

## VALIDACIÓN DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS APLICABLES AL ACICLOVIR POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL 200 MG/5 ML

Caridad Margarita García Peña<sup>1\*</sup>, María Teresa Herrera Santi<sup>2</sup>, Oscar García Pulpeiro<sup>2</sup>, Ennis Hernández Frometa<sup>2</sup>, Yanet Montes de Oca Porto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)

<sup>2</sup>Empresa Farmacéutica Roberto Escudero.

\*Autor de correspondencia: Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave 26 No. 1605 e/ Boyeros y Puentes Grandes. Plaza de la Revolución. La Habana. Cuba. e-mail: [caridadgp@infomed.sld.cu](mailto:caridadgp@infomed.sld.cu); [caridad.garcia@cidem.cu](mailto:caridad.garcia@cidem.cu)

### RESUMEN

El aciclovir polvo para suspensión, se emplea en el tratamiento de infecciones por virus herpes simple, en la profilaxis de infecciones por virus herpes simple en pacientes inmunocomprometidos, en pacientes inmunodeprimidos con herpes zóster, especialmente en infecciones cutáneas progresivas o diseminadas, en infecciones por virus herpes simple en neonatos, entre otras. El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar y validar dos métodos analíticos por espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución para aplicarlo al control de la calidad y estudio de estabilidad del polvo para suspensión; y comparar estadísticamente los resultados obtenidos por ambos métodos. Los métodos analíticos fueron validados mediante el análisis de los parámetros: linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad, precisión intermedia) y especificidad. Los resultados obtenidos en las validaciones de ambos métodos fueron adecuados. Ambos métodos analíticos resultaron lineales, exactos, precisos y específicos en el rango de concentraciones estudiadas. Se demostró que no existían diferencias significativas entre ambos métodos analíticos, pudiéndose emplear ambos métodos en el control de la calidad del producto terminado.

**Palabras clave:** aciclovir, polvo para suspensión, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Espectrofotometría, Validación.

## VALIDATION OF TWO ANALYTICAL METHODS APPLICABLE TO ACYCLOVIR POWDER FOR ORAL SUSPENSION 200 MG/5 ML

### ABSTRACT

Acyclovir powder for suspension is used in the treatment of herpes simplex virus infections in the prophylaxis of herpes simplex virus infections in immunocompromised patients, in immunocompromised patients with herpes zoster, especially in progressive or disseminated cutaneous infections, in virus infections Herpes simplex in neonates, among others. The objective of the present work was to develop and validate two analytical methods by spectrophotometry and high performance liquid chromatography to apply it to the quality control and stability study of the powder for suspension; And to statistically compare the results obtained by both methods. The analytical methods were validated by analyzing the parameters: linearity, accuracy, precision (repeatability, intermediate precision) and specificity. The results obtained in the validations of both methods were adequate. Both analytical methods were linear, exact, precise and specific in the range of concentrations studied. It was demonstrated that there were no significant differences between the two analytical methods, both methods being used to control the quality of the finished product.

**Keywords:** acyclovir, powder for suspension, High Resolution Liquid Chromatography, Spectrophotometry, Validation.

### INTRODUCCIÓN

El aciclovir polvo para suspensión oral, se emplea en diferentes patologías, entre los que se pueden citar: el tratamiento de las infecciones causadas por el virus del Herpes simple en la piel, las membranas mucosas y en la gingivoestomatitis herpética en todo tipo de pacientes; episodios iniciales, en el manejo de los cuadros recurrentes y en la profilaxis de infecciones por herpes genitales en pacientes tanto inmunocomprometidos como inmunocompetentes; en la supresión y prevención de infecciones recurrentes por virus de Herpes simple en pacientes inmunocompetentes; para la supresión (prevención de recurrencias) de las infecciones de Herpes simple recurrente en pacientes inmunocomprometidos, así como también en la profilaxis de las infecciones del Herpes simple en pacientes inmunocomprometidos., incluyendo los transplantados de médula ósea y otros trasplantes de órganos, pacientes infestados por HIV y que estén recibiendo quimioterapia. En el tratamiento de Herpes Zóster oftálmico; en la infección por virus Varicela Zóster causantes de infección de Varicela en niños y adultos inmunocompetentes<sup>1-3</sup>.

La empresa farmacéutica Roberto Escudero desarrolló una formulación de aciclovir polvo para suspensión, al no encontrarse el producto en monografías oficiales se desarrollaron dos métodos analíticos, uno por espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución. Todo método analítico desarrollado se le hace necesario el estudio de validación, ya que es el proceso mediante el cual se obtienen pruebas documentales de la confiabilidad del mismo, de ofrecer resultados seguros al ser aplicado en el control de la calidad y estudios de estabilidad de un producto farmacéutico<sup>4</sup>.

La validación de los métodos analíticos garantiza la confiabilidad y reproducibilidad de los índices de calidad de las materias primas y productos terminados, lo cual contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad, seguridad y eficiencia de los mismos<sup>5</sup>.

Los objetivos de este trabajo fueron desarrollar y validar dos métodos analíticos, para el control de la aciclovir 200 mg/5mL, polvo para suspensión; determinar si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos al aplicar ambos métodos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las sustancias de referencia química de Aciclovir y de guanina fueron calidad USP. La muestra de aciclovir, 200 mg / 5 mL polvo para suspensión empleada en el estudio de validación correspondió al lote 001, fabricada en la empresa Roberto Escudero, el cual cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para el control de la calidad del producto terminado.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica, procedentes de la Riedel –de Haen (España)

### **Método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)**

Para la determinación del Ingrediente farmacéutico activo (IFA) en el producto terminado se empleó la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, se utilizó un cromatógrafo (KNAUER) con detector UV/VIS (KNAUER) ajustado a 254 nm, un dosificador (Loop) de 20 µL e integrador (SHIMADZU CR 8 A). La separación se realizó isocráticamente sobre una columna Lichrocart RP- 18 con tamaño de partícula de 5 µm (4,6 mm x 25 cm). La fase móvil consistió en una solución de ácido acético 0,02 M; con una velocidad de flujo de 1,5 mL/min.

La sustancia de referencia química de aciclovir se preparó, pesando 25,0 mg, posteriormente se transfirió a un matraz aforado de 25 mL con ayuda de la solución de hidróxido de sodio 0,1 N, se disolvió y se completó volumen con el mismo solvente, luego se tomaron 10,0 mL y se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL y se llevó a volumen con agua destilada obteniéndose una concentración final de 0,1 mg/mL. Mientras que la sustancia de referencia de guanina se preparó de forma similar con la diferencia de diferentes concentraciones, a una concentración de 0,2 µg/mL.

Las muestras de producto terminado fueron preparadas, pesando 230 mg, posteriormente se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL, se adicionaron 50 mL de solución de hidróxido de sodio 0,1 N, se agitó por 15 minutos en zaranda, se completó a volumen con la solución de hidróxido de sodio 0,1 N (Solución A). De la solución A se tomaron 5,0 mL y se llevaron a un matraz aforado de 50 mL, se completó volumen con agua destilada, se mezcló y se filtró por papel medio rápido (solución B)

### **Método por Espectrofotometría ultravioleta (UV)**

La determinación se realizó por espectrofotometría ultravioleta, teniendo en cuenta la presencia de grupos cromóforos en su estructura. El espectro de absorción de la solución muestra preparada para la determinación de contenido, se realizó en un rango de 230 a 350 nm, mostrando un máximo de absorción a  $255 \text{ nm} \pm 1$  y un hombro ancho alrededor de 274 nm.

La sustancia de referencia química, se preparó a una concentración de  $15 \mu\text{g/mL}$ , pesando 75,0 mg de la sustancia de referencia, posteriormente se transfirió a un matraz aforado de 100 mL, se disolvió con solución de ácido sulfúrico 0,5 M y se agitó hasta disolución, una vez disuelta se tomó una alícuota de 2,0 mL y se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL, se le añadieron 18 mL de ácido sulfúrico 0,5 M y se completó a volumen con agua desionizada.

Mientras que para la preparación de las muestras, se pesaron con exactitud 0,172 g en un vaso para precipitado de capacidad adecuada, se disolvió con 30 mL de solución de ácido sulfúrico 0,5 M, con ayuda de una varilla de vidrio. Una vez disuelto se trasvasó la solución hacia un embudo separador de 250 mL de capacidad, se lavó el vaso para precipitado con 20 mL de la solución de ácido sulfúrico 0,5 M. y se unió al embudo separador. Se le adicionaron 50 mL de acetato de etilo y se agitó bien, se lavó la capa orgánica con 20 mL de ácido sulfúrico 0,5 M. Los extractos acuosos se unieron en el matraz aforado de 100 mL y se completó a volumen con ácido sulfúrico 0.5 M. Posteriormente se tomaron 2 mL y se trasvasaron a un matraz aforado de 100 mL, se agregaron 18 mL de ácido sulfúrico 0,5 M y se completó volumen con agua desionizada.

En el estudio de validación se evaluaron los siguientes parámetros:

#### **Linealidad**

Se prepararon soluciones de concentraciones conocidas de las sustancia de referencia química ácido ascórbico, que representan del 50 al 150 % de la concentración teórica del principio activo en la suspensión (100 mg/5 mL a 300 mg/5 mL). Se realizaron tres réplicas para cada nivel de concentración.

Criterios: ecuación de la recta:  $y = bx + a$ ; coeficiente de correlación  $r \geq 0,999$ ; coeficiente de determinación  $r^2 \geq 0,980$ ; desviación estándar relativa de la pendiente:  $S_b(\text{rel}) \leq 2,0 \%$ ; coeficiente de variación de los factores de respuesta:  $CV_f \leq 5,0 \%$ <sup>4-7</sup>.

### **Exactitud**

En el estudio de la exactitud se empleó el método de recuperación, preparando muestras con diferentes niveles de la concentración teórica del principio activo: bajo, medio y alto correspondiente con el 75, 100 y 125 %, respectivamente.

Criterios: recuperación media entre un 98,0 – 102,0 %, la G calculada debe ser menor que G tabulada para un nivel de confianza de 95 %<sup>4-7</sup>.

### **Precisión**

Se evaluó la precisión del método a través de los estudios de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se estudió sobre la base de 3 determinaciones al 100 % de la concentración. Se determinaron los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

El estudio de precisión intermedia se realizó por dos analistas, a tres niveles de concentración, tres días diferentes, en el mismo laboratorio.

Criterios: Repetibilidad ( $C.V \leq 2,0$  para métodos cromatográficos y  $C.V \leq 3,0$  para métodos espectrofotométricos). Precisión intermedia (t calculada debe ser menor t tabulada; F calculada debe ser menor F tabulada), para un nivel de confianza de 95 %<sup>4-7</sup>.

### **Especificidad**

Con el objetivo de evaluar la especificidad del método por CLAR se analizó: la sustancia de referencia química de aciclovir; el placebo; la muestra y muestras sometidas a condiciones drásticas tales como: hidrólisis ácida (HCL 1N), hidrólisis básica (NaOH 1 N), oxidación con peróxido de hidrógeno 1 % v/v refluados por 1 hora, luz natural y temperatura, durante 7 días.

Criterios: No se debe obtener señales del placebo, ni de los productos de degradación en la zona de elusión del ingrediente activo<sup>4-7</sup>.

Para el estudio de especificidad del método por espectrofotometría, se analizaron muestras de sustancia de referencia química de aciclovir placebo y muestras de producto terminado, midiéndose los espectros de absorción de 240 a 300 nm.

Criterios: No se debe obtener señales del placebo, a la longitud de onda donde absorbe la sustancia de referencia química de aciclovir<sup>4-7</sup>.

### **Comparación estadística entre métodos**

Con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos al aplicar ambos métodos en el control de la calidad del producto terminado, se realizó la comparación estadística a través de la prueba de t- Student y se realizaron seis réplicas de cada uno.

Criterio de aceptación: t calculada  $\leq$  t tabulada.

### RESULTADOS

Los resultados de los estudios de linealidad realizados por ambos métodos se reportan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Linealidad del método

Parámetros	Resultados		Límites
	CLAR	UV	
Ecuación de la recta	$Y = 0,9984 X + 1,27 \cdot 10^{-4}$	$Y = 0,0084 x + 0,0056$	$Y = bX + a$
Coefficiente de regresión lineal	$r = 0,999$	$r = 0,999$	$r \geq 0,990$
Coefficiente de determinación	$r^2 = 0,998$	$r^2 = 0,998$	$r^2 \geq 0,980$
<i>Significación estadística de la varianza de la pendiente (b)</i>			
Desviación estándar relativa de la pendiente (%)	$Sb \text{ rel}(\%) = 1,87$	$Sb \text{ rel}(\%) = 1,49$	$Sb \text{ rel}(\%) \leq 2,0\%$
<i>Coefficiente de variación de los factores de respuesta</i>			
Coefficiente de variación del factor de respuesta (%)	$CV_f = 4,24$	$CV_f = 1,67$	$CV_f \leq 5,0\%$

En la tabla 2, se reflejan los resultados de los estudios de exactitud.

**Tabla 2.** Exactitud de los métodos

Resultados		Criterios de aceptación
CLAR	UV	
total = 99,07 %	total = 98,14 %	: 98,0 – 102,0 %
$CV_{\text{total}} = 0,71 \%$	$CV_{\text{total}} = 0,91 \%$	$CV \leq 2,0 \%$
$t_{\text{calc}} = 2,184$ $t_{\text{tab}} = 2,306$	$t_{\text{calc}} = 1,968$ $t_{\text{tab}} = 2,306$	$t_{\text{calc}} \leq t_{\text{tab}}$
$G_{\text{calc}} = 0,635$ $G_{\text{tab}} = 0,797$	$G_{\text{calc}} = 0,705$ $G_{\text{tab}} = 0,797$	$G_{\text{calc}} < G_{\text{tab}}$

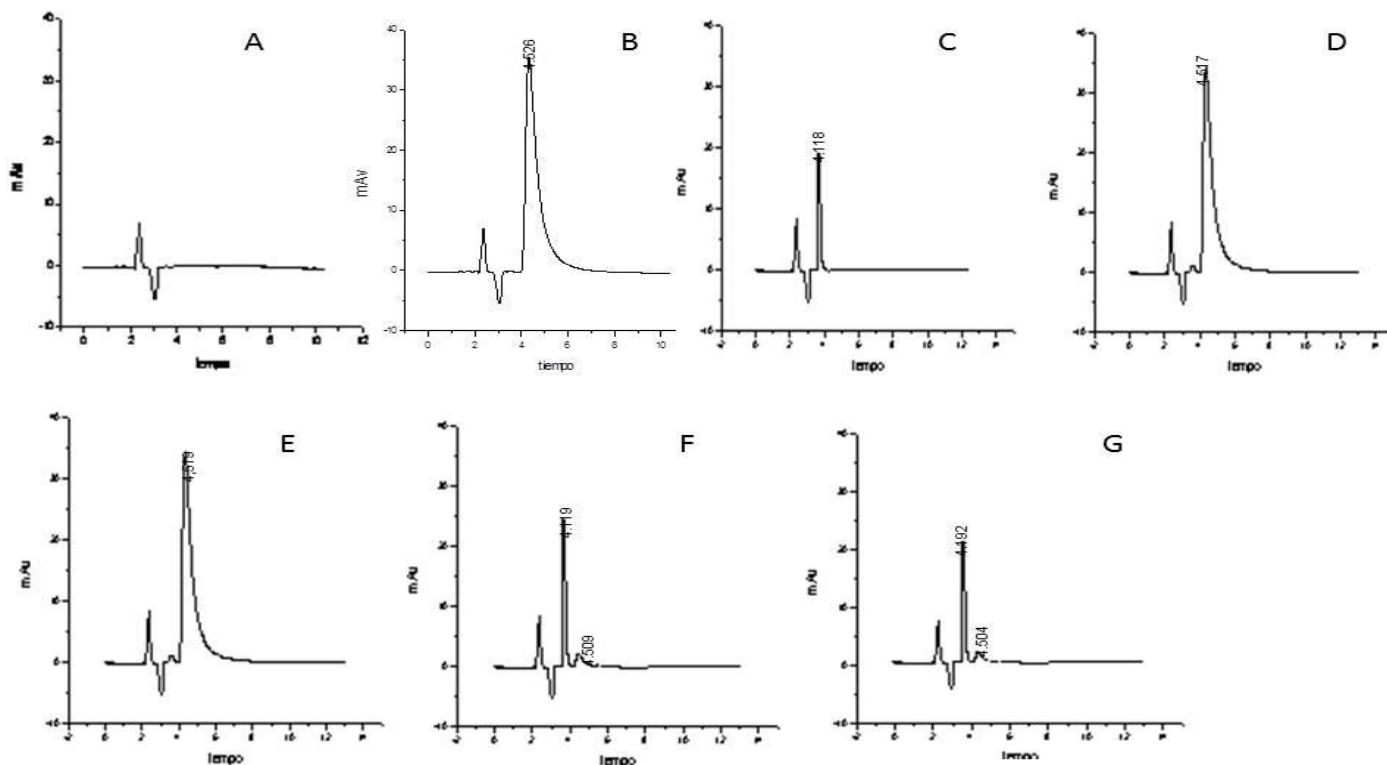
Los valores de los coeficientes de variación, en los estudios de repetibilidad evaluados, fueron de 1,85 % y 2,86 %, para los métodos cromatográfico y espectrofotométrico, respectivamente.

Los estudios de precisión intermedia, para cada método analítico evaluado se reportan en la tabla 3.

**Tabla 3.** Precisión intermedia de los métodos

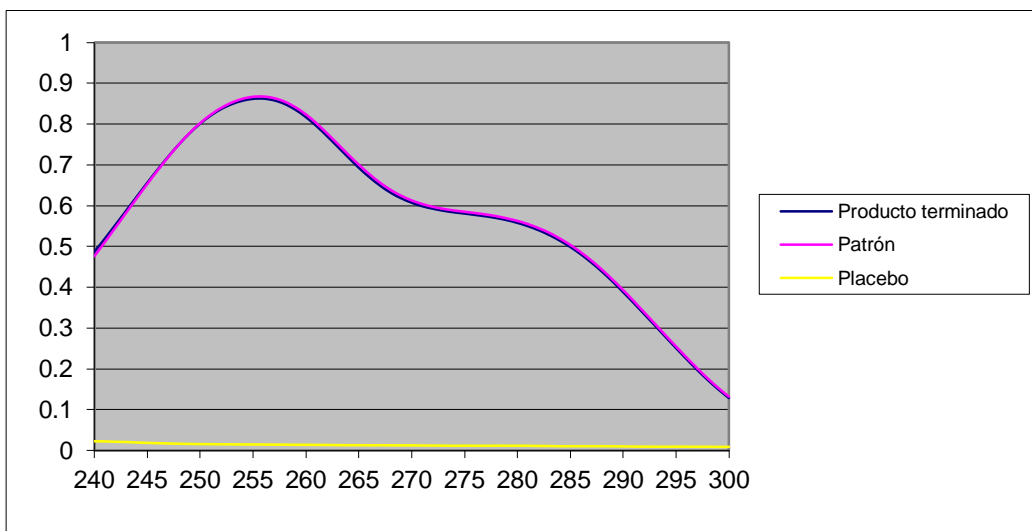
Pruebas	Concentración	CLAR		UV		Límites
		Día	Analista	Día	Analista	
Fischer	80%	4,58	4,12	4,58	4,12	F <sub>exp</sub> < F <sub>tab</sub> F <sub>tab</sub> : 5,05
	100%	3,55	4,92	3,55	4,92	
	120%	2,08	3,40	2,08	3,40	
t- Student	80%	1,256	1,234	1,437	1,213	t <sub>exp</sub> < t <sub>tab</sub> F <sub>tab</sub> : 2,101
	100%	1,153	1,379	1,649	1,449	
	120%	1,186	1,426	1,697	1,652	

En las figuras 1 y 2, se muestran los resultados de los estudios de especificidad para el método por CLAR y de espectrofotometría ultravioleta, respectivamente.



**Figura 1.** Especificidad del método cromatográfico. A- Cromatograma de la muestra placebo. B- Cromatograma de la solución de referencia química. C- Cromatograma de la solución de Guanina. D-

Cromatograma de la muestra. E- Cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis básica. F- Cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis ácida. G- Cromatograma de la muestra sometida a oxidación.



**Figura 2.** Especificidad del método espectrofotométrico

En la tabla 4, se muestran los resultados de la comparación estadística realizada entre ambos métodos.

**Tabla 4.** Comparación entre métodos

Métodos	Resultados	Límites
<b>CLAR</b>	X= 100,10 % S= 0,387	$t_{cal} \leq t_{tab}$  $t_{tab} (11; 0,05) = 2,20$
<b>UV</b>	X= 99,79 % S= 0,709	
<b>t-Student</b>	0,936	

## DISCUSIÓN

### Validación de los métodos analíticos

#### Linealidad

Los valores obtenidos de los coeficientes de regresión y de determinación resultaron cercanos a la unidad, mayores a los regulados: 0,99 y 0,98, respectivamente, demostrando la existencia de

correlación con una probabilidad elevada, así como el grado de relación entre las variables concentración y respuesta detectada por el equipo empleado. Las desviaciones estándares relativas de las pendientes ( $S_b \text{ rel}$ ) y los coeficientes de variación del factor de respuesta ( $CV_f$ ) fueron inferiores al criterio establecido como máximo para estos indicadores: 2,0 y 5,0 %, respectivamente, ambos son considerados estimadores puntuales que permiten caracterizar la variabilidad. Los valores obtenidos de los  $CV_f$ , demostraron que existe variabilidad en la relación respuesta y concentración para cada nivel evaluado. Los resultados obtenidos demuestran la linealidad del método propuesto<sup>4-7</sup>.

### **Exactitud**

En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud al aplicar la prueba de Cochran se obtuvo que las G calculadas fueron menores que la G tabulada para una probabilidad de 0,05,  $k=3$  y  $n=3$ ; por lo tanto, las varianzas de las concentraciones empleadas son equivalentes indicando que la concentración no influye en la variabilidad de estos. Al realizar la prueba de significación entre la recuperación media y el 100 % de recuperación, con un coeficiente de variación de 0,05 %, se obtuvo valores de t calculadas menores que la  $-t$  tabulada. En el rango seleccionado en el estudio de exactitud, los valores de **porcentaje** de recobro están dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos (98,0 – 102,0 %) y los valores de los coeficientes de variación, para cada uno de los niveles de concentración estudiados, fueron menores que el 2,0 %<sup>4-7</sup>.

### **Precisión**

En los estudios de la repetibilidad se alcanzaron coeficientes de variación adecuados lo que demuestra la buena precisión de los métodos según el límite para los métodos cromatográficos  $CV \leq 2,0\%$  y espectrofotométrico  $CV \leq 3,0\%$ .

Los valores que se obtienen de las pruebas de Fischer y t - Student, para los estudios de la precisión intermedia demuestran que no existen diferencias significativas entre las determinaciones alcanzadas por los analistas en diferentes días para una probabilidad de 0,05%, ya que los valores de F calculada son menores que la F tabulada. Al realizar la prueba de t- Student los valores calculados resultaron menores que el tabulado para una probabilidad de 0,05, lo cual demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias obtenidas, con un nivel de significación de un 5,0 %, en cada uno de los métodos evaluados<sup>4-7</sup>.

### **Especificidad.**

En la especificidad de ambos métodos se analizó la sustancia de referencia química de aciclovir, el placebo, la muestra de producto terminado aciclovir 200 mg/5 mL polvo para suspensión y las muestras sometida a condiciones drásticas.

Los resultados obtenidos en las Figuras 1 y 2, demuestran la especificidad del método para ser

aplicado al control de la calidad por no presentarse interferencias de los excipientes de la formulación en la determinación del IFA en el producto terminado por ambos métodos.

Los cromatogramas de las muestras sometidas a condiciones drásticas, demuestran que los productos de degradación no interfieren en la determinación del IFA, porque no eluyen al mismo tiempo de retención del aciclovir, observándose la disminución de la señal correspondiente al aciclovir y la aparición de picos secundarios a otros tiempos de retención (tr).

Por tanto, queda demostrada la especificidad del método analítico para el control de la calidad y el estudio de estabilidad del aciclovir polvo para suspensión, ya que no se evidenciaron interferencias de los excipientes de la formulación, ni de los productos de degradación del aciclovir<sup>4-7</sup>.

### **Comparación de métodos**

No se observaron diferencias significativas entre las medias obtenidas para cada método empleado, cumpliéndose con el criterio de aceptación establecido. Por tanto, se pueden emplear indistintamente ambos métodos, ya que no existen diferencias entre ellos. Al ser considerado el método espectrofotométrico un método sencillo, rápido y menos laborioso puede establecerse el mismo como un método alternativo aplicable al control de la calidad del aciclovir polvo para suspensión oral; mientras que el método cromatográfico pudiera emplearse en los estudios de estabilidad del producto terminado por ser un método altamente específico.

Los métodos analíticos validados para el aciclovir polvo para suspensión, resultaron lineales, exactos, precisos y específicos en el rango de concentraciones estudiadas.

Se demostró que no existían diferencias significativas entre ambos métodos analíticos, pudiéndose emplear ambos métodos en el control de la calidad del producto terminado.

### **LITERATURA CITADA**

1. World Health Organization International agency for research on cancer. Some antiviral and antineoplastic Drugs, and other Pharmaceutical Agents. Vol. 76. IARCS monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon, Francia; 2000. p. 42-72.
2. Canadian Pharmaceutical Association. CPS Compendium of Pharmaceuticals and Specialties, 32nd ed., Ottawa, Canadá; 1997. p. 147-148, 1811-1815.
3. Medical Economics Data Production. PDR®: Physicians' Desk Reference, 53rd ed., Montvale, Estados Unidos; 1999. p. 1272-1277.
4. Anexo I: Buenas Prácticas para Laboratorio de Control de Medicamentos. Validación de Métodos Analíticos. Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED). La Habana, Cuba; 2013. p. 3-25.
5. Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug

Evaluation and Research. Center for Biologics Evaluation and Research. Pharmaceutical Quality/CMC; 2015. p. 3-16.

6. Bliesner DN. Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide. Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc. Publication ed. New Jersey, Estados Unidos; 2006.
7. Chung C. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. En: Chung C, Herman L, Lee YC, Zhang XM. Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc. Publication ed. New Jersey, Estados Unidos; 2004. P. 11-50.