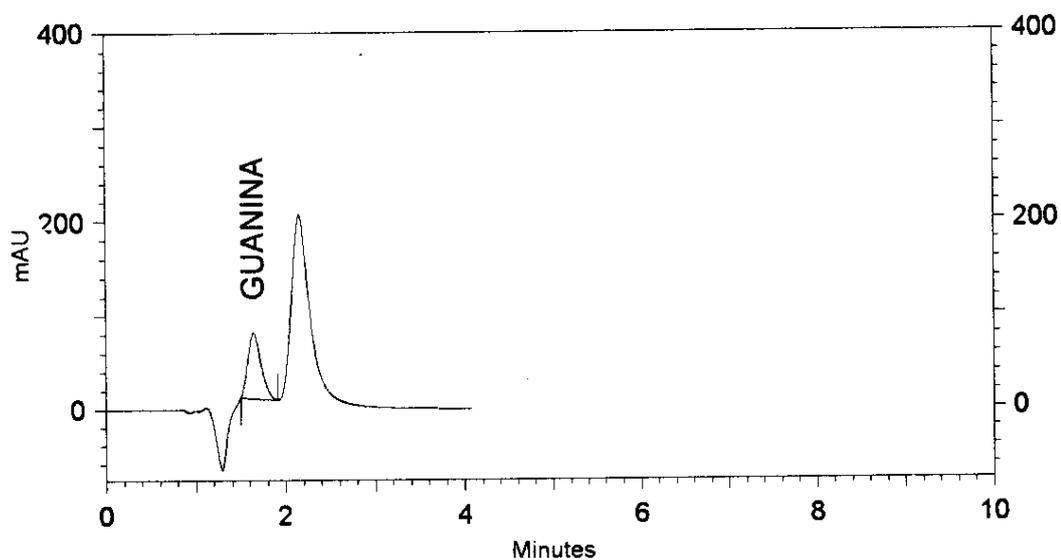
Para verificar que el pico secundario correspondía a la molécula de Guanina, se procedió a inyectar por triplicado el estándar de Guanina y el estándar de referencia degradado.

En el cromatograma del estándar de Guanina se observa un solo pico con un tiempo de retención de 1.64 minutos.



**Figura N° 7: Cromatograma de Estándar de Guanina**

En el cromatograma del estándar de referencia degradado, se observan dos picos, uno que presenta un tiempo de retención de 2.10 minutos y que corresponde a la molécula de Aciclovir y el otro con un tiempo de retención de 1.64 minutos que corresponde a la molécula de Guanina.



**Figura N° 8: Cromatograma de Estándar de Referencia degradado, en que se observa la formación del producto de degradación.**

#### **Técnica de Análisis.**

##### **a) Preparación de la muestra:**

Se pesó de crema el equivalente a 25.0 mg de Aciclovir, se transfirió a un frasco volumétrico de 100 mL y se le adicionó 50.0 mL de ácido clorhídrico 0.1 N. Se aplicó ultrasonido por 5 minutos. se aforo con ácido clorhídrico 0.1 N.

De la solución anterior se midió 10.0 mL y se aforo a 50.0 mL con ácido clorhídrico 0.1 N, obteniendo una concentración final de 50.0 µg/mL.

Se repitió el proceso para la muestras que estaría sujeta al proceso de degradación.

b) Preparación de solución de estándar.

Se pesó 25.0 mg de estándar de referencia, se transfirió a un frasco volumétrico de 100 mL y se le adicionó 50.0 mL de ácido clorhídrico 0.1 N. Se aplicó ultrasonido por 5 minutos. Se aforo con ácido clorhídrico 0.1 N.

De la solución anterior se midió 10.0 mL y se aforo a 50.0 mL con ácido clorhídrico 0.1 N, obteniendo una concentración final de 50.0 µg/mL.

Se repitió el proceso para el estándar que estaría sujeto al proceso de degradación.

c) Preparación de estándar de Guanina.

Se pesó 10.0 mg de Guanina y se transfirió a un frasco volumétrico de 100 mL, se le adicionó 25.0 mL de ácido clorhídrico 0.1 N, se le aplicó ultrasonido por 5 minutos y se aforó con agua. De la dilución anterior se midió 1.0 mL y se transfirió a un frasco volumétrico de 100 mL y se llevó

a aforo con ácido clorhídrico 0.1 N para obtener una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$

d) Análisis de Estándar de y muestra de crema sin degradar.

Cada una de las soluciones obtenidas en a) y b) se inyectaron por triplicado en el cromatógrafo bajo las siguientes condiciones:

- Equipo: HPLC Merck Hitachi Elite
- Detector: UV
- Longitud de onda : 254 nm
- Columna: Rp-18 Lichrograph 125-4 mm
- Temperatura: 40°C
- Fase móvil: Acetato de sodio 0.5 M, pH 3.

Se preparó pesando 41.01 g de acetato de sodio anhidro, se transfiere a frasco volumétrico de 1 litro se agrega 200 ml de agua, se acidifica con ácido fosforico a pH 3, se afora con agua a 1 litro.

- Volumen inyectado: 20  $\mu\text{L}$
- Flujo: 1mL/min.

e) Proceso de Degradación.

Una de las soluciones preparadas en los literales a) y b) se sometieron a condiciones drásticas para favorecer la degradación.

Las condiciones de degradaron fueron las siguientes:

Tiempo 4 minutos, a ebullición.

- f) Análisis de Estándar de referencia y Muestra de crema degradados.

Se inyectó por triplicado las soluciones degradadas del estándar, de la muestra de crema y de Guanina

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Cromatografía en Capa Fina

Respecto al análisis en Cromatografía en Capa Fina, se obtuvieron los siguientes resultados:

1. No fue posible determinar las condiciones que evidencien la degradación del Aciclovir utilizando cromatografía en capa fina.
2. No se aplicó condiciones drásticas al ingrediente activo, ya que se trabajó primero con el estándar intacto sin obtener resultados positivos.
3. No fue posible determinar la posibilidad de efectuar una cuantificación del Aciclovir por cromatografía en capa fina.
4. No se pudo demostrar que el método cromatográfico en capa fina sea capaz de detectar la degradación que experimente el Aciclovir, pues no se obtuvo resultados ya que no se presentó migración del estándar sobre el cromatofolio.

## 5.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Respecto al análisis por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, podemos decir lo siguiente:

Luego de aplicar Cromatografía Líquida de Alta Resolución en el activo y en la forma farmacéutica, degradados y sin degradación, se obtuvo los siguientes resultados:

La tabla 4 representa las áreas y el porcentaje obtenidos al efectuar el proceso de separación por HPLC para el estándar de referencia degradado y sin degradar.

**Tabla Nº 4: Resultados del análisis del Estándar de Referencia de Aciclovir degradado y sin degradar**

Estándar no degradado				
Inyecciones	Estándar 1		Estándar 2	
	%	Área	%	Área
1	99.68	13437105	99.73	13594070
2	99.53	13416729	99.93	13620479
3	99.24	13377008	100.08	13641871

Estándar degradado				
Inyecciones	Estándar 1		Estándar 2	
	%	Área	%	Área
1	64.98	8759384	65.03	8765846
2	65.00	8762239	65.10	8775698
3	64.94	8753778	65.15	8775724

La tabla 5 representa la áreas y el porcentaje obtenidos al efectuar el proceso de separación por HPLC para la muestra de Aciclovir degradada y sin degradar.

**Tabla Nº 5: Resultados del análisis de la Muestras de dos lotes distintos de Aciclovir en crema degradada y sin degradar**

<b>Muestra de Aciclovir no degradada</b>				
<b>Inyecciones</b>	<b>1</b>		<b>2</b>	
	<b>%</b>	<b>Área</b>	<b>%</b>	<b>Área</b>
1	100.71	13727098	92.22	13524300
2	100.64	13717042	99.37	13544577
3	100.29	13670555	99.50	13561830

<b>Muestra de Aciclovir degradada</b>				
<b>inyecciones</b>	<b>1</b>		<b>2</b>	
	<b>%</b>	<b>Área</b>	<b>%</b>	<b>Área</b>
1	65.21	8790080	61.69	8315171
2	65.39	8814497	61.53	8293906
3	65.42	8818239	61.55	8296278

En la tabla N° 6 se indican los porcentajes obtenidos de Guanina, como productos de degradación en el estándar y en la muestra sujetos a degradación.

**Tabla N° 6: Producto de degradación en estándar y en crema**

<b>Porcentaje de Guanina en Estándar y Muestra</b>					
	<b>Estándar</b>		<b>Crema</b>		
<b>Inyecciones</b>	<b>%</b>	<b>Área</b>	<b>Inyecciones</b>	<b>%</b>	<b>Área</b>
1	11.2	2688139	1	11.91	2859642
1	11.0	2640364	1	12.05	2893086
1	10.91	2619925	1	11.82	2837370

## **6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### **6.1. Cromatografía en Capa Fina.**

Por medio de cromatografía en capa fina en el estándar de trabajo de Aciclovir no se observó migración alguna de éste sobre la placa cromatográfica, por lo que no fue posible establecer con éste método condiciones cromatográficas que cuantifiquen dicha molécula, que evidencien la degradación del Aciclovir a distintos niveles de concentración y que el método sea capaz de evidenciar el apareamiento de otras moléculas como productos de degradación.

### **6.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución.**

Los datos de las tablas 2 a 6 demuestran la sensibilidad del método para detectar la degradación del Aciclovir, tanto en el estándar de referencia, como en la crema degradada y sin degradar.

Se puede observar que el valor del porcentaje del estándar sin degradar en los cromatogramas se mantiene en un 99% y el valor del porcentaje del estándar de referencia que ha sufrido degradación es de aproximadamente el 65%, es decir, el método detecta una pérdida del 35%.

Lo mismo sucede con la crema. En los cromatogramas de la crema sin degradar se tiene valores de aproximadamente del 100%, mientras que en la crema degradada los valores de porcentaje obtenidos son del 65%, se detecta una pérdida del 35% del activo en la crema sufrida durante el proceso de degradación por calentamiento.

Además se notó la presencia en los cromatogramas de una señal próxima a la señal que representaría al Aciclovir, la cual se esperaba representara a la Guanina, el principal producto de degradación del Aciclovir.

Para comprobarlo se realizó un análisis cromatográfico, por separado de estándar de Guanina, y luego, el cromatograma obtenido se comparó con el cromatograma del estándar de referencia de Aciclovir degradado y se pudo comprobar que tanto la señal secundaria en el cromatograma del estándar de referencia de Aciclovir como la del estándar de Guanina aparecían de la misma forma y a tiempos de retención similares, quedando demostrado que el método indicativo de estabilidad propuesto es capaz de detectar la degradación que sufre el activo, que puede cuantificar esa degradación, y que también es lo suficientemente sensible como para detectar al principal producto de degradación del Aciclovir.

Para tener una mayor certeza de que el método es capaz de producir los resultados para los que es propuesto, se realizó una aproximación de la validación del mismo, siendo los parámetros evaluados la linealidad, exactitud y precisión, de éste, obteniéndose los siguientes resultados:

### 6.2.1 Linealidad:

Para analizar la linealidad del método se analizó por quintuplicado distintas concentraciones del estándar de Aciclovir, los resultados se enlistan en la tabla siguiente

**Tabla N° 7: Relación entre Concentración y área obtenidos del análisis del estándar de referencia de Aciclovir**

	%	Área
1	25,00	3393326
2	25,00	3381560
3	25,00	3389473
4	25,00	3397102
5	25,00	3401015
6	50,00	6746702
7	50,00	6745688
8	50,00	6743016
9	50,00	6743192
10	50,00	6751466

**Tabla 7: Continuación**

	<b>%</b>	<b>Área</b>
11	74,00	9968580
12	74,00	9965473
13	74,00	9961599
14	74,00	9963249
15	74,00	9965431
16	99,00	13345819
17	99,00	13350653
18	99,00	13368950
19	99,00	13366041
20	99,00	13372180
21	149,00	19988192
22	149,00	19980962
23	149,00	19986842
24	149,00	19969830

En la tabla anterior puede observarse que a medida que se aumenta la concentración del estándar, también se aumenta el área del cromatograma. Esta es una característica de métodos lineales.

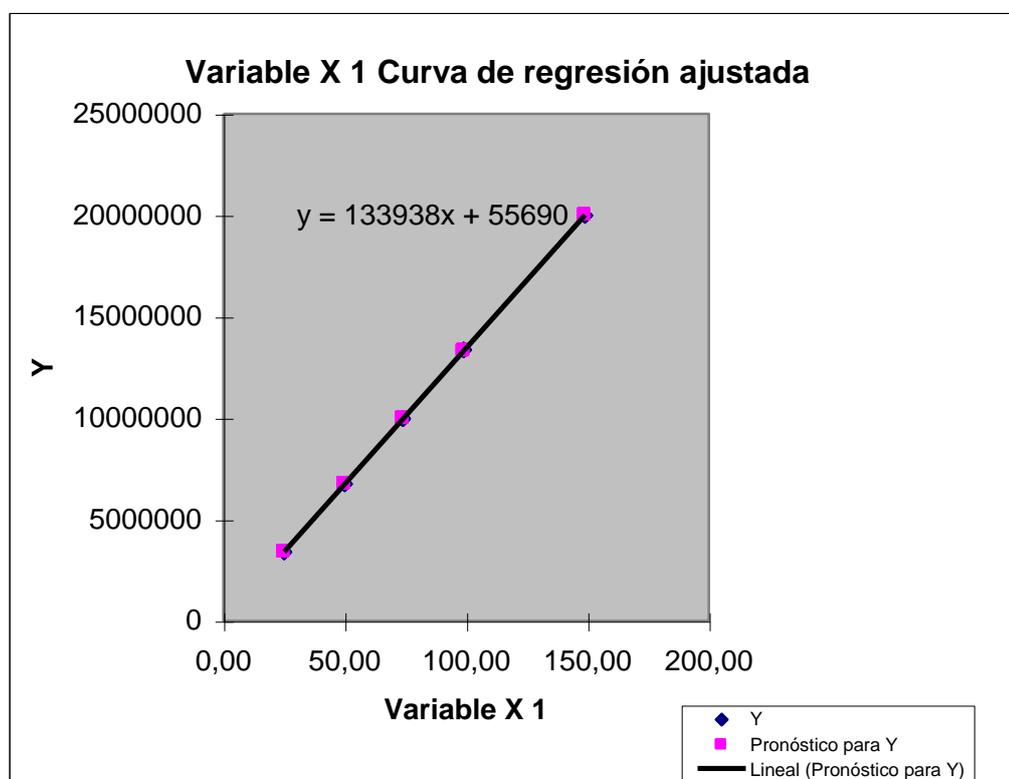
**Tabla Nº 8: Estadísticas de la regresión**

<b>Coefficiente de correlación múltiple</b>	0,999988933
<b>Coefficiente de determinación R<sup>2</sup></b>	0,999977867
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,999976861
<b>Error típico</b>	26989,54802
<b>Mediciones</b>	24

Los valores de los parámetros estadísticos de regresión demuestran la linealidad del método, así, el coeficiente de correlación está muy próximo a su valor máximo el cual es 1, es decir existe correlación con probabilidad alta.

**Tabla Nº 9: Análisis de Varianza**

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
<b>Regresión</b>	1	7,2403114	7,2403114	993953,8242	1,050352
<b>Residuos</b>	22	16025585450	728435702,3		
<b>Total</b>	23	7,2404714			



**Figura Nº 9: Gráfico Concentración vrs Área**

El análisis de la curva de regresión muestra que no existe mucha diferencia entre los valores obtenidos durante el análisis y los puntos de la recta, lo que indica una buena linealidad en el método. Además la pendiente de la recta es tal que permite ver una buena respuesta del método ante las variaciones de concentración de Aciclovir, es decir el método es bastante sensible.

### 6.2.2 Exactitud:

Para llevar a cabo la evaluación de la exactitud, se analizó por quintuplicado distintas concentraciones del estándar de Aciclovir, los resultados se enlistan en la tabla siguiente.

**Tabla N° 10: Relación entre valor teórico y valor obtenido de estándar de Aciclovir, expresado en porcentaje de error**

% teórico	% Real	Error	Promedio
25,00	24,92	0,32%	<b>0,35%</b>
25,00	24,83	0,67%	
25,00	24,89	0,44%	
25,00	24,95	0,21%	
25,00	24,98	0,09%	
50,00	49,96	0,09%	<b>0,10%</b>
50,00	49,95	0,10%	
50,00	49,93	0,14%	
50,00	49,93	0,14%	
50,00	49,99	0,02%	

Tabla N° 10: continuación

<b>% teórico</b>	<b>% Real</b>	<b>Error</b>	<b>Promedio</b>
74,00	74,01	0,02%	<b>0,03%</b>
74,00	73,99	0,02%	
74,00	73,96	0,06%	
74,00	73,97	0,04%	
74,00	73,99	0,02%	
99,00	99,23	0,23%	<b>0,34%</b>
99,00	99,26	0,26%	
99,00	99,40	0,40%	
99,00	99,38	0,38%	
99,00	99,42	0,43%	
149,00	148,82	0,12%	<b>0,16%</b>
149,00	148,77	0,16%	
149,00	148,81	0,13%	
149,00	148,68	0,21%	

Se inyectó el estándar de Aciclovir aumentando cada vez su concentración en aproximadamente 25 unidades porcentuales, cada una repetida 4 ó 5 veces, y del promedio de estas se obtuvo un valor de porcentaje de recuperación muy próximo al valor inyectado, así también el valor del porcentaje de error obtenido está por debajo de la unidad.

**Tabla Nº 11: Relación entre valor teórico y valor obtenido del análisis del estándar y la Muestra**

	% Teórico	% Real	Error	Promedio
Estándar 1	99,5	99,68	0,18%	<b>0,16%</b>
	99,5	99,53	0,03%	
	99,5	99,24	0,26%	
Estándar 2	99,9	99,73	0,17%	<b>0,13%</b>
	99,9	99,93	0,03%	
	99,9	100,08	0,18%	
Muestra 1	100,5	100,71	0,21%	<b>0,19%</b>
	100,5	100,64	0,14%	
	100,5	100,29	0,21%	
Muestra 2	99,4	99,22	0,18%	<b>0,10%</b>
	99,4	99,37	0,03%	
	99,4	99,5	0,10%	

En el cuadro anterior se muestra la evaluación de la exactitud a un mismo nivel de concentración (aproximadamente del 100%) para dos estándares y dos muestras, en los cuatro casos se evidencia que no existe diferencia entre ellos y que el método posee una adecuada exactitud no importando la variabilidad entre estándares o muestras ya que los errores promedio son inferiores al 1 %.

### 6.2.3 Precisión:

Para evaluar la precisión del método se inyectó por quintuplicado, distintos porcentajes del estándar de Aciclovir. Los resultados se enlistan en la tabla siguiente.

**Tabla N° 12: Relación entre valor teórico, valor obtenido y el coeficiente de variación**

<b>% Teórico</b>	<b>% Real</b>	<b>Error</b>	<b>%CV</b>
25,00	24,92	0,32%	<b>0,22%</b>
25,00	24,83	0,67%	
25,00	24,89	0,44%	
25,00	24,95	0,21%	
25,00	24,98	0,09%	
50,00	49,96	0,09%	<b>0,05%</b>
50,00	49,95	0,10%	
50,00	49,93	0,14%	
50,00	49,93	0,14%	
50,00	49,99	0,02%	
74,00	74,01	0,02%	<b>0,03%</b>
74,00	73,99	0,02%	
74,00	73,96	0,06%	
74,00	73,97	0,04%	
74,00	73,99	0,02%	
99,00	99,23	0,23%	<b>0,09%</b>
99,00	99,26	0,26%	
99,00	99,40	0,40%	
99,00	99,38	0,38%	
99,00	99,42	0,43%	
149,00	148,82	0,12%	<b>0,04%</b>
149,00	148,77	0,16%	
149,00	148,81	0,13%	
149,00	148,68	0,21%	

En la tabla se puede observar que en cada nivel de concentración se obtuvo valores de coeficientes de variación muy por debajo de **2%**, que es el límite superior de coeficiente de variación. según el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México.

**Tabla N° 13: Relación entre valor teórico, valor obtenido y el coeficiente de variación del Estándar sin degradar**

	<b>% Teórico</b>	<b>% Real</b>	<b>Error</b>	<b>% CV</b>
1	99,50	99,68	0,18%	<b>0,22%</b>
	99,50	99,53	0,03%	
	99,50	99,24	0,26%	
2	99,90	99,73	0,17%	<b>0,18%</b>
	99,90	99,93	0,03%	
	99,90	100,08	0,18%	

Evaluando la precisión al 100% de concentración, los coeficientes de variación del estándar sin degradación en ambos lotes fue de 0.22 % y 0.18 %, estando estos dos valores muy por debajo del valor permitido por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, el cual es menor o igual al 2% para métodos cromatográficos.

**Tabla N° 14: Relación entre valor teórico, valor obtenido y el coeficiente de variación crema sin degradar**

Muestra	% Teórico	% Real	Error	% CV
1	100,50	100,71	0,21%	<b>0,22%</b>
	100,50	100,64	0,14%	
	100,50	100,29	0,21%	
2	99,40	99,22	0,18%	<b>0,14%</b>
	99,40	99,37	0,03%	
	99,40	99,50	0,10%	

El valor de coeficiente de variación obtenido del análisis de dos lotes distintos de muestras de producto terminado están debajo del valor de **2%** aceptado.

**Tablas N° 15: Resultados del análisis del estándar degradado**

Estándar degradado		
	% Teórico	% CV
Aciclovir	64,98	<b>0,05%</b>
	65,00	
	64,94	
	64,97	<b>0,10%</b>
65,03		
65,10		
<b>Promedio</b>	<b>65,00</b>	

**Tablas N° 16: Resultados del análisis de la crema degradada**

Crema degradada		
	% Teórico	% CV
Aciclovir	65,21	<b>0,17%</b>
	65,39	
	65,42	
	61,69	<b>0,14%</b>
61,53		
61,55		
<b>Promedio</b>	<b>63,47</b>	

En las tablas anteriores se puede observar que el coeficiente de variación tanto en el estándar degradado como en la crema degradada son bajos con respecto al límite.

## 7. CONCLUSIONES

1. No es posible evaluar la estabilidad del Aciclovir por el método de Cromatografía en capa fina, ya que esta la molécula de este fármaco no presenta migración debido a que en su estructura posee grupos químicos ionizables como Amino ( $\text{NH}_2$ ) y (OH). Estos grupos interactúan con los grupos silanoles de la placa cromatográfica produciendo una interacción con elevada energía de adsorción, haciendo difícil la migración del Aciclovir sobre la placa cromatográfica,
2. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución es un método lo suficientemente sensible y selectivo para detectar y cuantificar la molécula de aciclovir en crema y su degradación que sufriría durante el tiempo que permanezca en el mercado.
3. El método analítica propuesto es capaz de detectar la degradación sufrida por la molécula de Aciclovir, y además de poder cuantificar esa degradación. Así lo demuestran los datos obtenidos de los cromatogramas, tanto del estándar como de la muestra de Aciclovir en crema. Además el método es capaz de distinguir entre la molécula del activo y la de su principal producto de degradación, la Guanina.

4. El estudio de las características, linealidad, exactitud y precisión del método, demuestra que éste es:

- **Lineal:** porque la pendiente de la recta es distinta de cero, la interpolación del intercepto tiende a cero y el coeficiente de correlación múltiple se aproxima a uno.

- **Exacto:** porque los valores de error obtenidos a diferentes niveles de concentración son inferiores al 1% muy próximos a los valores reales del analito.

- **Preciso:** porque los valores del coeficiente de variación a diferentes niveles de concentración están muy por debajo de 2, que es el límite para coeficiente de variación.

- **Selectivo:** porque permite distinguir entre el principio activo e interferencias que lo rodean.

En base a lo anterior, se puede confiar en que el método indicativo de estabilidad propuesto es capaz de producir los resultados esperados de él.

5. Luego de obtenidos los resultados experimentales se propone el siguiente método indicativo de estabilidad:

**Reactivos:**

- Agua calidad HPLC
- Acetato de Sodio Anhidro
- Ácido Acético

**Fase móvil:**

- Acetato de Sodio 0.5 N, pH 3.

**Preparación de fase móvil:**

Pesar 4.1 g de Acetato de Sodio Anhidro, transferir a un frasco volumétrico de 1000 mL. Agregar 500 mL de Agua y agitar hasta disolver. Adicionar 300 mL de agua agitando y llevar a pH 3 con Ácido Acético, llevar a volumen.

**Condiciones del equipo:**

- Longitud de onda: 254 nm
- Flujo: 1 mL por minuto
- Columna: RP18 LICHROART 125-4
- Volumen: 20 µl
- Temperatura 40 °C

**Preparación de la solución de Aciclovir en crema:**

Pesar una cantidad de crema en equivalente a 25.0 mg de Aciclovir, esta transferirla a un frasco volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de ácido clorhídrico 0.1 N y aplicar ultrasonido por 5 minutos para facilitar la dilución, luego aforar con ácido clorhídrico 0.1 N.

Injectar la solución en el cromatógrafo, bajo las condiciones especificadas.

## 8. RECOMENDACIONES

1. Que el método propuesto indicativo de estabilidad, sea aplicado por la industria farmacéutica, como método de rutina para evaluar la calidad de la crema de Aciclovir, ya que demuestra la formación de su producto de degradación, en presencia de la molécula intacta.
2. Que el método analítico propuesto pueda ser aplicado para evaluar la estabilidad del Aciclovir, en sus diferentes formas farmacéuticas.
3. Por su simplicidad y economía, este método, puede ser utilizable en docencia, para la realización de las prácticas de las asignaturas Química analítica III y Control de Calidad de Productos Farmacéuticos y Veterinarios.
4. Que el método analítico propuesta pueda ser adaptado para la evacuación de otros productos farmacéuticos.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

Guía de Entrevista para Investigación de Campo con el fin de  
Conocer la aceptación de Aciclovir en el mercado.

---

1. Formas farmacéuticas de Aciclovir que se comercializan:

Crema  Ungüento  Tabletas

jarabe  inyectable

2. Laboratorios que fabrican el producto:

Nacionales:

Extranjeros:

3. ¿Cuál es el precio de las distintas presentaciones?

Precio de:

Crema:

Jarabe:

Ungüento:

Inyectable:

Tabletas:

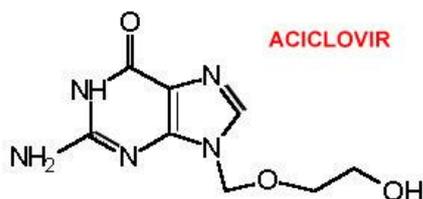
4. Aproximadamente, ¿cuantos tubos de Aciclovir en crema compra un paciente para su tratamiento?

5. ¿Época del año en que se vende con mayor frecuencia éste producto?

## ANEXO 2

### MONOGRAFÍA DE ACICLOVIR. MATERIA PRIMA

#### Aciclovir



Formula empírica :  $C_8H_{11}N_5O_3$     Peso Molecular : 225.20

Nombre Químico : 6H-Purin-6-ona, 2-amino-1,9-dihidro-9-[(2-hidroxietoxi)-metil]-. 9[(2-hidroxietoxi) metil]guanina

Denominación comun internacional : [59277-89-3].

Aciclovir contiene no menos de 98.0 % y no más de 101.0 % de  $C_8H_{11}N_5O_3$ , calculado en la base anhidra.

**Empaque y almacenamiento:** consérvese en contenedores bien cerrados.

**Estándar de referencia USP <11>:** Aciclovir USP RS.

**Identificación.**

**A:** Absorción Infrarroja <197 K>

**B:** El tiempo de retención del pico máximo en el cromatograma de la *Preparación del ensayo* corresponde al del *Preparación del estándar* obtenido bajo *Ensayo y límite de guanina*.

**Agua, Método I <921>** : no más del 6.0%

**Impurezas ordinarias <466>**

*Test solution:* dimetil sulfóxido

*Solución estándar:* dimetil sulfóxido

*Eluyente:* una mezcla de cloroformo, metanol e hidróxido de amonio  
(80:20:2)

*Visualización:* 1.

*Volumen de aplicación:* 5 µL.

*Límite:* 1%

**Impurezas orgánicas volátiles, método V <467>** : ver requerimientos

*Disolvente:* utilizar dimetil sulfóxido como disolvente.

## **Ensayo y límite de guanina.**

*Fase móvil:* preparar un solución filtrada y desgasificado de ácido acético glacial en agua (1 en 100). Hacer ajustes de ser necesario (ver *System Suitability* bajo *Chromatography* <621> ).

*Preparación del estándar de guanina:* transferir aproximadamente 8.75 mg de guanina, cuidadosamente pesada a un balón volumétrico de 500 mL. Disolver en 50 mL de Hidróxido de sodio 0.1 N, aforar con agua y mezclar.

*Preparación del estándar:* disolver aproximadamente 25 mg de Aciclovir USP RS, cuidadosamente pesado, en 5 mL de Hidróxido de sodio en un balón volumétrico de 50 mL, aforar con agua y mezclar. Transferir 10 mL de esta solución y 2 mL de la preparación del estándar de guanina a un balón volumétrico de 50 mL, diluir con hidróxido de sodio 0.01 N hasta volumen y mezclar para obtener una solución que contenga una concentración conocida de aproximadamente 0.1 mg de Aciclovir USP RS por mL y 0.7 µg de guanina por mL.

*Preparación del ensayo:* disolver aproximadamente 100 mg de Aciclovir, cuidadosamente pesado, en 20 mL de hidróxido de sodio 0.1 N en un balón volumétrico de 200 mL, aforar con agua y mezclar. Transferir 10.0 mL de ésta solución a un balón volumétrico de 50 mL, aforar con hidróxido de sodio 0.01 N y mezclar.

*Sistema cromatográfico* (ver *Chromatography* <621> ): el cromatógrafo líquido se equipa con un detector de 254 nm y una columna de 4.2 mm x

30 cm que contiene un empaquetamiento L 1. El rango de flujo es de 3 mL por minuto. Hacer cromatograma de la preparación del estándar y registrar los picos como se indica bajo *Procedimiento*: la resolución, R, entre el pico de Aciclovir y guanina no es menor de 2.0, el factor mayor del pico del analito no es más de 2 y la desviación relativa del estándar por inyección replicación es no más del 2%.

*Procedimiento*: separadamente inyectar volúmenes equivalentes (cerca de 20  $\mu$ L ) de preparación del estándar y de la preparación del ensayo dentro del cromatógrafo, registrar los cromatogramas y medir las respuestas para todos los picos. Calcular la cantidad, en  $\mu$ g, de guanina en la porción de Aciclovir a partir de la fórmula:

$$1000 C (r_u/r_s),$$

en donde C es la concentración, en  $\mu$ g por mL, de guanina en la preparación del estándar,  $r_u$  y  $r_s$  son la respuesta de picos debidos a la guanina en la preparación ensayo y la preparación estándar, respectivamente: no más del 0.7 % de guanina es encontrado. Calcular la cantidad, en mg, de  $C_8H_{11}N_5O_3$  en la porción de Aciclovir tomada de la fórmula:

$$1000 C (r_u/r_s),$$

en donde  $C$  es la concentración, en mg por mL, Aciclovir USP RS en la preparación del estándar,  $r_u$  y  $r_s$  son la respuesta de picos debidos a Aciclovir en la preparación ensayo y en la preparación estándar, respectivamente.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- AEFI (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria). 2001. Validación de métodos analíticos. España. Gráficos GISPERT. p. 54 y 55.
- 2- Deeter, R., y otros. 1999. Stability of valacyclovir hydrochloride in extemporaneously prepared oral liquids. (en línea) American Journal of Health-System Pharmacy. Consultado 10 oct. 2005. Disponible en <http://pt.wkhealth.com/pt/re/ajhp/abstract>.
- 3- Gennaro, A. 2000. Remington: ciencia y práctica de la farmacia. 20 ed. Philadelphia. E.U. Editorial Médica Panamericana. v. 1, p. 578, 579, y 1147; v 2., p. 1859.
- 4- Gilbert, D., y otros. 1998. Stability of acyclovir sodium 1, 7, and 10 mg/mL in 5% dextrose injection and 0.9% sodium chloride injection. (en línea) American Journal of Health-System Pharmacy. Consultado 10 oct. 2005. Disponible en <http://pt.wkhealth.com/pt/re/ajhp/abstract>.
- 5- Goodman & Gilman. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9 ed. México. Mc Graw-Hill. v. 2. p. 1267-1273.
- 6- Helman, J. 1982. Farmacotécnica teórica y práctica. México, Mex. Editorial Continental S.A de C.V. v. 7, p. 2102 – 2128.
- 7- Mac Van, B. 1995. Referencias farmacéuticas. Santa Fé, Col. Ed. El manual moderno. p. 159 -161.

- 8- Moffat, A. y otros. 2004. Clarke's Análisis of drugs and poisons. 3 ed. London, Ing. Pharmaceutical Press. v. 2, p. 582 y 583.
- 9- Pradeau, D. 2001. Análisis químicos farmacéuticos de medicamentos. México, Mex. Ed. Limusa. P.
- 10- Quattrocchi, o. 1992. Introducción a la HPLC, Aplicación y Practica. Buenos Aires, Argentina. P. 301-327.
- 11- Sbarbati, N. 1975. Estabilidad de medicamentos. Buenos Aires, Arg. Ed. El Ateneo. p. 47-59, 116-117.
- 12- Swarbrick, J. 2000. Drug stability, principles and practices. 3 ed. E. U. Marcel Dekker Inc. p. 331-336.
- 13- United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2002. United States Pharmacopeia. 25 ed. E.U. Webcom Limited. p. 48-49, 1982-1993, 2231-2234.