UNIVERSIDAD DE MURCIA

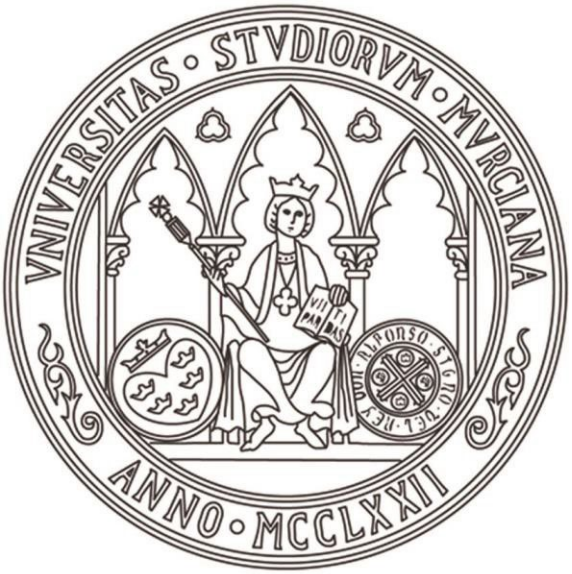
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN QUÍMICO-FARMACÉUTICA DE LACAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ONICOMICOSIS

D.ª Zenia Perez Rodriguez

2024



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN QUÍMICO-FARMACÉUTICA DE LACAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ONICOMICOSIS

Autor: D.ª Zenia Perez Rodriguez

Director/es: D.ª Pilar Viñas López-Pelegrín, D.ª Natalia Campillo Seva y D.ª Zenaida Rodriguez Negrin

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Zenia Perez Rodriguez

doctorando del Programa de Doctorado en

Química Básica y Aplicada

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Técnicas analíticas para la caracterización químico-farmacéutica de lacas para el tratamiento de la onicomicosis

y dirigida por,

D./Dña. Natalia Campillo Seva

D./Dña. Pilar Viñas López-Pelegrín

D./Dña. Zenaida Rodriguez Negrin

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 9 de septiembre de 2024

Fdo.: Zenia Perez Rodriguez

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Dª. Natalia Campillo Seva, Catedrática de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Técnicas analíticas para la caracterización químico-farmaceútica de lacas para el tratamiento de la onicomicosis", realizada por Dª. Zenia Pérez Rodríguez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de septiembre de 2024

CAMPILLO SEVA NATALIA - 27478084F

Firmado digitalmente por CAMPILLO SEVA NATALIA - 27478084F
Fecha: 2024.09.19 13:29:42 +02'00'

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Dª. Pilar Viñas López-Pelegrín, Catedrática de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Técnicas analíticas para la caracterización químico-farmaceútica de lacas para el tratamiento de la onicomicosis", realizada por Dª. Zenia Pérez Rodríguez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 20 de septiembre de 2024

VIÑAS LOPEZ PELEGRIN MARIA DEL PILAR NATIVIDAD - 22476043Y

Firmado digitalmente por VIÑAS LOPEZ PELEGRIN MARIA DEL PILAR NATIVIDAD - 22476043Y
Fecha: 2024.09.20 12:06:22 +02'00'

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Dª. Zenaida Rodriguez Negrin, Profesora Titular de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Técnicas analíticas para la caracterización químico-farmaceútica de lacas para el tratamiento de la onicomicosis", realizada por Dª. Zenia Perez Rodriguez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 9 de septiembre de 2024

Mis más profundos agradecimientos a:

- A mis tutoras Natalia y Pilar por confiar en mí, sobre todo por la ayuda que me han brindado desde el 1er día en que las conocí, no tengo como agradecerles todo lo que han hecho, son varios años ya y han sido las mejores, mis respetos para uds y su gran trabajo, no pude elegir mejores tutoras.
- A los demás profesores del Departamento, Manuel Hernández, Ignacio López, Natalia Arroyo y Marta Pastor, también a Miguel Ángel López, a todos muchas gracias porque de una forma u otra he tenido su ayuda y ha sido importante.
- A mi mamá que además de madre es mi otra tutora, gracias por todo lo bueno que me ha pasado en la vida, siempre estás a mi lado y eres mi ejemplo.
- A mi papá que ha estado siempre ayudándome en todo, eres el mejor padre que puedo tener, eres mi orgullo.
- A mi esposo Orlando, a ti darte las gracias por construir esta familia pequeña de 3 que somos ahora junto a Orlandito y por estar siempre conmigo luchando por salir adelante.
- A mi hijo Orlandito, llegaste a mitad de este proceso y has sido lo mejor que me ha pasado en la vida, te amamos y hacemos todo por ti.
- A mi abuela Zenaida por contonearme tanto desde pequeña hasta ahora y a mi abuelo Adriano que ya no está con nosotros, pero estuvo al inicio de esta etapa de mi vida y siempre me apoyó, a ti te dedico todo en mi vida, te extrañamos y sabemos que siempre vas a estar con nosotros.
- A mis tíos Zhenia y Héctor a quienes quiero con la vida y aunque estén lejos siempre están pensando en mí, por recordarme que el conocimiento es lo único que nos vamos a llevar en esta vida.
- A mi primita Yenia (la hermana que no tuve), mi sobrina Arliana, a mis tíos Adriano y María Victoria, gracias por estar en nuestras vidas.
- A María García, Claudia Giménez, Ana Castell, María José Muñoz, Consuelo Rodriguez y Carmen María Almagro gracias por todo lo que me enseñaron, fueron

especiales para mí, hicieron que estar en otro país lejos de la familia fuera llevadero, de todas me llevo su amistad.

- Al Profesor Francisco Otero, a Victoria, a la Universidad de Santiago de Compostela y a su Facultad de Farmacia, así como a todos los compañeros que me recibieron y ayudaron en los ensayos.
- A los profesores Aliuska, Reinaldo, Ricardo, Meneses, Osmani, Mirthica, Leisy, Michel, Hectico, a todos muchas gracias.
- A la Empresa Suchel Camacho S.A. por colaborar con el Centro.
- A la beca AUIP por concederme la ayuda para poder realizar mi doctorado en la Universidad de Murcia.
- Y una mención bien importante para el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y a la Universidad de Murcia por permitirme estudiar en tan prestigiosa institución.
- A todos los que de una forma u otra me han ayudado en todo este tiempo.

Muchísimas Gracias.

A mi familia

ÍNDICE

RESUMEN 1

SUMMARY 5

OBJETIVOS 9

INTRODUCCIÓN 13

1. ONICOMICOSIS 15
2. FURVINA 17
3. FORMULACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ONICOMICOSIS 18
   3.1. Lacas de uñas 20
4. ESTABILIDAD DE LOS PRODUCTOS FARMACÉUTICOS 20
   4.1. Estudio de estabilidad acelerada 22
   4.2. Estudio de estabilidad de vida de estante 22
   4.3. Estudio de estabilidad de vida estante de la Furvina® 23
5. QUIMICA VERDE Y QUIMICA ANALÍTICA VERDE. MINIATURIZACIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA 24
   5.1. Química analítica verde 25
   5.2. Miniaturización en química analítica 26
6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: MICROEXTRACCIÓN 27
   6.1. Microextracción en fase líquida 28
   6.1.1. Microextracción dispersiva líquido-líquido 29
7. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA CARACTERIZACIÓN QUÍMICO FARMACÉUTICA DE FÁRMACOS. DETERMINACIÓN DE FURVINA® 34
   7.1. Espectrofotometría de absorción molecular UV/VIS 35
   7.2. Espectroscopía infrarroja 36
   7.3. Técnicas cromatográficas 38
   7.4. Difracción de rayos X 39
   7.5. Calorimetría diferencial de barrido 40
   7.6. Microscopía electrónica de barrido 41
   7.7. Espectroscopía Raman 42
   7.8. Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica 44
   7.9. Técnicas analíticas aplicadas para la determinación del IFA Furvina® 46

8. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CONTROL EN LA FABRICACIÓN Y USO DE FÁRMACOS. GENERALIDADES 47

9. BIBLIOGRAFIA 49

CAPÍTULO I:
DESARROLLO DE UNA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA UV/VIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FURVINA® EN LACAS DE UÑAS 61

I.1. INTRODUCCIÓN 63

I.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL 64

I.2.1. Procedimiento de cualificación del espectrofotómetro UV/VIS 64

I.2.2. Procedimiento de aplicación del método espectrofotométrico UV/VIS para la determinación de Furvina® en la laca medicinal 66

I.2.3 Procedimiento de validación del método propuesto 67

I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 70

I.3.1. Cualificación del espectrofotómetro UV/VIS 70

I.3.2. Validación del método espectrofotométrico propuesto 72

I.4. CONCLUSIONES 83

I.5. BIBLIOGRAFIA 84

CAPITULO II:
DESARROLLO DE UN MÉTODO BASADO EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR CON DETECCIÓN POR DIODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FURVINA® EN LACAS DE UÑAS 87

II.1. INTRODUCCIÓN 89

II.2. PARTE EXPERIMENTAL 90

II.2.1. Reactivos 90

II.2.2. Instrumentación 91

III.2.3. Muestras 91

III.2.4. Tratamiento de las muestras 92

II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 92

III.3.1. Optimización de la separación cromatográfica y detección DAD 92

III.3.2. Validación del método analítico 93

II.4. CONCLUSIONES 96

II.5. BIBLIOGRAFÍA 97

CAPÍTULO III:
MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE FURVINA® EN ORINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN POR DIODOS 99

III.1. INTRODUCCIÓN 101

III.2. PARTE EXPERIMENTAL 105

III.2.1. Reactivos 105

III.2.2. Instrumentación 105

III.2.3. Muestras y procedimiento analítico 106

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 107

III.3.1. Selección de las condiciones cromatográficas y de detección 107

III.3.2. Optimización de las condiciones DLLME 107

III.3.3. Validación del método analítico 110

III.3.4. Análisis de muestras reales 116

III.4. CONCLUSIONES 117

III.5. BIBLIOGRAFÍA 118

CAPÍTULO IV:
CARACTERIZACIÓN DE LAS LACAS DE UÑAS MEDIANTE DIFERENTES METODOLOGÍAS ANALÍTICAS. EVALUACIÓN DE LA PENETRABILIDAD 123

IV.1. INTRODUCCIÓN 125

IV.1.1. Técnicas analíticas utilizadas para la evaluación de las lacas de uñas 125

IV.1.1.1. Estudios de penetrabilidad de las lacas 125

IV.2. PARTE EXPERIMENTAL 128

IV.2.1. Difracción de rayos X 128

IV.2.1.1. Elemento de prueba 128

IV.2.1.2. Metodología e instrumentación 129
IV.2.2. Microscopia electrónica de barrido 129
IV.2.2.1. Equipos 129
IV.2.2.2. Materiales, reactivos y muestras 129
IV.2.2.3. Metodología 129
IV.2.3. Espectroscopía infrarroja 130
IV.2.3.1 Equipos 130
IV.2.3.2. Muestras 130
IV.2.3.3 Metodología 130
IV.2.4. Calorimetría diferencial de barrido 130
IV.2.4.1 Equipos 130
IV.2.4.2 Materiales y muestras 130
IV.2.4.3 Metodología 130
IV.2.5. Permeabilidad 131
IV.2.5.1. Equipos 131
IV.2.4.2. Materiales y muestras 131
IV.2.4.3. Metodología 131
IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 132
IV.3.1. Resultados de los análisis mediante XRD 132
IV.3.2. Resultados obtenidos mediante SEM 133
IV.3.3. Resultados de los análisis mediante IR 136
IV.3.4. Resultados de los análisis mediante DSC 137
IV.3.5. Estudios de permeabilidad 137
IV.4. CONCLUSIONES 139
IV.5. BIBLIOGRAFIA 140

CAPÍTULO V:
DETERMINACIÓN DE PLOMO, ARSÉNICO Y COBRE EN LACAS DE UÑAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA 143

V.1. INTRODUCCION 145
V.1.1. Presencia de metales en cosméticos 145
V.1.2. Métodos analíticos para la determinación de metales en fármacos 150

V.1.2.1. Espectroscopía de absorción atómica 151
V.1.2.2. Espectrometría de absorción atómica electrotérmica con fuente continua de alta resolución 152

V.2. PARTE EXPERIMENTAL 154
V.2.1. Instrumentación 154
V.2.2. Reactivos 154
V.2.3. Muestras y procedimiento de preparación de la muestra 154
V.2.4. Procedimiento para la determinación de plomo 155
V.2.5. Procedimiento para la determinación de arsénico 156
V.2.6. Procedimiento para la determinación de cobre 157

V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 158
V.3.1. Selección de los programas de calentamiento 158
V.3.2. Validación de los métodos analíticos 159
V.3.3. Análisis de las muestras 161

V.4. CONCLUSIONES 162
V.5. BIBLIOGRAFIA 164

CAPÍTULO VI:
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LACAS DE UÑAS A DOSIS ÚNICA DÉRMICA Y DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS IRRITANTES Y/O CORROSIVOS DÉRMICOS EN CONEJOS 169

VI.1. INTRODUCCIÓN 171
VI.1.1. Productos cosméticos 171
VI.1.2. Estudios de seguridad 173
VI.1.3. Fundamentación del biomodelo a emplear 174

VI.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL 175
VI.2.1. Instrumentación 175
VI.2.2. Reactivos 175
VI.2.3. Características de la instalación de ensayo 175
VI.2.4. Muestras y procedimiento analítico 175

VI.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 185
VI.3.1. Estudio de toxicidad aguda dérmica 185

VI.3.2. Resultados del estudio de irritabilidad dérmica 192

VI.4. CONCLUSIONES 194

VI.5. BIBLIOGRAFÍA 196

CONCLUSIONES 201

CONCLUSIONS 205

ANEXOS 209

ABREVIATURAS 217

RESUMEN

Las infecciones fúngicas de las manos y los pies son muy comunes en los seres humanos. Los dermatofitos, las levaduras y los mohos son los tres principales hongos que afectan a la piel, pueden causar onicomicosis y perjudican a la población mundial. En la actualidad, en el mercado internacional existen muchos agentes antimicóticos orales que se han utilizado para el tratamiento de infecciones fúngicas de las uñas de las manos y de los pies, pero estos muestran varias desventajas como toxicidad y altos contenidos en el ingrediente farmacéutico activo (IFA).

El IFA 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)furano (también conocido como Furvina®) es un agente antimicrobiano eficiente con actividad de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras y hongos filamentosos. El fármaco Dermofural® es un ungüento dermatológico sobre la base de este IFA al 0,15% para el tratamiento de enfermedades fungosas en piel y uñas, que forma parte del Cuadro Básico de Medicamentos de Cuba. Este fármaco es activo frente a la onicomicosis, pero requiere tratamientos prolongados debido a su poca penetración en la uña, ya que es un ungüento.

En esta Tesis Doctoral se desarrollan diferentes metodologías analíticas para la caracterización químico-farmacéutica de fármacos en forma de lacas para el tratamiento de la onicomicosis. La presentación de dichas metodologías se halla estructurada en seis capítulos

En el Capítulo I se ha propuesto el desarrollo y validación una técnica analítica espectrofotométrica ultravioleta-visible para la determinación de Furvina® en diferentes lacas de uñas. Para la validación del método se utilizan los criterios establecidos en el Anexo No. I de Buenas Prácticas de Laboratorio para control de medicamentos del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos de Cuba, determinándose la especificidad, linealidad, sensibilidad, precisión y veracidad. Además, la instrumentación empleada fue sometida a la prueba de cualificación respecto a control de la absorbancia, límite de luz parásita y resolución.

En el Capítulo II se propone el desarrollo y validación de un método basado en la combinación de cromatografía líquida capilar con detección mediante diodos en serie (LCcapilar-DAD) para la determinación de Furvina® en lacas de uñas para el tratamiento de onicomicosis. La separación cromatográfica se llevó a cabo en modo de fase reversa. La validación del método proporcionó valores muy favorables para las distintas características analíticas estudiadas.

El Capítulo III se centra en el desarrollo de un nuevo método analítico basado en el acoplamiento LCcapilar-DAD para la determinación de Furvina® en orina humana. El

tratamiento de muestra implica la técnica miniaturizada microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME), permitiendo alcanzar altos niveles de preconcentración del analito en tiempos muy reducidos. El método desarrollado proporcionó muy buenos valores para las distintas características analíticas de validación y además resulta accesible para cualquier laboratorio de análisis, ya que emplea instrumentación de fácil acceso.

En el Capítulo IV se propone la caracterización de las lacas de uñas mediante diferentes metodologías analíticas incluyendo difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía infrarroja (IR) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Además, se evalúa la penetrabilidad de las lacas utilizando celdas de Franz, concluyendo la necesidad de mantener la laca en contacto con la uña durante un periodo superior a 11 días para que funcione contra la onicomicosis.

El Capitulo V aborda el uso de la técnica espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica con fuente continua de alta resolución (HR-CS ETAAS) para la determinación de los niveles de los metales plomo, arsénico y cobre en diferentes lacas de uñas y en el IFA Furvina®. Las metodologías desarrolladas para cada uno de los metales han permitido alcanzar muy buenos resultados para los parámetros de validación.

Por último, en el Capítulo VI se propone la evaluación de la toxicidad a dosis única dérmica en conejos y la determinación de los efectos irritantes y/o corrosivos dérmicos en conejos para tres lacas de uñas (transparente, roja y blanca). Los resultados obtenidos permiten afirmar que las lacas no producen toxicidad dérmica demostrable al administrarse a una dosis límite de 2000 mg/kg; además, no presentan potencial irritante dérmico y se clasifican como no irritantes para la piel.

SUMMARY

Fungal infections of the hands and feet are very common in humans. Dermatophytes, yeasts and moulds are the three main fungi that affect the skin, can cause onychomycosis and harm the world's population. Currently, there are many oral antifungal agents on the international market that have been used for the treatment of fungal infections of the fingernails and toenails, but these show several disadvantages such as toxicity and high active pharmaceutical ingredient (API) contents.

The API 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)furan (also known as Furvina®) is an efficient antimicrobial agent with broad spectrum activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts and filamentous fungi. Dermofural® is a dermatological ointment based on this 0.15% API for the treatment of fungal diseases of the skin and nails, which is part of Cuba's Basic Drug List. This drug is active against onychomycosis but requires prolonged treatment due to its poor penetration into the nail, as it is an ointment.

This Doctoral Thesis develops different analytical methodologies for the chemical-pharmaceutical characterisation of drugs in the form of lacquers for the treatment of onychomycosis. The presentation of these methodologies is structured in six chapters.

Chapter I proposes the development and validation of an ultraviolet-visible spectrophotometric analytical technique for the determination of Furvina® in different nail lacquers. For the validation of the method, the criteria established in Annex No. I of Good Laboratory Practices for drug control of the Centre for State Control of the Quality of Medicines, Equipment and Medical Devices of Cuba were used, determining the specificity, linearity, sensitivity, precision and trueness. In addition, the instrumentation used was subjected to qualification testing with respect to absorbance control, stray light limit and resolution.

Chapter II proposes the development and validation of a method based on the combination of capillary liquid chromatography with diode array detection (LCcapillary-DAD) for the determination of Furvina® in nail lacquers for the treatment of onychomycosis. The chromatographic separation was carried out in reverse phase mode. The validation of the method gave very favourable values for the different analytical characteristics studied.

Chapter III focuses on the development of a new analytical method based on LCcapillary-DAD coupling for the determination of Furvin® in human urine. The sample treatment involves the miniaturised dispersive liquid-liquid microextraction technique, allowing high pre-concentration levels of the analyte to be achieved in very

short times. The developed method provided very good values for the different analytical validation characteristics and is also accessible to any analytical laboratory, as it uses easily accessible instrumentation.

Chapter IV proposes the characterisation of nail lacquers by different analytical methodologies including X-ray diffraction, scanning electron microscopy, infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. In addition, the penetrability of the lacquers is evaluated using Franz cells, concluding that it is necessary to keep the lacquer in contact with the nail for a period of more than 11 days for it to work against onychomycosis.

Chapter V deals with the use of the high-resolution continuous source electrothermal atomisation atomic absorption spectrometry technique for the determination of the levels of the metals lead, arsenic and copper in different nail lacquers and in the IFA Furvina®. The methodologies developed for each of the metals have led to very good results for the validation parameters.

Finally, Chapter VI proposes the evaluation of dermal single dose toxicity in rabbits and the determination of dermal irritant and/or corrosive effects in rabbits for three nail varnishes (clear, red and white). The results obtained show that the lacquers do not produce demonstrable dermal toxicity when administered at a limit dose of 2000 mg/kg; furthermore, they have no dermal irritant potential and are classified as non-irritating to the skin.

OBJETIVOS

El trabajo presentado en Tesis Doctoral se encuentra enmarcado dentro del proyecto 90009 "Estudios Químico-Farmacéuticos de una formulación sobre la base de Furvina® para el tratamiento de la onicomicosis" del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Además, forma parte de la línea de trabajo del grupo de investigación "Métodos Instrumentales Aplicados" en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Murcia.

La identificación y cuantificación de ingredientes farmacéuticos activos (IFA) en formulaciones requiere el uso de herramientas de análisis. Por ello, en esta Tesis se pretende como objetivo general el desarrollo de diferentes metodologías analíticas para la caracterización químico-farmacéutica de lacas para el tratamiento de la onicomicosis conteniendo como Furvina® como IFA.

La espectrofotometría UV/VIS y la cromatografía líquida capilar con detector de diodos son dos técnicas analíticas que se han utilizado para la cuantificación del IFA. Se utilizó como criterio para la validación los establecidos en el Anexo No. I de Buenas Prácticas de Laboratorio de Control de Medicamentos del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), determinándose la especificidad, linealidad, precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia y la veracidad. Además, se realizó la prueba de cualificación al espectrofotómetro en cuanto a control de la absorbancia y límite de luz parásita.

La cromatografía líquida es la técnica de análisis más utilizada en los laboratorios de control farmacéutico debido a los diferentes tipos de analitos con diversas características que puede separar, permitiendo análisis muy específicos y sensibles.

Cuando la concentración de los analitos en la muestra es muy baja, es necesaria una etapa previa de aislamiento y preconcentración de los compuestos de interés. Gracias a los avances en los procesos miniaturizados se han desarrollado las denominadas técnicas de microextracción, que permiten la extracción de los analitos presentes en la muestra en un pequeño volumen de fase extractante, tanto de naturaleza líquida como sólida, produciéndose así la preconcentración de los analitos antes de su determinación cromatográfica.

Los objetivos concretos que se proponen a lo largo de la Tesis son:

1. Desarrollar y validar un método analítico basado en la técnica espectrofotométrica de absorción molecular UV/VIS para la cuantificación del IFA Furvina® en lacas

de uñas. Con objeto de garantizar la validez de los resultados obtenidos se realizan las pruebas correspondientes de cualificación del espectrofotómetro empleado. La validación de la metodología desarrollada implica la obtención de los parámetros: especificidad, linealidad, precisión, sensibilidad y veracidad.

2. Desarrollar y validar un método basado en cromatografía líquida capilar con detección mediante de diodos en serie (LCcapilar-DAD) para la determinación de Furvina® en lacas de uñas para el tratamiento de onicomicosis. El desarrollo del método implica optimizar las distintas variables que afectan tanto a la separación cromatográfica como al sistema de detección. Para validar el método propuesto se obtendrán los parámetros de especificidad, linealidad, precisión, sensibilidad y veracidad.

3. Desarrollar y validar un método de análisis basado en LCcapilar-DAD para la determinación de Furvina® en orina humana. Teniendo en cuenta los bajos niveles esperados de este IFA en las muestras, se propone utilizar la técnica de microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) en la etapa de preparación de la muestra. Por ello, las distintas variables que afectan a la eficiencia de preconcentración mediante DLLME serán objeto de estudio. La metodología DLLME con LCcapilar-DAD finalmente propuesta se ha validado y aplicado a muestras reales.

4. Caracterizar las lacas de uñas para el tratamiento de la onicomicosis mediante las técnicas difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía infrarroja (IR) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Evaluar la penetrabilidad de las lacas utilizando celdas de Franz.

5. Determinar el contenido de los metales plomo, arsénico y cobre mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica y fuente continua de alta resolución (HR-CS ETAAS) en las lacas de uñas, así como en el IFA Furvina®. Para ello, se estudia la influencia de las distintas variables que afectan a los parámetros de validación del método.

6. Evaluar la toxicidad de los formulados de lacas de uñas con IFA Furvina® a dosis única dérmica en conejos y determinar los efectos irritantes y/o corrosivos dérmicos en conejos.

INTRODUCCIÓN

1. ONICOMICOSIS

Las infecciones de las uñas y pliegues ungueales causadas por levaduras del género de hongos unicelulares *Candida* fueron descritas por Dubendorfer en 1904 y 1910. Sabouraud, a través de su descripción clínico-micológica de las enfermedades producidas por dermatofitos, denominó *tinea unguium* a la infección de las uñas por estos microorganismos (1).

La *tinea unguium*, onicomicosis (del griego *ónix* (uña) y *ónychos* (micosis)), tiña ungueal o tiña de las uñas es una infección superficial que altera el grosor y el color normal de las uñas, tanto de las manos como de los pies. Esta infección es provocada por tres tipos de hongos: dermatofitos (de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum*), levaduras (*Candida albicans* en personas inmunosuprimidas) y mohos no dermatofitos. La prevalencia de esta afección en la población general varía, dependiendo de la región estudiada, entre 2 y 20% (2,3). El riesgo de contraer una infección por un dermatofito en la vida de una persona varía entre un 10 y 20% y es una de las formas más frecuentes de onicomicosis. Las uñas de los pies son más propensas a sufrir esta afección que las de las manos y la prevalencia en la población es mayor en adultos (4–7).

Los síntomas de la onicomicosis son principalmente estéticos, al mostrar las uñas afectadas coloración blanquecina o amarillenta, quebradas, frágiles y deformes. Para entender mejor esta afección se muestra un esquema de la uña con sus partes diferenciadas (Figura 1): el perioniquio o unidad ungueal comprende la lámina ungueal o uña y las estructuras blandas que la rodean (el hiponiquio, la matriz ungueal y los pliegues).

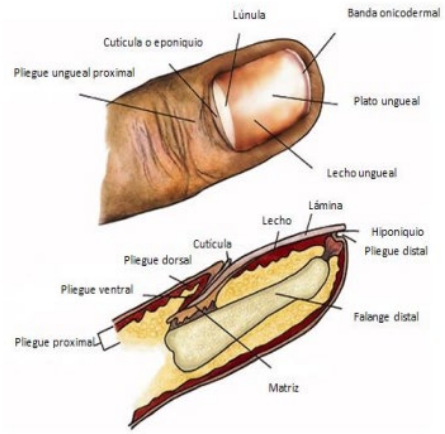


Figura 1. Representación anatómica de la unidad ungueal.

En el perioniquio se pueden distinguir cinco unidades anatómicas básicas:

- Matriz ungueal: Tejido generativo mayoritario del cuerpo de la uña. El cuerpo de la matriz se sitúa en la superficie ventral del pliegue ungueal proximal y se extiende hasta el extremo distal de la lúnula. La lúnula es el margen arqueado de la matriz visible a través de la lámina (8).
- Lecho ungueal (matriz estéril): Tejido compuesto de dermis y epidermis sobre el que se sitúa la lámina ungueal. Es un tejido que posee una elevada vascularización y una red de filamentos simpáticos. Se extiende desde la lúnula hasta el hiponiquio (9).
- Hiponiquio: Extremo cutáneo subyacente a la uña libre, bordeado por el pliegue distal (10).
- Pliegues ungueales: Surcos cutáneos que rodean la lámina sellando de forma efectiva el tejido subungueal, que por su situación se identifican como proximales, distales y laterales (9). A nivel del surco proximal, se juntan las capas córneas de la cara dorsal y ventral de la uña formando una expansión llamada cutícula, la cual constituye una protección frente a agentes externos (10).
- Lámina ungueal o uña: Estructura queratinizada en el segmento dorso-distal de los dígitos que se origina en la matriz ungueal y se encuentra insertada entre los pliegues ungueales adherida al lecho ungueal. Presenta una coloración rosada correspondiente a los vasos sanguíneos. En la parte distal de la lámina ungueal, en las proximidades del borde libre, se encuentra la banda onicodermal, una banda blanca que constituye la primera barrera para cualquier agente externo (11).

Al progresar la infección por micosis, se aprecia la separación de la lámina ungueal del lecho de la uña. En ocasiones, se desarrolla dolor o incomodidad y, a veces, también se observa celulitis de la piel vecina. El extremo distal de la uña es la parte que se afecta con más frecuencia, y por el contrario el inicio de la afección en el extremo proximal o lateral es mucho menos frecuente.

La bibliografía indica que alrededor del 30% de las micosis superficiales son onicomicosis. También se considera que las onicomicosis son las micosis superficiales más difíciles de diagnosticar y tratar, detectándose que uno de cada cinco pacientes con un diagnóstico y un tratamiento correcto de la enfermedad no se cura (12,13). Se trata de una patología infradiagnosticada, de modo que la prevalencia estimada en la población general varía de forma muy amplia. Un estudio realizado en Europa a principios de este siglo estimó en un 26,9% la prevalencia de onicomicosis (14,15). En España, la

prevalencia se estimó en un 2,6% en un trabajo publicado en 1995 por Sais et al. (16). Desde ese año hasta la actualidad estos valores han oscilado entre 1,7-9,1% (16–20) en adultos y entre 0-7,7% en niños (21). En cuanto a la localización, las onicomicosis de las uñas de los pies son más frecuentes que las de las manos, con una proporción en España de 4:1 (15,16). Concretamente en Cuba no existen datos de la Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud del Ministerio de Salud Pública acerca de la afectación de esta enfermedad (22), aunque la incidencia en la población es apreciable.

A pesar de encontrarse bien definidos los grupos de agentes de onicomicosis y del advenimiento de numerosos fármacos antifúngicos para la terapia de estas infecciones, persisten las dificultades para establecer un diagnóstico correcto y un tratamiento eficaz, por lo cual se puede afirmar que la onicomicosis sigue siendo en la actualidad una problemática de salud pública.

2. FURVINA®

El compuesto químico 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, comúnmente conocido como Furvina® o G-1, constituye un ingrediente farmacéutico activo (IFA), que es sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central ¨Marta Abreu¨ de Las Villas (Cuba). Se presenta en forma de polvo cristalino de color amarillo, sus partículas son alargadas y de superficie no lisa. Tiene una masa molecular de 296,924 g/mol y su temperatura de fusión es de 89-92 °C (23). La Figura 2 muestra la estructura química de la Furvina®.

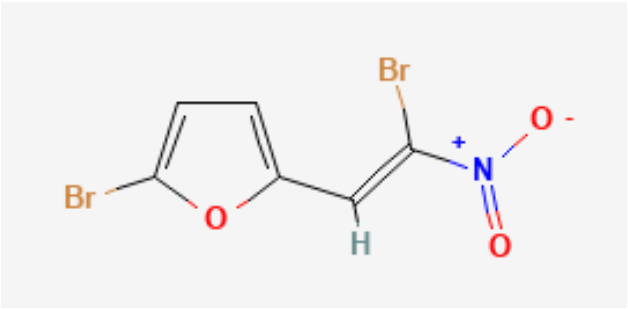


Figura 2. Estructura química de la Furvina®.

La Furvina® presenta actividad *in vitro* como bactericida-fungicida de amplio espectro, lo que ha sido comprobado frente a 908 cepas de bacterias Gram-negativas y 119 cepas de Gram-positivas, de las cuales sólo 11 cepas de 4 especies mostraron una

mínima concentración inhibitoria igual o mayor a 50 µg/mL (24). Otros trabajos refieren su actividad frente a *Enterobacter sp, Klebsiella* y *Pseudomona aeruginosa*. En el caso de la *Pseudomona aeruginosa*, Conde et al. en 1989 compararon la efectividad de la Furvina® con la de los antibióticos polimixin B, gentamicina y tetraciclina, mostrando que el 33% de las cepas fueron resistentes a estos antibióticos convencionales, no siendo así para la Furvina® (25,26). Asimismo, Torriente evaluó en 1990 la actividad de la Furvina® frente a 68 cepas de *Candida* de diferentes especies y demostró la potente acción antifúngica del IFA Furvina®, semejante a la de anfotericin B y superior a la de miconazol (27). Por otra parte, González et al. en 1993 obtuvieron resultados similares frente a 293 cepas de hongos gemantes del género *Candida*. Esta actividad ha sido demostrada también frente a hongos dermatofitos y hongos filamentosos (28). Estudios realizados por Blondeau et al. en 1997, corroboraron y ampliaron los resultados de actividad *in vitro* frente a 2702 microorganismos multi-resistentes (29,30). Los datos de actividad biológica de este principio activo le presentan como una interesante alternativa terapéutica a la línea de los antiinfecciosos.

La estabilidad de la Furvina® ha sido estudiada en estado sólido, disuelta en varios disolventes y en presencia de algunos excipientes de uso tradicional en formulaciones farmacéuticas. Jorge et al. en 1993 comprobaron que este compuesto no sufre degradación durante 35 días de exposición en condiciones de humedad de 100, 95, 86 y 76%, y además no se observaron variaciones significativas en ninguno de los parámetros evaluados en muestras expuestas a la luz durante 91 días. El estudio de estabilidad acelerado por la temperatura mostró que no se produce degradación de este IFA a los 89 días bajo temperaturas de 40, 50, 60 y 70°C, siendo estos resultados corroborados en estudios de estabilidad a largo plazo, en los que no se detectó degradación tras cinco años de almacenamiento a temperatura ambiente no controlada (31).

Por todo lo expuesto, el IFA Furvina® resulta muy prometedor en el tratamiento de la onicomicosis, ya que a partir del mismo pueden desarrollarse nuevas formulaciones debido a su actividad frente a *Candida albicans* y otros microorganismos causantes de esta enfermedad.

3. FORMULACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE ONICOMICOSIS

En el mercado centroamericano se encuentran diferentes formulaciones comerciales para el tratamiento de la onicomicosis, tales como Amorolfina 5%, Laca Ciclopirox 8% y

Tioconazol 28%, basándose todas ellas en la utilización de altas concentraciones de los IFAs y requiriendo períodos de tratamiento prolongados (32).

La empresa cubana "Laboratorios Farmacéuticos Roberto Escudero",situada en La Habana, tiene como misión fundamental la investigación, producción y distribución de medicamentos a empresas provinciales de suministros médicos y farmacéuticos, además de producir y comercializar de forma mayorista y minorista equipos médicos y sus accesorios, medicamentos sólidos y semisólidos en forma de óvulos, supositorios, polvos, cremas, jaleas, ungüentos y líquidos, destinados a uso oral, dérmico, rectal, vaginal, y estomatológico; envasar y comercializar materias primas para uso dispensarial y asistencia médica y brindar servicios de investigaciones, desarrollo de productos, así como transferencia de tecnologías.

En el cuadro básico de medicamentos de Cuba está registrada en el formulario nacional de medicamentos la Terbinafina 1%, usada para tratamientos antifúngicos, pero el IFA de esta formulación es importado, por lo que se dificulta su producción en la Empresa Farmacéutica Roberto Escudero, especializada para esos fines (33).

El IFA Furvina® posee un efecto antimicrobiano significativo comparable al de otros agentes antimicrobianos empleados en la clínica actualmente, siendo activos contra bacterias, levaduras y hongos filamentosos con valores de concentración mínima inhibitoria que oscilan de 0,5 a 32 μg/mL (34). Una de sus formulaciones en forma de crema contiene Furvina® al 0,25% y fue ensayada en pacientes con onicomicosis producida por *Candida* y dermatofitos y los resultados fueron superiores al fármaco Ketoconazol en crema al 2%, con el inconveniente de que la crema sobre la base de Furvina® es inestable, pudiendo observarse la generación de productos de degradación de la Furvina® (35).

En el año 2007 se registró el ungüento dermatológico Dermofural® sobre la base de este IFA al 0,15% para el tratamiento de enfermedades fungosas en piel y uñas, formando parte del Cuadro Básico de Medicamentos de Cuba. Este fármaco es activo frente a la enfermedad, pero los tratamientos son prolongados debido a su poca penetración en la uña, ya que es un ungüento. En 2015 el CBQ formuló una tintura con Furvina® al 0,25%, que además contenía urea al 1% como agente queratinizante y alcohol bencílico como disolvente (36). En la Figura 3 se observa una placa Petri en la que se evaluó la actividad del formulado frente a *Candida albicans*. Las diluciones de la tintura a 15 y 30 μg/mL fueron activas, lo que demostró que el formulado mantuvo su acción frente a este tipo de hongos al igual que el IFA (37). Por otro lado, al formulado

se le determinaron propiedades organolépticas y químico-físicas, resultando ser un líquido aceitoso de color amarillo, de densidad 1,043±0,02 g/mL, de olor característico al excipiente alcohol bencílico y determinándose que debía almacenarse protegido de la luz (36).

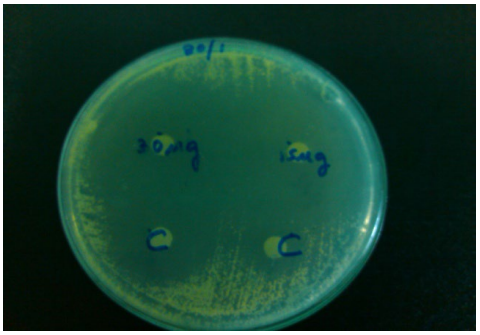


Figura 3. Evaluación de la tintura frente a *Candida albicans*.

Dado que el formulado no fue estable a lo largo del tiempo con condiciones controladas, fue necesario abordar el estudio de nuevas formulaciones sobre este IFA con otros vehículos y excipientes. Así se propone el desarrollo de un formulado sobre la base de una laca.

3.1. Lacas de uñas

Una laca es un colorante puro extendido sobre un sustrato por absorción, coprecipitación o reacción química que no incluye ninguna combinación de ingredientes realizada mediante un proceso de mezclado simple. Al ser las lacas poco solubles en agua, se utilizan cuando es importante evitar que el color se desplace y cuando es necesario que penetre sobre las uñas (38).

Las formulaciones sobre la base de lacas son utilizadas mundialmente debido a su adsorción sobre la superficie de la uña y a su rápida y fácil aplicación. Además, se usan como vehículos ya que son consideradas no irritantes para el tejido periungueal, tienen alta estabilidad y los periodos de tratamiento no son prolongados debido a sus altas capacidades de penetración a través de las uñas (39).

4. ESTABILIDAD DE LOS PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

La estabilidad de un fármaco puede definirse como la capacidad de una formulación particular, en un sistema de envase o cierre específico, para mantenerse dentro de sus especificaciones físicas, químicas, microbiológicas, terapéuticas y tóxicas (40). Los

estudios de estabilidad de un producto farmacéutico son necesarios para su registro y comercialización.

La fecha de caducidad es la fecha especificada en la caja o en la etiqueta de un medicamento e identifica el tiempo en el que el preparado se mantiene estable, si se almacena bajo las condiciones recomendadas, considerándose inadecuado su uso tras dicha fecha (41). La fecha de caducidad es una aplicación e interpretación directa de los conocimientos obtenidos a partir de estudios de estabilidad. La Tabla I muestra algunas propiedades de los medicamentos que pueden verse modificadas al cumplirse la fecha de su caducidad.

Tabla I. Propiedades de los fármacos que pueden afectarse tras su fecha de caducidad.

Propiedades	Consecuencia
Químicas	Cada ingrediente activo puede variar su integridad química y la potencia declarada
Físicas	Pueden alterarse algunas propiedades físicas originales: apariencia, uniformidad, disolución y color, entre otras
Microbiológicas	Puede afectarse la esterilidad o la resistencia al crecimiento bacteriano

Aunque existen excepciones, en general, el 90% de la potencia marcada para un fármaco se reconoce como el nivel de potencia mínima aceptable. La estabilidad de los principios activos es el principal criterio para determinar la aceptación o rechazo de un medicamento.

Existen diferentes procesos que determinan la inestabilidad y conducen al rechazo del producto:

1. Degradación química del principio activo.
2. Formación de algún producto tóxico resultante del proceso de descomposición.
3. Inestabilidad que puede disminuir la biodisponibilidad del fármaco.
4. Cambios sustanciales en la apariencia física de la forma dosificada.

Además, existen factores ambientales que pueden afectar a los medicamentos, de entre los que destacan (34):

- Humedad: puede provocar daño físico (ablandamiento) y químico (efervescencia o hidrólisis). Se recomienda evitar el uso de zonas de almacenaje húmedas. Además, los fármacos deben almacenarse separados entre 15-20 cm del suelo y muros, para evitar la transferencia de humedad.

- Temperatura: las altas temperaturas aceleran las reacciones de degradación y las bajas en exceso facilitan el deterioro de algunos materiales plásticos. Por ello, los productos farmacéuticos deben almacenarse en frigoríficos o locales con aire acondicionado debidamente termostatizados.

- Luz: puede provocar fotodegradación, observándose cambio de color en algunos casos, por lo que deben evitarse los envases transparentes.

La estabilidad de un producto farmacéutico puede valorarse a través de los estudios de estabilidad acelerada y de estabilidad de vida de estante. Los estudios de estabilidad acelerada se realizan a temperatura controlada de 40±2 ºC y 75±5% de humedad relativa, valorándose inmediatamente tras su preparación y tras 1, 2, 3 y 6 meses; mientras que los estudios de estabilidad de vida de estante se llevan a cabo a 70% de humedad relativa para una temperatura de 30 °C.

4.1. Estudio de estabilidad acelerada

Este tipo de estudio está diseñado para lograr el incremento de la velocidad de degradación química y los cambios físicos de la sustancia mediante condiciones de almacenamiento extremas o exageradas, con el propósito de monitorear las reacciones de degradación y predecir el período de validez bajo condiciones normales de almacenamiento. En el diseño de estos estudios se pueden incluir temperaturas elevadas, altas humedades y exposición a luz intensa. Los resultados de estudios acelerados de estabilidad deben ser complementados por los estudios efectuados en condiciones de almacenamiento normales o en condiciones definidas (40).

4.2. Estudio de estabilidad de vida de estante

Este estudio se realiza para verificar la estabilidad a partir de lotes de producción almacenados bajo condiciones normales o naturales. Además, permite determinar el período de validez, que es el tiempo necesario para que se degrade el 10% del principio activo contenido en una forma de dosificación ($t_{10\%}$). Para ello se hace necesario realizar

el estudio de las características físicas, químicas, microbiológicas y biofarmacéuticas del medicamento durante el período de validez propuesto bajo las condiciones de almacenamiento adecuadas y en el sistema envase/cierre en que se propone comercializar, o con el que circula en el mercado, permitiendo confirmar o establecer el período de validez y las condiciones de almacenamiento (42).

4.3. Estudio de estabilidad de vida estante de la Furvina®

El estudio de estabilidad del IFA Furvina® se realizó en conformidad con la regulación del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) de Cuba (42), las normas Consejo Internacional para la Armonización (ICH) de requisitos técnicos para productos farmacéuticos de uso humano (43) y de la Farmacopea estadounidense (USP) (44). La Tabla II muestra la evaluación de los criterios establecidos para el control de la calidad de la Furvina®.

Tabla II. Control de la calidad de la Furvina®.

Índices de calidad	Límites de aceptación
Características organolépticas	Cristalino y seco, de color amarillo
Intervalo de fusión	Entre 89,0 y 92,0 °C
Espectro UV/VIS	Máximo de absorción a 372 nm
Pérdidas por desecación	≤ 0,50%
Residuo de ignición	≤ 0,10%
Metales pesados	≤ 20 μg/g
Contenido de Furvina®	Entre 98,0 y 102,0%
Contenido de monobromado (MBr) (principal impureza)	≤ 1,00%
Límite microbiano	Recuento total de microorganismos aerobios UFC/g: No más de 10^3 Recuento total combinado de *hongos filamentosos* y *levaduras* UFC/g: No más de 10^2 Ausencia de: *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa*

UFC: Unidad formadora de colonias

5. QUÍMICA VERDE Y QUÍMICA ANALÍTICA VERDE. MINIATURIZACIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA

No cabe duda del papel de la química para el desarrollo y bienestar de la sociedad actual, siendo previsible que mantenga su protagonismo en el futuro más cercano. Con frecuencia se la ha relacionado con el deterioro medioambiental debido al amplio uso de productos contaminantes y a la aplicación de procesos energéticamente poco eficientes.

La química verde surgió para solventar estos problemas, manteniendo como prioridad el respeto al medio ambiente al proporcionar sistemas ecoeficientes con ahorros significativos de recursos y energía. En este sentido, la química verde minimiza o evita el uso y/o generación de sustancias peligrosas, reduciendo su impacto medioambiental y sobre la salud humana. Sus tecnologías abarcan los distintos tipos de procesos químicos, incluyendo síntesis, separaciones, catálisis, condiciones de reacción, análisis y medida. De forma ideal una tecnología en línea con la química verde incorpora sus principios desde las primeras etapas del diseño de un nuevo proceso o producto (45). En la Tabla III se incluyen los doce principios de la química verde que delimitan un marco de trabajo para el diseño de nuevos materiales, productos, sistemas y procesos. Los principales temas que dominan los 12 principios son: residuos, riesgos y energía (45).

Tabla III. Principios de la química verde.

Número	Principio
1	Prevención de la aparición de residuos
2	Maximización de la economía
3	Diseño de síntesis químicas menos peligrosas
4	Diseño de reactivos químicos y productos seguros
5	Uso de disolventes y condiciones de reacción seguros
6	Aumento de la eficiencia energética
7	Uso de materias primas renovables
8	Prevención en la generación de derivados químicos
9	Uso de catalizadores, no reactivos estequiométricos
10	Diseño de reactivos químicos y productos degradables
11	Análisis en tiempo real para evitar contaminación
12	Minimización de la posibilidad de accidentes

5.1. Química analítica verde

La química analítica verde fue definida por Namieśnik y Lawrence como: "el uso de las técnicas de química analítica y las metodologías que reducen o eliminan el uso de disolventes, preservantes, reactivos y otros productos químicos peligrosos para la salud humana o el medioambiente y que proporcionan análisis más rápidos y eficientes energéticamente sin comprometer los criterios de rendimiento". Los principios de la química verde considerados como más relevantes para el químico analítico corresponden a los principios 1, 5, 6, 8, 11 y 12 de la Tabla III (46).

Una buena monitorización del medio ambiente para un control seguro requiere generalmente el análisis de compuestos a muy bajas concentraciones en muestras de matrices muy complejas (suelos, aguas, muestras biológicas, etc.), por lo que es necesaria la aplicación de procedimientos de aislamiento de los analitos y su preconcentración previa a la cuantificación.

En esta línea se hallan las técnicas miniaturizadas de preparación de la muestra, que en su mayoría ofrecen la posibilidad de automatización, son técnicas selectivas y limpias, rápidas, eficaces e, idealmente, son baratas, sencillas y sin disolventes tóxicos (46).

La guía de la química analítica verde establece los siguientes principios para las técnicas analíticas verdes (47):

- Reducción del uso de compuestos químicos peligrosos para el medio ambiente, en especial de los disolventes orgánicos
- Limitación en la emisión de vapores y gases
- Limitación en la generación de residuos tóxicos
- Uso de disolventes amigables con el medio ambiente (agua, fluidos supercríticos, líquidos iónicos, etc.)
- Automatización, siempre que sea posible.
- Los principales aspectos prácticos de un procedimiento analítico basado en los principios de la química analítica verde son:
- Para la muestra: reducción de la cantidad requerida
- Para los reactivos: de naturaleza no tóxica, seguros y procedentes de fuentes renovables
- Para el método: automatizado, con mínimo tratamiento de muestra, eludiendo reacciones de derivatización
- Para la instrumentación: miniaturizada y energéticamente eficiente

- En cuanto al consumo: reducción en el consumo de disolventes orgánicos tóxicos
- Para el operador: mayor seguridad, mínimo manejo de sustancias peligrosas.

El control de calidad de productos farmacéuticos no es ajeno a la ideología de la química analítica verde y encuentra numerosas oportunidades para alinearse con sus principios en las distintas etapas del proceso analítico aplicado (48).

5.2. Miniaturización en química analítica

Se conoce como "miniaturización" en el área de la química analítica a la producción de nuevos sistemas de análisis sustancialmente reducidos en tamaño comparados con los sistemas convencionales.

Así, el término de miniaturización no se refiere solo a la escala de la instrumentación, sino que también es aplicable a la minimización del uso de distintos componentes como disolventes o reactivos. Este concepto no es nuevo, ya que comenzó a extenderse en 1970 (48), aunque en la actualidad sigue siendo un reto.

La miniaturización contempla las etapas de preparación de la muestra, separación analítica y detección, en la búsqueda de la mayor sensibilidad, selectividad y precisión en el menor tiempo posible, aplicando los principios de la química analítica verde (49). Los beneficios que supone la miniaturización en cada una de las etapas del proceso analítico se encuentran descritos en la Tabla IV.

Para obtener la información analítica requerida de una muestra se necesita: conseguir la muestra y conservarla bajo las condiciones adecuadas, su preparación o tratamiento, separación, detección y el análisis de datos. En la actualidad se tiende a miniaturizar todas estas etapas; sin embargo, no se ha logrado para todas en la misma medida (50).

Tabla IV. Beneficios de la miniaturización en el proceso analítico.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA
- Consumo mínimo de muestra - Libre de disolventes tóxicos - Minimización del uso de reactivos - Cero generación de residuos - Incremento de los factores de enriquecimiento - Limpieza de la matriz de la muestra - Tiempos bajos de preparación de la muestra - Procedimientos de fácil manejo - Automatización, economía y portabilidad
SEPARACIÓN ANALÍTICA
- Minimización del consumo de muestra - Reducción del uso de fases móvil y estacionaria - Mínima generación de residuos - Máximas eficiencias de extracción - Separaciones rápidas - Bajo consumo energético - Automatización, economía y portabilidad
SISTEMA DE DETECCIÓN
- Minimización del consumo de muestra - Reducción en el uso de reactivos y gases - Mínima generación de residuos - Máxima sensibilidad - Mejora de la reproducibilidad con pequeños volúmenes - Respuesta rápida - Mínimo consumo energético - Automatización, economía y portabilidad

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: MICROEXTRACCIÓN

Las desventajas de los métodos clásicos de tratamiento de muestra hicieron patente la necesidad de desarrollar nuevas técnicas más eficientes y amigables con el

medioambiente. En los últimos años, las técnicas de microextracción se han postulado como una alternativa que responde a los inconvenientes presentados por las técnicas convencionales. Entre las numerosas ventajas que presentan las técnicas de microextracción destacan su alta capacidad de extracción, mejorando la sensibilidad de los métodos de análisis, su sencilla y rápida aplicación con bajos costes, la posibilidad de ser automatizadas y el hecho de ser más respetuosas con el medioambiente (51).

Las técnicas de microextracción pueden dividirse en dos grandes grupos dependiendo de que los analitos sean aislados en una fase líquida o sólida, hablando así de microextracción en fase líquida (LPME) y microextracción en fase sólida (SPME), respectivamente. Tanto LPME como SPME han sido aplicadas en análisis farmacéutico (52). A continuación, se explican brevemente las técnicas LPME haciendo hincapié en la metodología aplicada en esta Tesis Doctoral.

6.1. Microextracción en fase líquida

Las técnicas LPME surgieron de la necesidad de superar los inconvenientes de la extracción líquido-líquido (LLE) convencional como son el uso de volúmenes grandes de disolventes orgánicos potencialmente peligrosos y tóxicos, los largos tiempos de aplicación o las numerosas etapas de operación. LPME es considerada una versión miniaturizada de LLE, ya que se utilizan volúmenes de fase aceptora del orden de microlitros (53). Desde sus inicios, LPME ha ido evolucionando en diferentes modalidades, que difieren principalmente en el modo en que las fases dadora y aceptora se ponen en contacto. A continuación, se describen las metodologías LPME más destacadas:

La microextracción en gota simple (SDME*)* es la técnica LPME más antigua y se basa en la distribución de los analitos entre la disolución de la muestra y una gota de fase extractante sostenida por una jeringa. El disolvente extractante puede entrar en contacto directo con la muestra o exponerse al espacio de cabeza de la muestra. La estabilidad de la gota extractante puede verse comprometida, especialmente cuando la disolución de muestra contiene partículas en suspensión o se agita a gran velocidad. Una variante de SDME es la microextracción en gota directamente suspendida (DSDME), en la que la gota extractante se deposita sobre la superficie de la disolución de muestra, siendo mantenida en agitación (54).

Cuando la fase extractante es albergada en el interior de una fibra polimérica hablamos de microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME). La naturaleza

porosa de la fibra estabiliza al disolvente extractante impidiendo su fuga, siendo así más reproducible y precisa que SDME (55).

El fundamento de la extracción en punto de nube (CPE) es el comportamiento de las disoluciones acuosas de agentes surfactantes no iónicos al aumentar su temperatura, que por rápida agregación de las micelas del surfactante genera una turbidez, que da lugar a una rápida extracción de los compuestos de interés (56).

La microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) es la técnica LPME más aplicada y, dado que ha sido empleada en la presente Tesis Doctoral, se explica con más detalle en la siguiente sección.

6.1.1. Microextracción dispersiva líquido-líquido

- *Principios básicos de DLLME*

La técnica DLLME fue introducida por primera vez en el año 2006 por Assadi et al. (57) y Rezaee et al. (58). DLLME se basa en el uso de un sistema ternario de disolventes (59–62), donde un disolvente orgánico inmiscible con el agua y más denso que ella (como, por ejemplo, tetraclorometano, cloroformo, disulfuro de carbono, nitrobenceno, bromobenceno, clorobenceno o 1,2-diclorobenceno) se dispersa en forma de finísimas gotas en el seno de la fase acuosa con la ayuda de un disolvente dispersante (como metanol, etanol, acetonitrilo o acetona) altamente miscible tanto con la fase extractante como en la acuosa, que provoca un aumento de la superficie de contacto y, por tanto, de la eficiencia de extracción.

En la práctica, la mezcla de fases extractante y dispersante se inyecta rápidamente en la muestra y con ayuda de una jeringa, produciéndose una gran turbulencia. Este régimen turbulento da lugar a la formación de pequeñas gotas que se dispersan a través de la muestra acuosa, por lo que el equilibrio de reparto se alcanza rápidamente y la extracción es independiente del tiempo, siendo esta la principal ventaja del método.

Esta simple metodología presenta todas las ventajas de las técnicas LPME como fácil manejo, bajo coste, mínimo gasto de muestra y disolventes, así como mínima generación de residuos. Además, DLLME presenta otras características que merece la pena destacar: a) rapidez para alcanzar el equilibrio debido a la gran superficie de contacto entre el disolvente extractante y la fase acuosa, b) cortos tiempos de extracción y c) altos factores de enriquecimiento (58). La Figura 4 muestra un esquema del procedimiento descrito.

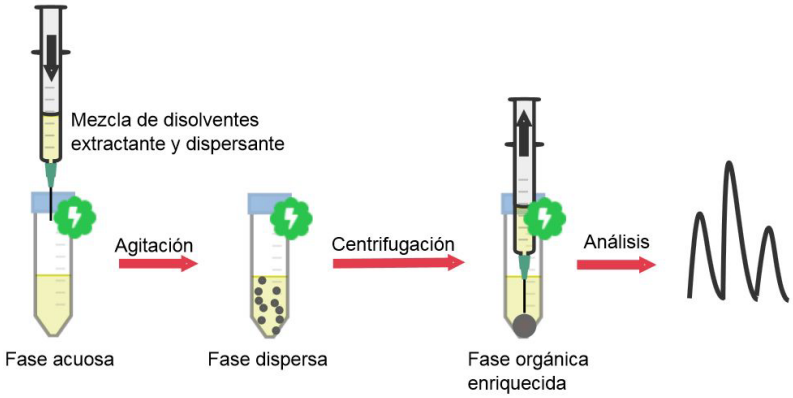


Figura 4. Representación esquemática del proceso de DLLME.

La naturaleza del disolvente dispersante puede influir en la distribución del tamaño de gota, el tamaño de gota medio y en la viscosidad de la emulsión (63). Una vez que se produce la extracción, la disolución turbia se centrifuga. El disolvente extractante se deposita en el fondo del tubo cónico y es recuperado para su análisis mediante la técnica más adecuada, con o sin tratamiento previo (64).

- *Ecuaciones básicas*

Como ya se ha comentado con anterioridad, en DLLME el equilibrio de reparto entre la fase acuosa y el disolvente extractante se alcanza muy rápidamente, siendo esta una importante ventaja de la técnica.

Se define el factor de enriquecimiento (EF) como la relación de la concentración de analito en la fase sedimentada (C_{sed}) y la concentración inicial de analito (C_0) en la muestra:

$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0} \qquad \text{(Ecuación 1)}$$

donde C_{sed} se obtiene a partir de una gráfica de calibrado.

Por otro lado, la recuperación de la extracción (ER) se establece como el porcentaje de la cantidad total de analito (n_0), extraída en la fase sedimentada (n_{sed}):

$$ER = \frac{n_{sed}}{n_0} x\,100 = \frac{C_{sed}\ x\ V_{sed}}{C_0\ x\ V_{aq}} x\,100 \qquad \text{(Ecuación 2)}$$

$$ER = \left(\frac{V_{sed}}{V_{aq}}\right) EF\ x\ 100 \qquad \text{(Ecuación 3)}$$

donde V_{sed} y V_{aq} son los volúmenes de la fase sedimentada y de la disolución de muestra, respectivamente.

- *Parámetros que afectan la DLLME*

Los parámetros que afectan a la eficiencia de la DLLME son la naturaleza y el volumen de los disolventes extractante y dispersante, el volumen, concentración de sal y pH de la disolución de la muestra, así como el tiempo de extracción y el tiempo y velocidad de centrifugación.

La selección de una fase extractante apropiada es el parámetro más importante para el proceso DLLME. La elección final debe hacerse tras comparar sus diferentes propiedades físicas para alcanzar buena sensibilidad, precisión y selectividad. Para los disolventes orgánicos se considera que tengan mayor densidad que el agua, capacidad de extracción de los analitos y buen comportamiento cromatográfico, si el análisis implica este tipo de separación. En este sentido, los disolventes extractantes usualmente adoptados son cloroformo, diclorometano, clorobenceno, tetracloruro de carbono y tetracloroetileno.

El volumen del disolvente extractante tiene un efecto importante sobre el valor de EF alcanzado. Al aumentar el volumen del disolvente extractante, aumenta el volumen de la fase sedimentada obtenida por centrifugación, llevando a una disminución del EF. Por tanto, el volumen óptimo del disolvente extractante debe asegurar simultáneamente altos valores de EF y volumen suficiente de la fase sedimentada para su análisis posterior. Para alcanzar altos valores de EF se necesita una relación pequeña fase extractante/muestra y una alta relación de distribución, K, definida como la relación de concentraciones del analito en el extractante y la fase acuosa en el equilibrio. Por tanto, el parámetro K, que depende en gran medida del tipo y naturaleza de la fase extractante, es una variable clave; así, es necesario enfatizar las diferentes fases extractantes que se pueden utilizar, teniendo en cuenta las propiedades físicas, tales como punto de ebullición, presión de vapor, solubilidad en agua, densidad, viscosidad, tensión superficial, momento dipolar y constante dieléctrica.

Por otra parte, el disolvente dispersante debería ser miscible tanto con el disolvente de extracción como con la muestra acuosa. Los disolventes dispersantes más utilizados son acetona, metanol, etanol y acetonitrilo.

El volumen del disolvente dispersante influye directamente sobre la formación de la turbidez (agua/disolvente dispersante/disolvente extractante), el grado de dispersión del disolvente extractante en la fase acuosa y, en consecuencia, en la eficiencia de extracción. La modificación del volumen de disolvente dispersante afecta al volumen de fase sedimentada, por tanto, dado que son variables que están interrelacionadas, es

necesario modificar los volúmenes del disolvente dispersante y extractante simultáneamente, para alcanzar un volumen de la fase sedimentada constante. El volumen útil del disolvente dispersante para obtener una disolución suficientemente turbia depende del volumen tanto de la fase acuosa como del disolvente extractante.

- *Variaciones de DLLME clásica*

A pesar de la amplia aceptación de la técnica DLLME clásica, algunos inconvenientes y limitaciones han conducido al desarrollo de variantes. Destacan como inconvenientes:

a) el uso de disolventes organoclorados que no son respetuosos con el medio ambiente,

b) el uso del disolvente dispersante que compite con el disolvente extractante durante la extracción y puede reducir los EFs, y

c) la necesidad de centrifugar para recuperar la fase enriquecida. A continuación, se presentan las modificaciones propuestas para solventar estas desventajas.

Para minimizar el impacto negativo sobre el medio ambiente producido por los disolventes extractantes tradicionalmente usados en DLLME se propone:

La variante de solidificación de gota flotante (SFOD-DLLME) se basa en el uso de disolventes orgánicos de menor densidad que el agua. Para solventar la mayor dificultad en la recogida de la gota desde la superficie de la fase acuosa, se congela y así resulta muy sencilla su recuperación con ayuda de una espátula y, tras su vuelta al estado líquido, se somete a análisis (65).

El uso de líquidos iónicos (ILs) como extractantes en DLLME fue propuesto por primera vez por Liu et al. (2009) (66) y usualmente nos referimos a la técnica como IL-DLLME. Una variante de IL-DLLME implica la formación del IL *in situ* en el seno de la fase dadora (IL-DLLME) a través de una reacción de metátesis (67).

La DLLME basada en disolventes supramoleculares (SM-DLLME) se desarrolló en 2011 y también ha sido aplicada en análisis farmacocinético (68).

Con objeto de disminuir o evitar el uso de disolventes dispersantes se proponen diferentes alternativas:

La variante DLLME asistida con surfactantes (SA-DLLME), en la que el comportamiento anfifílico de estos compuestos permite disminuir la tensión superficial entre las fases acuosa y extractante, facilitando así la dispersión del extractante en la muestra (69).

La dispersión de la fase extractante también puede conseguirse mediante la aplicación de energía externa. La DLLME asistida por ultrasonidos (UA-DLLME) consiste en el uso de la energía de ultrasonidos como alternativa al disolvente dispersante y cuenta con diferentes aplicaciones en análisis de fármacos como la determinación de niacinamida (70). La energía externa también puede aplicarse mediante agitación vórtex (VA-DLLME), presentada por primera vez por Yiantzi et al. (2010) (71), o mediante un flujo de aire (AA-DLLME), siendo esta última variante la más reciente y que cuenta con interesantes aplicaciones como la preconcentración de fármacos veterinarios en huevo (72).

Por último, para evitar el largo periodo de centrifugación, se propone la modalidad de demulsificación provocada por disolventes, que consiste en añadir un volumen de un disolvente orgánico, generalmente el dispersante, tras la formación de la emulsión e inmediatamente la mezcla comenzará a separarse en dos fases (73).

Se han descrito distintas técnicas derivadas de la DLLME dando lugar a muchos acrónimos para técnicas que tienen variaciones mínimas o incluso para referirse a la misma técnica, lo que hace que muchas veces sea tediosa la clasificación. Šandrejová et al. realizaron una estandarización y simplificación de los términos (74). Además, esta técnica está ya muy extendida en la comunidad científica, así lo expresan las casi 800 referencias encontradas en la Web of Science que hacen referencia a esta técnica en los últimos 5 años.

- *Análisis de extractos DLLME*

Para el análisis de los extractos orgánicos obtenidos tras la aplicación de DLLME se han empleado diferentes técnicas analíticas, siendo las cromatográficas las comúnmente seleccionadas. Debido a la compatibilidad de los disolventes organoclorados con los sistemas de inyección tradicionales con y sin división de flujo en cromatografía de gases (GC) (75), esta fue la primera técnica aplicada. Los compuestos no volátiles no pueden ser analizados mediante GC, sin una etapa previa de derivatización que los convierta en derivados volátiles. Por tanto, la cromatografía líquida (LC) es idónea para la separación de compuestos no volátiles, y considerando que su modalidad en fase inversa es la más común, el uso de disolventes extractantes en DLLME compatibles con las fases móviles aplicadas en fase inversa resulta muy interesante. Cuando se emplean disolventes extractantes clásicos, tales como clorobenceno, tetracloruro de carbono, cloroformo o tetracloroetileno, es necesario evaporarlos y reconstituirlos en un disolvente compatible

con la fase móvil empleada (76,77). Esta etapa de evaporación y reconstitución puede evitarse en caso de usar extractantes tales como 1-octanol y 1-undecanol, pues son miscibles con las fases móviles de LC en fase inversa. Sin embargo, la elección de este tipo de disolventes no es siempre adecuada, bien porque no extraigan eficientemente los analitos o bien por la dificultad para la recolección de la fase enriquecida por su menor densidad que la fase acuosa.

Aunque la mayoría de los estudios DLLME se han aplicado a compuestos orgánicos, los analitos inorgánicos también han sido preconcentrados mediante esta técnica. Dado que la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) emplea micro-volúmenes de muestra, la combinación DLLME-ETAAS resulta muy interesante. Para ello, se agrega un agente complejante a la disolución de la muestra, siendo entonces aplicada la etapa DLLME mediante los disolventes extractante y dispersante más adecuados (78).

- *Áreas de aplicación de DLLME*

Las primeras aplicaciones de la DLLME se centraron en el análisis de matrices muy simples, siendo las muestras acuosas las más estudiadas. Sin embargo, el interés en otros campos como el análisis de alimentos ha aumentado durante los últimos años, viéndose su aplicación directa en ocasiones dificultada debido a la interacción de los componentes de la matriz de este tipo de muestras con los disolventes orgánicos. En estos casos, la simplificación previa de la matriz de la muestra o la aplicación de modificaciones de la DLLME clásica han proporcionado exitosos resultados. Las áreas de aplicación donde DLLME bajo sus distintas variantes ha sido aplicada en mayor extensión son el análisis de alimentos (76), farmacéutico y biológico (79–81), forense (82,83) y ambiental (84).

7. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA CARACTERIZACIÓN QUÍMICO-FARMACÉUTICA DE FÁRMACOS. DETERMINACIÓN DE FURVINA®

La caracterización químico-farmacéutica de un formulado farmacéutico resulta de gran interés para la evaluación de la calidad de múltiples atributos del producto, necesarios para garantizar su eficacia y seguridad (85). Estos productos cumplirán su objetivo solo si contienen la cantidad de IFA adecuado a su propósito y si están libres de impurezas y se administran en la cantidad adecuada. Los fármacos pueden desarrollar impurezas en diversas etapas de su fabricación, transporte y almacenamiento y, dado que las impurezas pueden suponer un riesgo para la salud, deben detectarse y cuantificarse.

La calidad de un fármaco puede valorarse mediante diferentes técnicas analíticas como técnicas volumétricas, cromatográficas, espectroscópicas, electroforéticas y electroquímicas, entre otras (86), destacando: espectroscopía de absorción molecular ultravioleta-visible (UV/VIS), espectroscopía infrarroja (IR), espectrometría de masas (MS), resonancia magnética nuclear (RMN), difracción de rayos X (XRD), electroforesis capilar (EC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y GC.

A continuación, se detalla brevemente el fundamento de las técnicas analíticas empleadas en esta Tesis Doctoral para el estudio de la laca de uñas en base Furvina®, enmarcándolas dentro de su papel en el análisis y control de calidad de productos farmacéuticos.

7.1. Espectrofotometría de absorción molecular UV/VIS

La espectrofotometría de absorción molecular UV/VIS, comúnmente llamada espectrofotometría UV/VIS, tiene una larga y continua historia en el campo de la química analítica. Esta técnica está basada en la medición de absorción de radiación UV o visible por determinadas moléculas. Está basada en la Ley de Bouguer-Lambert-Beer (20) y permite corregir la dependencia de la concentración y otros factores operacionales al comparar distintos compuestos. La absorbancia específica de una sustancia disuelta se refiere a la absorbancia de una disolución al 1,0 % (m/v), en una cubeta de camino óptico (l) de 1 cm.

La precisión de las mediciones de absorbancia, siendo excelente, puede verse afectada por factores tales como:

• Error en la posición de la cubeta, debido a variaciones en la geometría que modifican el paso de luz, mediante ligeras diferencias en la reflexión y refracción de cada superficie.

• Problemas de contaminación cruzada. Cuando se desea obtener mayor precisión y veracidad se recomienda utilizar siempre la misma cubeta para una muestra determinada.

• Diferencias en la preparación de las muestras, así como suciedades y erosiones en las cubetas.

Por otro lado, cabe destacar las ventajas de estos métodos relacionadas con el bajo consumo de tiempo y mano de obra. El uso de la espectrofotometría UV/VIS, especialmente aplicada al análisis de productos farmacéuticos, ha aumentado notablemente en los últimos años. Cuando la especie de interés no absorbe radiación

UV/VIS, los métodos colorimétricos se aplican mediante la formación de complejos, implicando reacciones de oxidación-reducción o haciendo uso de su efecto catalizador (86).

La espectrofotometría UV/VIS puede aplicarse de forma directa en la identificación y cuantificación de Furvina® ya que los grupos cromóforos y la conjugación presente en su estructura molecular originan dos bandas: una n - π* de menor intensidad a 250 nm y otra de mayor intensidad π*- π* que aparece a 372 nm. En la Figura 5 se puede observar el espectro de absorbancia de una disolución de Furvina® preparada en etanol.

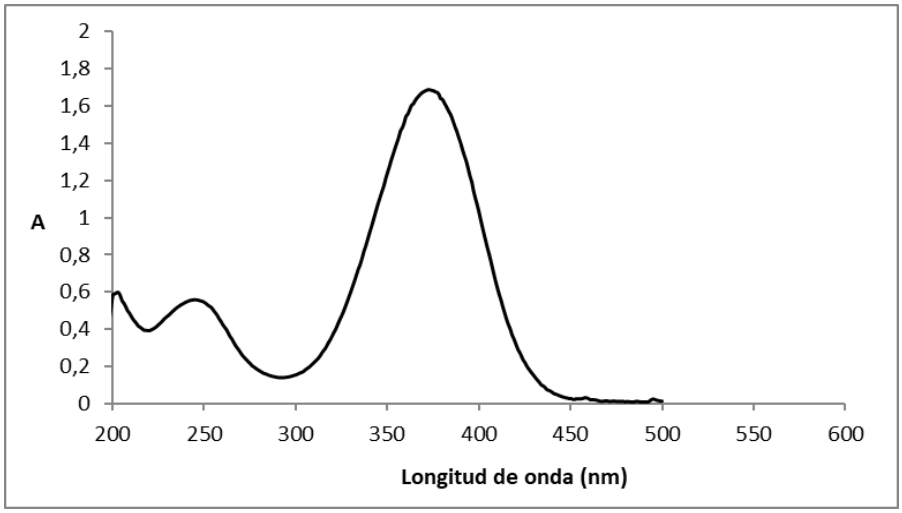


Figura 5. Espectro de absorción de la Furvina® en etanol.

7.2. Espectroscopía infrarroja

Esta técnica se basa en la absorción por parte de la muestra de radiaciones electromagnéticas comprendidas en la región infrarroja (entre 10 y 12500 cm^{-1}) debido a la interacción de la radiación con los enlaces químicos. Normalmente, la región infrarroja suele dividirse en tres zonas, puesto que las diferencias energéticas entre ellas son relevantes y no involucran las mismas transiciones. Mientras que en el infrarrojo cercano (NIR, entre 12500 y 4000 cm^{-1}) aparecen las transiciones de vibración de sobretonos y bandas de combinación, en el infrarrojo medio (MIR, entre 4000 y 400 cm^{-1}) lo hacen las vibraciones y rotaciones fundamentales y, por último, en el infrarrojo lejano (FIR, entre 400 y 10 cm^{-1}) pueden contemplarse las vibraciones como consecuencia de la rotación pura de las moléculas (87).

Para que la radiación sea absorbida por una molécula, su energía debe coincidir con la frecuencia de vibración de algún enlace de la molécula en cuestión. Además, dicha

vibración debe producir un cambio en el momento dipolar de la molécula como consecuencia de la interacción producida con la radiación incidente (lo que constituye la regla de selección básica para que una molécula sea activa en la región de infrarrojo). Por lo tanto, la interacción de la radiación infrarroja con la materia puede entenderse en términos de modificación de los dipolos moleculares asociados con vibraciones y rotaciones. Así, las vibraciones producidas pueden implicar o bien un cambio en la longitud de la distancia entre átomos a lo largo del eje del enlace (modos de estiramiento o tensión) o bien en el ángulo entre enlaces (modos de flexión) como aparece indicado la Figura 6. A su vez, los modos de tensión pueden aparecer en los enlaces de forma simétrica o antisimétrica (estando coordinados en fase o no) y los modos de flexión pueden ocurrir en el mismo plano de la molécula o fuera de él, existiendo variedades como el tijereteo, balanceo, aleteo o torsión.

Puesto que las moléculas simétricas no conducen a un cambio en el momento dipolar tan fácilmente como lo hacen las asimétricas, esto lleva a la conclusión de que las primeras tendrán menos vibraciones activas en la región infrarroja (por lo que dichas vibraciones serán más débiles que las antisimétricas). Por tanto, en el caso de la Furvina® las vibraciones de enlaces tipo C=C producirán bandas débiles en el espectro infrarrojo, mientras que las vibraciones de enlaces formados por elementos con polaridad muy distante se asocian con bandas muy intensas. En conjunto, la simplicidad o complejidad de un espectro infrarrojo vendrá dada por el acoplamiento entre las distintas vibraciones que tienen lugar en gran parte o la totalidad de la molécula involucrada. Esto se denomina el "esqueleto vibracional" de la molécula y suele producir un patrón o huella dactilar espectral del conjunto de la misma.

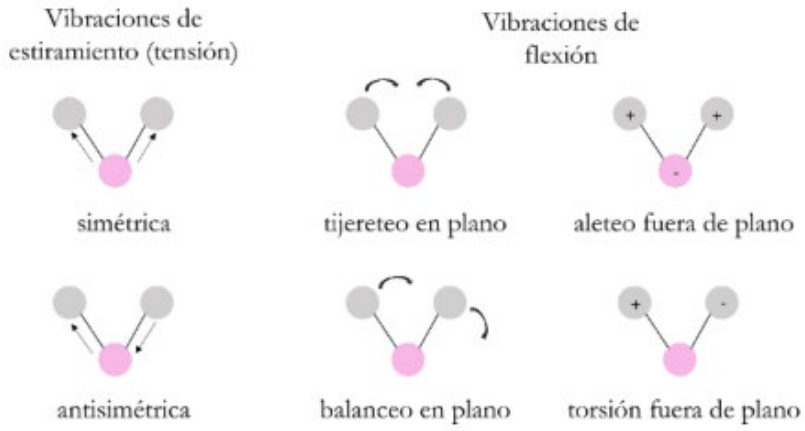


Figura 6. Esquema de las vibraciones moleculares fundamentales (88).

El primer acoplamiento de la microscopía con un espectrómetro de infrarrojo se describió a mitad del siglo XX, con la intención de usarlo en el estudio y análisis de áreas de muestra minúsculas. Sin embargo, los espectros obtenidos carecían de la calidad suficiente para su correcta interpretación y la resolución espacial era baja. Los avances tecnológicos relativos a instrumentación que se han producido en las dos últimas décadas (88) han permitido nuevos desarrollos en los sistemas ópticos, así como en fuentes de radiación infrarroja más potentes y avances en el sector de los detectores. Todo esto ha permitido el uso masivo y la expansión de la microespectroscopía infrarroja para el estudio de sistemas complejos (89,90).

7.3. Técnicas cromatográficas

Es sabido que la cromatografía es una técnica de separación de mezclas de multicomponentes en componentes individuales, gracias sus diferentes migraciones a lo largo de la fase estacionaria. Las separaciones cromatográficas pueden llevarse a cabo en fase líquida o en fase gaseosa. La muestra se introduce en una fase fluida en movimiento denominada fase móvil. Durante toda la separación la fase móvil transporta la muestra a través de un volumen o una capa de fase estacionaria y las interacciones químicas de los analitos pueden ocurrir a lo largo de toda la fase estacionaria. Después, son detectados los componentes separados midiendo los cambios que se producen en una serie de propiedades físicas o químicas (conducción de corriente eléctrica, absorción de luz o habilidad para conducir el calor, entre muchas otras). La gran aplicabilidad de la cromatografía se debe a la amplia variedad de condiciones que pueden utilizarse para separar los componentes de una mezcla.

Los métodos cromatográficos son una excelente herramienta en el análisis de productos farmacéuticos. Tanto TLC, como HPLC y GC permiten el análisis sistemático de la composición cualitativa y cuantitativa de estos productos. Así, HPLC es una herramienta de gran utilidad cuando se combina con diferentes detectores como los basados en espectroscopía UV/VIS, MS y la detección de fluorescencia para la monitorización de numerosos IFAs. Además, TLC combinada con densitometría y MS resulta adecuada para el cribado preliminar y determinación de actividad biológica de sustancias de origen vegetal. Las combinaciones de GC con MS y MS en tándem (MS/MS) resultan de particular importancia en el análisis de sustancias volátiles, como los aceites esenciales. Hasta hoy, HPLC puede considerarse como la técnica analítica

predominante en análisis farmacéutico debido a su versatilidad, reproducibilidad y gran cantidad de aplicaciones en investigación y control de calidad (91).

7.4. Difracción de rayos X

Se trata de una de las técnicas más utilizadas en el estudio de la materia sólida, aunque también encuentra aplicaciones en análisis de estados desordenados. Constituye una metodología muy establecida, aunque no deja de renovarse continuamente. Sus orígenes se remontan a principios del siglo XX, cuando Laue (1912) y W.H. Bragg y W.L. Bragg (1915) diseñaron experimentos sobre la difracción y reflexión de los rayos X por la materia cristalina que permitieron mostrar la naturaleza electromagnética de esta radiación. Los picos de XRD se producen por interferencia constructiva de un haz monocromático de rayos X dispersos en ángulos específicos desde cada conjunto de planos de red en una muestra. Las intensidades de los picos están determinadas por la distribución de los átomos dentro de la red. En consecuencia, el patrón de XRD es la huella digital de las disposiciones atómicas periódicas en un material determinado. Así, la técnica proporciona información sobre estructuras, fases, orientaciones cristalinas preferidas (textura) y otros parámetros estructurales, como tamaño promedio de grano, cristalinidad, deformación y defectos cristalinos (92).

En la actualidad, la XRD tiene multitud de aplicaciones en el estudio de la materia sólida: unas veces a partir de mezclas de sistemas de sólidos en polvo policristalinos (cristales o partículas de tamaños inferiores a 100 micras) y otras a partir de cristales con alas milimétricas de dimensiones cercanas, y que pueden analizarse individualmente como sistemas monocristalinos. Actualmente, la técnica avanza hacia el análisis de muestras estructuradas en dimensiones submicrométricas e, incluso, para el análisis estructural de sistemas no sólidos. Para todos ellos se pueden realizar estudios no destructivos de diversos tipos:

- Análisis cualitativo
- Análisis cuantitativo
- Análisis microtextural
- Tamaño del cristal = mosaico = dominio coherente (cristalinidad)
- Deformación no homogénea (deformación)
- Tensores de expansión térmica (termo-difracción)
- Cambios de fase (reacciones en estado sólido, procesos secuenciales)
- Análisis estructural (posiciones atómicas, oscilaciones atómicas térmicas, desorden posicional).

La XRD es una técnica muy utilizada para caracterizar materiales orgánicos, inorgánicos, superconductores, cementos, minerales, materiales corrosivos, metales y aleaciones, polímeros, detergentes, pigmentos, materiales forenses, productos farmacéuticos, zeolitas, cerámicas y explosivos.

La mayoría de los IFAs existen en estado sólido en condiciones ambientales y el conocimiento detallado de su estructura cristalina es importante para comprender las propiedades fisicoquímicas que pueden afectar la actividad farmacológica. Así, en el ámbito farmacéutico, durante el proceso de diseño, desarrollo y formulación de fármacos, la XRD para estudio de sistemas en polvo puede ayudar a establecer la morfología y el grado de cristalinidad, proporcionar una identificación polimórfica única y determinar la cantidad de cada componente en la mezcla. Con XRD también puede estudiarse la influencia de factores ambientales, como la humedad, en las propiedades físicas de los fármacos (92,93).

7.5. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica de análisis térmico que permite estudiar aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica (94). La finalidad de este ensayo es registrar el cambio de entalpía que tiene lugar entre la muestra y un material inerte de referencia en función de la temperatura o del tiempo, cuando ambos están sometidos a un programa controlado de temperaturas (95). Ambos son colocados en cápsulas idénticas que se calientan de manera independiente mediante resistencias. Cuando en la muestra tiene lugar una transformación física o química acompañada de una liberación o absorción de calor, se adiciona energía térmica, bien sea a la muestra o a la referencia, equivalente en magnitud a la energía asociada a dicho

proceso, con el objetivo de mantener ambas a la misma temperatura (principio del "balance nulo" de temperatura). De esta manera, la energía térmica suministrada proporciona una medida calorimétrica directa de la energía de la transición (96).

La técnica DSC resulta esencial en el campo de la ciencia de los materiales debido a su elevado grado de sensibilidad y a su rápida velocidad de análisis (97). No obstante, es sabido que el conocimiento de la estabilidad térmica de un IFA, así como la caracterización de sus transiciones, es de primordial interés en las entidades químicas con potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica y su uso va enfocado en la mayoría de los casos a la medición de la temperatura de fusión de la muestra (98), con el objetivo de garantizar la acción terapéutica aportada por el IFA al nuevo fármaco.

7.6. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica óptica que brinda información morfológica y tipográfica de la materia (98). Mediante la formación de imágenes, se reflejan las propiedades superficiales de la muestra y se obtienen detalles de la forma, textura y composición química elemental de los constituyentes presentes en la misma (100). Para lograrlo, solo se necesita garantizar que las sustancias sean puras, secas, buenas conductoras de la electricidad y resistentes al alto vacío aplicado por la instrumentación. Si se precisa estudiar un material no conductor, se impone secar y recubrir con una delgada capa metálica conductora, que en muchas ocasiones es oro, paladio o aleaciones de platino-oro u oro-paladio (101).

Esta poderosa técnica mejora la resolución de las imágenes obtenidas por un microscopio óptico convencional, ofrece la oportunidad de observar entes de pocas micras y en algunos casos nanométricos (102) y proporciona además análisis microsemicuantitativos de la composición de un pequeño volumen de muestra mediante la dispersión de rayos X (103). La interacción de los electrones de alta energía emitidos (haz incidente) con la muestra son percibidos por los correspondientes detectores para producir una señal eléctrica que da lugar a la formación de imágenes (104), que pueden ser clasificadas en:

- Dispersión elástica: Resulta de la desviación del electrón incidente por el núcleo atómico de la muestra o por los electrones de la capa exterior con energía similar. Este tipo de interacción va acompañada por una pérdida de energía insignificante. Los electrones incidentes, que son elásticamente

dispersados a través de un ángulo mayor de 90º, se llaman electrones retrodispersados.

- Dispersión inelástica: Se produce a través de una variedad de interacciones entre los electrones incidentes y los electrones o átomos de la muestra. La cantidad de energía perdida depende de la manera en que son excitados los electrones de la muestra.

La Figura 7 muestra las regiones a partir de donde se generan los diferentes tipos de señales que se detectan mediante SEM.

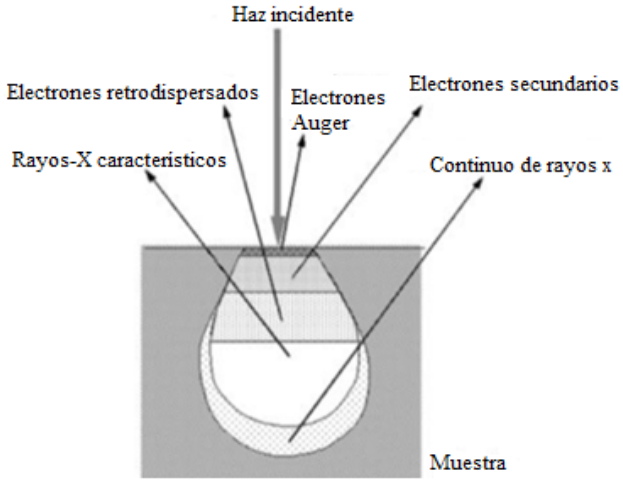


Figura 7. Regiones donde se generan los diferentes tipos de señales detectadas mediante SEM (105).

En la actualidad, para incrementar la velocidad de disolución de un producto farmacéutico y, por tanto, su biodisponibilidad, el uso de adsorbentes como ingredientes en la formulación se halla ampliamente extendido. Los adsorbentes también se utilizan en la formulación de sustancias con liberación de fármaco modificada u objetivo en un tejido específico. La técnica SEM se encuentra entre las herramientas más poderosas para la caracterización de sistemas terapéuticos modernos con adsorbentes porosos, junto con DSC, espectroscopia IR y Raman, así como XRD (106,107). La evaluación de la presencia de metales residuales en fármacos también ha sido abordada mediante la combinación de SEM con espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX).

7.7. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman se basa en el efecto descrito por Chandrasekhara Venkata Raman en 1928, que observó que cuando una radiación monocromática interacciona con

una molécula, la radiación es dispersada de forma elástica, en mayor medida, e inelásticamente en una proporción mucho menor. Mientras que la primera presenta la misma frecuencia que la radiación incidente (radiación Rayleigh), la radiación dispersada inelásticamente posee frecuencias tanto mayores (anti-Stokes) como menores (Stokes) a las de la radiación de excitación. Este cambio en la frecuencia de la radiación dispersada está relacionado con transiciones vibracionales y, por tanto, proporciona información relevante acerca de la estructura molecular de las sustancias implicadas.

Esta técnica aporta datos inequívocos acerca de la identificación molecular de los materiales y ofrece numerosas ventajas, entre las que pueden destacarse su naturaleza no destructiva ni invasiva, la escasa preparación de muestra necesaria y la posibilidad que ofrece de trabajar con sustancias de tamaño pequeño o muy reducido, y siendo aplicable en estado sólido, líquido y gaseoso. Además, en la mayoría de los casos, implica tiempos de análisis cortos y medidas fácilmente reproducibles (108).

Sin embargo, la mayor desventaja de la espectroscopía Raman está relacionada con el fenómeno de la fluorescencia, el cual tiene lugar cuando una molécula absorbe parte de la radiación incidente para situarse en un estado electrónico excitado (109). Posteriormente, decae hasta niveles vibracionales de menor energía a través de transiciones no radiativas y, finalmente, se relaja hasta el estado electrónico fundamental emitiendo radiación. Aunque este fenómeno puede, en parte, contrarrestarse mediante el empleo de una fuente de radiación láser de menor energía (es decir, mayor longitud de onda) para evitar la transición descrita hasta el estado electrónico excitado, también implica una menor cantidad de moléculas que experimentarán la dispersión Raman (disminuyendo de igual forma la sensibilidad y efectividad de la medida). En la espectroscopía Raman se emplea una radiación monocromática de alta intensidad (láser), un dispositivo dispersivo para seleccionar la longitud de onda deseada y descartar la radiación Rayleigh, una serie de espejos y lentes que direccionan la radiación y, por último, el detector.

Desde que en 1966 se introdujera el concepto de que la radiación dispersada era independiente del volumen de muestra analizada, el uso de la microespectroscopía Raman creció rápidamente y fue implementada en multitud de campos científicos para el análisis no invasivo y sin apenas preparación previa de micromuestras (110).

Para emplear esta técnica hay que implementar un microscopio, en el cual la radiación de la fuente láser se enfoca en una pequeña hendidura para constituir una fuente de dispersión limitada y, seguidamente, se dirige sobre las lentes. Una vez la

radiación Rayleigh ha sido bloqueada, la dispersión Raman continúa hasta el detector, donde se mide la intensidad recibida para cada longitud de onda. La microespectroscopía Raman permite la obtención de un mejor enfoque de la zona deseada de muestra, característica que beneficia a la hora de realizar medidas de mapeos en los que se quiera obtener información molecular y detallada de las heterogeneidades de la muestra. De esta forma, se facilita la diferenciación precisa entre tejidos, irregularidades o zonas específicas que existan en la muestra, haciendo posible los estudios de comparación entre las mismas.

A modo de resumen, las espectroscopías Raman e infrarroja son técnicas vibracionales que permiten la obtención de información molecular y de enlace de manera no invasiva, y son comúnmente consideradas como técnicas de análisis complementarias (110). Esto es debido a que la diferencia de energía involucrada en las transiciones Raman es del mismo orden que la de las transiciones vibracionales que tienen lugar en la región del infrarrojo (Figura 8).

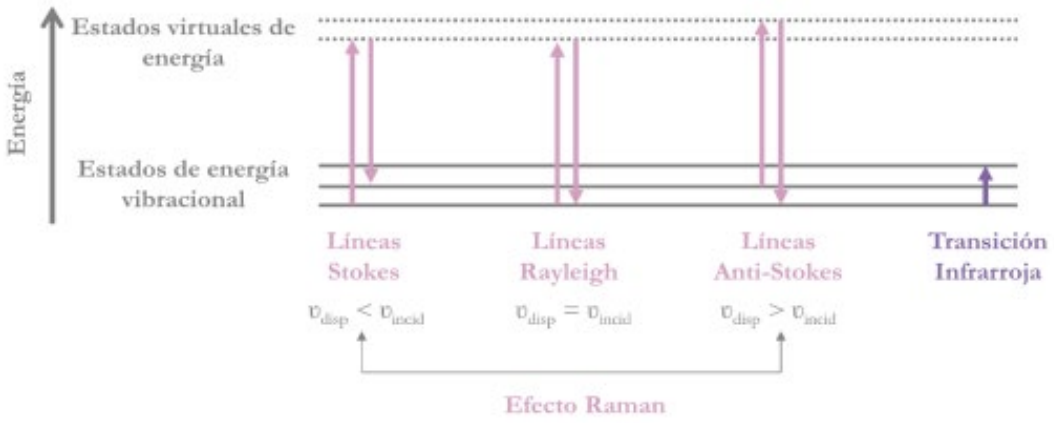


Figura 8. Transiciones producidas entre los estados energéticos en el efecto Raman y de absorción vibracional infrarroja (87).

7.8. Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica

La determinación de los metales es importante para la salud humana ya que en concentraciones bajas son necesarios para garantizar funciones del organismo humano, pero en concentraciones elevadas resultan ser tóxicos. Existen metales que son muy tóxicos ya que se acumulan fácilmente debido a su toxicidad y biodisponibilidad en organismos animales y vegetales, por lo que deben establecerse límites debido a que causan efectos adversos a corto o largo plazo (111).

La presencia de impurezas elementales puede surgir en los productos farmacéuticos en diferentes condiciones. Estas impurezas incluyen especies metálicas y no metálicas, que pueden ser tóxicas o no. La contaminación por metales, tales como plomo, cadmio, mercurio y arsénico, ha sido detectada en ocasiones en productos naturales, medicinas tradicionales orientales o hierbas medicinales, siendo relacionada principalmente con la deposición de metales en el suelo, contaminación de aguas, o su presencia como contaminantes en fertilizantes y pesticidas. Los productos sintéticos tampoco están libres de este tipo de contaminaciones, ya que se enfrentan a la deposición de catalizadores, la contaminación del agua, de las materias primas y excipientes, así como a procesos de fabricación incontrolados. Los envases de los fármacos también pueden resultar una fuente de contaminación.

La USP, la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), la Guía de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Guía del ICH de requisitos técnicos para productos farmacéuticos de uso humano son las cuatro guías más importantes en las que se basa la evaluación de impurezas elementales en productos farmacéuticos, IFAs, materias primas y productos intermedios. En los últimos años se han realizado una gran cantidad de investigaciones científicas sobre impurezas inorgánicas en productos farmacéuticos (111).

La determinación elemental en fármacos y cosméticos se puede llevar a cabo mediante varias técnicas analíticas, desde espectrofotometría molecular y absorción atómica hasta MS, que pueden combinarse con otros instrumentos para mejorar la calidad del análisis. La selección de la técnica más adecuada implica estudiar la matriz, el contenido estimado y la relación química matriz-analito.

Aunque las técnicas basadas en plasma acoplado inductivamente (ICP) con detección por emisión óptica (AES) y MS son la primera opción en la determinación de elementos potencialmente peligrosos en productos farmacéuticos, debido a su alta sensibilidad, robustez, precisión, exactitud y bajo nivel de interferencias, las técnicas espectrométricas de absorción atómica (con atomización en llama (FAAS), ETAAS, con generación de hidruros (HGAAS) y con vapor frio (CVAAS)) son una muy interesante y útil alternativa, ya que permiten alcanzar muy buenas sensibilidades bajo condiciones experimentales adecuadas, implicando instrumentación de costo inferior a las técnicas de ICP. Por ello, FAAS y ETAAS han sido y son usadas más comúnmente para determinación de metales y metaloides en productos farmacéuticos que las basadas en ICP.

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado ETAAS para la determinación de plomo, cobre y arsénico en los formulados de Furvina® a base de laca. El principio del método se basa en la absorción de luz por parte de un elemento en estado atómico. La longitud de onda a la cual la luz es absorbida es específica de cada elemento. Se mide la atenuación de la intensidad de la luz como resultado de la absorción, siendo la cantidad de radiación absorbida proporcional a la cantidad de átomos del elemento presente. El método involucra fundamentalmente 2 procesos: la atomización de la muestra y la absorción de radiación proveniente de una fuente por los átomos libres.

El tratamiento de la muestra hasta la lectura de absorbancia comprende las siguientes etapas: **1.** Secado. Una vez que la muestra ha sido inyectada en el tubo de grafito, se calienta con el objetivo de evaporar el disolvente. Para ello, la muestra (2-20 µL) es sometida a una temperatura algo inferior al punto de ebullición del disolvente (80-180 ºC). **2.** Calcinación. El siguiente paso del programa es la calcinación por incremento de la temperatura, para eliminar la mayor cantidad de material (materia orgánica) de la muestra como sea posible, sin pérdida del analito. La temperatura de calcinación usada varía típicamente en el rango de 350 a 1600 ºC. Durante la calcinación, el material sólido es descompuesto mientras que los materiales refractarios, como por ejemplo los óxidos, permanecen inalterados. **3.** Atomización. En esta etapa, el horno es calentado rápidamente a altas temperaturas (1800-2800 ºC) para generar una nube de átomos neutros, aislados y en fase vapor del analito, listos para absorber la radiación procedente de la fuente. La temperatura de atomización depende de la volatilidad del elemento. Durante la etapa de atomización se suele cortar el flujo de gas inerte del interior del atomizador, con el objetivo de incrementar la sensibilidad del procedimiento. **4.** Usualmente se agrega una cuarta etapa para limpieza del horno a una temperatura algo superior a la temperatura de atomización. Cuanto mejor sea la separación de los elementos concomitantes del analito, mejor será la atomización y la determinación estará más libre de interferencias.

7.9. Técnicas analíticas aplicadas para la determinación del IFA Furvina®

El IFA Furvina® se ha cuantificado mediante varias técnicas analíticas como espectrometría de absorción molecular UV/VIS directa, HPLC y GC (112–118). Desde 1992, el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) de Cuba viene desarrollando diferentes metodologías de análisis para la determinación de Furvina® en distintos formulados (ungüento y cremas). También en 1992, el Centro de Bioactivos

Químicos (CBQ) desarrolló un método GC usando columnas empaquetadas y detección por ionización por llama (FID), y más tarde otro método HPLC en este caso llevando a cabo la separación cromatográfica en fase inversa (23,116,117). En 2007 se desarrolla una metodología GC-FID en columna capilar (118). Posteriormente, en 2016 Caraballoso et al. determinaron el IFA Furvina® mediante GC con detección por captura de electrones (ECD) (113). Perez-Rodriguez et al. propusieron en ese mismo año un método basado en espectrofotometría UV/VIS para la cuantificación de Furvina® en una tintura que demostró una alta especificidad, precisión y veracidad en el intervalo lineal de 2 a 28 mg/L. El límite de cuantificación (LQ) fue 0,663 mg/L y el de detección (LD) 0,657 mg/L (114). También se demostró que la tintura preparada era activa frente a *Candida albicans* y se determinó por métodos cromatográficos la existencia de cuatro productos de degradación (36).

8. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CONTROL EN LA FABRICACIÓN Y USO DE FÁRMACOS. GENERALIDADES

El concepto de validación en la fabricación de productos farmacéuticos surgió hace más de 40 años cuando la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) revisó las normas relativas al control de su manufacturación. Dichas normas se conocen como buenas prácticas de fabricación (BPF) y fue en 1978 cuando la palabra "validación" apareció por vez primera en la documentación de algunas de sus secciones (119). Se trata del establecimiento de pruebas documentales que garanticen que la aplicación de un determinado protocolo proporcionará los resultados previstos (119). En la Regulación No. 37, 2012 CECMED (Cuba) se define como validación: "el establecimiento de pruebas documentales que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados" (120).

De acuerdo con el objetivo del análisis, los métodos pueden clasificarse en seis tipos: oficiales, estandarizados, modificados, desarrollados en el laboratorio, alternativos y para el control del producto en proceso (119). En el caso de un método desarrollado en el laboratorio, que son los métodos de ensayo generados por el propio laboratorio como alternativa a los métodos normalizados y estandarizados, es necesaria su validación exhaustiva (120,121).

Independientemente de la técnica o técnicas que se seleccionen para la caracterización y/o cuantificación de un IFA, y por ende para el control de calidad de un fármaco durante su fabricación y uso, el método debe ser validado y después ha de escribirse un procedimiento normalizado de operación (PNO) (17). La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados son confiables. Cuando se realiza este proceso por parte del laboratorio, se busca determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

En la actualidad, existen varias normas de validación de métodos analíticos teniendo como criterio el área donde estos se van a utilizar como, por ejemplo, alimentos, medicamentos y análisis biomédicos, entre otros. Sin embargo, existen normas generales que se adaptan a cualquier campo como son, entre otras, las de Eurachem (122–125), la Organización Internacional de Normalización (*International Organization for Standardization*, ISO) (126), ICH (127) y la Comisión de las Comunidades Europeas a través de su Directiva 96/23/CE, el Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (128).

9. BIBLIOGRAFIA

1. Ballesté R, Mousqués N, Gezuele E. Onicomicosis: Revisión del tema. Revista Médica del Uruguay. 2003;19(2):93–106.
2. Elewski BE, Hay RJ. Update on the management of onychomycosis: highlights of the Third Annual International Summit on Cutaneous Antifungal Therapy. Clinical infectious diseases. 1996;23(2):305–13.
3. Gupta AK, Shear NH. A risk-benefit assessment of the newer oral antifungal agents used to treat onychomycosis. Drug Safety. 2000;22(1):33–52.
4. Wikipedia. Tinea unguium. 2017. Último acceso: abril, 2024.
5. Trejo NXU, Ríos EV, Daza ERV, Gaytán AC, Rodríguez AGH, Trejo MFU, et al. Prevalencia de onicomicosis en los pies en pacientes con enfermedades crónicas diagnosticada mediante la prueba de hidróxido de potasio. Piel. 2020;35(2):77–81.
6. Relloso S, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Walker L, Agorio I, et al. Onicomicosis: estudio multicéntrico clínico, epidemiológico y micológico. Revista Iberoamericana de Micología. 2012;29(3):157–63.
7. Navarro Flores E. Evidencia científica de la laserterapia en onicomicosis. Revista Europea de Podología. 2017;3(2):66–74.
8. Cohen PR. The lunula. Journal of the American Academy of Dermatology. 1996;34(6):943–53.
9. Zook EG. Anatomy and physiology of the perionychium. Clinical Anatomy. 2003;16(1):1–8.
10. Hashimoto K. Ultrastructure of the human toenail I. Proximal nail matrix. Journal of Investigative Dermatology. 1971;56(3):235–46.
11. McCarthy DJ. Anatomic considerations of the human nail. Clinics in Podiatric Medicine and Surgery. 2004;21(4):477–91.
12. Elewski BE. Onychomycosis. Treatment, quality of life, and economic issues. American Journal of Clinical Dermatololgy. 2000;1(1):19–26.
13. Rodgers P, Bassler M. Treating onychomycosis. American Academy of Family Physicians. 2001;63(4):663.
14. Burzykowski T, Molenberghs G, Abeck D, Haneke E, Hay R, Katsambas A, et al. High prevalence of foot diseases in Europe: results of the Achilles Project. Mycoses. 2003;46(11-12):496–505.

15. Fernández-Chico N, García-Fernández D, Aguilar JL. Estrategias terapéuticas en las onicomicosis. Piel. 2008;23(5):268–72.
16. Sais G, Jugglág A, Peyri J. Prevalence of dermatophyte onychomycosis in Spain: a cross-sectional study. British Journal of Dermatology. 1995;132(5):758–61.
17. Perea S, Ramos MJ, Garau M, Gonzalez A, Noriega AR, del Palacio A. Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38(9):3226–30.
18. Sais G, Jugglág A, Peyri J. Prevalence of dermatophyte onychomycosis in Spain: a cross-sectional study. British Journal of Dermatology. 1995;132(5):758–61.
19. Marcos-Tejedor F, Mota M, Iglesias-Sánchez MJ, Mayordomo R, Gonçalves T. Identification of fungi involved in onychomycosis in patients of a Spanish rural area. Journal of Fungi. 2021;7(8):623.
20. Relloso S, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Walker L, Agorio I, et al. Onicomicosis: estudio multicéntrico clínico, epidemiológico y micológico. Revista Iberoamericana de Micología. 2012;29(3):157–63.
21. Vestergaard-Jensen S, Mansouri A, Jensen LH, Jemec GBE, Saunte DML. Systematic review of the prevalence of onychomycosis in children. Pediatric Dermatology. 2022;39(6):855–65.
22. Radha K, Dhiman RK CYK. Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Ministerio de Salud Pública de Cuba. Vol. 28. 2009. p. 5–16.
23. Jorge E, Jiménez I, Calvo AM, Morales S, Bravo L, Carta A, et al. G-1 Materia Prima. Métodos de Control. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara; 1994.
24. Silveira EA, Medina R, Blondeau JM, Castañedo N, Oraida G, Milagros G, et al. Evaluación in vitro del 2-bromo-5 (bromo-2-nitrovinil-2)-furano: un nuevo agente antiseudomonas. In vitro evaluation of 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan: a novel antipseudomonal agent. Revista Electrónica de Veterinaria. 2007;1–6.
25. Díaz Díaz M, Meneses Marcel A, Medina Marrero R, Morales Helguera A, García Bernal M, Sifontes Rodriguez S. Furvina (G-1). Efectividad in vitro sobre microorganismos aislados de infecciones dérmicas en caninos. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2016;27(3):595–606.

26. Conde N, González O, Silveira E, Rodríguez M, Castañedo N, Estrada A. Actividad antimicrobiana del 1-(5-bromo-fur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1). Registro del Dermofural 0,15%. No. M-07-020-D01. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). 2007.
27. Torriente J. Susceptibilidad un vitro e in vivo del G1 frente a Cándidas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; Santa Clara, 1990.
28. Estrada A, González O, Silveira EA, Castañedo NR, Rodríguez J, et al. Actividad antifúngica del 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G1) frente a hongos filamentosos. En: Queratofural. González O, Silveira EA, editors. 1993.
29. Gonzalez Bedia MM. Preformulación del 1(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 1997.
30. Blondeau JM, González O, Medina R. In vitro evaluation of G1: A novel antimicrobial compound. Technical Report. 1997.
31. Jorge E, Bravo LR, Díaz M, Diduk N, Morales S JI. Estudio de estabilidad de la materia prima para medicamentos G1. En: Queratofural. Registro de Medicamentos de Uso Veterinario No. 211. Laboratorio de control Estatal. Instituto de Medicina Veterinaria. Ministerio de Agricultura. 1993.
32. Welsh O, Vera-Cabrera L, Welsh E. Onychomycosis. Vol. 28. 2010. p. 151–9.
33. González HD, González PR, Cardoso JJ. Actualización terapéutica de las Micosis cutáneas. Gaceta Médica Espirituana. 2017;9(3).
34. Fabbretti A, Brandi L, Petrelli D, Pon CL, Castañedo NR, Medina R, et al. The antibiotic Furvina® targets the P-site of 30S ribosomal subunits and inhibits translation initiation displaying start codon bias. Nucleic Acids Research. 2012;40(20):10366–74.
35. Castañedo N, Gaitan T. Bromination of 2-nitrovinylfuran using charcoal; one step; neutralization and dehydrobromination using pyridine dissolved in carbon disulfide; purification, crystallization. Google Patents; 2003.
36. Perez Rodriguez Z. Estudio químico-farmacéutico de una tintura con furvina® para el tratamiento de la onicomicosis. Tesis de Grado. Facultad de Química y Farmacia. Universidad Central de Las Villas; 2015.
37. Silveira EA, Gómez R, González O. Actividad antibacteriana del producto furánico G1 frente a diferentes cepas de Pseudomona aeruginosa. Universidad Central de Las Villas; 1989.
38. Wikipedia. Lacas. 2017. Último acceso: abril 2024.

39. Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C, Hernández-Molina JM, Santos P, Cárdenes D, Giusiano G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. Revista Iberoamericana de Micología. 2010;27(2):49–56.
40. Suárez Pérez Y, Almirall Díaz I, González San Miguel HM, Bilbao Revoredo O, Nieto Acosta OM. Metodología para estudios de estabilidad química en formulaciones de quitina. Revista Cubana de Farmacia. 2000;34(1):12–8.
41. Paz Astudillo, IC. Diseño integral de biorreactores continuos de tanque agitado aplicados a procesos de fermentación. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. 2010.
42. Regulación C. Regulación 23-2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. CECMED, 2000.
43. Guideline ICHT. Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products. In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1996.
44. Pharmacopeia the United States USP 38-NF 33. 2015.
45. Anastas PT, Warner JC. Green chemistry: theory and practice. Oxford university press; 2000.
46. Keith LH, Gron LU, Young JL. Green analytical methodologies. Chemical Reviews. 2007;107(6):2695–708.
47. Kloskowski A, Marcinkowski Ł, Namieśnik J. Green aspects of miniaturized sample preparation techniques. De Gruyter; 2014.
48. Eldin AB, Ismaiel OA, Hassan WE, Shalaby AA. Green analytical chemistry: Opportunities for pharmaceutical quality control. Journal of Analytical Chemistry. 2016;71:861–71.
49. Tobiszewski M, Namieśnik J. Greener organic solvents in analytical chemistry. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry. 2017;5:1–4.
50. Pena-Pereira F. From conventional to miniaturized analytical systems. Miniaturization in Sample Preparation. 2014;1–28.
51. Jalili V, Barkhordari A, Ghiasvand A. Bioanalytical applications of microextraction techniques: a review of reviews. Chromatographia. 2020;83:567–77.

52. Jiménez-Skrzypek G, Ortega-Zamora C, González-Sálamo J, Hernández-Borges J. Miniaturized green sample preparation approaches for pharmaceutical analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2022;207:114405.
53. Rutkowska M, Płotka-Wasylka J, Sajid M, Andruch V. Liquid–phase microextraction: A review of reviews. Microchemical Journal. 2019;149:103989.
54. Tang S, Qi T, Ansah PD, Fouemina JCN, Shen W, Basheer C, et al. Single-drop microextraction. TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 2018;108:306–13.
55. Yamini Y, Rezazadeh M, Seidi S. Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations. TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 2019;112:264–72.
56. Madej K. Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 2009;28(4):436–46.
57. Berijani S, Assadi Y, Anbia M, Milani Hosseini MR, Aghaee E. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection. Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. Journal of Chromatography A. 2006;1123(1):1–9.
58. Rezaee M, Assadi Y, Hosseini M, et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. Journal of Chromatography A. 2006;1116(1-2):1-9.
59. Zgoła-Grześkowiak A, Grzeskowiak T. Dispersive liquid-liquid microextraction. TrAC – Trends in Analytical Chemistry. 2011;30(9):1382-99.
60. Herrera-Herrera AV, Asensio-Ramos M, Hernández-Borges JH, Rodríguez-Delgado MA. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 2010;29(7);728-51.
61. Bosch Ojeda C, Sánchez Rojas F. Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: A review. Chromatographia. 2009;69(11–12):1149–59.
62. Ban T, Kawaizumi F, Nii S, Takahashi K. Study of drop coalescence behavior for liquid–liquid extraction operation. Chemical Engineering Science. 2000;55(22):5385–91.
63. Schramm LL. Emulsions, Foams, and Suspensions Fundamentals and applications. Wiley-VCH Verlag. 2005.

64. Nerín C, Salafranca J, Aznar M, Batlle R. Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2009;393(3):809–33.
65. Silva LK, Rangel JHG, Brito NM, Sousa ER, Sousa ÉML, Lima DLD, et al. Solidified floating organic drop microextraction (SFODME) for the simultaneous analysis of three non-steroidal anti-inflammatory drugs in aqueous samples by HPLC. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2021;413:1851–9.
66. Liu Y, Zhao E, Zhu W, Gao H, Zhou Z. Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction in water samples. Journal of Chromatography A. 2009;1216(6):885–91.
67. Li L, Huang M, Shao J, Lin B, Shen Q. Rapid determination of alkaloids in Macleaya cordata using ionic liquid extraction followed by multiple reaction monitoring UPLC–MS/MS analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2017;135:61–6.
68. Lian X, Wang N, Ma L, Jiang H, Bai D, Xue H, et al. Determination of aucubin by supramolecular solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction and UPLC-MS/MS: Application to a pharmacokinetic study in rats with type 1 diabetes. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2020;186:113301.
69. Saraji M, Bidgoli AAH. Dispersive liquid–liquid microextraction using a surfactant as disperser agent. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2010;397:3107–15.
70. Altunay N. Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction of niacinamide in pharmaceutical and cosmetic samples using experimental design. Microchemical Journal. 2021;170:106659.
71. Yiantzi E, Psillakis E, Tyrovola K, Kalogerakis N. Vortex-assisted liquid–liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. Talanta. 2010;80(5):2057–62.
72. Teglia CM, Gonzalo L, Culzoni MJ, Goicoechea HC. Determination of six veterinary pharmaceuticals in egg by liquid chromatography: Chemometric optimization of a novel air assisted-dispersive liquid-liquid microextraction by solid floating organic drop. Food Chemistry. 2019;273:194–202.

73. Caldas SS, Rombaldi C, de Oliveira Arias JL, Marube LC, Primel EG. Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Talanta. 2016;146:676–88.
74. Šandrejová J, Campillo N, Viñas P, Andruch V. Classification and terminology in dispersive liquid–liquid microextraction. Microchemical Journal. 2016;127:184–6.
75. Rezaee M, Assadi Y, Hosseini MRM, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. Journal of Chromatography A. 2006;1116(1–2):1–9.
76. Viñas P, Campillo N, Lopez Garcia I, Hernández-Córdoba M. Dispersive liquid–liquid microextraction in food analysis. A critical review. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2014;406(8):2067–99.
77. Campillo N, Viñas P, Férez-Melgarejo G, Hernández-Córdoba M. Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography with diode array detection and atmospheric pressure chemical ionization ion-trap tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 2013;1282:20–6.
78. Viñas P, Campillo N, López-García I, Hernández-Córdoba M. Dispersive liquid–liquid microextraction in food analysis. A critical review. Anal Bioanal Chem. 2014;406:2067–99.
79. Tay KSJ, See HH. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for pharmaceutical analysis. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 2024;2:1–22.
80. Mansour FR, Khairy MA. Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid–liquid microextraction. Journal of Chromatography B. 2017;1061:382–91.
81. Ocaña-González JA, Fernández-Torres R, Bello-López MÁ, Ramos-Payán M. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. Analytica Chimica Acta. 2016;905:8–23.
82. Jain R, Singh R. Applications of dispersive liquid–liquid micro-extraction in forensic toxicology. TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 2016;75:227–37.
83. Samanidou V, Kovatsi L, Fragou D, Rentifis K. Novel strategies for sample preparation in forensic toxicology. Bioanalysis. 2011;3(17):2019–46.

84. Wang Y, Li J, Sun D, Yang S, Liu H, Chen L. Strategies of dispersive liquid-liquid microextraction for coastal zone environmental pollutant determination. Journal of Chromatography A. 2021;1658:462615.

85. Keire DA. Analytical Tools for physicochemical characterization and fingerprinting. The science and regulations of naturally derived complex drugs. 2019;91–113.

86. Siddiqui MR, AlOthman ZA, Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. Arabian Journal of Chemistry. 2017;10:S1409–21.

87. González Cabrera M. Avances en la aplicación de imágenes hiperespectrales de espectroscopía infrarroja y Raman para la caracterización de materiales naturales y artificiales y sus transformaciones químicas. Tesis Doctoral, Universidad de Jaén. 2021.

88. Salzer R, Siesler HW. Infrared and Raman spectroscopic imaging. John Wiley & Sons; 2014.

89. Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. American Journal of Cancer Research. 2012;2(1):1.

90. Bunaciu AA, Fleschin S, Aboul-Enein HY. Biomedical investigations using Fourier transform-infrared microspectroscopy. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 2014;44(3):270–6.

91. Parys W, Dołowy M, Pyka-Pająk A. Significance of chromatographic techniques in pharmaceutical analysis. Processes. 2022;10(1):172.

92. Bunaciu AA, UdriŞTioiu EG, Aboul-Enein HY. X-ray diffraction: instrumentation and applications. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 2015;45(4):289–99.

93. Thakral NK, Zanon RL, Kelly RC, Thakral S. Applications of powder X-ray diffraction in small molecule pharmaceuticals: achievements and aspirations. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018;107(12):2969–82.

94. Chountoulesi M, Naziris N, Pippa N, Pispas S, Demetzos C. Differential scanning calorimetry (DSC): An invaluable tool for the thermal evaluation of advanced chimeric liposomal drug delivery nanosystems. Thermodynamics and Biophysics of Biomedical Nanosystems: Applications and Practical Considerations. 2019;297–337.

95. Ferreira LT, Alarcon RT, Perpétuo GL, Bannach G. Investigation and characterization by TG/DTG–DTA and DSC of the fusion of riboflavin, and its interaction with the antibiotic norfloxacin in the screening of cocrystal. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2019;136:581–8.

96. Rojas Camargo AP, Cabeza Zabala LY. Estudio comparativo de tecnología DSC e infrarrojo en la identificación de posibles incompatibilidades en mezclas binarias activo-excipiente. Trabajo de Grado. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Colombia, 2014.

97. Ramírez A, Benítez JL, Rojas de Astudillo L, Rojas de Gáscue B. Materiales polímeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante FTIR, DSC, MEB y MET. Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales. 2016;36(2):108–30.

98. Matsuda H, Mori K, Tomioka M, Kariyasu N, Fukami T, Kurihara K, et al. Determination and prediction of solubilities of active pharmaceutical ingredients in selected organic solvents. Fluid Phase Equilibria. 2015;406:116–23.

99. Hernández A, Ventura J, Christoph R. Aplicaciones de la microscopia electrónica de barrido y análisis elemental de componentes electrónicos y apoyo a la investigación científica en El Salvador. http://nanotecnialab ufg edu sv/frm/newsletters/Nanoboletin_Abril2019 pdf. 2019.

100. Penagos JIC. Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). Elementos. 2013;3(3):133–46.

101. Abd Mutalib M, Rahman MA, Othman MHD, Ismail AF, Jaafar J. Scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray (EDX) spectroscopy. In: Membrane characterization. Elsevier; 2017. p. 161–79.

102. Acosta D, Hernández F, Magaña C, Champi A. Estudios por microscopía electrónica de materiales grafénicos obtenidos por exfoliación ultrasónica y rociado neumático. Acta Microscopica. 2018;27(3):196–201.

103. Goldstein JI, Newbury DE, Michael JR, Ritchie NWM, Scott JHJ, Joy DC. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Springer; 2017.

104. Zhou W, Apkarian R, Wang ZL, Joy D. Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications. Springer. 2007;1–40.

105. Krstić M, Ražić S. Analytical approaches to the characterization of solid drug delivery systems with porous adsorbent carriers. Current Medicinal Chemistry. 2018;25(33):3956–72.

106. Aleluia ACM, de Souza Nascimento M, dos Santos AMP, dos Santos WNL, Júnior A de FS, Ferreira SLC. Analytical approach of elemental impurities in pharmaceutical products: A worldwide review. Spectrochim Acta Part B Atomic Spectroscopy. 2023;106689.

107. Castro ÁR, Bondi MCM, Suau BMS. Técnicas espectroscópicas en química analítica: Aspectos básicos y espectrometría molecular. Volumen I. Síntesis; 2012.

108. Vandenabeele P. Practical Raman spectroscopy: an introduction. John Wiley & Sons; 2013.

109. Mitsutake H, Poppi RJ, Breitkreitz MC. Raman imaging spectroscopy: history, fundamentals and current scenario of the technique. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2019;30:2243–58.

110. Salzer R, Siesler HW. Infrared and Raman spectroscopic imaging. John Wiley & Sons; 2014.

111. Aleluia ACM, de Souza Nascimento M, dos Santos AMP, dos Santos WNL, Júnior A de FS, Ferreira SLC. Analytical approach of elemental impurities in pharmaceutical products: a worldwide review. Spectrochim Acta Part B Atomic Spectroscopy. 2023;205:106689.

112. Calvo AM, Nieto L, Quintana A, Morales S. Determination of furvina in human plasma by Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) and Gas Chromatography. Afinidad. 2012;69(560):278–82.

113. Caraballoso-Noa IM, Calvo-Alonso AM, de la Torre-López JB. Validación y cálculo de la incertidumbre del resultado de la técnica cromatográfica para determinar G-1 y MBr en lotes de Furvina. Revista Cubana de Química. 2016;28(3):818-33.

114. Perez-Rodriguez Z, Rodriguez-Rodriguez Y, Molina-Ruiz R, Rodriguez-Negrin Z, Medina-Marrero R, Ancede-Gallardo E. Development of a new formulation for onychomycosis treatment using Furvina® as an active pharmaceutical ingredient: Modeling natural environments. En: Proceedings of the 2nd International conference on bioGeoSciences. Springer. 2019;191–203.

115. Bravo Sánchez LR, Jiménez López E, Muro Tamayo D, Calvo Alonso AM, Morales Fernández S, Consuegra S, et al. Validación de las técnicas para la determinación de la pureza del bioactivo 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno. Afinidad. 1999;56(479):29–33.

116. Quiñones-García YA, Calvo-Alonso AM, Caraballoso-Noa IM, Alonso-Rodriguez HL. Validación de un método analítico para la determinación del contenido de monobromado en el Dermofural por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE), fase inversa. Revista Cubana de Química. 2015;27(2):163–81.

117. Yera Gonzáles A, Caraballoso Noa I, Calvo Alonso A. Procedimiento Normalizado de Operación. G-1 puro. Determinación del contenido de G-1 y monobromado por cromatografía de gases con columna capilar y detector de captura electrónica. 2014:8.

118. Calvo AM. Procedimientos analíticos para la determinación de G-1 en muestras de plasma humano. Tesis de Maestría. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara; 2007.

119. CECMED. Regulación No. 41-2007: Validación de métodos analíticos. Ámbito Regulador 2007.

120. CECMED. Regulación Nº. 37. Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Medicamentos. Anexo1. La Habana, Cuba. 2012.

121. Sardiñas Peña O, Hernández Peñalver MT. Aseguramiento de la calidad en un laboratorio acreditado. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 2002;40(1):16–9.

122. Ellison SLR, Williams A. EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2012 p. 191.

123. Ellison S, Rosslein M, Williams A. Draft EURACHEM / CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Second Edition. 2000. 1–128 p.

124. Morrillas P, Barwick V, Ellison Stephen, Engman J, Magnusson B. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. 2016. 1–57 p. Disponible en: www.eurachem.org

125. Barwick VJ. Eurachem—A focus for analytical chemistry in Europe. In: Proceedings. MDPI; 2020. p. 19.

126. Heires M. The international organization for standardization (ISO). New Political Economy. 2008;13(3):357–67.

127. Guideline ICH. Q2 (R2) on Validation of Analytical Procedures. ICH Quality Guidelines. 2017;5:127–66.

128. Commission Decision of 12 August 2002 (2002/657/EC) implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities 2002; L221:8–36.

CAPÍTULO I

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA UV/VIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FURVINA® EN LACAS DE UÑAS

I.1. INTRODUCCIÓN

El concepto de validación en la fabricación de productos farmacéuticos surgió hace más de 40 años, cuando la FDA revisó las normas relativas al control de la fabricación de los productos, que son conocidas como BPF y en 1978, la palabra validación apareció por vez primera en algunas de sus secciones (1). En la Regulación No 37, 2012 del CECMED se define como validación: el establecimiento de pruebas documentales que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados (2).

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados son confiables. Cuando se realiza este proceso por parte del laboratorio, se busca determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

En la actualidad, existen varias normas de validación de métodos de análisis teniendo como criterio el área donde se van a utilizar como, por ejemplo, alimentos, medicamentos y análisis biomédicos, entre otros. Sin embargo, existen normas generales que se adaptan a cualquier destino como son las de Eurachem (3–5) y de la ISO (6), entre otras.

En Cuba existen varias normas de validación, pero teniendo en cuenta que el método propuesto en este Capítulo de Tesis va a ser utilizado sobre un cosmético, añadiendo a la formulación un IFA, se va a utilizar el Anexo No. I de las Buenas Prácticas para Laboratorio de Control de Medicamentos del CECMED (2), incluyendo los siguientes criterios de otras normas:

- En la prueba de linealidad se incluye el requisito de la significación de la regresión, la verificación de la linealidad y la verificación de la proporcionalidad, todas estas establecidas en el Anexo No. I de la Regulación Nº 37 de 2012. El coeficiente de calidad es otro parámetro añadido ya que es una herramienta matemática que se ha utilizado recientemente como un parámetro de calidad de las curvas de calibración, siendo el valor máximo permisible de 5% (7,8).
- En el caso de la precisión del método, la propuesta es la precisión intermedia ya que es una muestra homogénea y se analiza por el mismo analista en días diferentes para reflejar las condiciones reales dentro del laboratorio (1).

• La veracidad se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra y se establece como criterio de aceptación entre 97-103%, ya que se trata de un método analítico espectrofotométrico (1).

• El límite de detección (LD) y cuantificación (LQ) se calcula por el método de extrapolación a concentración cero de muestras que contienen baja concentración de analito (8).

• La especificidad se determina comparando los resultados del análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas o excipientes con los resultados del análisis de muestras que no contienen dichas sustancias.

El IFA Furvina® en diferentes matrices ha sido cuantificado por diversas técnicas analíticas como espectrofotometría de absorción molecular UV/VIS (9–14), HPLC (15) y la cromatografía de gases GC (15); sin embargo, la laca de uñas no ha sido objeto de estudio para este propósito. Teniendo en cuenta los prometedores resultados del uso de este IFA administrado en forma de laca de uñas para el tratamiento de la onicomicosis, se plantea en este Capítulo el desarrollo y validación de una técnica de fácil aplicación como es la espectrofotometría UV/VIS para la cuantificación del IFA Furvina® en este tipo de fármaco.

I.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

I.2.1. Procedimiento de cualificación del espectrofotómetro UV/VIS

Se procedió a la cualificación del espectrofotómetro UV/VIS de doble haz (Thermo Scientific Genesys 10s UV/VIS, Alemania) empleado para el desarrollo de la metodología analítica, provisto de cubetas de cuarzo de 1 cm. La cualificación se llevó a cabo según lo establecido en la *Bristish Pharmacopea* (16).

I.2.1.1. Control de la absorbancia

Reactivos

Ácido sulfúrico concentrado (d = 1,84 g/mL; 96 %; puro para análisis (p.a.)) y dicromato potásico (p.a.) suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

Preparación de las disoluciones

- Ácido sulfúrico 0,005 M: en un matraz de 1000 mL conteniendo 500 mL de agua destilada se añadieron 0,2776 mL de ácido sulfúrico concentrado y se enrasó con agua destilada cuando la mezcla alcanzó la temperatura ambiente.

- Dicromato de potasio 0,102 mM: se secó el reactivo en la estufa a 130 ºC, durante 4 horas y seguidamente se guardó en desecador conteniendo gel de sílice. Se pesaron 30,03 mg y se transfirieron de forma cuantitativa a un matraz de 500 mL conteniendo ácido sulfúrico 0,005 M, posteriormente se enrasó.

Procedimiento

Se realizaron mediciones de absorbancia a las longitudes de onda de 235, 257, 313 y 350 nm, utilizándose como blanco la disolución de ácido sulfúrico 0,005 M. Este procedimiento se repite 5 veces, cambiando la muestra y lavando la cubeta con agua destilada.

En la Tabla I.1 se muestran los valores de absorbancia permitidos según la norma para la cualificación del espectrofotómetro (16).

Tabla I.1. Límites permisibles de absorbancia específica para cada longitud de onda.

λ (nm)	**A[a] (1%, 1 cm)**	**Tolerancia máxima[b]**
235	124,5	122,9 – 126,2
257	144,0	142,2 – 145,7
313	48,6	47,0 – 50,3
350	106,6	104,9 – 109,2

[a] Absorbancia del dicromato de potasio a una concentración del 1% utilizando una celda de 1 cm de camino óptico
[b] Intervalo de A que garantiza un buen estado del instrumento.

I.2.1.2. Límite de luz parásita

Se mide la absorbancia de una disolución de cloruro de potasio 1,2% (m/v) en cubetas de 1 cm de camino óptico a 200 nm. Se utiliza agua destilada como blanco. La absorbancia debe ser mayor de 2.

I.2.1.3. Resolución

Reactivos: Tolueno y hexano, ambos de tipo p.a. y obtenidos de Fluka (Darmstadt, Alemania).

Procedimiento: Se registró el espectro de absorbancia de 200 a 400 nm de una disolución al 0,02% (v/v) de tolueno en hexano, empleándose hexano como blanco.

Resultado esperado: El espectro debe tener un máximo a 269 nm y un mínimo a 266 nm. La razón es de 1,2.

I.2.2. Procedimiento de aplicación del método espectrofotométrico UV/VIS para la determinación de Furvina® en la laca medicinal

I.2.2.1. Instrumentación

Se utilizó el espectrofotómetro UV/VIS de doble haz (Thermo Scientific Genesys 10s UV/VIS, Alemania) que había sido previamente cualificado. Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo usando cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Se empleó un baño ultrasónico Marca Julabo, modelo ED THERM 60 de origen alemán.

I.2.2.2. Reactivos

Los estándares de Furvina® (99,73% de pureza) y 2-bromo-5-[(E)-2-nitrovinil]-furano (99,64% de pureza) fueron suministrados por el CBQ (Santa Clara, Cuba). La acetona de grado HPLC se obtuvo de Chem-Lab (Zedelgem, Bélgica).

I.2.2.3. Muestras y procedimiento analítico

Se utilizó una laca de uñas donada por la empresa Suchel Camacho S.A. (La Habana, Cuba) etiquetada como "Endurecedor" (transparente). La laca de uñas medicalizada se preparó mezclando Furvina® como IFA al 0,25% (m/v) y laca al 99,75% (m/v) como vehículo farmacéutico. La mezcla se colocó en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos para lograr la completa disolución del IFA en la matriz de la laca. La laca de uñas se disolvió en acetona debido a su solubilidad en este disolvente, que se utilizó durante el proceso de validación para obtener concentraciones entre 1-5 mg/L.

Teniendo en cuenta la disposición técnica existente en nuestro Centro de trabajo y los estudios previos para la cuantificación de este IFA, se propone desarrollar un método espectrofotométrico UV/VIS para su cuantificación en las lacas debido a la simplicidad de su matriz. Para catalogar el método propuesto también se tiene en cuenta el impacto de su aplicación sobre el medio ambiente, el mantenimiento del equipo, sus costes de funcionamiento y depreciación, así como la formación de los técnicos y especialistas.

I.2.2.4. Selección de la longitud de onda analítica

Se realizó un espectro de la Furvina®, de la laca y del formulado en el rango de longitudes de onda de 200-400 nm para obtener la máxima absorbancia.

I.2.2.5. Preparación de las curvas de calibración

Se pipetearon diferentes alícuotas de distinto volumen de la disolución madre de laca de uñas medicada en matraces volumétricos de 5 mL con acetona para obtener diferentes disoluciones estándar de la laca de uñas medicada entre 1-5 mg/L. La absorbancia de cada disolución se midió tres veces en diferentes días para obtener la curva de calibración a 372 nm.

I.2.3. Procedimiento de validación del método propuesto

El método espectrofotométrico propuesto para la cuantificación de Furvina® en la laca de uñas medicada fue validado de acuerdo con las directrices de la *Bristish Pharmacopea* (18), la ICH (17–20) y el CECMED (1,2,21–23). Los parámetros de validación seleccionados fueron: especificidad, linealidad, veracidad, precisión intermedia, LD y LQ.

I.2.3.1. Especificidad

La evaluación de la especificidad de este método se llevó a cabo según el siguiente procedimiento: los ingredientes de los formulados para las uñas (Furvina® y laca comercial) se disolvieron en acetona para obtener la misma concentración que el punto intermedio en la curva de calibración (3 mg/L), cada uno en un matraz diferente, tomando la acetona como blanco de reactivo. Paralelamente, se preparó una disolución del formulado de concentración 3 mg/L para el tratamiento de las uñas. Se colocaron alícuotas de las disoluciones mencionadas en la cubeta del espectrofotómetro y se registraron los espectros correspondientes en el rango de 200 a 400 nm para determinar si el método era específico para cuantificar Furvina® en la laca de uñas medicada (2).

I.2.3.2. Linealidad

Se prepararon disoluciones estándar de Furvina® en acetona a cinco concentraciones (1, 2, 3, 4 y 5 mg/L), y se determinaron por triplicado los valores de absorbancia correspondientes a 372 nm en tres días diferentes. Los resultados obtenidos se utilizaron para evaluar la linealidad del método mediante diferentes pruebas reconocidas (21,24).

Con los valores experimentales obtenidos se determinó la ecuación de la recta de calibración, se calculó el coeficiente de correlación lineal (r), el coeficiente angular (n), la desviación estándar relativa de la pendiente Sb_{rel} (%) y el intervalo de confianza de la ordenada en el origen (a). Se realizaron también una prueba de t-Student para evaluar la

sensibilidad del calibrado y la prueba F. Además, se calculó el coeficiente de calidad (C.C.) y el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_f).

Los criterios de aceptación definidos para evaluar la capacidad del método analítico propuesto, para obtener resultados lineales que sean proporcionales a la concentración de Furvina® en laca a partir de los resultados obtenidos en el estudio de la linealidad, son:

- Coeficiente de correlación lineal: $r \geq 0{,}99$.
- $0{,}9 < n < 1{,}1$
- El cumplimiento de la condición de proporcionalidad, que considera la inclusión del cero en el intervalo de confianza de la ordenada en el origen (a)
- El cumplimiento de la condición de linealidad, que incluye el valor del $CV_f < 5\%$ y de la $Sb_{rel} < 2\%$.
- El valor de la prueba $F > F_{crítico}$
- Pendiente: $b \neq 0$.
- Coeficiente de variación de los factores de respuesta: $CV_f \leq 5\ \%$
- Desviación estándar relativa de la pendiente de la línea de regresión (Sb_{rel}): $Sb_{rel} \leq 2\%$.

Con los resultados experimentales obtenidos se construyó la recta de regresión de la linealidad, se calculó r, CV_f, la varianza de la pendiente de la línea de regresión (Sb^2) y el intervalo de confianza de a.

I.2.3.3. Límite de detección y de cuantificación

Los valores de LD y LQ se determinaron según el método de extrapolación a cero, descrito por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AESI) (26). Véanse las ecuaciones 1 y 2.

$$LQ = \frac{\bar{y}_{bl} + 10 S_{bl}}{b\sqrt{n}} \qquad (1)$$

$$LD = \frac{\bar{y}_{bl} + 3 S_{bl}}{b\sqrt{n}} \qquad (2)$$

donde:

S_{bl}: la desviación estándar de la respuesta analítica,

b: la pendiente del rango lineal dinámico,

$\overline{y}_{bl}$: intercepto de la línea recta entre A(promedio) *vs* c(mg/L)

n: número de concentraciones estudiadas.

I.2.3.4. Precisión

Repetibilidad

Se prepararon tres disoluciones del formulado con diferentes niveles de concentración de Furvina® para evaluar la repetibilidad del método. Se midieron seis réplicas de cada muestra a nivel bajo (1 mg/L), medio (3 mg/L) y alto (5 mg/L) de concentración del IFA. A continuación, se calcularon la concentración media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la repetibilidad (CVr).

Precisión intermedia

La precisión intermedia (variación dentro del laboratorio) fue determinada por tres analistas el mismo día, utilizando los mismos niveles de concentración descritos anteriormente. A continuación, se calcularon la desviación estándar, el coeficiente de variación entre analistas (CV), el coeficiente de variación teórico según Horwitz (Horwitz CV%) y el valor estadístico de la prueba de Cochran (C) para la evaluación de esta prueba.

I.2.3.5. Veracidad

Para la determinación de la veracidad del método se realizaron nueve determinaciones de una disolución de referencia de concentración conocida (3 mg/L) de Furvina®, que se encuentra en un punto intermedio de la curva de calibración, donde se comparó el valor medio encontrado con el esperado en cada caso a través del cálculo de recuperación (27).

$$\frac{\overline{C}_X}{C_{TEOR}} = \frac{R}{100\%}$$

donde:

$\overline{C}x$: Concentración media experimental

C_{TEOR}: Concentración teórica o valor esperado

R: valor de recuperación obtenido.

Se realizó una prueba de hipótesis t de Student, planteando la hipótesis (H) nula:

H_0: $R_m = 100$, siendo R_m el porcentaje de la recuperación media (Rm) obtenida,y como hipótesis alternativa:

H_1: $R_m \neq 100$, para demostrar si R_m es o no significativamente diferente de 100. Para ello se utilizó la expresión:

$$t_{exp} = \frac{|100 - R_m|\sqrt{n}}{CV}$$

donde: R_m= porcentaje de recuperación media; n= número de determinaciones; CV= coeficiente de variación del porcentaje de recuperación.

El valor experimental de t se comparó con el valor tabulado de t, $t_{((1-\alpha),\ n-1)}$, para α=0,05.

Al evaluar la veracidad se consideraron los criterios siguientes:

- Con un valor de recuperación media en el intervalo $97\% < R_m < 103\%$ puede considerarse que $\overline{Cx}$ es estadísticamente igual a C_{TEOR} y el método es exacto.
- Si el valor de $t_{exp} < t_{tab}$, no existen diferencias significativas entre R_m y 100, demostrando una buena veracidad del método.

I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.3.1. Cualificación del espectrofotómetro UV/VIS

A continuación, se describen las pruebas y los resultados obtenidos en la cualificación del espectrofotómetro UV/VIS utilizado en el desarrollo de la investigación, según lo establecido en la *British Pharmacopoeia* (16).

I.3.1.1. Control de la absorbancia

Al espectrofotómetro UV/VIS sometido al proceso de cualificación, se le realizó primero la prueba para el control de la absorbancia. En la Tabla I.2 se muestran los valores de absorbancia específica [A (1%, 1 cm)] obtenidos a cuatro longitudes de onda, los cuales fueron calculados a partir de las absorbancias obtenidas, para 5 réplicas de una disolución patrón de dicromato de potasio.

De los resultados obtenidos, se concluye que el espectrofotómetro cumplió con la prueba para el control de la absorbancia, ya que los valores de absorbancia específica obtenidos de forma experimental se hallaron dentro del intervalo de tolerancia tabulado para cada longitud de onda (16). Esto constituyó una evidencia objetiva de que el instrumento funcionaba de forma correcta, en lo que a este parámetro se refiere, ya que la cualificación de los equipos es de gran importancia, tanto para la correcta ejecución de los ensayos como para la obtención de resultados analíticos con la fiabilidad y la

precisión requerida (26).

Tabla I.2. Resultados de la prueba para el control de la absorbancia.

Nº de réplica	Longitud de onda			
	235 nm	257 nm	313 nm	350 nm
1	0,742	0,860	0,294	0,640
2	0,741	0,859	0,293	0,638
3	0,741	0,859	0,294	0,640
4	0,742	0,859	0,294	0,638
5	0,742	0,860	0,293	0,639
Media	0,7416	0,8594	0,2936	0,6390
SD	0,0005	0,0005	0,0005	0,0010
CV	0,0739	0,0637	0,1866	0,1565
A tabulada	122,9-126,2	142,4-145,7	47,0-50,3	104,9-109,2
A experimental	123,6	143,2	48,9	106,5

I.3.1.2. Límite de luz parásita

Se realizó la determinación del límite de luz parásita (16) que se define como cualquier luz que llega al detector y que se encuentra fuera de la región espectral aislada por el monocromador. La luz parásita reduce el rango de absorbancia medible y altera la linealidad entre concentración y absorbancia. Para comprobar la presencia de luz parásita en el dispositivo se necesitan filtros de corte (filtros con un espectro estrictamente definido). Para su determinación se colocó una disolución de cloruro de potasio 1,2% (m/v) en una cubeta de 1 cm de camino óptico y se utilizó agua destilada como disolución blanco. La absorbancia medida a 200 nm fue de 2,52; resultando este valor mayor que 2, que es el valor mínimo de absorbancia reportado para la prueba en la literatura (18).

El espectrofotómetro UV/VIS utilizado para realizar la validación de la técnica analítica para la determinación del contenido de Furvina® cumplió con las pruebas realizadas para su cualificación.

I.3.1.3. Resolución

Se obtuvo el espectro de una disolución al 0,02% de tolueno en n-hexano empleando este último disolvente como blanco y en el espectro aparecieron dos máximos de

absorbancia: uno a 269 nm y otro a 266 nm, siendo 2:1 la relación de absorbancias entre ellos, por lo que el instrumento cumplió con la prueba de cualificación según lo establecido en la farmacopea.

Teniendo en cuenta los resultados de las pruebas de cualificación del espectrofotómetro, se consideró apto para su utilización.

I.3.2. Validación del método espectrofotométrico propuesto

El método propuesto para la determinación de la concentración de Furvina® en la laca es desarrollado de forma interna por el laboratorio del CBQ, de ahí la necesidad de realizar una validación completa del mismo. Los parámetros de validación estudiados en esta investigación fueron especificidad, linealidad, LD, LQ, precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y veracidad, según lo establecido por la Regulación Nº 41-07 (1) y previamente explicados en el apartado I.2.3. A continuación, se exponen los resultados.

I.3.2.1. Especificidad

Al analizar la Figura I.1, se observa como las posibles sustancias que están presentes en la laca, no influyen en la determinación de Furvina®, ya que sus máximos de absorbancia no afectan en la determinación del IFA, porque se encuentran a valores inferiores de longitud de onda. Por tanto, se ratifica que este método es específico para la determinación de Furvina® en la laca a 372 nm.

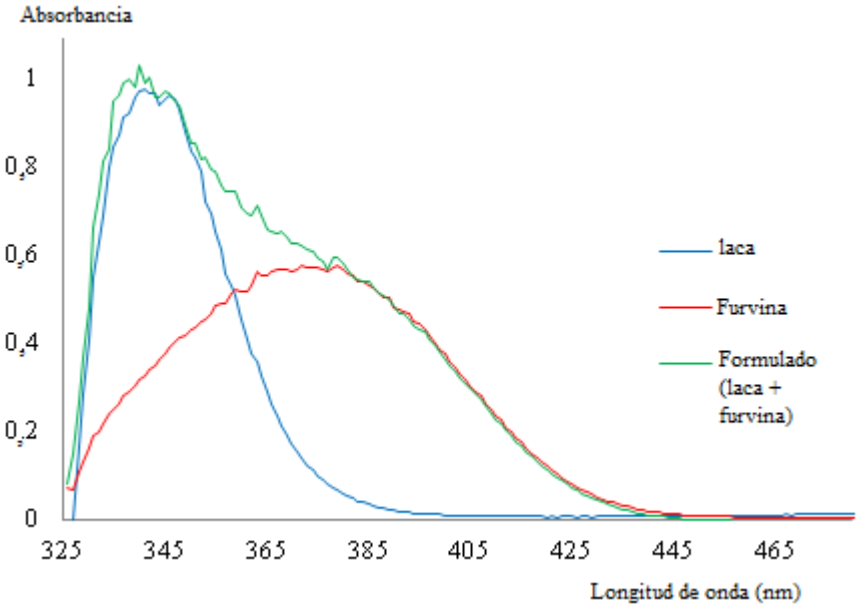


Figura I.1. Espectro UV/VIS del IFA Furvina®, la laca y el formulado.

I.3.2.2. Linealidad

En la Tabla I.3 se muestran los valores experimentales de absorbancia y los factores respuesta (Fr= absorbancia dividida entre la concentración que proporciona dicha señal analítica) para los distintos experimentos, calculados para las tres curvas de calibración de Furvina® obtenidas para el intervalo de 1-5 mg/L. Las Figuras I.2 y I.3 muestran las curvas de calibración obtenidas al representar la concentración (mg/L) *vs* absorbancia y el logaritmo de la concentración *vs* logaritmo de la absorbancia, respectivamente, observándose que en ambos casos existe una correlación lineal.

Tabla I.3. Parámetros de calibración de Furvina® en acetona

Nº	**$c_{Furvina}$ (mg/L)**	**A**	**Fr**	**log $c_{Furvina}$**	**log A**
1	1,0	0,060	0,0600	0,0000	-1,22185
2	1,0	0,060	0,0600	0,0000	-1,22185
3	1,0	0,062	0,0620	0,0000	-1,20761
4	1,0	0,062	0,0620	0,0000	-1,20761
5	1,0	0,064	0,0640	0,0000	-1,19382
6	1,0	0,064	0,0640	0,0000	-1,19382
7	1,0	0,064	0,0640	0,0000	-1,19382
8	1,0	0,064	0,0640	0,0000	-1,19382
9	1,0	0,064	0,0640	0,0000	-1,19382
10	2,0	0,132	0,0660	0,3010	-0,87943
11	2,0	0,132	0,0660	0,3010	-0,87943
12	2,0	0,132	0,0660	0,3010	-0,87943
13	2,0	0,133	0,0665	0,3010	-0,87615
14	2,0	0,133	0,0665	0,3010	-0,87615
15	2,0	0,133	0,0665	0,3010	-0,87615
16	2,0	0,133	0,0665	0,3010	-0,87615
17	2,0	0,133	0,0665	0,3010	-0,87615
18	2,0	0,133	0,0665	0,3010	-0,87615
19	3,0	0,207	0,0690	0,4771	-0,68403
20	3,0	0,207	0,0690	0,4771	-0,68403
21	3,0	0,207	0,0690	0,4771	-0,68403

22	3,0	0,208	0,0693	0,4771	-0,68194
23	3,0	0,208	0,0693	0,4771	-0,68194
24	3,0	0,208	0,0693	0,4771	-0,68194
25	3,0	0,208	0,0693	0,4771	-0,68194
26	3,0	0,208	0,0693	0,4771	-0,68194
27	3,0	0,208	0,0693	0,4771	-0,68194
28	4,0	0,273	0,0683	0,6021	-0,56384
29	4,0	0,273	0,0683	0,6021	-0,56384
30	4,0	0,273	0,0683	0,6021	-0,56384
31	4,0	0,273	0,0683	0,6021	-0,56384
32	4,0	0,273	0,0683	0,6021	-0,56384
33	4,0	0,273	0,0683	0,6021	-0,56384
34	4,0	0,273	0,0683	0,6021	-0,56384
35	4,0	0,273	0,0683	0,6021	-0,56384
36	4,0	0,273	0,0683	0,6021	-0,56384
37	5,0	0,322	0,0644	0,6990	-0,49214
38	5,0	0,322	0,0644	0,6990	-0,49214
39	5,0	0,322	0,0644	0,6990	-0,49214
40	5,0	0,346	0,0692	0,6990	-0,46092
41	5,0	0,346	0,0692	0,6990	-0,46092
42	5,0	0,346	0,0692	0,6990	-0,46092
43	5,0	0,322	0,0644	0,6990	-0,49214
44	5,0	0,322	0,0644	0,6990	-0,49214
45	5,0	0,322	0,0644	0,6990	-0,49214

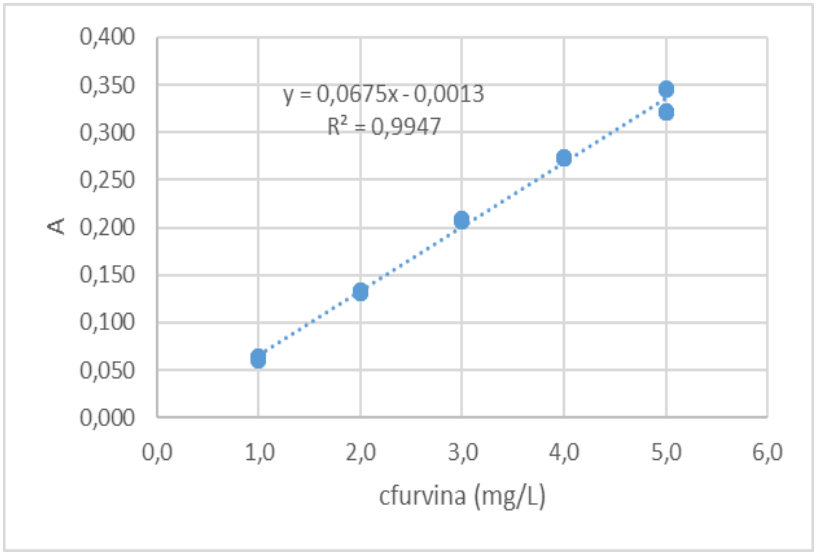


Figura I.2. Curva de calibración lineal para Furvina® en acetona.

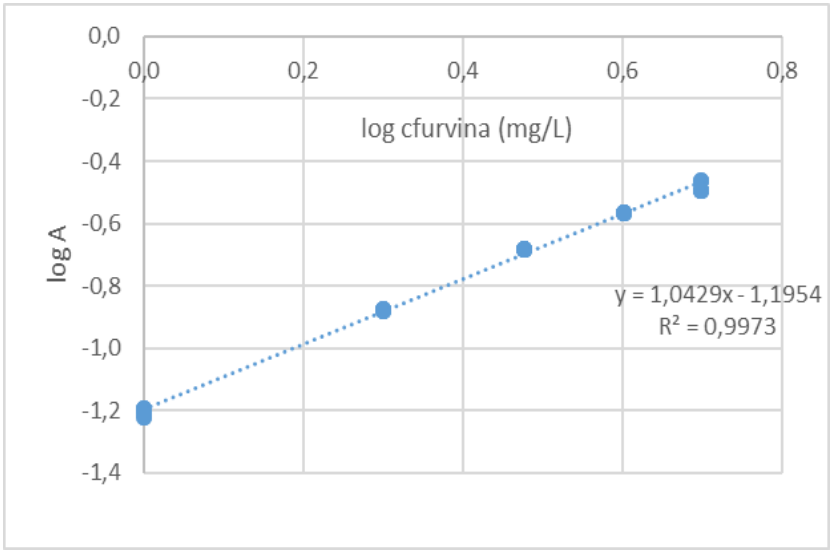


Figura I.3. Curva logarítmica para la determinación del coeficiente angular.

En la Tabla I.4 se muestran los parámetros evaluados para verificar la linealidad y proporcionalidad para la calibración usando disoluciones estándar de Furvina® preparadas en acetona, los cuales cumplen con los criterios de aceptación correspondientes.

Tabla I.4. Parámetros de la recta de regresión lineal de Furvina® en acetona por espectrofotometría UV/VIS

Parámetro	**Valor experimental**	**Criterio de aceptación**
Número de datos (*n*)	45	-
Intervalo de linealidad (mg/L)	1-5	-
Coeficiente de correlación (r)	0,9973	r ≥0,99
Coeficiente de determinación (R^2)	0,9947	R^2 ≥0,98
Coeficiente angular (n)	1,0429	0,9-1,1
Pendiente (*b*)	0,0675	-
Ordenada en el origen *(a)*	-0.0013	-
Intervalo de confianza de *a*	-0,0063 a 0,0037	que contenga el 0
Intervalo de confianza de *b*	0,0660 a 0,0690	que sea diferente de 0
Desviación estándar relativa de la pendiente de la línea de regresión ($Sb_{rel.}$)	0,97%	$Sb_{rel} \leq 2\%$
Coeficiente de variación de los factores respuesta CV_f	3,92%	$CV_f \leq 5\%$
Test F	8048,88 > 1,5146E^{-50}	$F > F_{crítico}$
Coeficiente de calidad (QC)	3,51%	QC≤ 5%

Como puede concluirse a partir de la Tabla I.4, el método cumple con todos los criterios evaluados, lo que indica que la técnica analítica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado de 1- 5 mg/L, con una alta correlación entre la absorbancia y la concentración de Furvina® (observar valores de r y R^2). El coeficiente angular (n) con un valor de 1,0429 es garantía de que la pendiente corta en un ángulo de 45 grados, por lo que el método presenta una adecuada sensibilidad ya que la variación de la absorbancia con la concentración está dentro del parámetro establecido. Además, la línea recta obtenida pasa por el origen de coordenadas ya que incluye el cero, lo que es indicativo de la no existencia de error sistemático y esto permite despreciar el valor de la ordenada en el origen para el cálculo de los coeficientes de variación de los factores respuestas, el cual es igual a 3,92%, inferior al criterio establecido. La desviación estándar relativa de la pendiente de la línea de regresión ($Sb_{rel.}$) garantiza que la curva analizada en días diferentes va a tener igual pendiente. El valor de la prueba F obtenido es un criterio más que reafirma que la variabilidad en la curva no afecta la linealidad.

El coeficiente de calidad (QC) es una herramienta matemática que se utiliza como un parámetro de calidad de las curvas de calibración. Existen varios tipos de QCs, los

cuales se encuentran registrados en la literatura (7). El valor máximo permisible es de 5%. Se propone utilizar el QC_{mean}, el cual se basa en la aceptación de una desviación estándar constante:

$$QC_{mean} = 100\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(\frac{y_i-\hat{y}_i}{\bar{y}}\right)^2}{n-1}}$$

donde:

n: número de puntos de la curva de calibración

y_i: señal medida para un cierto valor de x_i

$\hat{y}_i$: señal predicha por el modelo

$\bar{y}$: valor promedio de la señal medida.

El valor de QC obtenido es menor que el umbral máximo establecido, siendo otra prueba que reafirma que en el intervalo estudiado existe una alta correlación entre las variables.

I.3.2.2 Límite de detección y cuantificación

La Tabla I.5 muestra los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones teóricas de 0,25 mg/L; 0,50 mg/L y 0,75 mg/L. Las Figuras I.4 y I.5 muestran la concentración (mg/L) *vs* absorbancia media y la concentración (mg/L) *vs* desviación estándar (SD) de la absorbancia medida, observándose que en ambas existe una buena correlación lineal.

Tabla I.5. Valores obtenidos de absorbancia para las 3 concentraciones evaluadas.

$c_{Furvina}$ (mg/L)	A	A	A	A media	SD
0,2500	0,014	0,013	0,016	0,0143	0,001528
0,5000	0,032	0,030	0,031	0,0310	0,001000
0,7500	0,046	0,046	0,047	0,0463	0,000577

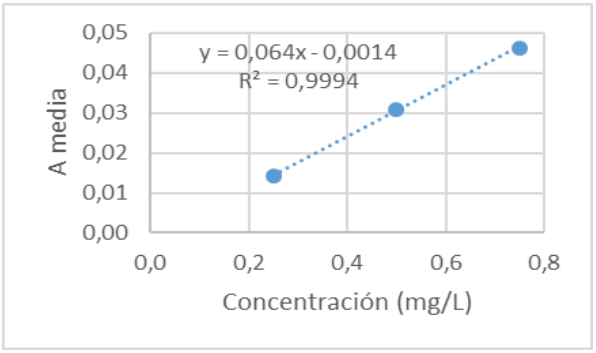


Figura I.4. Representación de la concentración de Furvina® *vs* absorbancia media.

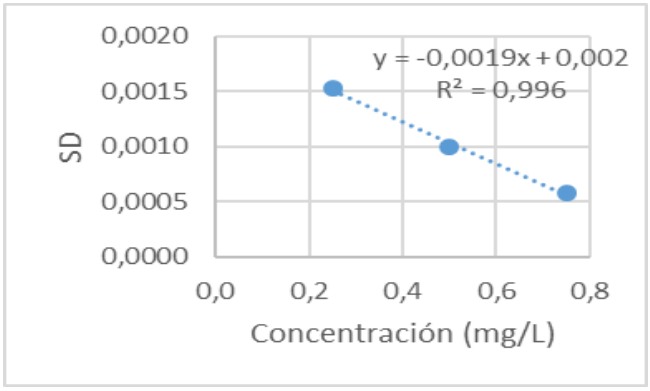


Figura I.5. Representación de la concentración de Furvina® *vs* desviación estándar.

Los valores estimados de LD y LQ para este método, así como otras características analíticas se presentan en la Tabla I.6.

Tabla I.6. Características analíticas del método espectrofotométrico propuesto.

Pendiente recta A media *vs* c (mg/L), **m**	0,064
Ordenada en el origen recta A media *vs* c(mg/L), $\bar{y}_{bl}$	-0,0014
Pendiente recta SD *vs* c (mg/L), **m**	-0,0019
Ordenada en el origen recta SD *vs* c (mg/L), S_{bl}:	0,002
Pendiente de la curva de linealidad de la laca, **b**	0,0682
LD, $\frac{\bar{y}_{bl}+3S_{bl}}{b\sqrt{n}}$:	(-0,0014+(3*(0,002)))/ (0,0682*1,73)= 0,0382 mg/L
LQ, $\frac{\bar{y}_{bl}+10S_{bl}}{b\sqrt{n}}$:	(-0,0014+(10*(0,0020)))/ (0,0682*1,73)= 0,1560 mg/L

I.3.2.3. Precisión

Repetibilidad

Para la determinación de la repetibilidad, se analizaron seis réplicas de la muestra de laca a diferentes niveles de concentración de Furvina®, por un mismo analista y el mismo día, y los resultados se muestran en la Tabla I.7.

Al determinar el coeficiente de variación obtenido, para cada nivel de concentración, en ninguno de los casos excedió el 3%, que es el valor aceptable para ensayos físico–químicos, por lo tanto, el método se consideró preciso en cuanto a la repetibilidad (26).

Precisión intermedia

La Tabla I.8 muestra los resultados de concentración de Furvina® obtenidos para el estudio de precisión intermedia sobre la base de 18 determinaciones llevadas a cabo por tres analistas el mismo día, con el empleo de la técnica espectrofotométrica UV/VIS, a nivel bajo de concentración. En el Anexo 1 se muestra el test de análisis de la varianza (ANOVA) realizado.

Tabla I.7. Valores experimentales de la repetibilidad.

	Nivel concentración		
Item	**Bajo c (mg/L)**	**Medio c (mg/L)**	**Alto c (mg/L)**
1	1,0119	3,0859	5,0563
2	1,0267	3,1007	5,0711
3	1,0119	3,1007	5,0563
4	1,0119	3,0859	5,0711
5	1,0267	3,1007	5,0711
6	1,0119	3,0859	5,0563
Media	**1,0168**	**3,0933**	**5,0637**
SD	**0,00765**	**0,00811**	**0,00811**
CV (%)	**0,75**	**0,26**	**0,16**

A través del análisis de la precisión intermedia y por los cálculos realizados para los CVs entre los analistas y de Horwitz (27), se confirmó que $CV\%_{(\text{entre analistas})}$ ***9,16*** < ***15,85*** $CV\%_{(\text{Horwitz})}$; por tanto, se considera este criterio como de precisión aceptable del método. La comparación de los valores de F obtenidos de ANOVA evidencian que $F_{calculado}$ ***685,61 > 3,68*** $F_{tabulado}$ y como $CV\%_{(\text{entre analistas})}$ ***0,38*** < ***14,46*** $CV\%_{(\text{Horwitz})}$, el método es

también considerado preciso. La comparación del valor de la C de Cochram calculado con el tabulado muestra que $C_{calculado}$ ***0,515*** < ***0,707*** $C_{tabulado}$, entonces la variación del método se considera igual para los tres analistas y es este un criterio que avala la precisión intermedia del método.

Tabla I.8. Muestra analizada por distintos analistas.

Nivel bajo de concentración			
Item	**Analista 1**	**Analista 2**	**Analista 3**
1	1,0119	1,0563	1,1896
2	1,0267	1,0711	1,2044
3	1,0119	1,0563	1,2044
4	1,0119	1,0711	1,1896
5	1,0267	1,0711	1,2044
6	1,0119	1,0711	1,2193
Media	**1,0168**	**1,2020**	**1,2020**
SD	**0,00765**	**0,01115**	**0,01115**
CV (%)	**0,75**	**0,93**	**0,93**

En la Tabla I.9 se presentan los resultados de concentración de Furvina® obtenidos para el estudio de reproducibilidad sobre la base de 18 determinaciones realizadas por tres analistas el mismo día, con el empleo de la técnica experimental espectrofotométrica UV/VIS, a nivel medio de concentración. En el Anexo 2 se muestra el ANOVA realizado.

A través del análisis de la precisión intermedia y los cálculos realizados para los coeficientes de variación los analistas y de Horwitz (27), confirman que $CV\%_{(entre\ analistas)}$ ***4,88*** < ***13,61*** $CV\%_{(Horwitz)}$, por tanto, se considera este criterio como de precisión aceptable del método. La comparación de los valores de F obtenidos de ANOVA evidencian que $F_{calculado}$ ***504,57*** > ***3,68*** $F_{tabulado}$ y como $CV\%_{(entre\ analistas)}$ ***4,88*** < ***13,61*** $CV\%_{(Horwitz)}$, el método es también considerado de precisión aceptable. La comparación del valor de la C de Cochram calculado con el tabulado muestra que $C_{calculado}$ ***0,257***< ***0,707*** $C_{tabulado}$, entonces la variación del método se considera igual para los tres analistas, un criterio que avala la precisión intermedia del método.

Tabla I.9. Valores de una muestra analizada por distintos analistas.

Nivel medio de concentración			
Item	**Analista 1**	**Analista 2**	**Analista 3**
1	3,0859	2,9822	2,9230
2	3,1007	2,9970	2,9378
3	3,1007	2,9822	2,9230
4	3,0859	2,9970	2,9378
5	3,1007	2,9970	2,9081
6	3,0859	2,9822	2,9230
Media	**3,0933**	**2,9896**	**2,9254**
SD	**0,00811**	**0,00811**	**0,01115**
CV (%)	**0,26**	**0,27**	**0,38**

En la Tabla I.10 se presentan los resultados de la concentración de Furvina® obtenidos para el estudio de reproducibilidad sobre la base de 18 determinaciones llevadas a cabo por tres analistas en el mismo día, con el empleo de la técnica propuesta, a nivel alto de concentración. En el Anexo 3 se muestra el ANOVA realizado.

Tabla I.10. Valores de una muestra analizada por distintos analistas.

Nivel alto de concentración			
Item	**Analista 1**	**Analista 2**	**Analista 3**
1	5,0563	4,9526	5,0563
2	5,0711	4,9526	5,0415
3	5,0563	4,9378	5,0563
4	5,0711	4,9674	5,0267
5	5,0711	4,9378	5,0563
6	5,0563	4,9526	5,0415
Media	5,0563	4,9526	5,0563
SD	5,0711	4,9526	5,0415
CV (%)	5,0563	4,9378	5,0563

A través del análisis de la precisión intermedia y los cálculos realizados para los coeficientes de variación entre los analistas y de Horwitz (27), confirman que $CV\%_{(Entre\ analistas)}$ ***2,72*** < ***12,60*** $CV\%_{(Horwitz)}$, por tanto, se considera este criterio como preciso. La

comparación de los valores de F obtenidos de ANOVA evidencian que $F_{calculado}$ ***200,33> 3,68*** $F_{tabulado}$ y como $CV\%_{(Entre\ analistas)}$ ***2,72*** < ***12,60*** $CV\%_{(Horwitz)}$, el método es también considerado de precisión aceptable. La comparación del valor de la C de Cochram calculado con el tabulado muestra que $C_{calculado}$ ***0,435*** < ***0,707*** $C_{tabulado}$, entonces la variación del método se considera igual para los tres analistas, lo que avala la precisión intermedia del método.

Al tener en cuenta el estudio realizado a los 3 niveles de concentración de Furvina®, variando el analista, en todos los casos se obtuvo como resultado una precisión aceptable ya que los CVs de la repetibilidad para cada analista fueron menores que el 3%.

I.3.2.4. Veracidad

Los resultados de la evaluación de la veracidad de este método a través del análisis repetitivo de una disolución de referencia aparecen en la Tabla I.11 (punto intermedio de la curva de calibración).

Tabla I.11. Estudio de la veracidad a través del análisis repetitivo de una disolución de concentración conocida (3 mg/L)

Item	**c (mg/L)**	**Recuperación (%)**
1	3,0015	100,05
2	2,9867	99,56
3	3,0015	100,05
4	2,9867	99,56
5	2,9867	99,56
6	3,0015	100,05
7	3,0015	100,05
8	3,0015	100,05
9	3,0015	100,05
Concentración media experimental	2,9965	
Concentración conocida C_{TEOR}	3	
Recuperación media (%)	99,88	
CV de la recuperación (%)	0,25	
t_{exp}	1,3984	
t(9-1;0,05)	1,8595	

El porcentaje de recuperación obtenido se encontró dentro del rango 97-103%, reportado como criterio de aceptación para este parámetro (25).

El valor del estadístico t_{exp} resultó menor que el tabulado (t_{tab}) para un 95% de confianza, criterio que avala la veracidad del método, por lo que se demuestra que no existían diferencias significativas entre el valor medio experimental y el esperado.

Los resultados presentados permitieron afirmar que el método espectrofotométrico de absorción molecular UV/VIS propuesto para la determinación de Furvina® es veraz en las condiciones seleccionadas.

I.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método de análisis basado en espectrofotometría de absorción molecular para la cuantificación del IFA Furvina® en un formulado medicinal preparado en base de laca de uñas, con muy buenas características analíticas y de muy fácil aplicación. El método analítico propuesto ha sido validado obteniéndose valores muy adecuados para los distintos parámetros calculados, pudiendo afirmar sus favorables niveles de especificidad, precisión y veracidad dentro del intervalo lineal de 1-5 mg/L. Se han obtenido niveles adecuados para LQ y LD, siendo de 0,156 y 0,038 mg/L, respectivamente.

I.5. BIBLIOGRAFIA

1. CECMED. Regulación Nº. 41. Validación de métodos analíticos. Ámbito Regulador 2007.
2. CECMED. Regulación Nº 37. Buenas prácticas de laboratorio para el control de medicamentos. Anexo1. La Habana, Cuba. 2012.
3. Barwick VJ. Eurachem—A focus for analytical chemistry in Europe. Proceedings. 2020;55(1):19.
4. Ellison SLR, Williams A. EURACHEM/CITAC Guide CG 4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Thrid edition. 2012:1-141
5. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A. EURACHEM / CITAC Guide CG 4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Second Edition. 2000:1–128.
6. Heires M. The International Organization for Standardization (ISO). New Political Economy. 2008;13(3):357–67.
7. de Beer J, Naert C, Deconinck E. The quality coefficient as performance assessment parameter of straight line calibration curves in relationship with the number of calibration points. Accreditation and Quality Assurance. 2012;17(3):265–74.
8. Evans EH, Day JA, Palmer CD, Price WJ, Smith CMM, Tyson JF. Atomic spectrometry update. Advances in atomic emission, absorption and fluorescence spectrometry, and related techniques. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 2005;20(6):562–90.
9. Perez Rodriguez Z. Estudio químico-farmacéutico de una tintura con furvina® para el tratamiento de la onicomicosis. Tesis. Facultad de Química y Farmacia. Universidad Marta Abreu de las Villas, Santa Clara, Cuba, 2015.
10. Perez-Rodriguez Z, Molina-Ruiz R. Estudio químico-farmacéutico de una laca con furvina® para el tratamiento de la onicomicosis. Tesis. Facultad de Química y Farmacia. Universidad Marta Abreu de las Villas, Santa Clara, Cuba,2017.
11. Perez Rodriguez Z, Rodriguez Rodriguez Y, Rodriguez Negrin Z. Facultad de Química y Farmacia. Tesis de Maestría. Departamento de licenciatura en química "química analítica." 2017.

12. Valdés-Negrin HL, Alvarez O, Perez-Rodriguez Z, Rodriguez-Negrin Z, Perez-Rodriguez M. Analyzing thermal degradation of furvina drug using a stability indicating spectrophotometric method and characterization studies. Chemistry Africa. 2022;5(2):305–12.
13. Perez-Rodriguez Z, Rodriguez-Rodriguez Y, Rodriguez-Negrin Z, Molina-Ruiz R, Medina-Marrero R, Ancede-Gallardo E. Development of a new formulation for onychomycosis treatment using Furvina® as an active pharmaceutical ingredient. In: Proceedings of the 2nd International Conference on BioGeoSciences: Modeling Natural Environments 2. Springer; 2019. p. 191–203.
14. Caraballoso-Noa IM, Calvo-Alonso AM, de la Torre-López JB. Desarrollo, validación y cálculo de la incertidumbre del resultado de la técnica cromatográfica para determinar G-1 y MBr en lotes de Furvina. Revista Cubana de Química. 2016;28(3):818–33.
15. Jorge E, Jiménez I, Calvo A. 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. Materia Prima. Métodos de control. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Santa Clara, Cuba 2003.
16. British Pharmacopoeia. British Pharmacopoeia 2009. 2016;39:418–20.
17. Pogány J. ICH Pharmaceutical quality system Q10. WHO Drug Information. 2008;22(3):177–81.
18. ICH Q10 Pharmaceutical Quality System (PQS) ICH Q10 PQS Guideline. Quality.
19. Iniesta JF. Buenas Prácticas Clínicas (BPC) y Normas ICH (Conferencia Internacional de Armonizacion).
20. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005.
21. CECMED. Regulación Nº 41. Validación de métodos analíticos. 2007.
22. CECMED. Regulación Nº 21. Requisitos para la autorización y modificación de ensayos clínicos. 2008.
23. CECMED. Regulación Nº 23. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. 2000.
24. Castro M, Gascón S, Pujol M, Sans J. Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. 1989.

25. M PR. Desarrollo y validación de técnicas analíticas por HPLC y SQV, para determinar el contenido de UC-244. Licenciatura en Química. Universidad Central Marta Abreu de las Villas, Cuba. 2008.

28. Norma Cubana ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. La Habana, Cuba. 2006.

27. Garfield FM. Principios de garantía de calidad para laboratorios analíticos. AOAC International. Second edition. 1993.

CAPÍTULO II

DESARROLLO DE UN MÉTODO BASADO EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR CON DETECCIÓN POR DIODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FURVINA® EN LACAS DE UÑAS

II.1. INTRODUCCIÓN

La onicomicosis o *tinea unguium* es una infección fúngica del lecho, matriz o placa ungueal, que afecta a las uñas de los pies con más frecuencia que a las de las manos (1,2). La onicomicosis representa un tercio de las infecciones por hongos y la mitad de todas las enfermedades de las uñas. Los dermatofitos, las levaduras y los mohos son los tres principales hongos que afectan la piel. La incidencia real de esta infección es probablemente mucho mayor que la documentada, que oscila entre el 2 y el 18,5% de la población general (3–5). Se ha constatado la mayor prevalencia de esta infección en zonas de clima húmedo y cálido, así como en individuos de edad avanzada y con diversas condiciones de salud como diabetes, inmunosupresión, pie de atleta y enfermedad vascular periférica (6). Además, el calzado oclusivo, la exposición a vestuarios públicos y la diseminación de diferentes cepas de hongos en todo el mundo han contribuido al aumento de la incidencia de onicomicosis (1).

La onicomicosis es más que un problema estético, ya que, aunque a menudo las personas con esta infección se avergüenzan de la desfiguración de sus uñas, también puede limitar su movilidad, disminuir indirectamente la circulación periférica, empeorando así afecciones como la estasis venosa y las úlceras del pie diabético (4). Las infecciones por hongos en las uñas también pueden propagarse a otras áreas del cuerpo y, quizás, a otras personas (7).

La dificultad para tratar la onicomicosis se debe a la profundidad generalmente alcanzada por la infección dentro de la unidad ungueal (lámina ungueal, lecho ungueal y tejido circundante) y a la incapacidad de los medicamentos para llegar eficazmente a todas las zonas afectadas. Con objeto de solventar estos problemas, las investigaciones se han centrado en la propuesta de nuevas tecnologías de administración para facilitar la penetración de los fármacos antimicóticos existentes a través de la placa ungueal y en el descubrimiento de nuevos antimicóticos inherentemente penetrantes (2).

Actualmente, existen diferentes agentes antimicóticos orales disponibles comercialmente que se utilizan para el tratamiento de las uñas (8). La griseofulvina (Grisactin®, Gris-PEG®) ha estado disponible durante muchos años, pero su uso hoy en día se ve restringido por su limitado espectro de aplicación, la necesidad de ciclos de tratamiento prolongados y las altas tasas de recaída. La forma oral de ketoconazol (Nizoral®) es mucho más eficaz, pero conlleva riesgo de hepatotoxicidad (1,9). Por otro

lado, el tratamiento mediante avulsión ungueal en combinación con terapia tópica ha sido algo más exitoso, pero este enfoque puede llevar mucho tiempo, ser temporalmente incapacitante y doloroso (1).

Debido a la toxicidad sistémica y otras desventajas asociadas con la terapia oral, comúnmente se recomienda la terapia tópica, ya que mejora el tratamiento del paciente y reduce el costo (10). En las últimas décadas, el tratamiento tópico de las infecciones por hongos en las uñas ha sido objeto de investigación, ya que ofrece una alternativa mucho más segura y específica que la terapia oral convencional (4). La FDA ha etiquetado la laca de uñas basada en el ingrediente farmacéutico activo (IFA) ciclopirox (Penlac®) para el tratamiento de la onicomicosis leve a moderada causada por el hongo Trichophton rubrum (T. rubrum) sin afectación de la lúnula. Aunque es seguro y relativamente económico, el tratamiento con ciclopirox rara vez es eficaz (1,11).

El IFA 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil) furano (Furvina®) ha demostrado su eficiencia como agente antimicrobiano de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras y hongos filamentosos (12,13). Este IFA contiene una impureza conocida como monobromado (MBr, 2-bromo-5-(2-nitrovinil) furano) cuyo contenido en el producto final debe conocerse para cumplir con las especificaciones de calidad del IFA (14). Actualmente, la Furvina® se usa con fines médicos en Cuba, siendo comercializada para humanos como el ungüento Dermofural® (15–18) y para uso veterinario como Furvinol® (19,20).

El objetivo de esta investigación es el desarrollo y validación de un método analítico basado en cromatografía líquida capilar con detección mediante diodos en serie (LCcapilar-DAD) para la cuantificación de Furvina® en lacas medicinales de uñas, proporcionando así una herramienta de gran utilidad para el control de calidad de estos productos.

II.2. PARTE EXPERIMENTAL

II.2.1. Reactivos

Los disolventes acetonitrilo (ACN) y acetona de calidad cromatográfica fueron obtenidos de Chem-Lab (Zedelgem, Bélgica). Por otro lado, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) proporcionó ácido fórmico y benzo(α)antraceno (BaA, 1000 µg/mL en metanol), este último usado como estándar interno (EI). Se preparó una disolución de trabajo del EI de 200 µg/mL en ACN.

El agua usada se purificó previamente mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). El estándar de Furvina® (99,73%) fue proporcionado por el CBQ (Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba), donde es sintetizado. Se preparó una disolución concentrada del IFA de 250 μg/mL en ACN, manteniéndose en todo momento protegida de la luz.

II.2.2. Instrumentación

El sistema cromatográfico (Agilent Technologies 1200 Series, Agilent, Waldbronn, Alemania) incluye una bomba capilar 1260 (G1376A) y un sistema de membrana 1260 para desgasificación de disolventes (G4225A). El equipo DAD (Agilent, G1321A) viene provisto de una célula de flujo de 0,5 μL y operó a las longitudes de onda de 380 y 250 nm, para la detección del analito y del EI, respectivamente.

La separación cromatográfica se realizó en modo de fase reversa usando una columna capilar Zorbax SB-C18 (Agilent) de 15 cm de longitud, 0,5 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula. La fase móvil consistió en una mezcla de una disolución acuosa de ácido fórmico al 0,1% (v/v) y ACN en la proporción 20:80, trabajando en modo isocrático con una velocidad de flujo de 20 μL/min. El volumen de inyección fue de 2 μL, llevándose a cabo la inyección de forma manual mediante una válvula de inyección Rheodyne Modelo 7125-075 (Rheodyne, Berkeley, CA, EE.UU.). Bajo las condiciones experimentales aplicadas, el analito eluyó con un tiempo de retención de 2,9 min y el EI a 5,8 min.

En la etapa de preparación de la muestra se empleó un agitador vórtex LLG-uniTEXER (LLG-Labware, Constantí, Tarragona, España).

II.2.3. Muestras

El método LCcapilar-DAD propuesto se ha aplicado al análisis de tres lacas formuladas en el CBQ de Cuba, usando Furvina® como IFA y esmalte de uñas como excipiente. Para su preparación la empresa Suchel Camacho S.A. (La Habana, Cuba) donó generosamente los excipientes, tratándose de tres tipos de esmalte de uñas que básicamente diferían en el color y venían etiquetados como "Endurecedor" (transparente), "Alicia 512" (color rojo) y "Pasión 46" (color blanco). La densidad de las lacas es 0,941 g/mL. A partir de cada uno de los tres esmaltes descritos, se prepararon tres lacas de uñas medicinales al añadirles el IFA Furvina® hasta una concentración final de 2,5 mg/mL ya que a mayores concentraciones es irritante (21). Para ello, se pesaron 5

mg del IFA en un matraz aforado de 2 mL de capacidad, enrasándose con los esmaltes correspondientes (rojo, blanco o transparente). La mezcla se homogeneizó por agitación vórtex durante 5 min para asegurar la completa disolución del IFA. Estas lacas resultan muy efectivas en el tratamiento de infecciones por hongos, caracterizándose por su menor toxicidad respecto de los tratamientos orales y mayor comodidad en la dosificación.

II.2.4. Tratamiento de las muestras

Para el análisis de las lacas preparadas, 500 µL de muestra fueron disueltos en 5 mL de acetona y las disoluciones fueron filtradas usando filtros Uniprep de 0,2 µm (Agilent). Antes de su inyección en el sistema LC capilar las muestras fueron debidamente diluidas en acetona y el EI añadido a un nivel de concentración de 2 µg/mL. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1. Optimización de la separación cromatográfica y detección DAD

Para la optimización de la separación cromatográfica se usó la laca medicinal preparada a partir del esmalte "Pasión 46", tal y como se detalla en la Sección II.2.3, siendo seguidamente diluida y filtrada de acuerdo con el protocolo detallado en la Sección II.2.4, quedando una concentración final del IFA Furvina® de 250 µg/mL y del EI de 2 µg/mL. Teniendo en cuenta el carácter apolar del IFA y del EI se seleccionó el modo de separación en fase reversa empleando una columna capilar Zorbax SB-C18 (15 cm, 0,5 mm, 5 µm).

Se ensayaron distintas mezclas de ácido fórmico al 0,1% (v/v) y ACN en las proporciones 10:90, 20:80 y 30:70 (v/v) operando en modo isocrático con una velocidad de flujo de 20 µL/min. Para el sistema de detección se seleccionaron las longitudes de onda que proporcionaron la máxima absortividad molar para el IFA y el EI, que fueron 380 y 250 nm, respectivamente.

Los mejores resultados en cuanto a eficiencia de separación en el menor tiempo se obtuvieron con la mezcla 20:80 ácido fórmico:ACN, que permitió la elución del IFA y el EI con tiempos de retención de 1,9 y 5,8 min, respectivamente.

II.3.2. Validación del método analítico

El método desarrollado se validó en términos de intervalo de linealidad, LD, LQ, exactitud y precisión de acuerdo con las guías internacionales (22–24). Considerando la baja probabilidad de la presencia de BaA en las muestras se seleccionó este compuesto como EI, teniendo en cuenta su comportamiento cromatográfico similar al del analito. Además, se comprobó que este compuesto no era detectado en ninguna de las muestras analizadas bajo las condiciones experimentales adoptadas. Las gráficas de calibrado se obtuvieron representando la concentración de Furvina® frente a la relación entre las áreas de pico del analito y del EI (2 µg/mL).

Con el objetivo de evaluar el posible efecto matriz en las distintas muestras se compararon las pendientes de calibración obtenidas usando las tres lacas medicinales (transparente, blanca y roja) disueltas en acetona, como previamente ha sido descrito en el apartado II.2.4. Las muestras fueron fortificadas a siete niveles de concentración, comprendidos entre 0,1 y 10 µg/mL, y cada nivel se analizó por triplicado. Todas las disoluciones se mantuvieron protegidas de la luz. Los resultados se muestran en la Tabla II.1.

Los coeficientes de regresión fueron en todos los casos superiores a 0,99 (Tabla II.1), lo que confirma que existe una alta correlación entre la concentración del analito y la relación de áreas de analito y EI.

Tabla II.1. Parámetros de calibración para las muestras.

Muestra	**Pendiente[a], mL/µg**	**Coeficiente de regresión**
Laca transparente	0,2332 ± 0,0043	0,9934
Laca blanca	0,2362 ± 0,0063	0,9975
Laca roja	0,2353 ± 0,0049	0,9937

[a] Valor medio ± desviación estándar (n=21)

Para la comparación de pendientes se utilizó una prueba estadística de tipo ANOVA de un factor, no encontrándose diferencias significativas entre las mismas (p=0,171), al 95% de nivel de confianza. Por tanto, se seleccionó el método de calibración con matriz modelo (*matrix-matched calibration)* para la cuantificación de las muestras, evitándose así el tedioso método de adiciones estándar a cada muestra.

La sensibilidad del método se evaluó calculando los correspondientes valores de LD y LQ, usando los criterios de relación señal-ruido (S/N) igual a 3 y 10, respectivamente. Los valores obtenidos para LD y LQ de Furvina® fueron 0,01 y 0,035 µg/mL, respectivamente.

La precisión se estudió mediante la desviación estándar relativa (RSD) de las relaciones de las áreas de pico del analito respecto del EI para una serie de 6 análisis consecutivos de una muestra de laca fortificada a tres niveles de concentración (0,5, 4 y 10 µg/mL). Estos estudios de repetibilidad se llevaron a cabo usando las tres lacas bajo análisis, siendo los coeficientes de variación inferiores al 5% en todos los casos (Tabla II.2). Este resultado es aceptable para ensayos físico-químicos y, por tanto, el método puede definirse como preciso en términos de repetibilidad (23).

Tabla II.2. Resultados obtenidos en los estudios de precisión para repetibilidad.

Muestra	**0,5 µg/mL**	**4 µg/mL**	**10 µg/mL**
	Repetibilidad[a] (CV, %)		
Laca transparente	2,83	1,14	0,23
Laca blanca	1,43	0,89	0,42
Laca roja	0,68	0,90	0,66

La precisión intermedia se determinó mediante análisis llevados a cabo por el mismo analista en días diferentes, usando los tres niveles de concentración anteriormente citados para la zona baja, media y alta de la curva de calibración. La Tabla II.3 muestra los resultados obtenidos para el estudio de precisión intermedia, en base a 18 determinaciones en las tres lacas medicinales.

La veracidad del método se estudió a través de estudios de recuperación, llevados a cabo mediante fortificación de las tres lacas medicinales a los niveles de concentración de 0,5, 4 y 10 µg/mL. Como muestra la Tabla II.4, los análisis de las muestras proporcionaron valores de recuperación comprendidos entre 99,5 y 101,2%.

Tabla II.3. Resultados obtenidos en los estudios de precisión para precisión intermedia.

	Precisión intermedia[b] (CV, %)		
	Laca transparente		
Concentración	**Día 1**	**Día 2**	**Día 3**
Baja	2,83	1,70	1,79
Media	1,14	1,05	0,47
Alta	0,23	1,17	1,39
	Laca roja		
Baja	0,68	1,11	1,36
Media	0,90	1,27	0,83
Alta	0,66	1,77	1,19
	Laca blanca		
Baja	1,43	1,41	1,37
Media	0,89	0,99	1,39
Alta	0,42	0,56	0,71

[b] n=18

El valor estadístico de la "t" de Student fue inferior al valor tabulado para un nivel de confianza del 95%, garantizando así la veracidad del método, al no existir diferencias significativas entre los valores experimentales y los teóricos. Estos resultados confirman que el método LCcapilar-DAD para la determinación de Furvina® en lacas medicinales de uñas es totalmente confiable.

Tabla II.4. Resultados obtenidos en los estudios de veracidad.

	Recuperación[a], %		
Muestra	0,5 µg/mL	4 µg/mL	10 µg/mL
Laca transparente	100,5	100,1	100,4
Laca blanca	100,3	99,6	100,4
Laca roja	99,5	101,0	101,2

[a] Valor medio ± desviación estándar (n=9)

II.4. CONCLUSIONES

El método analítico propuesto ha demostrado su capacidad para la determinación de Furvina® en lacas de uñas medicinales. El uso de LCcapilar permite llevar a cabo el análisis con un mínimo consumo de muestra y de disolventes orgánicos. La detección DAD se presenta como una instrumentación común en los laboratorios analíticos, habilitando la metodología analítica propuesta como de fácil acceso, permitiendo análisis rápidos y confiables. Además, el método LCcapilar-DAD desarrollado muestra unas características analíticas muy favorables en términos de intervalo de linealidad (0,1-10 µg/mL), precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia (CV menores de 5%).

Por todo ello, se puede afirmar que el método desarrollado permite obtener resultados de muy alta calidad, contribuyendo a las investigaciones sobre el tratamiento de la onicomicosis, una enfermedad que afecta a una proporción considerable de la población mundial.

II.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Rodgers P, Bassler M. Treating onychomycosis. American Family Physician. 2001;63(4):663.
2. Alley MRK, Baker SJ, Beutner KR, Plattner J. Recent progress on the topical therapy of onychomycosis. Expert Opinion on Investigational Drugs. 2007;16(2):157–67.
3. Cutrín-Gómez E, Conde-Penedo A, Anguiano-Igea S, Luis Gómez-Amoza J, Otero-Espinar FJ. Pharmaceutics optimization of drug permeation from 8% Ciclopirox cyclodextrin/poloxamer-soluble polypseudorotaxane-based nail lacquers. Pharmaceutics. 2020;12(3):231.
4. Baswan S, Kasting GB, Li SK, Wickett R, Adams B, Eurich S, et al. Understanding the formidable nail barrier: A review of the nail microstructure, composition and diseases. Mycoses. 2017;60(5):284–95.
5. Queller JN, Bhatia N. The dermatologist's approach to onychomycosis. Journal of Fungi. 2015;1(2):173-84.
6. Aizenberg DJ. Common complaints of the hands and feet. Medical Clinics of North America. 2021;105(1):187—97.
7. Welsh O, Vera-Cabrera L, Welsh E. Onychomycosis. 2010;28:151–9.
8. Elewski B, Tavakkol A. Safety and tolerability of oral antifungal agents in the treatment of fungal nail disease: a proven reality. Therapy and Clinical Risk Management. 2005;1(4):299–306
9. Lesher Jr JL. Recent developments in antifungal therapy. Dermatologic Clinics. 1996;14(1):163–9.
10. Aggarwal R, Targhotra M, Kumar B, Sahoo PK, Chauhan MK. Treatment and management strategies of onychomycosis. Journal of Mycologie Medicale. 2020;30(2):100949.
11. Ciclopirox (Penlac) nail lacquer for onychomycosis. The Medical Letter on Drugs and Therapeutics. 2000 Jun;42(1080):51–2.
12. Furvina. PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=Furvina. Último acceso: abril 2020.

13. Fabbretti A, Brandi L, Petrelli D. The antibiotic Furvina® targets the P-site of 30S ribosomal subunits and inhibits translation initiation displaying start codon bias. Nucleic Acids Research. 2012;40(20):10366–74.
14. Quiñones-García YA, Calvo-Alonso AM, Caraballoso-Noa IM, Alonso-Rodríguez HL. Validación de un método analítico para la determinación del contenido de monobromado en el Dermofural por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), fase inversa. Revista Cubana de Química. 2015;27(2):163–81.
15. Urquijo García A. Dermofural ointment (0.15 %) as an antibacterial of local use in a burned patient. Medicentro Electrónica. 2017;21(3):253–6.
16. Dermofural. https://www.ecured.cu/Dermofural. Último acceso: mayo 2020.
17. Calvo Barbado DM, Delgado Martinez I. Dermofural. Formulario Nacional de Medicamentos. Ministerio de Salud Pública, Cuba. Editorial ECIMED, 2014;431–432.
18. Autorización del Inicio del Ensayo Clínico del Dermofural. CECMED 2005.
19. González Ferrer LS, Samé Pérez AM. Diseño y validación de un método espectrofotométrico para el control de la calidad del furvinol. Revista Cubana de Farmacia. 2013;47(4):446–54.
20. Furvinol. Available from: https://www.ecured.cu/Furvinol. Último acceso: mayo 2020.
21. Medina Marrero R. Actividad antimicrobiana in vitro e in vivo del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano frente a bacterias y hongos. Tesis Doctoral. Universidad Central ¨Marta Abreu¨ de Las Villas (Santa Clara) e Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana; 2007.
22. Gad SC, Taverniers I, Van Bockstaele E, De Loose M. Analytical method validation and quality assurance. In: Pharmaceutical sciences encyclopedia. John Wiley & Sons, Inc.; 2010.
23. Cox Gad S. Pharmaceutical manufacturing handbook. Regulations and Quality. Wiley-Interscience; 2008.
24. Commission Decision of 12 August 2002 (2002/657/EC) implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities 2002; L221:8–36.

CAPÍTULO III

MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE FURVINA® EN ORINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN POR DIODOS

III.1. INTRODUCCIÓN

La monitorización de fármacos constituye uno de los objetivos más importantes de los estudios bioanalíticos, junto con la determinación de metabolitos, toxinas y biomarcadores. Puede definirse bioanálisis como una subdisciplina de la química analítica centrada en la identificación y cuantificación de diferentes sustancias en sistemas biológicos, con el objetivo de obtener información sobre el estado de salud de un individuo, detección y control de enfermedades y sus tratamientos, así como evaluar los efectos de los fármacos sobre los organismos. Esta disciplina resulta de gran interés en diferentes áreas de investigación, tales como el desarrollo de nuevos medicamentos, identificación de biomarcadores para diagnóstico de enfermedades, control de dopaje y análisis forense (1).

El desarrollo de productos farmacéuticos supuso un incremento de la esperanza y calidad de vida del hombre. La información farmacológica de los IFAs es esencial para un buen uso de estos, por lo que su determinación y la de sus metabolitos en los fluidos biológicos resultan de gran interés. La farmacología estudia el destino de los fármacos en el organismo, pudiendo abordarse desde el punto de vista farmacodinámico o desde el farmacocinético. Mientras que el primer enfoque estudia la forma en la que el compuesto afecta al organismo con el tiempo, el segundo se centra en la ruta y la velocidad de transformación del fármaco una vez suministrado (2).

La compleja matriz de las muestras biológicas, conteniendo proteínas, carbohidratos, lípidos, un amplio rango de iones, etc., dificulta los análisis ya que no pueden ser inyectadas directamente en los sistemas instrumentales de medida. Además, los altos contenidos de sustancias interferentes dificultan enormemente la identificación y cuantificación de los compuestos de interés que generalmente se hallan a muy bajas concentraciones. Por todo ello, un protocolo de análisis de muestras biológicas implica considerar su composición para seleccionar tanto el tratamiento de la muestra como las condiciones para la medida instrumental (3).

Las matrices biológicas más ampliamente estudiadas son orina y sangre, ya que la toma de muestra puede ser no invasiva, en el caso de la orina, o mínimamente invasiva, para sangre, a diferencia de otras muestras como tejido o fluido cerebroespinal. La orina es una muestra de fácil recogida, no requiere personal especializado, y de fácil acceso, en términos de cantidad. Además, se considera un biofluido integrador, al igual que la

sangre, pues las funciones y fenotipos de diferentes partes del cuerpo se hallan integradas en una sola muestra (3). Veamos algunos aspectos más de la orina, considerando que será objeto de análisis en este Capítulo de la Tesis. La orina contiene un 95% de agua y solutos de diversa naturaleza que incluyen sales (conteniendo iones sodio, amonio, sulfato, fosfato), moléculas de pequeña masa molecular (creatinina, urea), proteínas insolubles y solubles, ácidos nucleicos, vesículas extracelulares, células y residuos celulares. En torno a la mitad de las proteínas en la orina se hallan solubilizadas (con tamaños moleculares típicamente inferiores a 40 kDa), las proteínas de células epiteliales desprendidas del sistema urogenital o renal constituyen la mayor parte de la otra mitad y, finalmente, la fracción exosomal contabiliza un porcentaje mucho más bajo (4).

En personas sanas la orina de la mañana es levemente ácida (pH=6,5-7,0), alcalinizándose ligeramente (pH=7,5-8,0) en la noche debido al ayuno. Para su análisis, este fluido presenta ventajas propias respecto de la sangre, no solo por su disponibilidad en mayor cantidad a través de métodos no invasivos, sino porque puede repetirse el muestreo sin problema y su preparación previa al análisis es más sencilla por su menor contenido en proteínas (de 0,5 a 1 g/L frente a 60-80 g/L en sangre), lípidos y otras sustancias de alto peso molecular (5).

El muestreo de orina puede llevarse a cabo de modo aleatorio, planificado o generando una composición suma de muestras durante un ciclo de 24 h. El muestreo aleatorio se lleva a cabo en cualquier momento del día, mientras que se toma de forma cronometrada para el estudio de tendencias relacionadas con el tiempo y monitorización de biomarcadores o metabolitos. Para evitar la gran variabilidad en los perfiles de metabolitos obtenidos en periodos de tiempo muy cortos, se recoge la muestra de orina de 24 h. Cuando los análisis se plantean con objetivos clínicos, generalmente se recoge la orina limpia de la primera hora del día (5). Las muestras de orina se suelen recoger en recipientes estériles de polipropileno. Algunos procedimientos recomiendan la adición de surfactantes para minimizar la adsorción de los analitos sobre las paredes internas del recipiente. El uso de estos agentes químicos no está recomendado cuando los análisis se llevan a cabo mediante MS, pues pueden provocar inhibición de la ionización.

La adición de agentes conservantes es una práctica habitual para impedir contaminación bacteriana o cambios metabólicos. Sin embargo, algunos modifican ciertas propiedades químicas y pueden provocar la aparición de materia sólida en suspensión. Así, el ácido bórico se emplea para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas*

spp. Entre otros preservantes usados en muestras biológicas cabe destacar formaldehído, clorhexidina y sales de mercurio (5).

Con objeto de garantizar una buena conservación de la orina desde su muestreo hasta el análisis se recomienda su conservación a baja temperatura. Así, si el análisis se va a realizar durante las 48 h tras la recolección, es suficiente con mantener la orina en el frigorífico a 4 ºC; se recomienda mantenerla a -20 ºC para tiempos largos de almacenamiento (de hasta 6 meses) y nunca superar los nueve ciclos de congelación-descongelación. De hecho, es preferible evitar dichos ciclos. Sin embargo, no existen protocolos establecidos para la conservación de muestras de orina que sean válidos para la determinación de todos los componentes de esta matriz biológica, por lo que, en cada caso concreto, se requiere aplicar condiciones específicas.

La Furvina®, también conocida como G-1, es un IFA, sintetizado en el CBQ en Cuba, prometedor para el tratamiento de la onicomicosis debido a su actividad frente a *Candida albicans* y otros microorganismos causantes de esta enfermedad. A partir de este producto se han desarrollado diferentes formulaciones bajo distintos formatos y contenidos del IFA. Para un control de su absorción por parte del organismo, el desarrollo de metodología analítica para su monitorización a bajos niveles de concentración en fluidos biológicos resulta de gran interés.

La bibliografía muestra la aplicación de diferentes métodos analíticos para la determinación de Furvina®. Así, considerando la presencia de grupos cromóforos en la molécula de Furvina® se ha empleado espectrofotometría de absorción molecular UV/VIS para su cuantificación en diferentes fármacos, como un ungüento oftálmico de uso veterinario comercializado como Furvinol® (6), una laca de uñas medicinal (7) y una tintura medicinal de uñas (8), así como para estimar su estabilidad térmica (9).

La técnica de separación GC también ha sido empleada para la cuantificación de Furvina® en concentrados emulsionables para el tratamiento de afecciones de la piel usando detección FID (10). Además, para estimar la pureza de este IFA en distintos lotes también se ha empleado GC-FID usando columnas de relleno y una volumetría de precipitación con detección potenciométrica del punto final. En este último caso se valora el bromo liberado de la molécula de Furvina® en forma de bromuro inorgánico y se emplea nitrato de plata como reactivo valorante, haciendo uso de electrodos de plata y calomelanos para la detección mediante potenciometría. La comparativa entre ambas técnicas ensalzó la mayor selectividad de GC-FID (11). La separación mediante TLC también ha sido aplicada para control de calidad de diferentes lotes de Furvina®,

concretamente para la estimación del contenido de la impureza sintética MBr (2-bromo-5-(2-nitrovinil) furano). Los resultados obtenidos mediante esta técnica semicuantitativa se compararon con los proporcionados por la técnica GC-FID, mostrándose la validez de los mismos y destacando la simplicidad del instrumental requerido para TLC que permite hacer los análisis más baratos y rápidos (12). La combinación GC con columna capilar acoplada a ECD también ha resultado muy exitosa para el control de la pureza de Furvina® en distintos lotes del IFA, así como de la presencia del MBr (13). La determinación de dicha impureza en el ungüento tópico Dermofural también ha sido llevada a cabo mediante cromatografía líquida con detección ultravioleta-visible (14).

La determinación de Furvina® en otras matrices diferentes del propio principio activo y de medicamentos solo se ha abordado en plasma humano mediante GC-ECD (15) y en orina y suero humano, en este último caso mediante GC con columnas de relleno y detector selectivo de nitrógeno (16). El presente Capítulo de la Tesis se centra en el desarrollo de una metodología de análisis para la determinación de Furvina® en orina humana mediante LCcapilar-DAD. La complejidad de las muestras biológicas obliga a incluir varias etapas en el tratamiento de las muestras para obtener extractos limpios y enriquecidos con los analitos. En este contexto, las técnicas convencionales tales como LLE (17) y extracción en fase sólida (SPE) (18) se han aplicado para la determinación de distintos fármacos en muestras biológicas. Es de destacar el tratamiento de la muestra propuesto por Calvo et al. (15) para la determinación de Furvina® en plasma basado en dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) donde la mezcla de la muestra con 1 g de C18 se pasa a un cartucho conteniendo 1 g de gel de sílice para la retención de albúmina y proteínas de la muestra, procediendo a la elución con hexano del compuesto de interés. Para el análisis de orina y suero, Gil del Valle et al. (16) aplican LLE en metil isobutil cetona (MIBK). Aunque los procedimientos de extracción SPE y LLE se han enfocado en los últimos años hacia la minimización del consumo de muestra y de disolventes orgánicos, en este último caso, los gastos no pueden compararse con los volúmenes habitualmente implicados en las técnicas de microextracción. Las técnicas miniaturizadas de extracción hacia fases sólidas y líquidas han proporcionado excelentes resultados para la determinación de distintos IFAs en orina, destacando la modalidad DLLME (19–23), cuyo fundamento ha sido expuesto en la Introducción de esta Tesis Doctoral. Habida cuenta de las reconocidas ventajas de la técnica DLLME, se propone aquí el desarrollo y validación de un procedimiento analítico para la determinación de Furvina® en orina humana empleando DLLME combinada con LCcapilar-DAD.

III.2. PARTE EXPERIMENTAL

III.2.1. Reactivos

Se emplearon los disolventes orgánicos acetona, ACN, etanol, metanol, 1-octanol, 1-undecanol, cloroformo, diclorometano y MIBK de grado HPLC obtenidos de Chem-Lab (Zedelgem, Bélgica), así como ácido fórmico de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Otros reactivos utilizados fueron cloruro de sodio, hidróxido de sodio y ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemania). El agua utilizada fue previamente purificada en un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).

Los estándares de Furvina® (99,73% de pureza) y 2-bromo-5-[(E)-2-nitrovinil]-furano (99,64% de pureza), fueron suministrados por el Centro de Bioactivos Químicos (Santa Clara, Cuba). Se prepararon disoluciones de dichos estándares en acetona al nivel de concentración de 250 µg/mL, que fueron protegidas de la luz. Las disoluciones estándar de trabajo para Furvina® se prepararon diariamente en ACN. Se utilizó el BaA como estándar interno (EI) y se preparó semanalmente al nivel de concentración de 200 µg/mL el cual fue almacenado en el frigorífico a 4 ºC.

III.2.2. Instrumentación

Para la separación cromatográfica se empleó un sistema LC capilar Serie 1200 Infinity de Agilent Technologies (Agilent, Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba capilar 1260 (G1376A) y un módulo de vacío 1260 (G4225A) para la desgasificación en línea de los disolventes mediante membranas. El detector DAD (Agilent, G1321A), provisto de una celda de flujo de 0,5 µL, operó a una longitud de onda de 380 nm para la detección del analito y a 250 nm para la del EI. La separación cromatográfica se llevó a cabo en modo de fase reversa utilizando una columna capilar Zorbax C18 (5 µm, 0,5 mm × 150 mm, Agilent). La fase móvil consistió en una mezcla de una disolución acuosa de ácido fórmico al 0,1% (v/v) y ACN en la proporción 20:80, trabajando en condiciones isocráticas con un caudal constante de 20 µL/min. Bajo estas condiciones el analito eluyó con un tiempo de retención de 2,9 min y el EI a 5,8 min. Se inyectaron alícuotas de 20 µL de muestra utilizando una válvula de inyección Rheodyne modelo 7125-075 (Rheodyne, Berkeley, CA, EE. UU.). Las disoluciones se guardaban en viales de vidrio ámbar de 2 mL de capacidad provistos de insertos de vidrio (250 µL) con pie polimérico.

Para la preparación de la muestra se utilizó un agitador vórtex LLG- uniTEXER (LLG-Labware, Constantí, Tarragona) y una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany).

III.2.3. Muestras y procedimiento analítico

Se obtuvieron muestras de orina de diez individuos sanos de edades comprendidas entre 24 y 65 años. Cada voluntario recogió un volumen de muestra de alrededor de 100 mL en recipientes de plástico estériles, siendo congeladas a -20 ºC hasta el momento de su análisis, que generalmente se llevó a cabo dentro de las 48 h siguientes a su recogida. Para el análisis, se descongeló cada muestra de orina y se centrifugó durante 4 min a 3000 rpm y el sobrenadante se filtró usando filtros de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 µm de tamaño de poro.

Para el análisis de las muestras, se colocaron volúmenes de 5 mL de orina filtrada en tubos de vidrio de centrífuga con fondo cónico de 15 mL de capacidad y se diluyeron en proporción 1:1 con agua, añadiéndose seguidamente 50 µL del EI (200 µg/mL) para obtener una concentración final de 1 µg/mL. A continuación, con ayuda de una microjeringa, se inyectó de forma rápida una mezcla formada por 1,5 mL de ACN (disolvente dispersante) y 400 µL de $CHCl_3$ (disolvente extractante), formándose la turbidez resultante de la dispersión de las finas gotas de $CHCl_3$ en la disolución acuosa. Se agitó manualmente la mezcla durante unos segundos y seguidamente se centrifugó durante 3 min a 3000 rpm, sedimentando la fase enriquecida en el fondo del tubo cónico. Finalmente, la fase depositada se recogió utilizando una microjeringa y se evaporó hasta sequedad usando un flujo suave de nitrógeno, siendo reconstituido el residuo seco por adición de 50 µL de ACN. Se inyectó una alícuota de 20 µL en el sistema LCcapilar-DAD.

Para la optimización del método, se mezclaron varias muestras, con objeto de disponer de una matriz única para el estudio de los distintos parámetros, y la mezcla se fortificó hasta un nivel de concentración 2 µg/mL con una disolución de Furvina® preparada en ACN. Las disoluciones se mantuvieron protegidas de la luz hasta su análisis, que se llevó a cabo bajo las condiciones anteriormente descritas.

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.1. Selección de las condiciones cromatográficas y de detección

Para la selección de las condiciones óptimas de la separación cromatográfica se empleó una disolución estándar de Furvina® (1 µg/mL) utilizando el BaA como EI en ACN, inyectándose alícuotas de 2 µL en el sistema LCcapilar-DAD y fijando una velocidad de flujo de la fase móvil de 20 µL/min. La optimización de la composición de la fase móvil se llevó a cabo utilizando mezclas de ACN, como fase orgánica, y agua o ácido fórmico 0,1% (v/v) como fase acuosa. La resolución más elevada se consiguió para la Furvina® utilizando la mezcla ácido fórmico:ACN en la proporción 20:80 trabajando en condiciones isocráticas. El analito eluyó con un tiempo de retención de 2,9 min y el EI a los 5,8 min. Las longitudes de onda para la detección DAD de Furvina® fueron a 380 nm, para el MBr a 355 nm y del EI a 250 nm.

III.3.2. Optimización de las condiciones DLLME

Para optimizar el procedimiento de preconcentración DLLME se fijó el volumen de disolución de muestra en 10 mL (orina: H_2O, 1:1) a un nivel de fortificación tanto para la Furvina® como para el EI de 1 µg/mL. Para la selección de la naturaleza de los disolventes extractante y dispersante se fijaron sus volúmenes en 500 µL y 1,5 mL, respectivamente. Así, se estudió la capacidad extractante de disolventes de mayor (cloroformo y diclorometano) y menor (1-octanol, 1-undecanol y MIBK) densidad que el agua. Como fases dispersantes se estudiaron ACN, metanol y etanol.

La Tabla III.1 muestra los resultados obtenidos para la preconcentración DLLME de Furvina® con distintas combinaciones de disolventes extractante y dispersante. Puede apreciarse que las recuperaciones más altas se obtuvieron con $CHCl_3$ como disolvente extractante y ACN como disolvente dispersante, por lo que fueron seleccionados. Además, el cloroformo como disolvente de densidad mayor que el agua, tras la etapa de centrifugación sedimenta en el fondo del tubo cónico, siendo así muy fácil de recolectar. Obsérvese también que cuando se usó 1-octanol y 1-undecanol no se obtuvo una fase orgánica enriquecida discernible tras la etapa de centrifugación de la mezcla ternaria. El extractante MIBK no preconcentró la Furvina® en combinación con ACN como dispersante, y sí lo hizo con metanol y etanol, aunque con menor eficiencia de la proporcionada por $CHCl_3$.

Tabla III.1. Áreas de pico obtenidas para Furvina® en función del tipo de disolventes extractante y dispersante.

			1,5 mL Dispersante		
			ACN	**Metanol**	**Etanol**
500 µL	Extractante	Cloroformo	5881	3976	4241
		Diclorometano	1680	2491	5077
		1-Octanol	-	-	-
		1-Undecanol	-	-	-
		MIBK	-	2423	475,9

Para evaluar la influencia del pH de la fase acuosa sobre la eficiencia de extracción se ajustó este parámetro a valores de 3 y 5, mediante adición de ácido acético 1 mol/L, pH de 6,5 que correspondía a la disolución de muestra sin ajuste y a pH 9 y 12 mediante adición de hidróxido sódico 1 mol/L. La Tabla III.2 muestra los resultados obtenidos en el estudio de pH, donde se puede observar que los mejores resultados se obtuvieron a pH 6,5 (que corresponde al pH de la muestra), mientras que la sensibilidad disminuye a valores de pH ácido y básico, no llegándose a detectar el analito a pH 12. Por consiguiente, se descartó el ajuste de pH de la fase acuosa.

Tabla III.2. Influencia del pH de la fase acuosa sobre la señal de Furvina®.

pH	3	5	6,5	9	12
Área de pico	5166	4222	10356	941	-

La optimización del resto de los factores que influyen en la eficiencia de extracción en DLLME (volumen del disolvente extractante, volumen del disolvente dispersante y concentración de NaCl en la fase acuosa) se realizó mediante un diseño de composición central (CCD) (2^3 + estrella, centrado en la cara), con tres puntos centrales espaciados, lo que incluye 17 análisis (Tabla III.3) para crear la superficie de respuesta, utilizando el área del pico como respuesta analítica. Los diferentes factores se evaluaron en los siguientes rangos: volumen del disolvente extractante (200 - 500 µL), volumen del disolvente dispersante (1 - 5 mL) y concentración de NaCl (0 - 5% m/v). En todos los casos, la mezcla ternaria fue centrifugada durante 3 min a 3000 rpm para recuperar la fase orgánica extractante.

Tabla III.3. Ensayos realizados para la optimización de los volúmenes de disolventes y concentración de sal.

Análisis	Volumen de $CHCl_3$ (µL)	Volumen de ACN (mL)	Concentración de NaCl (% m/v)
1	350	1,5	2,5
2	500	1,5	2,5
3	350	1,5	5,0
4	500	2,0	5,0
5	350	1,5	0,0
6	500	2,0	0,0
7	200	2,0	0,0
8	200	2,0	5,0
9	350	1,5	2,5
10	500	1,0	0,0
11	500	1,0	5,0
12	200	1,0	0,0
13	200	1,5	2,5
14	350	1,0	2,5
15	200	1,0	5,0
16	350	2,0	2,5
17	350	1,5	2,5

Al procesar los datos obtenidos mediante el software estadístico Statgraphics Centurión XV versión 15.1.02 se obtuvieron los valores óptimos para la etapa DLLME en relación con los tres parámetros estudiados (Tabla III.4).

Tabla III.4. Intervalo de parámetros estudiados y valores óptimos para DLLME.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Volumen cloroformo (µL)	200,0	500,0	420,7
Volumen ACN (mL)	1,0	2,0	1,83
Concentración NaCl (% m/v)	0,0	5,0	$4,5 \times 10^{-9}$

La Figura III.1 muestra asimismo la superficie de respuesta obtenida a través del diseño CCD para los intervalos de volumen de disolventes extractante y dispersante a un valor establecido de concentración de sal.

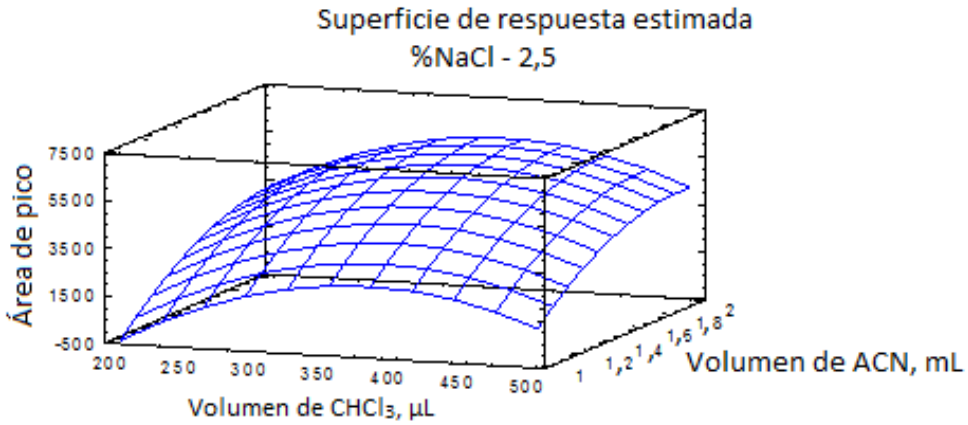


Figura III.1. Superficie de respuesta obtenida para el CCD considerando el volumen de dispersante y extractante para una concentración fija de sal.

De acuerdo con los valores aportados como óptimos por el software (Tabla III.4 y Figura III.1) se seleccionó un volumen de cloroformo de 400 µL, volumen de ACN de 1,5 mL y se descartó la adición de sal a la fase acuosa.

III.3.3. Validación del método analítico

El método se validó obteniéndose los parámetros analíticos de linealidad, LD, LQ, precisión, exactitud y selectividad de acuerdo con las guías internacionales (24).

Las pendientes de calibración obtenidas por aplicación del método aplicado a tres muestras de orina diferentes no resultaron significativamente diferentes al nivel de confianza del 95%. Como p= 0,315 se comprueba que no existen diferencias entre las pendientes de las curvas de calibración para la determinación de Furvina® en orina, para un nivel de significación de 0,05. Por consiguiente, la cuantificación de las muestras se llevó a cabo utilizando una matriz modelo, lo que evitó la aplicación del tedioso método de adiciones estándar a las muestras.

La linealidad del método se estudió mediante el método de adiciones estándar a una muestra de orina modelo, llevando a cabo las fortificaciones en el intervalo de concentraciones de 0,01 a 1 µg/mL, y sometiendo las disoluciones a la etapa de preconcentración DLLME, bajo las condiciones experimentales finalmente

seleccionadas. Las curvas de calibración para la Furvina® fueron construidas representando el cociente entre el área del analito y el área del EI frente a la concentración, a seis niveles de concentración y analizados por duplicado. Los resultados obtenidos aparecen resumidos en la Tabla III.5, junto con los valores de R^2, que demostraron buena linealidad para el intervalo estudiado de concentraciones. El intervalo de confianza de la pendiente se calculó realizando un análisis de varianza simple factorial con un 95 % de confianza mientras que el coeficiente de calidad (QC) se basa en la aceptación de una desviación estándar constante (25):

$$QC_{mean} = 100\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(\frac{y_i-\hat{y}_i}{\bar{y}}\right)^2}{n-1}}$$

donde:

n: número de puntos de la curva de calibración

y_i: señal medida para un cierto valor de x_i

$\hat{y}_i$: señal predicha por el modelo

$\bar{y}$: valor promedio de la señal medida.

Tabla III.5. Características analíticas del método DLLME con LCcapilar-DAD.

Parámetro	**Valor experimental**	**Criterio de aceptación** (26)
Intervalo de linealidad (µg/mL)	0,01 -1	-
Coeficiente de correlación (r)	0,9987	r ≥0,99
Coeficiente de determinación (R^2)	0,9973	r^2 ≥0,98
Pendiente (*b*) (mL/µg)	1187,7	-
Ordenada en el origen *(a)*	45,51	-
Intervalo de confianza de *b*	1102,3 a 1273	diferente de 0
Test F	1492,7847 > 2,6805E^{-06}	F > $F_{crítico}$
Coeficiente de calidad (%)	3,71	QC≤ 5
LD (µg/mL)	0,003	-
LQ (µg/mL)	0,01	-

Los valores de LD y LQ se determinaron por el método de extrapolación a concentración cero.

La precisión del método desarrollado se estudió mediante ensayos de repetitividad y reproducibilidad, calculando los valores de desviación estándar relativa (RSD) de una serie de seis análisis consecutivos y dieciocho análisis realizados en tres días diferentes, respectivamente. Para ello, se utilizaron muestras de orina fortificadas con el analito a una concentración de 0,120 µg/mL y el EI a 1 µg/mL.

Los resultados de los análisis llevados a cabo en un mismo día aparecen en la Tabla III.6, junto con el correspondiente valor medio de las concentraciones encontradas y su SD y RSD asociados.

Tabla III.6. Estudio de repetitividad.

Experimento	**Concentración Furvina® (µg/mL)**
1	0,1218
2	0,1215
3	0,1217
4	0,1218
5	0,1213
6	0,1217
Valor medio	**0,1217**
SD	**0,00021**
RSD (%)	**0,170**

El valor obtenido para la RSD en los ensayos realizados durante el mismo día demuestra una muy buena repetitividad del método que, además, no excede al 3%, que es el valor aceptable para ensayos físico–químicos de control de medicamentos (27).

En la Tabla III.7 se presentan los valores de concentración de Furvina® obtenidos para el estudio de precisión intermedia sobre la base de 18 determinaciones llevadas a cabo por el mismo analista, en tres diferentes días.

Tabla III.7. Estudio de reproducibilidad.

Experimento	Día 1	Día 2	Día 3
1	0,1218	0,1210	0,1211
2	0,1215	0,1218	0,1213
3	0,1217	0,1211	0,1227
4	0,1218	0,1212	0,1217
5	0,1213	0,1211	0,1222
6	0,1217	0,1217	0,1211
Valor medio	**0,1217**	**0,1213**	**0,1217**
SD	**0,00021**	**0,00036**	**0,00067**
RSD (%)	**0,17**	**0,30**	**0,55**

A partir de los datos de la Tabla III.7 se obtiene una RSD entre días menor al 1 %, demostrando a su vez una muy buena reproducibilidad para el método desarrollado.

También se determina la desviación estándar ($S_{entre/días}$) (28) y el coeficiente de variación entre los días ($CV_{entre/días}$), así como el coeficiente de variación teórico según Horwitz ($CV\%_{Horwitz}$). La desviación estándar entre los días se calcula según:

$$S_{entre/dias} = \sqrt{\left[\frac{(M * S_{entre} - M * S_{dentro})}{n}\right.}$$

donde: n = número de mediciones por día y M= media de los valores

El cálculo del coeficiente de variación entre días se realiza utilizando la expresión:

$$Cv_{entre\ días} = \frac{S_{entre\ días}}{Xm}$$

El coeficiente de variación se calcula según:

$$CV\%_{Horwitz} = 2^{(1 - 0{,}5\ \log C)}$$

donde: C = media de las concentraciones de los tres días expresada en m/m, que es calculada de acuerdo a:

Como C está expresada en (mg/L) = 1 mg/L =0,001 g/kg = 0,001 g/1000 g = $1*10^{-6}$ g/g

Se realiza un análisis de varianza (ANOVA simple factorial, α=0,05) para determinar el valor de $F_{calculado}$ con el objetivo de conocer si existen o no diferencias significativas entre los resultados.

A partir del test F, se calcula el estadígrafo de Cochran (C) para conocer la homogeneidad de varianza en cada analista por separado, para ello se divide la mayor (máxima varianza) entre la suma de todas ellas utilizando la expresión:

$$C = \left[\frac{(S_{máx})^2}{\Sigma(S_i)^2}\right]$$

Los criterios de aceptación definidos para evaluar la capacidad del método propuesto de dar resultados semejantes de concentración de Furvina®, cuando se aplica repetidamente a una muestra de tintura, a partir de los resultados obtenidos en el estudio de la precisión son:

• Criterio de aceptación para evaluar la repetibilidad del método bajo estudio: Que el coeficiente de variación de la repetibilidad no supere el valor del 3% (26).

• Criterios de aceptación para el análisis de la precisión intermedia del método propuesto: El valor de CV % $_{Entre\ días}$ < CV % $_{Horwitz}$, entonces el coeficiente de variación obtenido en la precisión intermedia es aceptable y el método es considerado preciso. Si el valor de $F_{calculado} < F_{tabulado}$, criterio que demuestra que los resultados obtenidos en los diferentes días no difieren entre sí y que el método es preciso. Por último, si el valor de $F_{calculado} > F_{tabulado}$, pero CV % $_{Entre\ días}$ < CV % $_{Horwitz}$, el método es también considerado de precisión aceptable.

• El valor $C_{calculado} < C_{tabulado}$ es un criterio a favor de la precisión del método porque no existen variaciones del método para los tres días estudiados.

A través del análisis de la precisión intermedia y por los cálculos realizados para los valores de RSD entre los diferentes días y su comparación con los valores de RSD de Horwitz, se confirma que dado el valor de $RSD\%_{(entre\ días)} = 0,02$ es inferior al obtenido mediante el criterio de Horwitz, la precisión del método es aceptable (29).

Por otro lado, se realizó un análisis de varianza (ANOVA, simple factorial, α=0,05) para determinar el valor de $F_{calculado}$ con el objetivo de conocer si existen o no diferencias significativas entre los resultados de los diferentes días. La comparación de los valores de F obtenidos evidencia que el valor de $F_{calculado}$ de 1,10 es inferior al valor tabulado, proporcionando así otro parámetro que indica la aceptable precisión del método desarrollado. A partir del test F, se calcula el estadígrafo de Cochran (C) para conocer la

homogeneidad de varianza en cada día por separado. La comparación del valor de la C de Cochram calculado, que fue de 0,0682, con el valor tabulado (0,707) muestra que $C_{calculado} < C_{tabulado}$, y por tanto se considera que la variación del método es igual para los tres días, siendo este otro criterio que avala la precisión intermedia del método.

La ausencia de picos interferentes en los cromatogramas obtenidos para todas las muestras al tiempo de retención tanto del analito como del EI demostró un alto grado de selectividad para el método de determinación de Furvina®, en parte alcanzado por la etapa DLLME, permitiendo el uso de un sistema DAD acoplado a HPLC capilar para el análisis de orina, muestra de reconocida matriz compleja.

Dado que no se disponía de materiales de referencia certificados, la exactitud del método DLLME con LCcapilar-DAD se estudió a través de estudios de recuperación. Para ello, se fortificaron las muestras a 0,12 µg/mL para Furvina® donde los niveles de recuperación variaron entre 100,82 % y 101,52 % para un nivel de 9 muestras. La Tabla III.8 muestra una comparación del método aquí propuesto para la determinación de Furvina® en orina con otros previamente propuestos para la determinación del IFA en otros fluidos biológicos (plasma y suero) por otros autores.

Tabla III.8. Comparación del método propuesto con otros previamente desarrollados para análisis de Furvina® en fluidos biológicos.

Muestra (volumen)	Tratamiento de muestra (consumo de disolventes)	Medida	Linealidad (µg/mL)	LD (µg/mL)	RSD (%)	Ref.
Orina y suero (2 mL)	LLE, 3 mL MIBK, 550 µL metanol	GC-NSD	1-50	0,5	2,9-41	(16)
Plasma (0,5 mL)	MSPD, 9 mL hexano	GC-ECD	0,5-8	0,14	<10	(15)
Orina (5 mL)	400 µL $CHCl_3$, 1,5 mL ACN	LCcapilar -DAD	0,01-1	0,03	<3	Este método

LLE, extracción líquido-líquido; MIBK, metil isobutil cetona; MSPD, dispersión en fase sólida de matriz; NSD, detector selectivo de nitrógeno

Destaca el hecho de que hasta el momento no se ha propuesto ningún método para determinación de Furvina® en fluidos biológicos implicando tratamientos de muestra basados en técnicas de microextracción. El procedimiento DLLME propuesto en este

capítulo requiere un tiempo de análisis significativamente más bajo, siguiendo además las directrices de la Química Analítica Verde. De entre las principales ventajas del método desarrollado frente a los previamente publicados destacan el menor consumo de disolventes orgánicos, así como la mayor facilidad de aplicación de la técnica de tratamiento de muestra, sobre todo al compararla con MSPD que implica la mezcla previa de la muestra con el adsorbente (gel de sílice C18) y la posterior inmovilización en un cartucho conteniendo gel de sílice para la retención de la albúmina y las proteínas de la muestra, de forma previa a la elución de la Furvina® en hexano. Es de resaltar, además, la mayor sensibilidad alcanzada por el método DLLME con LCcapilar-DAD, así como su mayor precisión.

III.3.4. Análisis de muestras reales

El método DLLME con LCcapilar-DAD desarrollado se aplicó al análisis de diez muestras de orina. Como era de esperar, dado que ninguno de los individuos había recibido tratamiento con Furvina®, los resultados mostraron la ausencia del IFA en todas las muestras, al menos a niveles de concentración superiores al correspondiente LD. La Figura III.2 muestra un cromatograma obtenido para una muestra de orina fortificada, al nivel de concentración de 0,01 µg/mL de Furvina® analizada bajo las condiciones experimentales finalmente seleccionadas para la detección del IFA. Es de destacar que no se detectó la impureza MBr a 355 nm en ninguna de las muestras analizadas.

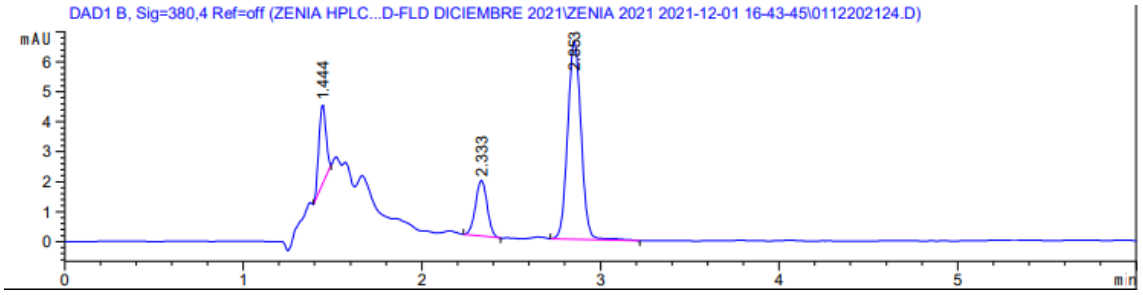


Figura III.2. Cromatograma obtenido a la longitud de onda de 380 nm para una muestra de orina fortificada y analizada mediante el método propuesto.

III.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método analítico sencillo, preciso, exacto y selectivo que permite determinar muy bajas concentraciones de Furvina® en orina humana mediante la aplicación de DLLME y la cuantificación del analito mediante LCcapilar acoplada a DAD. El procedimiento de preconcentración basado en DLLME implica el uso de cantidades muy pequeñas de disolventes orgánicos y de muestra y su aplicación requiere una mínima manipulación, así como tiempos cortos. Además, el consumo de disolventes también se ve minimizado con el uso de un sistema cromatográfico basado en LCcapilar, que además requiere de volúmenes de inyección muy pequeños, lo que es ideal para el análisis de muestras biológicas por su limitada disponibilidad. El método desarrollado ha proporcionado muy buenos valores para los diferentes parámetros analíticos, incluida la selectividad, permitiendo así, el uso de un sistema de detección fácilmente accesible para cualquier laboratorio de análisis.

III.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Moein MM, El Beqqali A, Abdel-Rehim M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. Journal of Chromatography B. 2017;1043:3–11.
2. S. Bell, Drugs, poisons and chemistry. Collection: Essentials of forensic science. First edition. Facts On File Inc. Editorial. 2008.
3. Medvedovici A, Bacalum E, David V. Sample preparation for large-scale bioanalytical studies based on liquid chromatographic techniques. Biomedical Chromatography. 2018;32(1):e4137.
4. Thomas S, Hao L, Ricke WA, Li L. Biomarker discovery in mass spectrometry-based urinary proteomics. Proteomics-Clinical Applications. 2016;10(4):358–70.
5. Niu Z, Zhang W, Yu C, Zhang J, Wen Y. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. TrAC -Trends in Analytical Chemistry. 2018;102:123–46.
6. Ferrer LSG, Perez AMS. Design and validation of a spectrophotometric method for the quality control of Furvinol. Revista Cubana de Farmacia. 2013;47(4):446–54.
7. Rodríguez ZP, Negrín ZR, Álvarez O, Marrero RM, Rodríguez-Rodríguez Y. Development of a medicated nail lacquer for onychomycosis treatment. Afinidad. 2021;78(593).
8. Perez-Rodríguez Z, Rodríguez-Rodríguez Y, Rodriguez-Negrin Z, Molina-Ruiz R, Medina-Marrero R, Ancede-Gallardo E. Development of a new formulation for onychomycosis treatment using Furvina® as an active pharmaceutical ingredient. In: Proceedings of the 2nd International Conference on BioGeoSciences: Modeling Natural Environments 2. Springer; 2019. p. 191–203.
9. Valdés-Negrin HL, Alvarez O, Perez-Rodriguez Z, Rodriguez-Negrin Z, Perez-Rodriguez M. Analyzing thermal degradation of furvina drug using a stability indicating spectrophotometric method and characterization studies. Chemistry Africa. 2022;5(2):305–12.

10. de Armas MA, Bravo Sanchez LR, Gallo Torres A. Quantitative determination of G-1 in an emulsifiable concentrate by gas chromatography capillary. Revista CENIC Ciencias Químicas. 2010;41.
11. Sanchez LRB, López EJ, Tamayo DM, Alonso AMC, Fernandez SM, Consuegra S, et al. Validación de las técnicas para la determinación de la pureza del bioactivo 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno. Afinidad: Revista de Química Teórica y Aplicada. 1999;56(479):29–33.
12. Fernandez SM, Tamayo DM, Sanchez LRB. Determinación del 1-(5-bromofur-2-il)-2-nitroeteno, principal impureza sintética del principio activo 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-1-nitroeteno, a través de la cromatografía en capa fina. Afinidad: Revista de Química Teórica y Aplicada. 1998;55(477):377–80.
13. Perez-Rodriguez Z, Álvarez O, Rodriguez-Negrin Z, Calvo AM, Valdés-Negrin HL, Perez-Rodriguez M. Comprehensive certification of the Furvina production by modeling quality control parameters. Journal of Pharmaceutical Innovations. 2021;1–7.
14. Quiñones-García YA, Calvo-Alonso AM, Caraballoso-Noa IM, Alonso-Rodriguez HL. Validación de un método analítico para la determinación del contenido de monobromado en el Dermofural por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), fase inversa. Revista Cubana de Química. 2015;27(2):163–81.
15. Calvo AM, Nieto L, Quintana A, Morales S. Determination of furvina in human plasma by matrix solid-phase dispersion (MSPD) and gas chromatography. Afinidad. 2012;69(560):278–82.
16. Gil del Valle L, Gebru D, Rodríguez AM, Peraza RT, Ramos F, Avila JP. Contribution to the determination of the chemotherapeutic drug G1 in biological fluids. Journal of Chromatography B. 1997;698(1–2):312–6.
17. Carson M, Kerrigan S. Quantification of suvorexant in urine using gas chromatography/mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 2017;1040:289–94.
18. Salem AA, Wasfi I, Al-Nassib SS, Allawy Mohsin M, Al-Katheeri N. Determination of some β-blockers and β2-sgonists in plasma and urine using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and solid phase extraction. Journal of Chromatographic Science. 2017;55(8):846–56.

19. Mansour FR, Khairy MA. Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid–liquid microextraction. Journal of Chromatography B. 2017;1061:382–91.
20. Tay KSJ, See HH. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for pharmaceutical analysis. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 2023;1–22.
21. Campillo N, Marín J, Fenoll J, Garrido I, López-García I, Hernández-Córdoba M, et al. Determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors by LC-MS2 in waters and human urine submitted to dispersive liquid-liquid microextraction. Talanta. 2017;174:638–44.
22. Pastor-Belda M, Campillo N, Arroyo-Manzanares N, Hernández-Córdoba M, Viñas P. Determination of amphenicol antibiotics and their glucuronide metabolites in urine samples using liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 2020;1146:122122.
23. Rodríguez-Palazón MC, Arroyo-Manzanares N, Vinas P, Campillo N. Metabolomic study of capsaicinoid compounds in urine samples by dispersive liquid–liquid microextraction and ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Microchemical Journal. 2022;178:107373.
24. Commission Decision of 12 August 2002 (2002/657/EC) implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities 2002; L221:8–36
25. de Beer JO, Naert C, Deconinck E. The quality coefficient as performance assessment parameter of straight line calibration curves in relationship with the number of calibration points. Accreditation and Quality Assurance. 2012;17(3):265–74.
26. CECMED. Regulación Nº 41-2007: Validación de métodos analíticos. Ámbito Regulador. La Habana, Cuba. 2007.
27. CECMED. Regulación Nº 37. Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Medicamentos. Anexo1. La Habana, Cuba. 2012.
28. Rodríguez Rodríguez Y. Determinación de oro en muestras geológicas. Tesis. Departamento de Química. Tesis de Maestría. Universidad Central Marta Abreu de las Villas. 2011.

29. Horwitz W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. Analytical Chemistry. 1982;54(1):67A-76A.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN DE LAS LACAS DE UÑAS MEDIANTE DIFERENTES METODOLOGÍAS ANALÍTICAS. EVALUACIÓN DE LA PENETRABILIDAD

IV.1. INTRODUCCIÓN

IV.1.1. Técnicas analíticas utilizadas para la evaluación de las lacas de uñas

En este capítulo fueron utilizadas para la caracterización de las lacas de uñas las técnicas de difracción de rayos X (XRD) (1,2), microscopía electrónica de barrido (SEM) (3,4), la espectroscopía infrarroja (IR) (5,6) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC) (7,8), cuyos fundamentos han sido detallados en la Introducción general de esta Tesis.

IV.1.1.1. Estudios de penetrabilidad de las lacas

Los estudios *in vitro* cada vez se utilizan más, a pesar de que la interpretación de los resultados debe hacerse con cautela, puesto que pueden implicar el uso de membranas de distinta procedencia y esto alterar los resultados obtenidos.

En la realización de los ensayos de difusión transdérmica *in vitro* resulta de gran importancia trabajar en condiciones estandarizadas y controlar los factores que pueden afectar a la absorción transdérmica, de modo que los resultados obtenidos sean reproducibles y permitan alcanzar los objetivos planteados. Así pues, resulta relevante la selección de las celdas de difusión y las características de la membrana a emplear, la composición del líquido empleado en el compartimento receptor y la temperatura de realización del ensayo (9). A continuación, se mencionan los aspectos y las directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) para la realización de estudios de absorción transdérmica.

Celdas de difusión

La mayor parte de los sistemas empleados en los estudios de permeabilidad se basan en la utilización de celdas de difusión formadas por dos compartimentos, uno dador, con la disolución conteniendo el agente penetrante o la formulación a ensayar, y otro compartimento receptor, que contiene la disolución receptora. El material empleado en la fabricación de la celda puede variar, si bien suele emplearse vidrio neutro u otros materiales inertes. Entre los compartimentos dador y receptor se dispone la membrana, que puede ser de distinta naturaleza según la finalidad del ensayo planteado. La superficie de la membrana que queda expuesta entre los dos compartimentos generalmente es la misma y puede variar. Suelen emplearse membranas de entre 0,3 y 5

cm^2. La Figura IV.1 muestra un esquema de funcionamiento de los dos tipos de celdas de difusión de flujo vertical y de flujo horizontal con su barra de agitación.

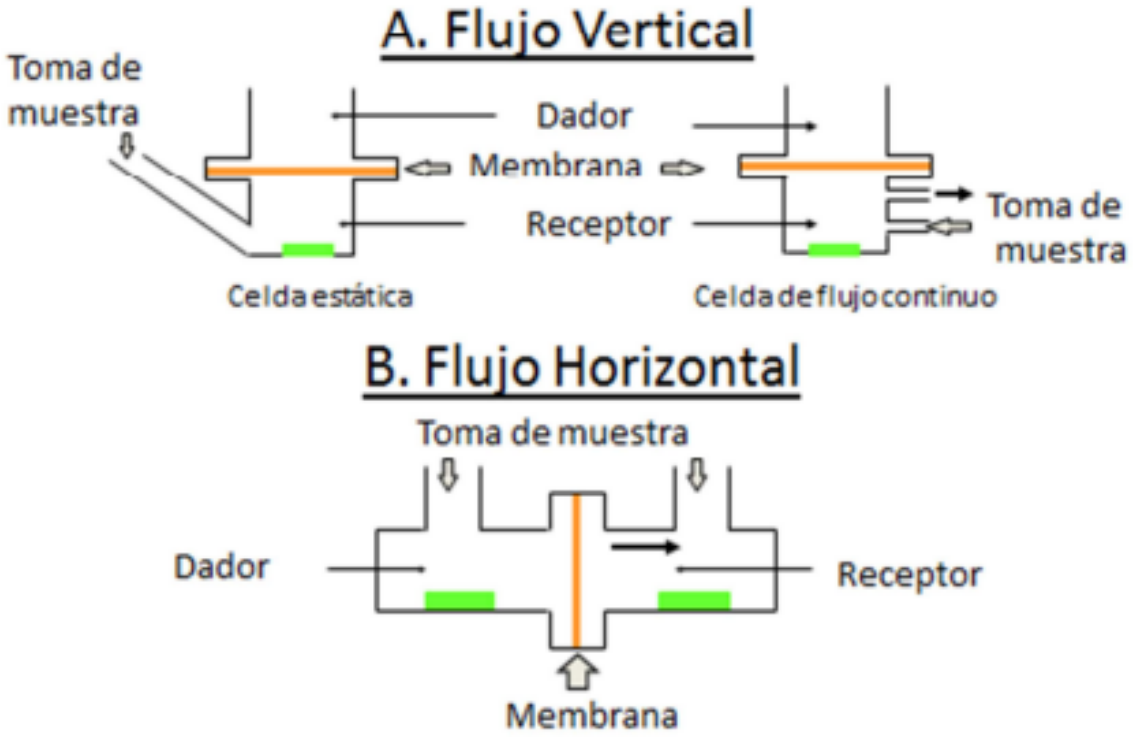


Figura IV.1. Esquema de las celdas de difusión de flujo (A) vertical y (B) horizontal, empleadas en los estudios *in vitro* de absorción transdérmica (9).

Celdas de flujo vertical

Las celdas de difusión estáticas fueron inicialmente propuestas por Coldman y posteriormente modificadas por Franz y comprenden las llamadas estáticas y las de flujo continuo. En ambos casos, el compartimento dador se sitúa sobre el receptor y, entre ellos, se dispone la membrana en posición horizontal. El compartimento receptor tiene una tubuladura lateral que permite la toma de muestras de este compartimento. En las celdas de flujo continuo, el contenido del compartimento receptor está en continua renovación, tratando de simular el drenaje vascular, lo que resulta muy útil tanto en el caso de sustancias penetrantes poco solubles en el fluido receptor, como en el de sustancias que alcancen elevadas concentraciones en el mismo, ya que en ambos casos la velocidad de difusión puede estar limitada por la pérdida de las condiciones de sumidero.

Normalmente, el vehículo donador no se agita durante el ensayo, con el fin de reproducir las condiciones atmosféricas en las que el medicamento se aplica sobre la piel,

donde se dan situaciones de evaporación, difusión o depleción. Las celdas diseñadas para este tipo de ensayos pueden utilizarse con cualquier clase de vehículos (componentes líquidos que transportan los demás elementos de una fórmula farmacéutica y facilita su administración), y hacen posible controlar, en el compartimento dador, variables como la humedad, temperatura, u otros factores ambientales. De este modo, mediante ensayos comparativos, se pueden determinar los efectos de las técnicas oclusivas, por ejemplo. Además, la membrana puede tratarse, previamente o durante el ensayo, con promotores, disolventes u otras sustancias para determinar su efecto sobre la permeabilidad.

Celdas de flujo horizontal

En este tipo de celdas, la membrana se dispone verticalmente, entre los compartimentos dador y receptor. Estas celdas tienen un uso minoritario. Están diseñadas para trabajar con formulaciones líquidas o con disoluciones o suspensiones de fármaco preparadas en distintas condiciones. En este caso ambos compartimentos se hallan sometidos a agitación.

Líquido receptor

Generalmente el volumen del compartimento receptor oscila entre 2 y 20 mL. Por lo que respecta al fluido empleado para rellenarlo, se suele emplear una disolución salina tamponada a pH fisiológico (11,12). Excepcionalmente, en celdas de difusión estáticas, si se trata de analizar compuestos muy poco solubles, se puede variar la composición de dicho fluido, empleando líquidos en los que la solubilidad sea lo suficientemente elevada como para garantizar que el proceso de difusión no está limitado por la solubilidad. En estas situaciones pueden emplearse mezclas etanol:agua (1:1) o bien agua conteniendo muy bajas concentraciones de tensoactivo. Este fluido debe estar en contacto directo con la membrana y debe mantenerse bajo agitación, para evitar la formación de capas acuosas estáticas que limiten la difusión. Igualmente, este líquido se mantiene a temperatura constante, con objeto de que la temperatura en la superficie de la membrana sea de 32 ºC. Ambas precauciones permiten simular mejor las condiciones fisiológicas.

Membranas

Para estudios de penetrabilidad de lacas de uñas, las membranas más empleadas son las de pezuñas bovinas. La pezuña bovina y las uñas humanas poseen propiedades análogas con respecto al contenido de queratina. Las queratinas de la pezuña bovina poseen una conformación α igual que las que forman parte de la epidermis, el pelo o las

uñas humanas (10). Sin embargo, estudios de difusión de fármacos realizados a través de estas membranas deben considerarse con cierta cautela, ya que las pezuñas son más permeables que las uñas (11) debido posiblemente a que sus queratinas presentan menor número de enlaces disulfuro, dando lugar de este modo a una estructura más sensible a la hidratación (12).

A pesar de ello, la pezuña bovina puede proporcionar información útil sobre la difusión de fármacos a través de estas estructuras queratinizadas. Así, Mertin y Lippold (11) indicaron que el coeficiente de permeabilidad a través de la lámina ungueal humana se puede estimar conociendo el coeficiente de permeabilidad de la membrana de la pezuña bovina, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\log P_N = 3{,}7323 + 1{,}751 \log P_H$$

donde P_N es el coeficiente de permeabilidad a través de la lámina ungueal y P_H el coeficiente de permeabilidad a través de la membrana de pezuña bovina.

En este Capítulo, los estudios de permeabilidad de laca de uñas conteniendo Furvina® en células de Franz se realizarán empleando como sustrato la pezuña bovina, ya que es una aproximación comúnmente empleada en los estudios de difusión de medicamentos por vía ungueal.

IV.2. PARTE EXPERIMENTAL

IV.2.1. Difracción de rayos X

IV.2.1.1. Elemento de prueba

Las muestras tienen una apariencia homogénea y microcristalina etiquetadas como “G1Patrón”, “MBr” y “LotG1” (lote de Furvina®), todas proporcionadas por el CBQ. Los tres formulados de uñas se presentaron en forma de láminas de aspecto plástico y homogéneo (lámina de lacas de uñas secas).

Las láminas de plástico se cortaron en pequeñas fibras para depositarlas planas sobre la superficie del soporte, para preservar la geometría de Bragg-Brentano. Todas las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente y en viales hasta el momento de su análisis, protegidos de la luz.

IV.2.1.2 Metodología e instrumentación

Los datos de difracción de rayos X de polvo cristalino (XRPD) se recolectaron en geometría Bragg-Brentano usando un difractómetro de rayos X tipo "Bruker D8 Advance" (40 kV, 40 mA, theta/theta) equipado con un tubo de rayos X de Cu sellado (CuKα1 (λ = 1.5406 Å)) y un detector tipo LYNXEYE XE-T (Karlsruhe, Alemania).

Los difractogramas se obtuvieron en el rango angular 3-45º con un paso de 0,02º y un tiempo por paso de 2 s. Las muestras se rotaron durante la medición para obtener los perfiles de pico óptimos para el análisis, así como para minimizar el efecto de la orientación preferencial. Se depositaron sobre una base de cristal orientado (grasa de silicona SI-511) para evitar el ruido de fondo (dispersión) provocado por un soporte tipo vidrio.

Para realizar el análisis matemático de los difractogramas obtenidos se utilizó el software "HighScore Plus, Versión 3.0d".

IV.2.2. Microscopia electrónica de barrido

IV.2.2.1. Equipos

Microscopio para análisis mediante microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) marca TESCAN modelo MIRA3 (Brno, Chequia) y recubridor por pulverización de escritorio DSR1 (Markham, Canadá)

IV.2.2.2. Materiales, reactivos y muestras

Se utilizó un portador de muestras con cinta de carbono para análisis SEM de las muestras y nanopartículas de oro. Además, fueron utilizados la Furvina®, laca transparente, roja y blanca, así como los formulados transparente, rojo y blanco al 0,25%.

IV.2.2.3. Metodología

Para la caracterización estructural del IFA Furvina® por SEM se depositaron unos 20 mg tanto de Furvina® como de películas secas de los tres formulados y de las tres lacas de uñas en el portador de muestras con cinta de carbono y se colocaron en una desecadora durante 20 min. Todas las muestras se recubrieron con nanopartículas de oro cuyo espesor fue de 20 nm haciendo uso del recubridor por pulverización DSR1. Se registraron las imágenes captadas por el detector de electrones secundarios (SE) a diferentes escalas (1, 2, 20, 100 y 200 μm).

IV.2.3. Espectroscopía infrarroja

IV.2.3.1. Equipos

Espectrómetro IR Spectrum Two™ (Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.).

IV.2.3.2. Muestras

Furvina®, lacas transparente, roja y blanca, así como los formulados transparente, rojo y blanco al 0,25%.

IV.2.3.3. Metodología

Cada espectro IR fue registrado en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1}.

IV.2.4. Calorimetría diferencial de barrido

IV.2.4.1. Equipos

Calorímetro diferencial de barrido DSC-Q1000 V9.9 Build 303 (TA Instruments, New Castle, EE.UU.) y Recubridor por pulverización de escritorio DSR1 (Markham, Canadá).

IV.2.4.2. Materiales y muestras

Cápsula de aluminio para análisis de muestras por DSC, Furvina®, lacas transparente, roja y blanca, así como los formulados transparente, rojo y blanco al 0,25%.

IV.2.4.3. Metodología

Para la caracterización estructural del IFA Furvina® y las lacas de uñas por DSC y para conocer el intervalo de fusión del principio activo y las lacas se procede a efectuar la calibración del calorímetro con estándares proporcionados por el fabricante cuyos valores de entalpía son conocidos con exactitud. Una vez calibrado el equipo, se pesaron unos 12 mg de Furvina® y de los formulados en una cápsula de aluminio para su análisis y se colocó en el calorímetro. Se dejó estabilizar en presencia de una corriente de nitrógeno durante 15 minutos a temperatura y presión estándar ambiente. Como referencia se utilizó una cápsula de aluminio vacía. Ambas cápsulas fueron sometidas a un programa controlado de temperaturas comprendidas entre 0 y 300 ºC.

IV.2.5. Permeabilidad

IV.2.5.1. Equipos

Espectrofotómetro UV-VIS Cary 60 modelo 2 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.), baño de agua termostatizado (Julabo, ED THERM 60, Alemania).

IV.2.4.2. Materiales y muestras

Celdas de Franz, pinzas para celdas de Franz, pezuñas bovinas (obtenidas de Compostelana de carnes S.L; Santiago de Compostela, España), jeringa, papel parafilm, guantes quirúrgicos de látex, tubos eppendorf, agitador magnético, buffer pH=7, Furvina®, laca transparente, roja y blanca, así como los formulados transparente, rojo y blanco al 0,25 %.

IV.2.4.3. Metodología

Se preparó una curva de calibración para Furvina® a partir de disoluciones patrón preparadas en acetona y midiendo la absorbancia a 363 nm. Para ello se pesaron 20 mg de Furvina® y se disolvieron en 10 mL de acetona para obtener una concentración de 2000 µg/mL. Se tomaron 500 µL de esta disolución y se mezclaron con 500 µL de acetona para obtener una concentración de 1000 µg/mL. A partir de esta última se prepararon diluciones de concentraciones comprendidas entre 0,06 y 31,25 µg/mL como patrones de concentración.

Las pezuñas se hidrataron durante dos horas y se seleccionaron las que presentaron un grosor similar y ausencia de defectos o grietas que pudieran alterar los resultados. En el compartimento dador se colocaron 1 mL de las muestras de cada formulado (transparente, rojo y blanco) a una concentración de Furvina® de 2500 µg/mL. Seguidamente se rellenó el compartimento receptor con 6,5 mL de disolución reguladora de pH=7 y se introdujo un imán en la disolución para su posterior agitación magnética. Se colocó la uña bovina entre el compartimento receptor y el dador, sosteniéndola con unas pinzas para celdas de Franz. La superficie disponible de liberación fue de 0,418 cm^2. Entonces, se colocó la celda en un baño termostatado a 37 ºC durante aproximadamente 1 hora, con agitación magnética a 300 rpm con objeto de que se alcance el equilibrio de reparto entre los dos compartimentos. Es importante que no se generen patrones turbulentos en el compartimento receptor ya que puede incorporar aire

en el mismo. Si queda alguna burbuja entre el compartimento receptor y la membrana, se procede a girar la celda unos 90º para eliminar las burbujas por la abertura lateral.

Cada ensayo de los formulados fue realizado por triplicado. A través de la abertura lateral de la celda se tomaron volúmenes de las muestras de 1 mL, reponiendo en cada caso el volumen retirado con disolución reguladora de pH=7. Esta reposición asegura que el fluido receptor se mantiene en contacto con la pezuña de modo que el proceso de difusión no se vea limitado. Se tomaron muestras a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 y 264 horas.

La cantidad de fármaco acumulada en el compartimento receptor a cada tiempo de muestreo cuando se emplean celdas de difusión estáticas se calcula de la siguiente manera. En la muestra recogida tras 1 h de mantenimiento en la celda:

$$Q_{t1} = C_{t1} * V_r$$

expresión en la que Q_{t1} es la cantidad en masa acumulada en el compartimento receptor al primer tiempo de toma de muestra, C_{t1} es la concentración analizada en el primer tiempo de muestreo y Vr es el volumen del compartimento receptor. En el segundo y los sucesivos tiempos de muestreo se cumple:

$$C_{tn} = C_{tn} * V_r + \sum_{t1}^{tn-1} C_t V_m$$

siendo Vm el volumen de las muestras tomadas. Una vez obtenida esta cantidad a cada tiempo se divide por la superficie de piel empleada, S, para normalizar la información.

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1. Resultados de los análisis mediante XRD

Los resultados obtenidos para el análisis XRD de los distintos formulados y de la Furvina® permitieron establecer los correspondientes difractogramas, que aparecen reflejados en la Figura IV.2. SE puede observar que los tres formulados (transparente, rojo y blanco) proporcionaron difractogramas similares, no presentando picos, lo cual sugiere que las lacas no cumplen con la ley de Bragg y los rayos X no atraviesan el material. Sin embargo, el difractograma de Furvina® muestra sus picos característicos, descritos anteriormente por otros autores (13).

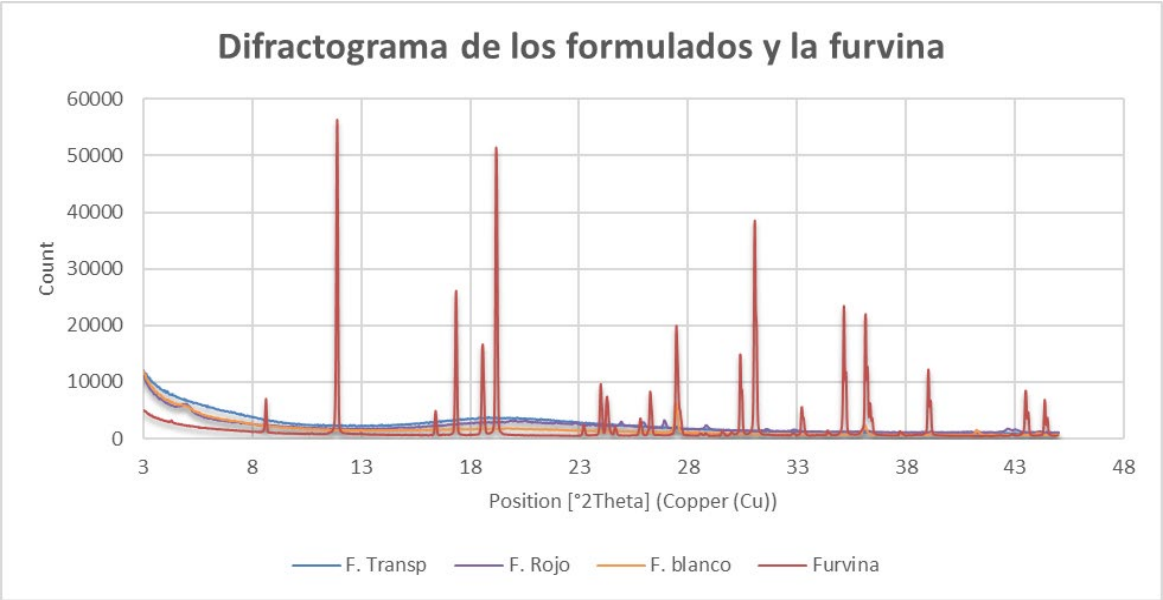


Figura IV.2. Difractogramas de los formulados y la Furvina®.

IV.3.2. Resultados obtenidos mediante SEM

Las Figuras IV.3-IV.9 muestran las imágenes obtenidas mediante análisis SEM-SE de las nueve muestras (formulados, lacas y Furvina®) con un voltaje de aceleración (EHT) de 3,00 kV y en diferentes escalas, A (1 µm), B (2 µm), C (20 µm), D (100 µm) y E (200 µm).

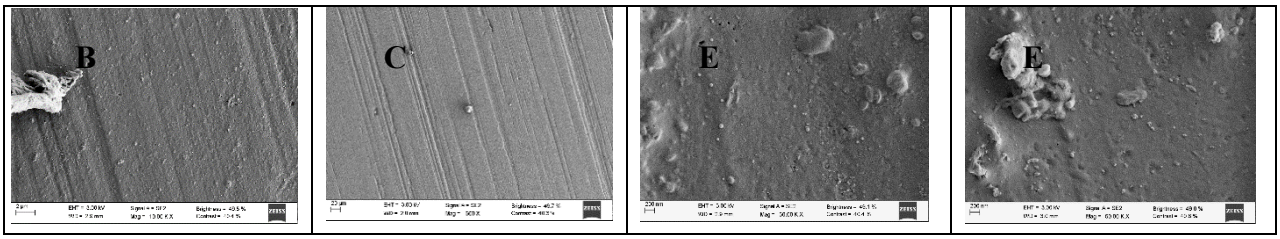


Figura IV.3. Imágenes SEM-SE obtenidas para el formulado transparente.

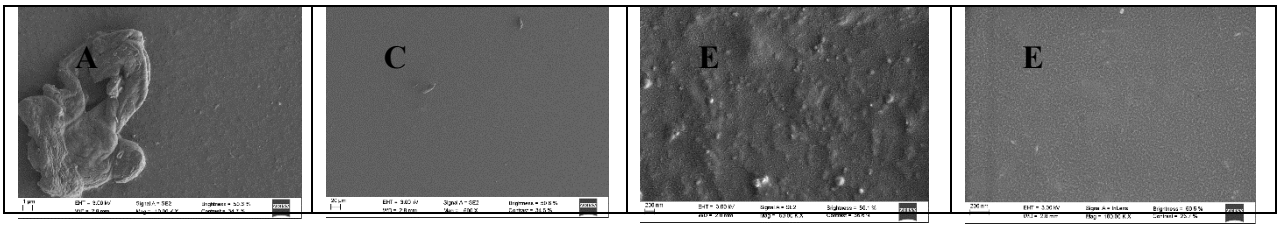


Figura IV.4. Imágenes SEM-SE obtenidas para el formulado rojo.

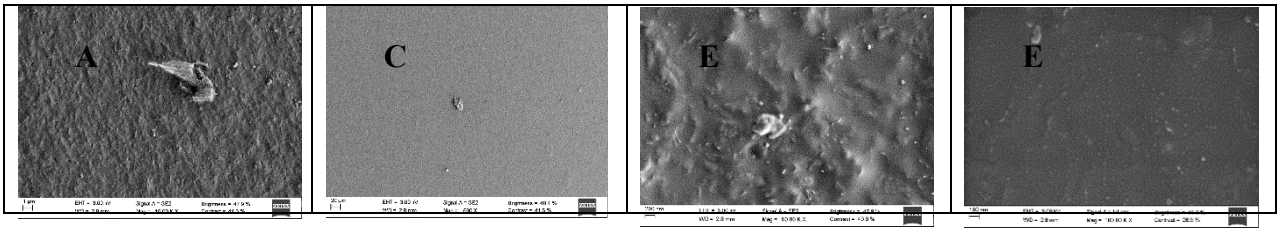


Figura IV.5. Imágenes SEM-SE obtenidas para el formulado blanco.

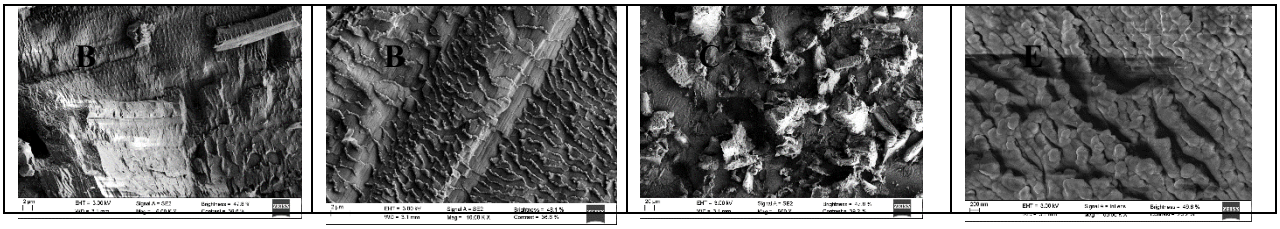


Figura IV.6. Imágenes SEM-SE obtenidas para Furvina®.

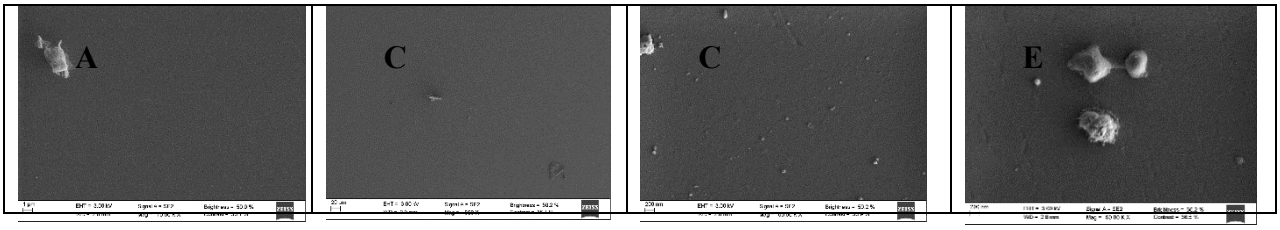


Figura IV.7. Imágenes SEM-SE obtenidas para la laca transparente.

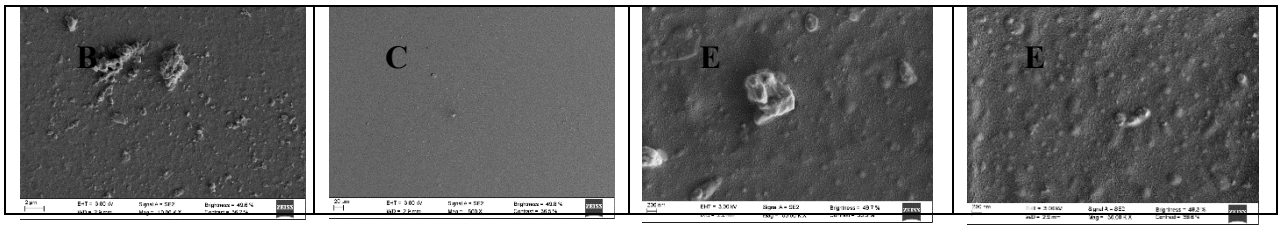


Figura IV.8. Imágenes SEM-SE obtenidas para la laca roja.

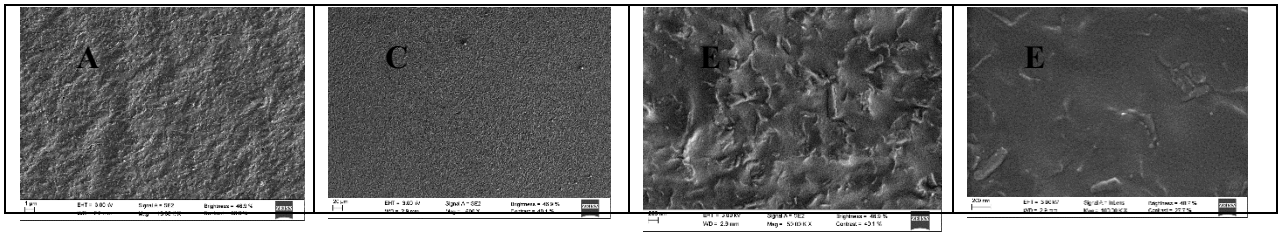


Figura IV.9. Imágenes SEM-SE obtenidas para la laca blanca.

Al observar las imágenes captadas mediante SEM-SE a las diferentes escalas y comparando cada formulado con su correspondiente excipiente de cada color de laca se puede observar que existen cambios morfológicos y tipográficos de los cristales del IFA probablemente debidos a su disolución en el medio.

Comparando las Figuras IV.3, IV.6 y IV.7 se puede observar que el formulado transparente adquiere una forma morfológica y tipográfica diferente a la de la laca sola. A medida que la resolución aumenta se aprecian partículas que son propias del IFA Furvina®, ya que la laca transparente presenta prácticamente una superficie lisa.

La comparación de las Figuras IV.4, IV.6 y IV.8 muestra que el formulado rojo sí mantiene la estructura de la laca roja y no se observan grandes partículas cristalinas del IFA, lo cual puede deberse a la disolución del IFA en el vehículo.

Al comparar las Figuras IV.5, IV.6 y IV.9, se observa que el formulado blanco tiene partículas cristalinas que deben ser propias del IFA, aunque también se observa la forma morfológica propia de la laca blanca.

Por otra parte, si se comparan los 3 formulados por separado también se observan los cambios morfológicos y tipográficos, probablemente debidos al tipo de pigmento que cada uno contiene y que aportan a la coloración de la laca (transparente, rojo y blanco).

IV.3.3. Resultados de los análisis mediante IR

Los espectros IR (4000 – 400 cm^{-1}) de los formulados evaluados se representan en la Figura IV.10.

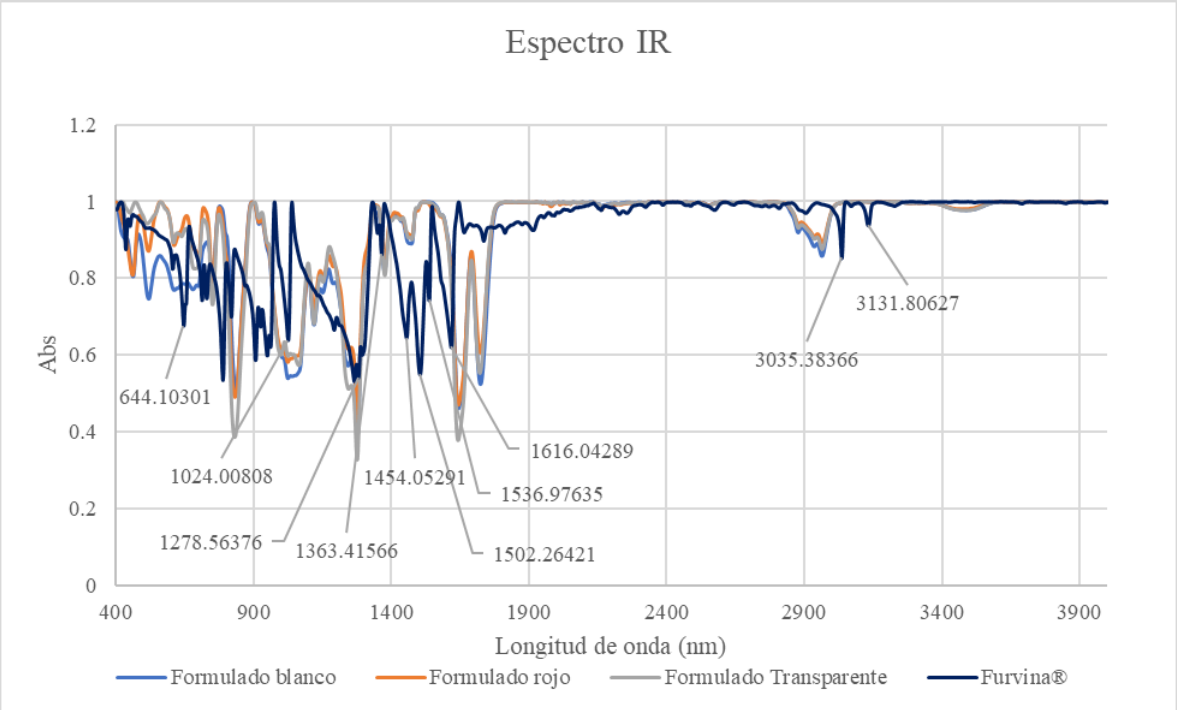


Figura IV.10. Espectros IR de los formulados y del IFA.

Como se observa en la Figura IV.10, las regiones de bandas alrededor de 3230 – 2800 cm^{-1} y 1800 – 560 cm^{-1} resultaron ser las más importantes, aunque aparecen otras bandas que se atribuyen a las lacas. Una evaluación comparativa de datos reveló una similitud entre las bandas de los espectros, ya que las bandas de la Furvina® no desaparecen en los formulados de uñas. Las bandas características de la Furvina® se atribuyeron de la siguiente manera:

Csp_2-H 3131,8 cm^{-1} y 3035,4 cm^{-1},

C = C 1618,0 cm^{-1}, 1537,0 cm^{-1} y 1454,1 cm^{-1},

NO 1502,3 cm^{-1} y 1363,4 cm^{-1},

C–O–C 1278,6 cm^{-1} y 1024,0 cm^{-1}, y

C–Br 644,1 cm^{-1}.

Se puede llegar a la conclusión de que mediante la técnica IR se puede identificar la presencia del IFA en los tres formulados.

IV.3.4. Resultados de los análisis mediante DSC

En la Figura IV.11 se muestran los termogramas obtenidos del análisis del IFA Furvina® y de los formulados por DSC en el intervalo de 0 a 300 ºC.

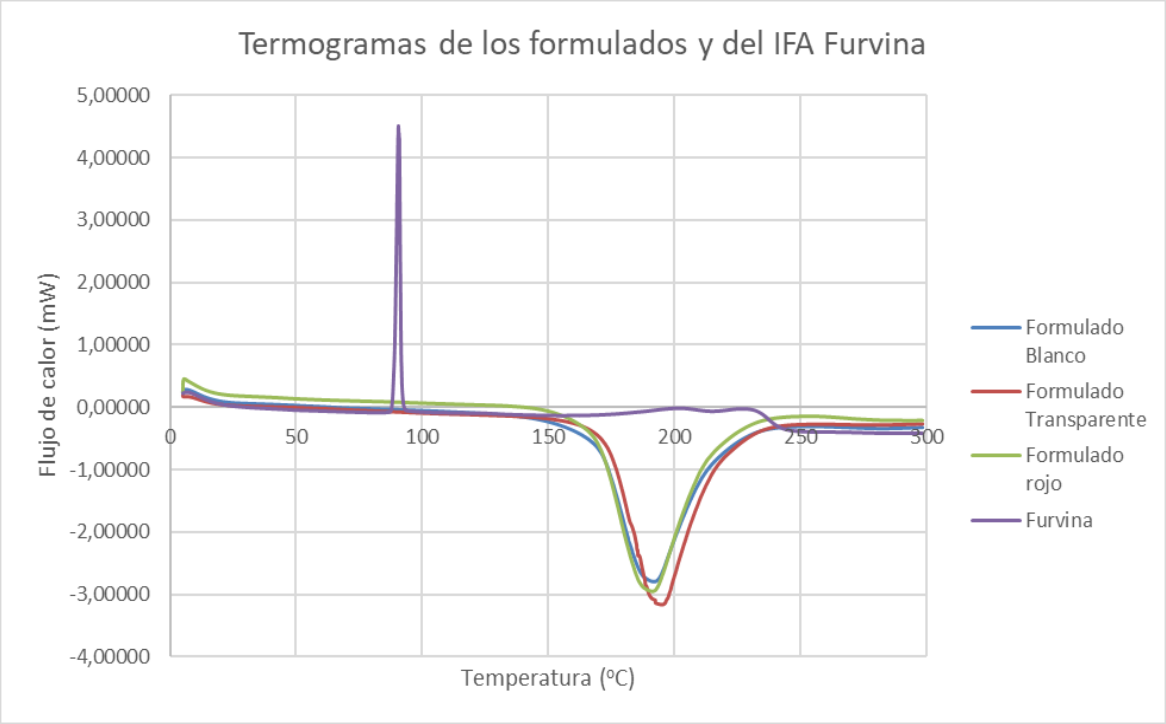


Figura IV.11. Termograma de Furvina® y los formulados obtenidos mediante DSC.

Los termogramas muestran un pico endotérmico a la temperatura de 90,59 ºC correspondiente a la fusión del principio activo como resultado del calentamiento del material certificado. Por su parte, los tres formulados presentan un pico similar exotérmico por lo que se puede llegar a la conclusión de que los formulados, a pesar de no observarse el pico del IFA debido a la concentración de los mismos (0,25% (m/m)), deben mantenerse a una temperatura inferior a 87,57 ºC, que es la temperatura a partir de la cual comienza a fundir la Furvina®.

IV.3.5. Estudios de permeabilidad

La curva de calibración se obtuvo usando disoluciones de Furvina® en acetona en un rango de concentración entre 0,06 y 31,25 µg/mL (Figura IV.12).

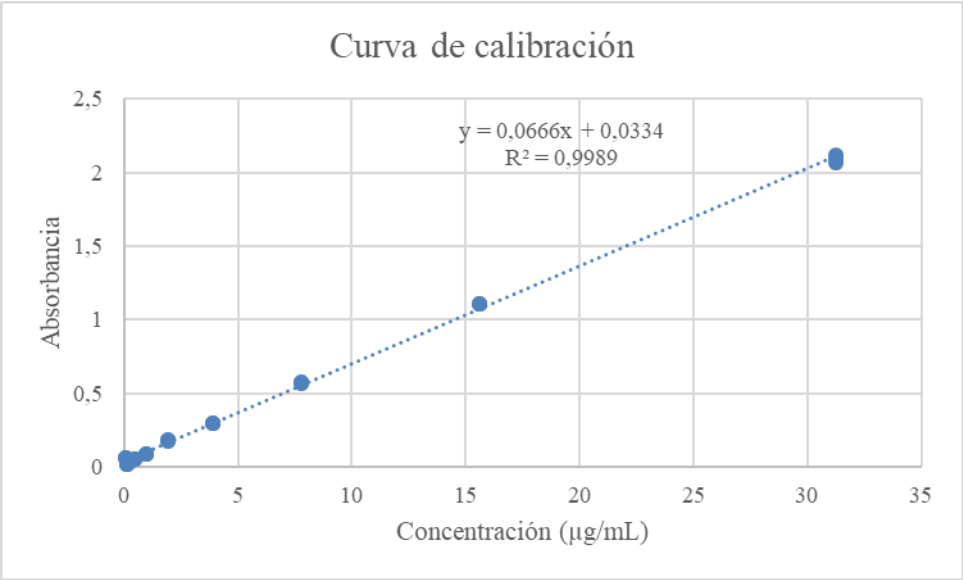


Figura IV.12. Curva de calibración del IFA en acetona a 363 nm.

La Figura IV.13 muestra los resultados obtenidos a través del estudio de permeabilidad de las tres lacas a lo largo de 11 días, donde se representa la cantidad de Furvina® difundida total por unidad de superficie de la uña a lo largo del tiempo. Debido a la consistencia de las lacas de uñas y su poca solubilidad en agua, al inicio prácticamente no se cuantifica fuvina en el compartimiento receptor. A partir de las 168 horas es cuando comienza a cuantificarse el IFA, por lo que se recomienda un período de contacto con la uña superior a los 11 días para que el formulado sea capaz de adherirse a la uña y atravesarla, pudiendo actuar en el tratamiento de la onicomicosis.

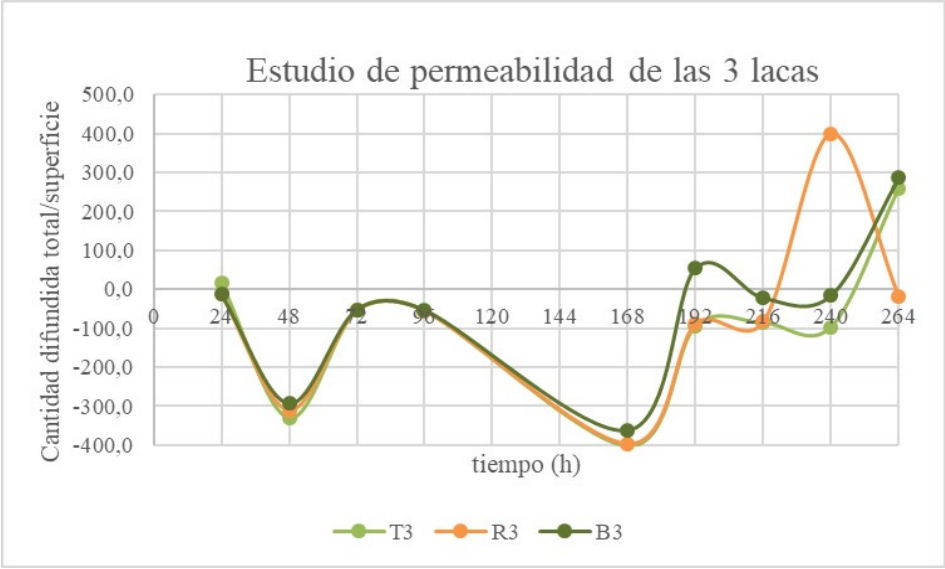


Figura IV.13. Estudio de permeabilidad de las tres lacas a lo largo de 11 días.

IV.4. CONCLUSIONES

Mediante los análisis mediante IR, DSC, XRD y SEM-SE se pudo identificar y caracterizar la Furvina® en los formulados. Mediante la espectroscopía IR se pudieron determinar las bandas del IFA en los formulados, corroborando su presencia los mismos. La aplicación de la técnica DSC permitió establecer las condiciones de temperatura de almacenamiento de los formulados, al comprobar la temperatura de fusión de la Furvina® (87,57-95,46 ºC), reportando así un criterio de la estabilidad térmica para los formulados. Los difractogramas obtenidos mediante XRD fueron similares entre las lacas pero diferentes al obtenido para el IFA, lo que sugiere que las lacas no cumplen con la Ley de Bragg y los rayos X no atraviesan este material. Los análisis SEM-SE mostraron cambios morfológicos y tipográficos de los cristales del IFA en los formulados. Los resultados obtenidos a través del estudio de permeabilidad conducen a recomendar el contacto del formulado con la uña durante un periodo superior a los 11 días, para que este sea capaz de adherirse a la uña y cumplir su objetivo de curar la onicomicosis.

IV.5. BIBLIOGRAFIA

1. Bunaciu AA, UdriŞTioiu EG, Aboul-Enein HY. X-ray diffraction: instrumentation and applications. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 2015;45(4):289–99.
2. Thakral NK, Zanon RL, Kelly RC, Thakral S. Applications of powder X-ray diffMerino V, Melero A, Nácher A, Merino-S. Applications of powder X-Ray diffraction in small molecule pharmaceuticals: achievements and aspirations. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018;107(12):2969–82.
3. Penagos JIC. Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). Elementos. 2013;3(3):133–46.
4. Acosta D, Hernández F, Magaña C, Champi A. Estudios por microscopía electrónica de materiales grafénicos obtenidos por exfoliación ultrasónica y rociado neumático. Acta Microscopica. 2018;27(3):196–201.
5. Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. American Journal of Cancer Research. 2012;2(1):1.
6. Bunaciu AA, Fleschin S, Aboul-Enein HY. Biomedical investigations using Fourier transform-infrared microspectroscopy. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 2014;44(3):270–6.
7. Chountoulesi M, Naziris N, Pippa N, Pispas S, Demetzos C. Differential scanning calorimetry (DSC): An invaluable tool for the thermal evaluation of advanced chimeric liposomal drug delivery nanosystems. Thermodynamics and Biophysics of Biomedical Nanosystems: Applications and Practical Considerations. 2019;297–337.
8. Ferreira LT, Alarcon RT, Perpétuo GL, Bannach G. Investigation and characterization by TG/DTG–DTA and DSC of the fusion of riboflavin, and its interaction with the antibiotic norfloxacin in the screening of cocrystal. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2019;136:581–8.
9. Merino V, Melero A, Nácher A, Merino-Sanjuán M. Curso Actualización Absorción Percutánea. Proyecto “Desarrollo de metodologías biofarmacéuticas racionales para la evaluación de medicamentos transdérmicos en enfermedades crónicas de alta prevalencia”. Proyectos de Cooperación al Desarrollo 2014.

Vicerrectorado de Internacionalización y Cooperación de la Universitat de València. Universidad de Valencia; 2016:83–108.

10. Kitahara T, Ogawa H. Coexpression of keratins characteristic of skin and hair differentiation in nail cells. Journal of Investigative Dermatology. 1993;100(2):171–5.
11. Mertin D, Lippold BC. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: prediction of the penetration rate of antimycotics through the nail plate and their efficacy. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 1997;49(9):866–72.
12. Kitahara T, Ogawa H. Variation of differentiation in nail and bovine hoof cells. Journal of Investigative Dermatology. 1994;102(5):725–9
13. Estrada E, Castañedo NR, Pomés R. Análisis estructural del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. Registro Público Cubano de Ensayos Clínicos (RPCEC). Ciudad de La Habana, Cuba. 1995; 1-12.

CAPÍTULO V

DETERMINACIÓN DE PLOMO, ARSÉNICO Y COBRE EN LACAS DE UÑAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

V.1. INTRODUCCION

Algunos metales, tradicionalmente tóxicos en diferentes tipos de muestras, son muy peligrosos debido a su alta biodisponibilidad, toxicidad potencial y facilidad de acumulación por diversos organismos vegetales y animales y muestras ambientales (1).

En la Unión Europea (UE) el reglamento de la Comisión Europea (CE nº 1223/2009) sobre cosméticos establece la información que debe figurar en la etiqueta de los productos e incluye diferentes anexos con numerosos ingredientes prohibidos y restringidos (2). Es imprescindible asegurarse de que el cosmético cumple con los requisitos del reglamento de la UE de forma previa a su introducción en el mercado comunitario, siendo necesario revisar previamente su fórmula y etiquetado. En Cuba, los productos cosméticos para su producción, importación, procesamiento, envase, expendio y comercialización, así como las presentaciones cosméticas de desarrollo avanzado estarán sujetas a aprobación por el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM) previa sustentación técnica presentada por el solicitante (3).

La evaluación del producto tiene por objeto conceptuar sobre la capacidad del fabricante, del proceso de fabricación y de la calidad del producto. Con respecto a los medicamentos, la EMA (4) garantiza la evaluación científica, la supervisión y el seguimiento de la seguridad de los medicamentos de uso humano y veterinario en la UE. Para los efectos del análisis técnico de la formulación del producto, se adoptan como oficiales las normas para los cosméticos expedidas por la FDA (5) y la norma cubana de requisitos sanitarios (3,6), sin perjuicio de las que en el futuro se expidan en el país para productos específicos.

V.1.1. Presencia de metales en cosméticos

En los últimos años se ha logrado el desarrollo de formulaciones cosméticas inteligentes a través de la combinación exacta de cada ingrediente, permitiendo de esta manera el desarrollo de cosméticos seguros y tecnológicamente mejor elaborados. Aun así, algunos cosméticos pueden contener metales pesados como plomo, arsénico, cobre, mercurio y antimonio, los cuales, a pesar de contribuir a la belleza, representan un riesgo para la salud (7). Sin embargo, existen diferentes investigaciones que corroboran la presencia de metales pesados en formulaciones cosméticas actuales como: tintes de cabello, maquillaje, sombras y labiales que han producido daños en el consumidor. Por

tanto, la presencia de metales pesados es una gran preocupación y requiere de un monitoreo constante (7).

En la actualidad, el cuidado de la piel y la cosmética forman parte de la vida diaria, lo que ha incrementado la producción de cosméticos (8). Con la aparición de nuevas materias primas y tecnologías avanzadas, éstos han evolucionado en formulaciones mejor elaboradas; sin embargo, las investigaciones continúan identificando en algunos de ellos la presencia de metales contaminantes que acceden al organismo, acumulándose en diferentes órganos y generando un daño a lo largo del tiempo de exposición (8,9).

Los pigmentos fabricados con plomo a menudo son usados para cerámicas o artesanías; sin embargo, también se encuentran en cosméticos. En los labiales, pinturas o sombras, la concentración de plomo en el producto varía de acuerdo con el color y cobertura que se le vaya a dar al producto, así, los más oscuros y opacos son los que más contenido de plomo presentan. Cuando se fabrican cosméticos, debe prestarse especial atención al análisis de la materia prima, específicamente a los pigmentos, debido a que estos en su composición pueden contener plomo como impureza (10).

Con respecto a los productos farmacéuticos, el ICH cuenta con directrices que establecen normas estrictas sobre la cantidad de metal que puede contener un IFA o un medicamento, que varía en función del propio metal y del método de administración del fármaco al paciente. En los fármacos, los contaminantes metálicos pueden proceder de varias fuentes, siendo la más común la de cualquiera de las materias primas, reactivos o disolventes utilizados en la síntesis del IFA y de los excipientes (estabilizantes, colorantes, recubrimientos, aromatizantes, agentes liberadores, etc.) (11). Por ejemplo, los metales pueden haberse usado deliberadamente en el proceso de fabricación del IFA como catalizadores (paladio o platino) de reacciones de hidrogenación o catalizadores quirales que pueden contener rutenio o rodio (12). En 2008, la EMA publicó una directriz sobre los límites de especificación para residuos de catalizadores metálicos o reactivos metálicos, que fue adoptada por la Farmacopea Europea y debe aplicarse tanto a los medicamentos nuevos como a los ya existentes (13). Los metales también pueden aparecer en el fármaco como impurezas liberadas por el equipo de fabricación, el agua o los sistemas de embalaje. Por otro lado, algunos metales se encuentran en los medicamentos no como contaminantes sino por sus propiedades beneficiosas sobre la salud. De hecho, algunos IFAs incorporan metales y metaloides en su estructura. Por ejemplo, algunos agentes antimicrobianos conteniendo hierro, plata y oro, agentes

antipsicóticos conteniendo litio o fármacos empleados en terapias de cáncer basados en compuestos de platino (11).

La USP (14) establece como mandatorios el monitoreo de plomo, mercurio, bismuto, arsénico, antimonio, estaño, cadmio, plata, cobre y molibdeno, mientras que la Ph. Eur. incluye además vanadio, paladio, platino, oro y rutenio (15).

La directriz Q3D de la ICH sobre impurezas elementales ofrece un enfoque de control basado en el riesgo, así clasifica los metales potencialmente peligrosos en cuatro grupos, dependiendo de su efecto biológico en los seres humanos. La clase 1 incluye arsénico, cadmio, mercurio y plomo, elementos que casi nunca participan activamente en la fabricación de un producto farmacéutico. Sin embargo, el elevado peligro que suponen obliga a incluirlos en la evaluación de riesgos. La clase 2 contempla metales clasificados como tóxicos para el ser humano y se divide a su vez en dos subcategorías (2A y 2B), en función de la probabilidad de que sus elementos estén presentes en el producto farmacéutico. Cobalto, níquel y vanadio forman la subcategoría 2A, presentando una probabilidad relativamente alta de aparecer en un medicamento, por lo que se requiere una evaluación del riesgo en todas sus fuentes potenciales. Los metales de la subcategoría 2B tienen una probabilidad menor de hallarse presentes en el producto farmacéutico y no es necesario incluirlos en la evaluación de riesgos, a menos que se usen intencionadamente en la fabricación del IFA, los excipientes o cualquier otro componente del producto. Esta lista incluye varios metales utilizados habitualmente como catalizadores, así como plata, oro, osmio, selenio y talio. La clase 3 incluye un número bajo de metales (antimonio, bario, cromo, cobre, litio, molibdeno y estaño), caracterizados por una toxicidad relativamente baja incluso si se toman por vía oral (generalmente superior a 500 µg/día). Estos elementos, al igual que los de la subcategoría 2B, sólo deben tenerse en cuenta en la evaluación de riesgos si se han usado deliberadamente en el proceso de fabricación del fármaco (16).

En esta Tesis Doctoral se proponen metodologías de análisis para dos metales incluidos en la clase 1 (arsénico y plomo) y uno de clase 3 (cobre), para los que la ICH y la USP establecen límites máximos permitidos en productos farmacéuticos considerando sus vías de administración (11).

El arsénico es un contaminante ambiental natural al que los seres humanos están expuestos a través de los alimentos, el agua, el aire y el suelo. Tiene una larga historia de uso como veneno, pero también se ha empleado como pesticida y agente quimioterapéutico. En algunas zonas del mundo, el arsénico está presente de forma

natural en el agua potable y constituye un problema toxicológico. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasifica al arsénico y sus compuestos como carcinógenos para los humanos, pudiendo causar cáncer de pulmón, urinario y de piel, así como cáncer de riñón, hígado y próstata (17).

El arsénico pertenece al grupo de los semimetales puesto que presenta características tanto de los metales como de los no metales. Al exponerse al aire húmedo, se oxida fácilmente, cubriéndose de anhídrido arsenioso que es altamente tóxico (9). El arsénico es soluble en el agua y se puede encontrar en forma de arseniato en aguas superficiales.

La principal agencia reguladora del arsénico es la Agencia de Protección Ambiental (EPA) estadounidense, debido a las enormes consecuencias que este presenta para el medio ambiente (9). La Tabla V.1 muestra los niveles de exposición a arsénico permitidos por diferentes organizaciones (EPA estadounidense, FDA, ICH, INHEM, Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH), Organización Mundial de la Salud (OMS), Administración de Seguridad y Salud en el Trabajo (OSHA) y USP) a través de distintas vías de acceso al organismo.

Tabla V.1. Niveles máximos permitidos de arsénico según diferentes organizaciones.

Organización	Nivel de exposición
EPA (19)	2 μg/m^3 de aire inhalado (ambiente laboral) durante 15 min
NIOSH (19)	10 μg/m^3 de aire inhalado (ambiente laboral) durante 8 h
OSHA (19) y Directiva Europea 8/83/EC (20)	10 ng/mL en agua de consumo humano
OMS (19)	0,5-2 ppm en animales para alimentación tratados con medicamentos
INHEM (3)	2 μg/g para cosméticos
ICH Q3D (11)	1,5 μg/g (exposición oral y parenteral), 0,29 μg/g (exposición por inhalación)
USP 232 (11)	1,5 μg/g (exposición oral y parenteral), 0,19 μg/g (exposición por inhalación)
FDA (21)	3 μg/g en cosméticos

Por su parte, el plomo es insoluble en agua, así como en ácidos diluidos; sin embargo, es soluble en los ácidos nítrico, acético y sulfúrico concentrados. Además, algunos de los compuestos derivados del plomo son solubles en lípidos (22). Su alta

solubilidad en grasas hace que este metal tenga una buena absorción a través de la piel y mucosas, facilitando la distribución en el cuerpo. Esto es de gran importancia en los cosméticos, puesto que estos cuando son de uso diario y contienen este metal, pueden llegar a producir intoxicación tanto aguda como crónica, dependiendo de la dosis a la que el organismo esté sometido (23).

Dependiendo de la manera en que se haya dado la exposición al plomo, las diferentes entidades internacionales no gubernamentales, establecen límites máximos del mismo para asegurar la seguridad tanto de las personas como del medio ambiente (9). La FDA establece como límite de exposición al plomo una concentración de 10 ppm; sin embargo, se hace una excepción cuando se usa como conservante en productos cosméticos de ojos, elevando al límite hasta 65 ppm (21). La Tabla V.2 muestra los niveles de exposición a plomo permitidos por diferentes organizaciones y a través de distintas vías de acceso al organismo.

Tabla V.2. Niveles máximos de plomo establecidos por diferentes organizaciones.

Organización	Nivel de exposición
EPA (19)	1,5 μg/m^3 de aire inhalado promediado durante 3 meses
OSHA (19)	50 μg/m^3 de aire inhalado (ambiente laboral) durante 8 horas
NIOSH (19)	0,6 μg/mL en sangre y 100 μg/m^3 en aire inhalado
OMS (19)	0,4 μg/mL para hombres y 0,3 μg/mL para mujeres (en sangre)
Directiva Europea 8/83/EC (20)	10 ng/mL en aguas de consumo humano
INHEM (19)	2 μg/g para cosméticos
ICH Q3D (11) y USP 232 (11)	0,5 μg/g (exposición oral, parenteral y por inhalación)
FDA (21)	10 μg/g por exposición

El cobre es cada vez más utilizado como ingrediente activo en los cosméticos debido a sus múltiples beneficios para la piel. Además, posee propiedades antiinflamatorias, ayuda a la cicatrización, calma y puede reducir la inflamación en la piel, por lo que se suele recomendar para pieles muy reactivas, con acné o con rosácea. Además, es utilizado como antioxidante natural (algunos de sus derivados son 40 veces más antioxidantes que la vitamina C), protege la piel de los radicales libres que pueden causar daño celular y envejecimiento prematuro de la piel y, ligado a su potencial antiedad, es

un cofactor esencial en la síntesis de colágeno y elastina. El cobre colabora dando un impulso a la producción de colágeno en la piel, que es clave para mantenerla firme y elástica, además de estimular la regeneración celular y reparar el tejido dañado (24). En la Tabla V.3 se detallan los niveles de exposición a cobre permitidos por diferentes organizaciones y a través de distintas vías de acceso al organismo.

Tabla V.3. Niveles máximos de cobre establecidos por diferentes organizaciones.

Organización	Nivel de exposición
EPA (19)	1,3 ppm en aire
OSHA (19) y NIOSH (19)	1 mg/m^3 (polvos y nieblas de Cu) y 0,1 mg/m^3 (humo de cobre) durante 8 horas (OSHA) y 10 h (NIOSH)
Directiva Europea 8/83/EC (20)	2 ng/mL en aguas de consumo humano
INHEM (19)	10 µg/g para cosméticos
ICH Q3D (11) y USP 232 (11)	130 µg/g exposición oral, 13 µg/g exposición parenteral y 1,3 µg/g exposición por inhalación

Por todo lo expuesto resulta de gran interés la cuantificación de estos metales en productos farmacéuticos, cuestión que será abordada en este capítulo para las lacas medicinales de uñas mediante espectrometría de absorción atómica (AAS).

V.1.2. Métodos analíticos para la determinación de metales en fármacos

Uno de los desafíos actuales de las instalaciones de control de calidad y de investigación y desarrollo farmacéutico es el desarrollo de nuevos métodos y protocolos para la determinación rápida, precisa y exacta de metales, en especial metales pesados. Estas especies químicas pueden evaluarse mediante diferentes técnicas analíticas según la matriz y las características de la muestra. Los métodos propuestos para determinar la concentración elemental deben mostrar una alta sensibilidad y límites satisfactorios de detección y cuantificación. Además, la bibliografía muestra el desarrollo de métodos para atender los requisitos actuales de la química verde sobre la mínima generación de residuos químicos (1).

Las técnicas FAAS, ETAAS, fluorescencia de rayos X (XRF), análisis por activación neutrónica, así como las combinaciones de ICP con AES y con MS son empleadas actualmente para la detección de metales y metaloides en productos farmacéuticos. Otras técnicas más innovadoras como ICP acoplado a MS con analizador de tiempo de vuelo (ICP-TOF-MS) y espectrometría de ablación inducida por láser (LIBS) y ablación láser

con ICP-MS (LA-ICP-MS) también han comenzado a aplicarse para control de calidad en la industria farmacéutica (11,25).

La AAS se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica para análisis elemental y puede utilizarse para determinar más de 70 elementos diferentes. Sin embargo, la mayoría de los instrumentos AAS utilizan fuentes de radiación lineal, como lámparas de cátodo hueco, que solo permiten el análisis de un elemento particular que es específico para la lámpara utilizada. El uso de fuentes continuas de alta resolución (HR-CS) aparece como una interesante alternativa a las lámparas tradicionales, siendo el principal avance la calidad de la fuente, que permite la determinación de diferentes elementos, determinaciones secuenciales y simultáneas, gran corrección de la señal de fondo y mejor radiación de la fuente electromagnética (1). Teniendo en cuenta que la técnica HR-CS ETAAS ha sido aplicada en este capítulo, a continuación, se dedica un apartado a su explicación.

V.1.2.1. Espectroscopía de absorción atómica

La espectroscopia de absorción atómica es un método instrumental de la química analítica que permite medir las concentraciones específicas de un material en una mezcla y determinar una gran variedad de elementos. Esta técnica se utiliza para determinar la concentración de un elemento particular (el analito) en una muestra y permite determinar más de 70 elementos diferentes en disolución o directamente en muestras sólidas utilizadas en farmacología, biofísica o investigación toxicológica.

La espectroscopia de absorción atómica fue utilizada por primera vez como una técnica analítica, y los principios subyacentes fueron establecidos en la segunda mitad del siglo XIX por Robert Wilhelm Bunsen y Gustav Robert Kirchhoff, ambos profesores de la Universidad de Heidelberg, Alemania.

La forma moderna de la espectroscopia de absorción atómica fue desarrollada durante los años 50 por un equipo de químicos australianos, dirigidos por Alan Walsh en la Organización de Investigación Científica e Industrial del Commonwealth (CSIRO), División de Química Física, en Melbourne, Australia (26).

Es un método de química analítica que está basado en la atomización del analito en una matriz líquida y que utiliza comúnmente un nebulizador (o cámara de nebulización) para crear una niebla de la muestra y un quemador con forma de ranura que da una llama con una longitud de trayecto más larga, en caso de que la transmisión de energía inicial al analito sea por el método "de llama". La niebla atómica queda desolvatada y expuesta a

una energía a una determinada longitud de onda emitida ya sea por la llama, o por una lámpara de cátodo hueco (HCL) construida con el mismo analito a determinar o una lámpara de descarga sin electrodos (EDL).

V.1.2.2. Espectrometría de absorción atómica electrotérmica de fuente continua de alta resolución

En la década de los 50 se introdujo por primera vez el término Espectrometría de absorción atómica, pero no fue hasta 1996 que Harnly desarrollara un prototipo de ETAAS con fuente de espectro continuo y corrección de fondo basada en el efecto Zeeman. La técnica HR-CS ETAAS es considerada como una gran innovación. Una de las desventajas que tiene la técnica es que, hasta el momento, no se pueden realizar determinaciones multielementales. A pesar de esto, la técnica ofrece varias ventajas que se enumeran a continuación (27-30):

1. Consume un menor volumen de muestra
2. Alta sensibilidad
3. Pueden analizarse directamente muestras sólidas
4. Accesibles todas las líneas de absorción de 190 a 900 nm
5. Las líneas secundarias tienen la misma relación señal/ruido que la línea analítica principal y pueden utilizarse con fines analíticos
6. Estabilidad de señal mejorada
7. Potencial de corrección de fondo superior
8. Mejora en la fiabilidad de la medida y los límites de detección
9. Mejora en la corrección de la absorción inespecífica (interferencias espectrales)
10. Control de la sensibilidad y del rango lineal

La Figura V.1 muestra el esquema de un equipo de HR-CS AAS. Las principales diferencias frente a un equipo de AAS son:

- Fuente de arco corto de xenón que emite a todas las longitudes de onda del rango espectral indicado.
- Monocromador de alta resolución que consiste en un sistema doble de dispersión (prisma que actúa como pre-monocromador y una red de difracción).
- Detector de carga acoplada de 200 píxeles con fines analíticos que actúan como 200 detectores independientes.

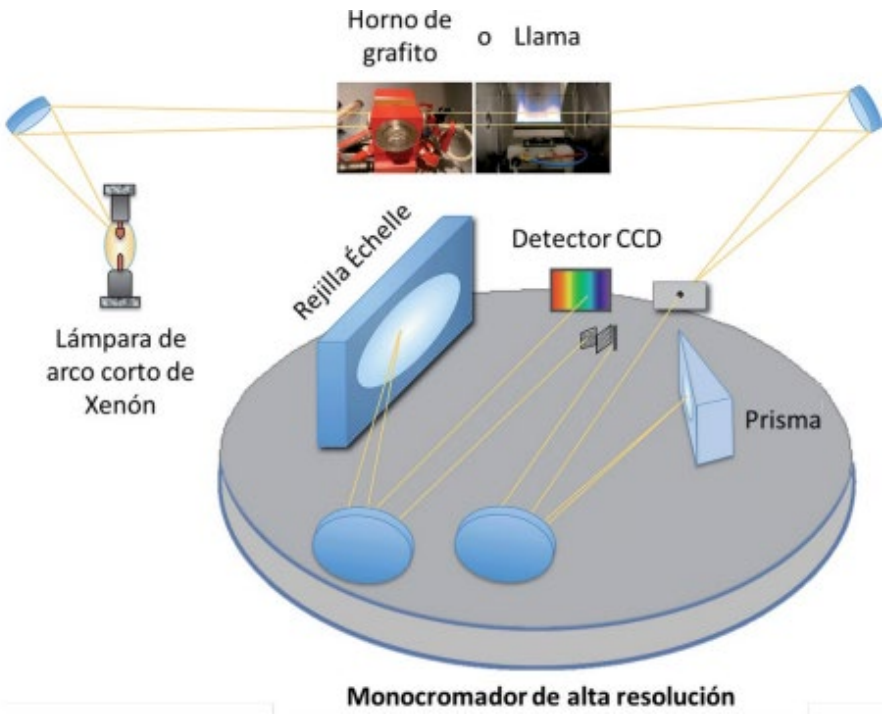


Figura V.1. Esquema de HR-CS ETAAS (27).

La bibliografía muestra algunas aplicaciones de la técnica HR-CS ETAAS para la determinación de los elementos estudiados en este capítulo. Así, Barbosa et al. (31) determinaron plomo en suplementos alimenticios. Otro método que utiliza esta técnica fue propuesto por Aleluia et al. (32) para determinar plomo en diferentes formulaciones farmacéuticas alcanzando límites de detección y cuantificación de 49 y 165 ng/g, respectivamente. El análisis de fármacos administrados para el tratamiento de patologías renales para la determinación de plomo, entre otros metales, permitió la detección de ciertas muestras con niveles del metal superiores a los recomendados por la Farmacopea Brasileña (33). Los niveles de macroelementos, entre ellos cobre, y micronutrientes, como plomo y arsénico, en suplementos multivitamínicos han sido monitorizados mediante HR-CS ETAAS con análisis de la muestra en suspensión, eludiendo la etapa previa de mineralización convencionalmente incluida en las etapas de preparación de la muestra (34).

La determinación de plomo también ha sido abordada mediante HR-CS ETAAS en cosméticos tales como barras labiales mediante análisis directo de la muestra sólida, reportando resultados comparables a los obtenidos mediante ICP-MS con digestión previa de la muestra (35).

V.2. PARTE EXPERIMENTAL

V.2.1. Instrumentación

Se utilizó un espectrómetro de absorción atómica de fuente continua de alta resolución (HR-CS AAS) ContrAA 700 de Analytik Jena AG (Jena, Alemania). Este instrumento está equipado con una lámpara de arco corto de xenón como fuente de radiación, un monocromador de doble echelle de alta resolución y un detector de matriz de dispositivo acoplado a carga lineal con 588 píxeles, 200 de los cuales se utilizan para monitorear la señal analítica y para la corrección de fondo (Zeeman). El instrumento está provisto de un atomizador de grafito calentado transversalmente. Se utilizaron exclusivamente tubos de grafito pirolítico provistos de plataformas. Se trabajó a las longitudes de onda de 217,0005; 324,7540 y 193,6960 nm para las medidas de absorbancia debidas a plomo, cobre y arsénico, respectivamente. Los datos se evaluaron utilizando la absorbancia integrada sumada en tres píxeles mediante el software ASPECT CS v.5.1 proporcionado por Analytik Jena. El gas de purga fue argón de alta pureza (Messer, España).

V.2.2. Reactivos

Se utilizó agua pura obtenida con un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.). Para evitar la contaminación, el material de vidrio se lavó con ácido nítrico al 10 % (v/v) y después se aclaró con agua antes de su uso. Las disoluciones estándar de plomo, arsénico y cobre fueron proporcionadas por Merck (Darmstadt, Alemania) a la concentración de 1000 µg/mL y preparadas a partir de los correspondientes patrones de H_3AsO_4, $Cu(NO_3)_2*3H_2O$ y $Pb(NO_3)_2$, todos en presencia de ácido nítrico 0,5 M. Los disolventes acetona y ANC también fueron suministrados por Sigma. El modificador químico utilizado fue $Pd(NO_3)_2$ de 10 g/L del que se prepararon las diluciones necesarias. El ácido nítrico (65%) se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania). Las disoluciones de trabajo de Pb, Cu y As se prepararon en un medio que contenía una mezcla de acetona:ACN 3:2 (v/v).

V.2.3. Muestras y procedimiento de preparación de la muestra

Para la determinación de los tres metales estudiados en los tres formulados de uñas (cuyos ingredientes fueron proporcionados por Suchel Camacho S.A y el CBQ) se propone el procedimiento descrito en la Figura V.2. Se pesan 0,0125 g de Furvina® y se

enrasan en un matraz de 5 mL con los tres colores de las lacas (transparente, rojo y blanco), a estos formulados le llamamos (FORMULADO 1). Se pesan entonces 0,2 g del formulado 1 en un matraz de 5 mL y se enrasan con una mezcla de acetona:ACN (3:2 v:v) (FORMULADO 2). Para conocer si los metales estaban presentes en el IFA o en los excipientes, se realizó el mismo procedimiento al IFA Furvina®.

Furvina®

Pesar 0,0125 g de Furvina®

Enrasar hasta 5 mL con las 3 lacas (2500 ppm)

FORMULADO 1

Pesar 0,2 g de Formulado 1 de cada color

Enrasar hasta 5 mL con mezcla acetona:ACN (3:2 v:v).

C_{rojo}=101,3155 ppm

C_{transp}=98,8145 ppm

C_{blanco}=102,1115 ppm

FORMULADO 2

Figura V.2. Procedimiento para la preparación de los formulados 1 y 2.

V.2.4. Procedimiento para la determinación de plomo

A partir de la disolución estándar comercial de Pb de 1000 µg/mL se preparó una disolución de concentración intermedia de 10 µg/mL con una mezcla de acetona:ACN (3:2), de la que se tomaron diferentes alícuotas para preparar las disoluciones estándar (0, 25, 50, 75 y 100 ng/mL) para la obtención de la curva de calibración con una mezcla de acetona:ACN (3:2). La Tabla V.4 muestra las condiciones experimentales seleccionadas para la determinación de plomo en las muestras.

Tabla V.4. Parámetros instrumentales y programa de calentamiento propuesto para la determinación de plomo

Longitud de onda (nm)	217,0005		
Rendija (nm)	0,7		
Atomizador	Transversal con plataforma de L'Vov		
Corrección de fondo	Efecto Zeeman		
Volumen de muestra inyectado (µL)	10		
Modificador químico	-		
Programa de calentamiento			
Etapa	**Temperatura (ºC)**	**Rampa (ºC/s)**	**Mantenido (s)**
Secado 1	80	20	15
Secado 2	110	3	30
Pirólisis 1	400	15	10
Pirólisis 2	700	30	10
Atomización[a]	1700	1700	5
Limpieza	2450	500	4

[a] Flujo de argón= 0 mL/min

V.2.5. Procedimiento para la determinación de arsénico

A partir de la disolución estándar comercial de As de 1000 µg/mL se preparó una disolución intermedia de concentración 10 µg/mL con una mezcla acetona:ACN (3:2). De esta disolución intermedia fueron tomadas distintas alícuotas para preparar las disoluciones de calibración de concentraciones 0, 40, 100, 160 y 200 ng/mL. La Tabla V.5 incluye las condiciones experimentales aplicadas para la determinación de arsénico.

Tabla V.5. Parámetros instrumentales y programa de calentamiento propuesto para la determinación de arsénico

Longitud de onda (nm)	193,6960		
Rendija (nm)	0,7		
Atomizador	Transversal con plataforma de L'Vov		
Corrección de fondo	Efecto Zeeman		
Volumen de muestra inyectado (µL)	10		
Modificador químico	5 µL de Pd(II) de 1000 µg/mL		
Programa de calentamiento			
Etapa	**Temperatura (ºC)**	**Rampa (ºC/s)**	**Mantenido (s)**
Secado 1	80	5	5
Secado 2	120	5	40
Pirólisis 1	300	15	10
Pirólisis 2	600	30	5
Atomización[a]	1400	1400	5
Limpieza	2450	500	4

[a] Flujo de argón= 0 mL/min

V.2.6. Procedimiento para la determinación de cobre

A partir de la disolución estándar comercial de Cu de 1000 µg/mL se preparó una disolución intermedia de concentración 10 µg/mL. De esta disolución intermedia fueron tomadas alícuotas de diferente volumen para preparar los estándares de la curva de calibración a concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 80 ng/mL enrasando con una mezcla de acetona:ACN (3:2). La Tabla V.6 muestra los parámetros instrumentales y el programa de horno aplicados para la determinación de cobre.

Tabla V.6. Parámetros instrumentales y programa de calentamiento propuesto para la determinación de cobre

Longitud de onda (nm)	324,7540
Rendija (nm)	0,7
Atomizador	Transversal con plataforma de L'Vov
Corrección de fondo	Efecto Zeeman
Volumen de muestra inyectado (µL)	10
Modificador químico	-

Programa de calentamiento

Etapa	**Temperatura (ºC)**	**Rampa (ºC/s)**	**Mantenido (s)**
Secado 1	80	6	10
Secado 2	110	5	10
Pirólisis 1	350	50	10
Pirólisis 2	1100	300	10
Atomización[a]	2300	2600	5
Limpieza	2450	500	4

[a] Flujo de argón= 0 mL/min

V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sensibilidad proporcionada por la instrumentación HR-CS puede ser modificada en función del número de pixels a procesar para la medida (27). Dado que las concentraciones esperadas de los metales en estudio eran bajas, para obtener una alta sensibilidad se utilizó la suma de las señales obtenidas en tres píxeles (CP-1, CP y CP+1, donde CP significa el píxel central) para todas las mediciones realizadas con el espectrómetro empleado (36).

V.3.1. Selección de los programas de calentamiento

Las distintas etapas de los programas de horno aplicados se estudiaron para los tres metales. Teniendo en cuenta la naturaleza viscosa de la muestra se concluyó en la necesidad de llevar a cabo su secado a través de dos etapas, para evitar salpicaduras y la consiguiente pérdida de reproducibilidad. Del mismo modo, se comprobó que la aplicación de dos etapas sucesivas de pirólisis reportaba una mayor repetitividad en las

señales de absorbancia finalmente obtenidas. Las temperaturas que proporcionaron la mayor sensibilidad para plomo, arsénico y cobre fueron de 1700, 1400 y 2300 ºC, respectivamente, siendo la temperatura alcanzada a máxima velocidad y mantenida durante 5 s. Los programas finalmente adoptados para plomo, arsénico y cobre aparecen detallados en las Tablas V.4, V.5 y V.6, respectivamente.

La determinación de arsénico en matrices complejas resulta difícil por su tendencia a formar compuestos que causan pérdidas de analito de forma previa a su atomización. Para evitar este problema, la bibliografía muestra el uso de paladio, níquel o una mezcla de paladio y níquel como modificadores de matriz (37). En nuestro caso, la adición de 5 µL de paladio como modificador de matriz proporcionó las máximas señales, añadiéndose antes de cada inyección de muestra con una etapa de secado posterior.

V.3.2. Validación de los métodos analíticos

Se obtuvieron las curvas de calibración para los tres analitos mediante inyección de 10 µL de las disoluciones estándar preparadas a niveles de concentración de hasta 100, 200 y 80 ng/mL en una mezcla de acetona:ACN (3:2) para plomo, arsénico y cobre, respectivamente.

Las Figuras V.3, V.4 y V.5 muestran las curvas de calibración obtenidas para los tres metales, donde se observa una muy buena correlación lineal entre las absorbancias y las concentraciones.

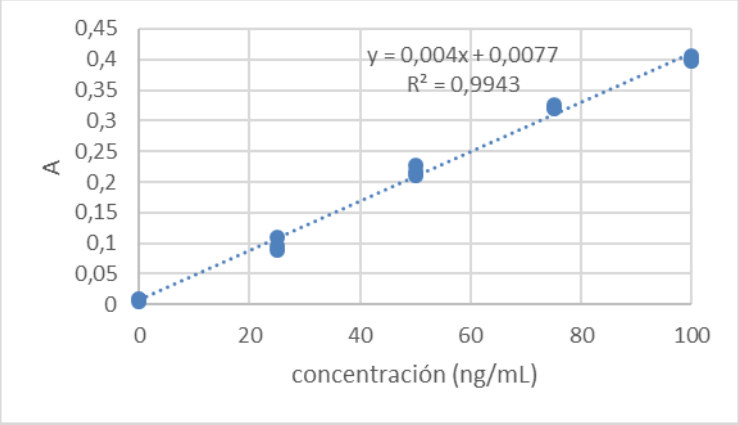


Figura V.3. Curva de calibración para Pb.

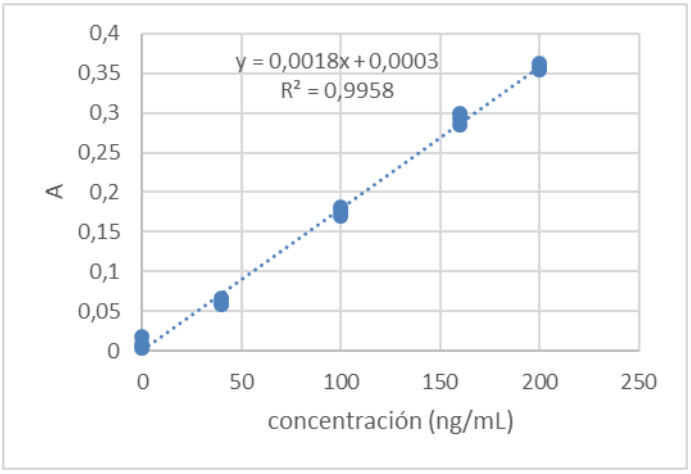
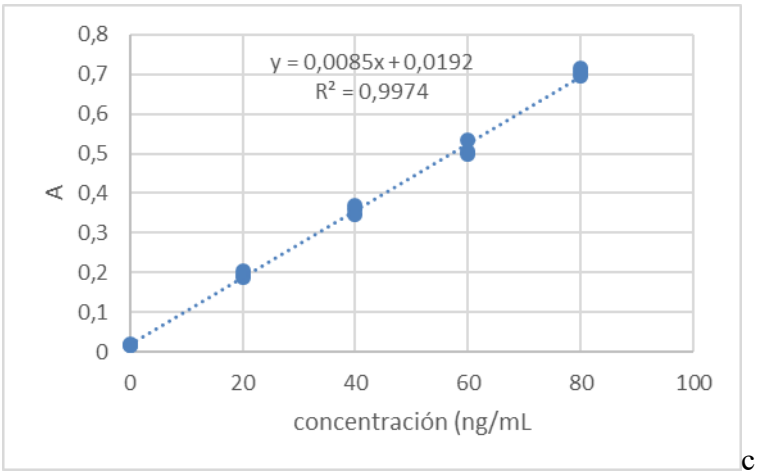


Figura V.4. Curva de calibración para As.



c

Figura V.5. Curva de calibración para Cu.

Los métodos cumplen con todos los criterios evaluados, lo que indica que la técnica analítica es lineal en los intervalos de concentraciones estudiados, observándose una alta correlación entre la absorbancia y la concentración del correspondiente metal (observar valores de R^2).

Los LDs se calcularon considerando 3 veces la desviación estándar de la ordenada en el origen de las rectas de calibrado y dividiendo por la correspondiente pendiente. Así, los valores de LD fueron de 5,8; 0,5 y 6,8 ng/mL para Pb, As y Cu, respectivamente. Asimismo, los límites de cuantificación (LQ) se obtuvieron considerando 10 veces la desviación estándar de la ordenada en el origen dividido por la pendiente de calibración, siendo los valores obtenidos de 19, 1,7 y 22,5 ng/mL para Pb, As y Cu, respectivamente.

Los estudios de repetitividad establecen que los coeficientes de variación disminuyen a medida que aumenta la concentración de las muestras, siendo en todos los casos inferior al 5%.

La exactitud de los procedimientos se evaluó a través de estudios de recuperación, mediante análisis de muestras de lacas previamente fortificadas con los analitos al nivel de sus LQs. El porcentaje de recuperación obtenido para los tres metales fue de 102,6; 98,1 y 100,1% para Pb, As y Cu, respectivamente, encontrándose dentro del rango 97-103%, reportado como criterio de aceptación para este parámetro (25). El valor del estadístico t_{exp} resultó menor que el tabulado (t_{tab}) para un 95% de confianza, criterio que avala la veracidad del método, por lo que se demuestra que no existían diferencias significativas entre el valor medio experimental y el esperado.

V.3.3. Análisis de las muestras

Una vez validados los métodos de análisis se procedió al análisis de las muestras de laca transparente, roja y blanca, así como del IFA Furvina® bajo las condiciones experimentales seleccionadas. En todos los casos la muestra estudiada corresponde al formulado 2 (detallado en el apartado V.2.3).

La Tabla V.10 muestra las concentraciones medias encontradas de los tres analitos para cada muestra junto con su desviación estándar asociadas, así como los límites máximos permisibles (LMP) según el manual del registro sanitario del 2007 para cosméticos del INHEM (3). Se puede apreciar que la concentración de cada elemento en las lacas de uñas se encuentra por debajo de los LMPs según el citado manual del registro sanitario de 2007.

Tabla V.7. Contenidos de Pb, Cu y As para los formulados para las uñas y el IFA Furvina® así como el LMP.

	Laca transparente	Laca roja	Laca blanca	IFA Furvina®	LMP
c(Pb) µg/g	1,39 ±0,09	1,66 ±0,05	1,45 ±0,07	0,13±0,02	2
c(As) µg/g	0,00 ±0,01	0,15 ±0,06	0,12 ±0,03	0,00±0,002	2
c(Cu) µg/g	1,47±0,06	1,41 ±0,05	1,53 ±0,07	0,51 ±0,02	10
Cumplimiento	cumple	cumple	cumple	cumple	-

Al comparar los contenidos de los metales en las distintas lacas se aprecia un nivel ligeramente superior para Pb en la laca roja. No se detectan diferencias significativas para los niveles hallados de cobre en las tres lacas, mientras que el contenido de arsénico resultó ser sensiblemente menor en la laca transparente. Se realizó el análisis de varianza unidireccional por rangos de Kruskal-Wallis, resultando que existen diferencias entre los grupos de plomo, arsénico y cobre obteniendo valores de p=0,0216; p=0,0303 y p=0,0273, respectivamente, para cada metal.

Por otro lado, al relacionar el contenido medio de los metales en las lacas y en el IFA Furvina® se puede decir que, de manera general, el IFA aporta en cada caso aproximadamente un 9% para el Pb, un 36% para el Cu y un 45% para el As; adjudicándole el resto del contenido metálico a los componentes del excipiente laca (roja, transparente y blanca).

Comparando los valores de concentración obtenidos para cada una de las lacas con los LMPs, se puede decir que las lacas son aptas para su comercialización según el apartado de límite de contaminantes metálicos en el producto del manual del registro sanitario del 2017 (3,6,38).

V.4. CONCLUSIONES

La determinación de plomo, arsénico y cobre en las lacas de uñas transparente, roja, blanca y en el IFA Furvina® se ha llevado a cabo mediante HR-CS ETAAS, alcanzando altos niveles de sensibilidad, precisión y exactitud. Los valores de los coeficientes de variación para el estudio de precisión en todos los casos fueron inferiores al 5% y en cuanto a la exactitud los valores se encontraron en el rango 97-103%, reportado como criterio de aceptación para este parámetro.

Los contenidos encontrados en las lacas de uñas fueron en todos los casos inferiores a los LMPs, por lo que los productos pueden considerarse como seguros y considerados como aptos en cuanto a los metales bajo estudio para su comercialización según las normal del INHEM.

V.5. BIBLIOGRAFIA

1. Aleluia ACM, de Souza Nascimento M, dos Santos AMP, dos Santos WNL, Júnior A de FS, Ferreira SLC. Analytical approach of elemental impurities in pharmaceutical products: a worldwide review. Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy. 2023;205:106689.
2. Reglamento de la Comunidad Europea (CE) No 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos.
3. Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología. Registro sanitario de alimentos, cosméticos, juguetes y otros productos de interés sanitario: regulaciones e indicadores. 6ª edición. La Habana, Cuba. 2017.
4. Agencia Europea de Medicamentos (EMA). https://www.ema.europa.eu/. Último acceso: mayo, 2024.
5. US Food and Drug Administration. Bacteriological analytical Manual. Edition 8, Revision A, 1998.
6. Gómez RF, Martínez MVL, Almaral OV, Castro NF, Pino AC, Alfonso AC, et al. Estado del Registro Sanitario de Cuba para alimentos y cosméticos. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. 2009;19(1):115–23.
7. TSI Life Science by TECNOSOLUCIONES. 2021. https://www.tecnosolucionescr.net/blog/303-presencia-de-metales-pesados-en-los-productos-cosmeticos. Último acceso: Agosto, 2024.
8. González Minero FJ, Bravo Díaz L. Historia y actualidad de productos para la piel, cosméticos y fragancias. Especialmente los derivados de las plantas. Ars Pharmaceutica. 2017;58(1):5–12.
9. Laguna Gozme LS, Ricaldi Casas ED. Determinación de plomo y arsénico en lápices labiales de diferentes marcas que se expenden en Lima Metropolitana. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 2017.
10. Gallegos W, Vega M, Noriega P. Espectroscopia de absorción atómica con llama y su aplicación para la determinación de plomo y control de productos cosméticos. La Granja. 2012;15(1):19–29.

11. Balaram V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals–Status, challenges and moving frontiers. TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 2016;80:83–95.
12. Un enfoque de mitigación de riesgos para detectar y cuantificar los metales en los medicamentos. https://www.isoboxsystems.com/mitigacion-de-riesgos-para-detectar-y-cuantificar-los-metales-en-los-medicamentos/ Último acceso: mayo, 2024.
13. EMEA/CHMP/SWP/4446/2000. Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts or metal reagents. 2008.
14. United States Pharmacopeia. General chapter: Heavy metals. 37-NF32. 2014. https://www.usp.org/impurities/elemental-impurities-updates. Último acceso: julio, 2024.
15. European Pharmacopeia, General chapter 2.4.8. Heavy metals. Vol. 8.1. 2014.
16. ICH Q3D Elemental impurities - Scientific guideline. 2022. https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3d-elemental-impurities-scientific-guideline. Último acceso: julio, 2024.
17. Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. Toxicological Sciences. 2011;123(2):305–32.
18. Sacoto AV, Zamora QMEF. Material Educativo. Facultad de Ciencias Químicas Carrera de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.
19. Rosales Arroyo MJ, Tacunan Riveros EL. Determinación de arsénico y mercurio en sombras para ojos de diferentes marcas que se importan desde China. Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico. Universidad nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú, 2019.
20. Directiva Europea 98/83/EC de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. 1998.
21. Hepp NM, Mindak WR, Gasper JW, Thompson CB, Barrows JN. Survey of cosmetics for arsenic, cadmium, chromium, cobalt, lead, mercury, and nickel content. Journal of Cosmetic Science. 2014;65(3):125.
22. Delgado CJ. Determinación de la concentración de plomo por espectrofotometría de absorción atómica en sombras de ojos que se comercializan en los mercadillos de Tacna, 2014. Revista Médica Basadrina. 2018;12(1):23–7.

23. Ramírez A V. El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo. En: Anales de la Facultad de Medicina. UNMSM. Facultad de Medicina; 2005. p. 57–70.
24. El cobre, el activo cosmético que quiere competir con el retinol. 2023. https://www.industriacosmetica.net/noticias/el-cobre-el-activo-cosmetico-que-quiere-competir-con-el-retinol-ZkVda. Último acceso: junio, 2024
25. Janchevska K, Stafilov T, Memed-Sejfulah S, Bogdanoska M, Ugarkovic S, Petrushevski G. ICH Q3D based elemental impurities study in liquid pharmaceutical dosage form with high daily intake–comparative analysis by ICP-OES and ICP-MS. Drug Development and Industrial Pharmacy. 2020;46(3):456–61.
26. McCarthy GJ. Walsh, Alan-Biographical entry. A history of atomic absorption spectrometry" Analytical Chemistry “Encyclopedia of Australian Science. 2012.
27. Resano M, Flórez MR, García-Ruiz E. High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple lines. A critical review of current possibilities. Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy. 2013;88:85–97.
28. Welz B, Morés S, Carasek E, Vale MGR, Okruss M, Becker-Ross H. High-resolution continuum source atomic and molecular absorption spectrometry—a review. Applied Spectroscopy Reviews. 2010;45(5):327–54.
29. Resano M, García-Ruiz E. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: Is it as good as it sounds? A critical review. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2011;399:323–30.
30. Pupyshev AA. The high-resolution continuum source atomic absorption spectrometers. Analitika i kontrol. 2008;12(3–4):64–91.
31. Barbosa UA, dos Santos IF, dos Santos AMP, Ferreira SLC. Determination of lead in iron supplements by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. Analytical Letters. 2016;49(6):799–807.
32. Aleluia ACM, de Santana FA, Brandao GC, Ferreira SLC. Sequential determination of cadmium and lead in organic pharmaceutical formulations using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. Microchemical Journal. 2017;130:157–61.
33. Maziero M, Adolfo FR, Camera Leal G, de Carvalho LM, Nascimento PC do, Viana C. Elemental analysis of pharmaceutical products for chronic kidney

disease by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR–CS GFAAS). Analytical Letters. 2022;55(1):109–22.

34. Krawczyk M. Determination of macro and trace elements in multivitamin dietary supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2014;88:377–84.
35. Lemaire R, Bianco D Del, Garnier L, Beltramo JL. Determination of lead in lipstick by direct solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: comparison of two digestion methods. Analytical Letters. 2013;46(14):2265–78.
36. Feichtmeier NS, Ruchter N, Zimmermann S, Sures B, Leopold K. A direct solid sampling analysis method for the detection of silver nanoparticles in biological matrices. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2016;408:295–305.
37. Welz B, Sperling M. Atomic absorption spectrometry. John Wiley & Sons; 2008.
38. Reglamento de Registro y Control Sanitario. Ministerio de Salud, Ecuador, Quito. 2013;(0777):1–16.

CAPÍTULO VI

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LACAS DE UÑAS A DOSIS ÚNICA DÉRMICA Y DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS IRRITANTES Y/O CORROSIVOS DÉRMICOS EN CONEJOS

VI.1. INTRODUCCIÓN

VI.1.1. Productos cosméticos

La utilización de productos de cosmética decorativa está muy extendida en nuestra sociedad. Según la actual reglamentación, un producto cosmético es toda sustancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano con el fin de perfumarlas, protegerlas, para mantener su buen estado, modificar su aspecto y corregir los olores corporales (1).

Los productos cosméticos decorativos o maquillajes cosméticos son aquellos cuya función es dar color o modificar el color de la zona corporal en la que van a ser aplicados. Es por esta razón que este tipo de preparados está formado por dos componentes esenciales, la parte activa compuesta por pigmentos o colorantes y el vehículo o excipiente (2).

Los colorantes utilizados en este tipo de cosméticos deben presentar unas características comunes tales como figurar en las listas permitidas de la legislación cosmética vigente (1,3), ser dermatológicamente inocuos, cumplir los requisitos de pureza química y presentar el tamaño de partícula adecuado para su incorporación (1).

Las lacas de uñas son una suspensión de pigmentos en un sistema tixotrópico, formado por una sustancia filmógena, un plastificante, una resina y un sistema disolvente, los cuales deben ser dermatológicamente inocuos para las uñas y las cutículas. Debe poder aplicarse con facilidad, poseer un efecto brillo, cubrir la superficie de la uña uniformemente, adherirse en las condiciones normales de uso, tener un efecto duradero y que no tienda a cuartearse. El color de este cosmético no debe variar en el tiempo, tanto en su aplicación como en el frasco en que está contenido. Debe secarse con facilidad y ser eliminado con un apropiado disolvente sin dejar manchas ni decolorar la uña (1).

En relación con la preparación de maquillajes, la tendencia actual es proveerlos de propiedades adicionales de forma que sean un producto de continuidad en el tratamiento de la piel. Los activos más empleados son del tipo antienvejecimiento, ya sean vitaminas o derivados vegetales (1). También se añaden sustancias con efecto tensor, tanto de origen vegetal (proteínas y sus derivados) como de origen sintético, así como activos hidratantes o sustancias con propiedades emolientes. En maquillajes para adolescentes pueden encontrarse activos seboreguladores o principios activos específicos para este grupo de consumidores (1).

En el CBQ de Cuba se produce el IFA Furvina®, que posee comprobada acción bactericida y fungicida de amplio espectro. Dicho componente posee una potente acción contra hongos del género *Candida*, principales micro-organismos responsables de la producción de la patología conocida como onicomicosis (4–7), que produce una gradual erosión de la estructura de la uña y una pérdida de la apariencia estética muy indeseable para el humano que la padece.

La empresa de cosméticos cubana Suchel Camacho S.A. mantiene un proyecto de investigación con el CBQ para desarrollar lacas de uñas con el IFA Furvina® añadido y así poder contar con un maquillaje cosmético que combine la acción estética de la laca con los efectos antifúngicos de dicho IFA.

Para el desarrollo de nuevos productos, incluidos los cosméticos en países como Cuba, generalmente es necesario evaluar la seguridad toxicológica preclínica de estos como medida de estimación de los posibles riesgos por exposición en humanos (8).

Los estudios toxicológicos constituyen un paso de la ruta crítica de un nuevo producto, para su establecimiento sobre bases científicamente sustentadas, que aporten los criterios de seguridad, consumo y disposición (9).

En el caso de las evaluaciones de nuevos productos, la EPA ha emitido un grupo de guías de ensayos a través de la Oficina de Seguridad Química y Prevención de la Contaminación (OCSPP) para su investigación y desarrollo (10). Estas metodologías incluyen las guías de ensayos toxicológicos y una de las primarias en orden de ejecución es la de determinación de la toxicidad dérmica a dosis única en mamíferos de laboratorio (10). La determinación de los efectos en la piel de mamíferos es útil en la determinación y evaluación de las características de una sustancia donde se prevé la exposición por dicha vía. La información derivada de dicho ensayo servirá para indicar la existencia de posibles riesgos producto de exposición de la piel a la sustancia de ensayo. Los datos del estudio serán requeridos para sustentar el registro del producto, tanto en su manufacturación como en su comercialización y uso final.

La finalidad del estudio presentado en este Capítulo es la de contribuir a elucidar una de las evaluaciones de seguridad primarias en la investigación y desarrollo de nuevos productos, en este caso de tres lacas para uñas conteniendo Furvina® que se fabricarán en la Empresa Suchel Camacho S.A. En este estudio se propone evaluar la toxicidad a dosis única dérmica en conejos, determinar los efectos irritantes y/o corrosivos dérmicos en conejos, de tres lacas conteniendo el IFA Furvina® para el tratamiento de las uñas.

VI.1.2. Estudios de seguridad

Los estudios de seguridad de un producto se realizan para salvaguardar la seguridad del paciente; es decir, detectar y evitar todo riesgo o posible daño para el ser humano.

Estos estudios deben dar respuesta a las siguientes cuestiones:

- Caracterización de los efectos tóxicos y reversibilidad de los mismos.
- Identificación de los órganos diana.
- Determinación de la relación dosis-respuesta: qué dosis producen qué efectos.
- Establecimiento del nivel de efectos adversos no observables (NOAEL).

Así mismo, se deben correlacionar los efectos tóxicos con la exposición sistémica al compuesto mediante la toxicocinética e identificar biomarcadores para la estimación de una dosis inicial segura y un diseño adecuado en los futuros ensayos clínicos en humanos en el caso de medicamentos.

Se han establecido numerosas guías para identificar la potencial toxicidad del candidato tan temprano como sea posible y armonizar los requerimientos, en cuanto al tipo y duración de estudios necesarios para cada fase del desarrollo de un medicamento. Por ello, los estudios preclínicos de seguridad se consideran regulatorios y se deben llevar a cabo siguiendo determinados requisitos, de acuerdo con las guías en vigor y las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

La definición de los ensayos toxicológicos a realizar es altamente dependiente del producto y de su aplicación, así como de la fase clínica a la que tienen que dar cobertura. Existen baterías de ensayos que son de estricto cumplimiento para la solicitud del ensayo clínico y, conforme se va avanzando en la fase clínica, se van incorporando nuevos datos al expediente. Es importante definir exactamente qué se debe hacer y qué no se debe hacer, caso a caso, así como el momento y las condiciones que aplican para no desperdiciar recursos y tiempo.

En la evaluación toxicológica de nuevas sustancias se emplean baterías de ensayos en diferentes especies animales, que comprenden modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (11,12). La valoración armónica de los resultados de estos estudios permite llegar a un criterio más integral de la toxicidad de la sustancia evaluada y sus posibles consecuencias para el ser humano.

Con el objetivo de garantizar la adecuada conducción e interpretación de los estudios toxicológicos y armonizar internacionalmente los requisitos de registro sanitario, el ICH define criterios para ser considerados en el diseño de los diferentes

estudios toxicológicos, con base en la evidencia aportada por años de investigación en el campo de la toxicología, de forma tal que se garanticen resultados confiables y reproducibles (13,14).

En Cuba, el INHEM es el órgano regulador que garantiza la seguridad de los cosméticos. El manual del registro sanitario de 2017 contiene la compilación sobre las regulaciones e indicadores requeridos en lo referente a requisitos, metodología de evaluación y dictámenes de los productos objeto de registro sanitario para autorizar su comercialización y libre venta en el país desde el punto de vista sanitario. En su anexo 9 este manual incluye las pruebas toxicológicas que deben realizarse en productos cosméticos para que puedan ser registrados, el test de irritabilidad dérmica y el test de irritabilidad oftálmica (si lo requieren) (8).

VI.1.3. Fundamentación del biomodelo a emplear

Los conejos pertenecen a la familia *Leporidae* (lepóridos), la cual engloba a más de 40 especies, siendo el conejo europeo la única entre ellas que ha sido objeto de domesticación. El conejo común o conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus)* es una especie de mamífero lagomorfo de la familia *Leporidae*, y el único miembro actual del género *Oryctolagus*.

Oryctolagus cuniculus es una especie usada en modelos experimentales científicos debido a su buen temperamento, a su fácil manejo, cuidado y reproducción. La raza más usada y estudiada es la Nueva Zelanda, en concreto la variedad del conejo Blanco, que como bien indica su nombre, es albina. La fisiología general de los conejos es similar a la de los seres humanos y, al igual que los ratones y las ratas, sufren muchas enfermedades con equivalentes en el humano (8).

Actualmente se considera un biomodelo multipropósito general y en cifras globales de uso muy frecuente, después de las ratas y los ratones, que son los más utilizados. Se utiliza en toxicología, inmunología, oncología, reproducción, nutrición y producción de anticuerpos policlonales (8). Específicamente en la rama de la toxicología evaluativa, experimental y/o preclínica, continúa siendo la especie no roedora recomendada para la evaluación de productos químicos y para los estudios de toxicidad dérmica (8) y de reproducción (15).

VI.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

VI.2.1. Instrumentación

Estufa (Binder ED 115 – 114 L, Tuttlingen, Alemania). Micrótomo (Accu-Scope Gem Scope 3052-GEM, Beijing, China). Baño termostatizado (Julabo ED THERM 60, Seelbach Alemania). Procesador de tejidos (Sakura, model RH-128, AlphenaandenRijn, Países Bajos). Balanza técnica digital (Sartorius, CP225D, Seelbach, Alemania). Microscopio (ZUZI, UCMOS03100KPA, Barcelona, España). Autoclave vertical (Selecta, Autester ST Dry pv III 50L 4002516, Barcelona, España). Estereoscopio o lupa (Olympus optical CO., LTD, Tokyo, Japón). pH-metro (Suizmed PHSJ – 3F, Jiangsu, China). Máquina de pelar y rasuradora (LJXiioo B08H875M5W, Wuhan, China).

VI.2.2. Reactivos

El etanol se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) y agua estéril o solución salina fisiológica provienen del Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN, La Habana, Cuba).

VI.2.3. Características de la instalación de ensayo

Los laboratorios contarán con sistema de barreras convencional, tipo prebox y box, disposición de las instalaciones para no mezclar los flujos de materiales limpios con los sucios, filtro sanitario para el cambio de ropa del personal, sistema de climatización por acondicionadores de aire y sistema de luz artificial que asegurará la iluminación suficiente para el bienestar de los animales y el desarrollo del ensayo. Para cumplir con los sistemas de barreras, el personal encargado realizará los accesos y salidas de la zona de experimentación según PNO I.9.014 “Acceso y salida al área de experimentación de conejos” (16). Los locales contarán con superficies lisas a costa de carpintería de cristal y aluminio, y dispondrán de estantes específicos para alojar los animales en ensayo.

VI.2.4. Muestras y procedimiento analítico

El protocolo utilizado se desarrolló teniendo en cuenta lo establecido por la EPA estadounidense para la toxicidad aguda dérmica y la irritabilidad dérmica (17,18). En el caso de la irritabilidad oftálmica no se desarrolló el ensayo ya que se consideró invasivo

para el animal debido a la composición de las lacas y su efecto en el ojo, siguiendo así el principio de bioética de los animales y el principio de las 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento).

Para realizar los ensayos de la toxicidad aguda dérmica, el producto en prueba se aplicó en una dosis única elevada a la piel de animales experimentales. Posteriormente, se realizan observaciones de efectos y mortalidad. A los animales que mueran durante la prueba se les practicará necropsia, y en la conclusión de la prueba, los animales supervivientes se sacrificarán y se les practicará igualmente necropsia. Se valorará la naturaleza de los efectos tóxicos observados y se realizará un análisis anatomopatológico de los animales.

En el caso de la irritabilidad dérmica, las lacas en estudio se aplicarán en un volumen único en la piel rasurada de varios conejos de laboratorio (0,5 mL). Cada animal servirá como su propio control de comparación (el área de aplicación se comparará con las áreas de piel adyacentes no tratadas). Los signos de irritación graduados como edema y eritema serán leídos y archivados a intervalos específicos para su posterior descripción e interpretación. La duración del estudio será suficiente para permitir una evaluación de la reversibilidad de los efectos observados, pero no excederá los 14 días. Las 3 lacas de uñas de ensayo se utilizarán al 0,25%.

Las muestras fueron codificadas como laca 1 (laca transparente), laca 2 (laca roja) y laca 3 (laca blanca).

VI.2.4.1. Sistema de ensayo

Clasificación taxonómica:

- Reino: Animalia, animales.
- Subreino: Eumetazoa.
- Filo: Chordata.
- Subfilo: Vertebrata.
- Clase: Mamalia.
- Subclase: Theria.
- Orden: Lagomorpha.
- Familia: *Leporidae*.
- Género: *Oryctolagus*.
- Especie: *Oryctolagus cuniculus*.

Se realizaron los ensayos en el CBQ, utilizando adultos jóvenes de la especie *Orictolagus cuniculus,* del cruce F1 entre la raza albina Nueva Zelanda Blanco y la Semi Gigante Blanco, suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba), de ambos sexos, con un peso entre 1 y 2 kg. El peso se verificó con una báscula de plataforma electrónica, ubicada en el mismo local de tenencia y alojamiento de los animales. Las hembras eran nulíparas y no embarazadas.

Todos los animales presentaron un adecuado desarrollo somatotrófico y la piel no tenía alteración, trauma o enfermedad alguna. La variación de peso de los animales utilizados en el ensayo no excedió el ±20% de la media del peso para cada sexo.

Sexo: Se utilizó igual número de animales de cada sexo.

Número: Se utilizaron diez animales, cinco animales de cada sexo para cada laca. Como se evaluaron 3 lacas, se utilizaron en total 15 machos y 15 hembras.

VI.2.4.2. Condiciones de mantenimiento y alimentación de los animales

Condiciones de alojamiento: Los animales se mantuvieron en módulos de alojamiento individual para conejos (6 animales/módulo), de fondo sólido con agujeros para permitir la caída en bandejas metálicas de las deposiciones de los animales.

Descripción e identificación de la dieta y el agua: Los animales se alimentaron de forma continua con dieta de pienso comercial concentrado y peletizado, certificado para conejos (CMO 1400), producida en el CENPALAB, según PNO I.9.E21 "Alimentación de rutina para conejos" (19). El agua de bebida que se les suministra es apta para el consumo y fue suministrada según PNO I.9.E20 "Suministro de agua de bebida para conejos" (20).

Suministro de agua y alimentos: El acceso al agua y los alimentos fue *ad libitum*, durante todo el estudio.

Alojamiento y adaptación: Se efectuó la recepción de los animales según PNO I.GB.E01 "Recepción de animales de laboratorio para ensayos" (21). Se inspeccionó el estado de salud de la colonia según PNO I.GB.T01 "Examen clínico de animales de laboratorio" (22) y PNO I.GB.T14 "Manipulación del conejo" (23), así como otros requisitos preestablecidos en el diseño experimental para aceptar su paso a la adaptación en el local de alojamiento.

Una vez aceptados, los animales fueron alojados en los módulos para conejos habilitados sanitariamente e identificados individualmente mediante tarjeta en la puerta

del compartimento. Se aloja un animal por división y cada módulo puede alojar hasta 6 animales. Los conejos son sometidos a una adaptación, PNO I.9.E22 "Adaptación de conejos" (24), de 7 a 14 días de duración en las mismas condiciones ambientales que para el ensayo definitivo. Se inspeccionan diariamente, al final de dicho proceso se pesan según PNO I.GB.T04 "Pesaje de animales de laboratorio" (25) y se escogen los animales siguiendo los criterios de selección según PNO I.9.E04 "Aceptación de roedores y conejos de laboratorio para estudios definitivos" (26). Sólo los animales que son certificados como saludables pasan al ensayo definitivo. En caso de encontrar animales moribundos o muertos se procede a su análisis según PNO I.GB.E03 "Animales moribundos y encontrados muertos" (27) y posteriormente se les realiza necropsia según PNO I.9.T06 "Necropsia en roedores y conejos de laboratorio" (28). En el caso de encontrar animales moribundos se les practica, previo a la necropsia, el sacrificio por métodos eutanásicos según PNO I.GB.T12 "Eutanasia de roedores y conejos de laboratorio. Método de concusión" (29).

El cambio de bandejas, recambio y fregado de pomos de agua de bebida se realiza diariamente durante todo el estudio, según PNO I.GB.E02 "Alojamiento de conejos en módulos de fondo sólido" (30).

Procedimiento de identificación: Cada compartimento de cada módulo se identificó mediante una tarjeta colocada en el lugar correspondiente de la puerta de rejilla, donde se recoge una información resumida pero orientativa acerca del animal que aloje, según PNO I.GB.014 "Identificación de módulos para conejos" (31).

Aleatorización: Los animales se asignaron aleatoriamente a los grupos experimentales utilizando la metodología propuesta en el PNO I.GB.T06 "Aleatorización de biomodelos experimentales" (32).

Sacrificio o eutanasia: Los animales al finalizar el estudio se sacrificaron mediante el método eutanásico de concusión, según PNO I.GB.T12 "Eutanasia de roedores y conejos de laboratorio. Método de concusión" (29). Se evitó todo sufrimiento innecesario y se tuvieron en consideración principios y procedimientos bioéticos.

Condiciones ambientales

- Temperatura: 20 ± 3 ºC
- Humedad: 30 a 70%
- Ciclos luz-oscuridad: 12 / 12 horas.
- Intensidad luminosa: 200 a 250 lux.

Dichas variables climáticas se mantendrán mediante aire acondicionado y luminarias fluorescentes, teniendo en cuenta los procedimientos descritos en PNO I.GB.003 "Control de variables ambientales" (33).

Limpieza y desinfección: Durante todo el tiempo del estudio se mantuvieron las superficies de trabajo y los locales limpios y desinfectados con etanol al 70%, según PNO I.9.015 "Limpieza en el área de experimentación de conejos" (34). Previo al comienzo del estudio, los materiales a utilizar se lavaron según PNO I.9.004 "Limpieza y fregado del material para ensayos con animales de laboratorio" (35). Durante el experimento, se tomaron todas las medidas de seguridad personal, como es el lavado frecuente de manos según procedimiento I.GB.004 "Lavado de manos" (36).

Los desechos sólidos generados durante el ensayo se recogieron en bolsas de polietileno colocadas en contenedores adecuados y se mantuvieron en un lugar seco hasta la fecha de traslado para gestión de los desechos, según PNO R.01.006 "Manejo de desecho en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos" (37).

VI.2.4.3. Distribución y formación de grupos experimentales

Los conejos recepcionados, aceptados y seleccionados se utilizaron en los ensayos según PNO I.9.T03 "Estudio de toxicidad a dosis única dérmica en conejos" (38) y PNO I.9.T45 "Estudio de irritabilidad dérmica en conejos" (39). Se conformó un único grupo experimental para cada laca y no fue necesario agregar un grupo control debido a que el área adyacente de piel no tratada de cada animal sirve como control de comparación en cada caso.

A cada grupo experimental utilizado para la toxicidad aguda dérmica se le asignó 5 conejos de cada sexo (Tabla VI.1) y permanecieron en los módulos de alojamiento y bajo las mismas condiciones durante todo el ensayo, mientras que para la irritabilidad dérmica se utilizaron 3 animales del mismo sexo, a los que se aplicó el mismo volumen del producto (ver Vía de administración, dosis, frecuencia y duración), por la misma vía de administración.

Tabla VI.1. Grupos experimentales para la toxicidad aguda dérmica.

Grupo	Cantidad de animales y sexo	Dosis
Laca 1	5 Hembras 5 Machos	2000 mg/kg masa corporal
Laca 2	5 Hembras 5 Machos	
Laca 3	5 Hembras 5 Machos	

VI.2.4.4. Vía de administración, dosis, frecuencia y duración

La aplicación de cada producto se llevó a cabo por vía dérmica, según PNO I.9.T47 "Aplicación dérmica en animales de laboratorio" (40). Se aplicó a todos los conejos para la toxicidad aguda dérmica o la irritabilidad dérmica una dosis de 2 g por kilogramo de masa corporal o 0,5 mL del formulado, respectivamente, en el área de piel destinada y rasurada 24 horas antes de la aplicación.

Para proceder al depilado de los conejos para el ensayo se colocaron en *decubito prono* en una superficie plana y con el cuerpo bien extendido. A continuación, se realizó el depilado de la parte dorsal del tronco tratando de no producir ningún daño en la piel. El área a aplicar correspondió a aproximadamente el 10% de la superficie corporal total de cada animal. Esta abarca desde las escápulas u hombros hasta las alas de los *ileum*, y desciende por los flancos hasta aproximadamente la mitad del tronco de cada animal.

La sustancia de ensayo se aplicó uniformemente sobre la superficie preparada de cada animal. La misma se mantiene en contacto con la piel con un apósito de gasa porosa y sujetada con una cinta del mismo material, la cual impide que los animales puedan ingerir la sustancia de ensayo. Para asegurar la permanencia del vendaje en el lugar deseado, se utiliza esparadrapo alrededor del mismo. De ser necesario se utiliza un cepo para evitar la ingestión de la sustancia y aplicar el formulado con seguridad.

La duración de la exposición del formulado en la piel fue de 24 h post-aplicación si se trata de toxicidad aguda dérmica o 4 h en el caso de la irritabilidad dérmica. Al final del período de exposición, la laca residual se elimina, si es necesario, utilizando agua estéril.

VI.2.4.5. Observaciones clínicas

- *Observaciones clínicas para la toxicidad aguda dérmica*

Los animales tratados se observaron a simple vista durante las primeras 3-4 horas después de la administración, según PNO I.GB.T01 "Examen clínico de animales de laboratorio" (22) y PNO I.GB.T14 "Manipulación del conejo" (23), observando la ocurrencia de mortalidad o la aparición de síntomas o signos de toxicidad. Posteriormente, se realizaron observaciones 1 o 2 veces por día según la ocurrencia de alteraciones en los conejos. El período de observación se extiende dependiendo de la sintomatología que se observe y de la mortalidad que ocurra, pero se enmarca entre 14 y 21 días.

Las variables principales que se midieron son: mortalidad, síntomas clínicos y peso corporal.

Además, se hicieron observaciones adicionales todos los días para evitar la pérdida de animales en estudio que estén en estados agónicos, moribundos o recién muertos y necesiten practicárseles necropsia en conejos débiles o moribundos.

Las observaciones en los animales incluyen cambios en:

1. La piel y el pelo.
2. Los ojos y las membranas mucosas.
3. El sistema respiratorio.
4. El sistema circulatorio.
5. El sistema nervioso autónomo y central.
6. La actividad somato-motriz.
7. Patrón de comportamiento.
8. Observación de temblores, convulsiones, diarrea, letargo, salivación, sueño y coma.
9. Otras alteraciones en otros sistemas.

El momento de la muerte se registra con la mayor precisión posible.

Al finalizar el período de observación se practica el sacrificio de los conejos por un método de eutanasia, PNO I.GB.T12 "Eutanasia de roedores y conejos de laboratorio. Método de concusión" (29) y se les realiza un análisis macroscópico patológico por técnicas de necropsia, según PNO I.9.T06 "Necropsia en roedores y conejos de laboratorio" (28).

- *Observaciones clínicas para la irritabilidad dérmica*

Los animales tratados son observados frecuentemente durante las primeras 3-4 h después de la administración, según PNO I.GB.T01 "Examen clínico de animales de laboratorio" (22) y PNO I.GB.T14 "Manipulación del conejo" (23), observando la ocurrencia de cualquier alteración en el área de aplicación. Las áreas adyacentes de piel no tratada de cada animal sirven como control para la prueba. Estas observaciones son realizadas por dos especialistas experimentados.

Cualquier alteración o lesión de consideración que se observe en los animales de ensayo provocará el cese inmediato del estudio y llegado el caso de sufrimiento evidente, el sacrificio de los animales por un método eutanásico, según PNO I.GB.T12 "Eutanasia de roedores y conejos de laboratorio. Método de concusión" (29).

Los animales fueron examinados en busca de signos de eritema y edema en los tiempos 30-60 minutos y a las 24 h, 48 h y 72 h después de la eliminación del parche.

Las alteraciones de irritación dérmica se anotaron y registraron de acuerdo con los grados de eritema y edema. Es posible que se necesiten más observaciones, según las alteraciones observadas. Estas igualmente se recogerán para establecer la reversibilidad de las lesiones. Además de la observación de las lesiones de irritación, cualquier lesión y otros efectos tóxicos deben ser descritos completamente.

Se observan y clasifican los signos de irritabilidad dérmica asignando una puntuación según cada alteración dérmica observada, de acuerdo con la Tabla VI.2, descrita por Draize (41) y que aparece recogida en la norma de la OECD (42).

Las observaciones se prolongaron hasta 14 días post-retirada de los parches según la persistencia y/o no reversibilidad de las alteraciones dérmicas que se producen.

Al finalizar el período de observación, entre 72 h y hasta 14 días post retirada de los parches, dependiendo de lo anteriormente expresado, a los animales se les practica el sacrificio por un método de eutanasia, PNO I.GB.T12 "Eutanasia de roedores y conejos de laboratorio. Método de concusión" (29) y se les realiza un análisis macroscópico patológico por técnicas de necropsia, según PNO I.9.T06 "Necropsia en roedores y conejos de laboratorio" (28).

Tabla VI.2. Evaluación de la reacción dérmica

Formación de eritema y escaras	Valor
No eritema	0
Eritema muy ligero, apenas perceptible	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a severo	3
Eritema severo a formación de escara	4
Máximo posible	4
Formación de edema	**Valor**
No edema	0
Edema muy ligero (escasamente perceptible)	1
Edema ligero (bordes del área bien definidos, elevación definida)	2
Edema moderado (elevación de aproximadamente 1 mm)	3
Edema severo (elevación > 1 mm y extendido más allá del área de exposición)	4
Máximo posible	4

VI.2.4.6. Peso corporal

En los estudios de toxicidad aguda dérmica, el peso de los animales individuales se determina poco antes de que el material de ensayo se administre, después semanalmente, y en la muerte. Las variaciones de peso se calculan y registran cuando la supervivencia sea superior a 1 día. También se evaluará la ganancia de peso corporal cada semana y hasta que termine el período de observación post administración, según PNO I.9.E19 "Evolución de la ganancia de peso de roedores y conejos de laboratorio" (43).

Por otra parte, en los estudios de irritabilidad dérmica, se pesan los animales al inicio del estudio y a las 72 horas de observación post-aplicación. De prolongarse el período de observación para evaluar la reversibilidad de las alteraciones cutáneas, se pesan los animales una vez por semana. El pesaje de los animales se realiza con una báscula electrónica de 60 kg.

VI.2.4.7. Consideraciones éticas

El estudio considera los principios de reducción del número de animales al realizar las evaluaciones de manera escalonada. El personal que ejecuta el estudio está cualificado en el uso de mamíferos de laboratorio y tiene en cuenta los procedimientos que disminuyen el estrés, angustia y el deterioro del estado higiénico sanitario, de tal

modo que se garantice durante el estudio el bienestar de los animales mediante el mantenimiento de las condiciones de tenencia para la especie, la no-variabilidad en las respuestas y la validez y confiabilidad de los datos que se generen durante el estudio. El informe de la Comisión Ética del CBQ puede consultarse en el Anexo 4.

VI.2.4.8. Análisis estadístico y análisis de datos

Para analizar el comportamiento del peso por sexos en el estudio de toxicidad aguda dérmica se realizó un análisis no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov y una prueba de pares de Wilcoxon para comparar los pesos del inicio con los del final por sexo. El nivel de significación estadística fue de $p \leq 0{,}05$. Los estudios fueron realizados mediante el paquete estadístico STATISTICA, versión 10.

Una vez obtenidas las lecturas de eritema y edema en los 3 animales de cada laca en el estudio de irritabilidad dérmica, se procedió a promediar las calificaciones de eritema por animal a los 4 tiempos de lectura (30 a 60 minutos, 24 h, 48 h y 72 h después de eliminar el parche) para los tres animales (12 calificaciones en total para eritema) y, por separado, promediar las calificaciones de edema de la misma manera (12 calificaciones en total para edema). A partir de estos promedios se calcula el índice de irritación primaria (IIP) para cada laca como sigue:

IIP=(Promedio de eritema + Promedio de edema)/(nº animales * nº observaciones)

Interpretación de los resultados

Según el IIP calculado, el producto en estudio podrá clasificarse según las siguientes categorías:

Categoría	**Rango de IIP**
No irritante……	0 - 1
Ligeramente irritante…….	1,1 - 2
Moderadamente irritante……	2,1 - 5
Irritante moderado a severo……	5,1 - 6
Irritante severo……...…….	6,1 – 8

VI.2.4.9. Estudio anatomopatológico

Se practicó la. necropsia a los animales muertos, moribundos y/o sobrevivientes al final del estudio en busca de lesiones macroscópicas. En caso de detectar lesiones en la observación macroscópica se procede a tomar muestras y fijarlas para análisis histopatológico, según PNO I.11.T21 “Toma de muestras y fijación de tejidos de

mamíferos para procesamiento histopatológico" (44); a la deshidratación de las muestras de tejidos mediante etanol, xilol y parafina (PNO I.11.T22 "Deshidratación, inclusión y confección de bloques de tejido de mamíferos para procesamiento histopatológico") (45); corte de muestras incluidas en parafina mediante micrótomo y montaje en láminas portaobjetos (PNO I.11.T11 "Corte de tejidos incluidos en parafina para procesamiento histopatológico") (46); coloración de los cortes mediante tinción de hematoxilina-eosina (PNO I.11.T23 "Desparafinado, tinción y montaje de láminas de mamíferos para procesamiento histopatológico") (47); y examen diagnóstico por observación microscópica (PNO I.11.T24 "Lectura diagnóstica de láminas histológicas") (48).

VI.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.3.1. Estudio de toxicidad aguda dérmica

En cada grupo de evaluación de cada una de las 3 lacas, se utilizaron cinco conejos de cada sexo clínicamente sanos y aptos para este tipo de estudio. No se presentó mortalidad ni ningún síntoma clínico asociado con la aplicación de las 3 lacas con Furvina® en los 30 animales.

El peso de los animales durante el estudio se comportó de manera creciente y lógica, para lo cual se tuvo en consideración el tiempo de duración del experimento (14 días), según muestran las Tablas VI.3, VI.4 y VI.5.

Tabla VI.3. Comportamiento del peso corporal en conejos del estudio de toxicidad dérmica de la laca transparente con Furvina®.

Producto	Animal	Sexo	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)	Incremento de peso (kg)
Laca 1	1	Machos	1,76	1,92	0,16
	2		1,54	1,58	0,04
	3		1,56	1,84	0,28
	4		1,64	1,78	0,14
	5		1,61	1,77	0,16
	6	Hembras	1,58	1,74	0,16
	7		1,64	1,82	0,18
	8		1,56	1,82	0,26
	9		1,68	1,80	0,12
	10		1,68	1,86	0,18

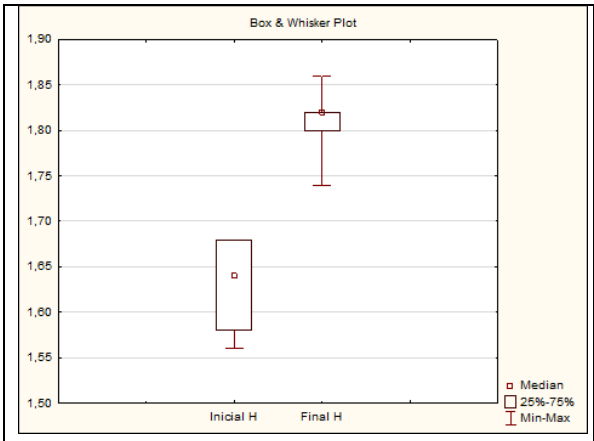
Tabla VI.4. Comportamiento del peso corporal en conejos del estudio de toxicidad dérmica de la laca roja con Furvina®.

Producto	Animal	Sexo	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)	Incremento de peso (kg)
Laca 2	1	Machos	1,76	2,02	0,26
	2		1,46	1,6	0,14
	3		1,62	1,74	0,12
	4		1,5	1,77	0,27
	5		1,61	1,8	0,19
	6	Hembras	1,74	1,9	0,16
	7		1,66	1,88	0,22
	8		1,64	1,72	0,08
	9		1,56	1,81	0,25
	10		1,76	1,95	0,19

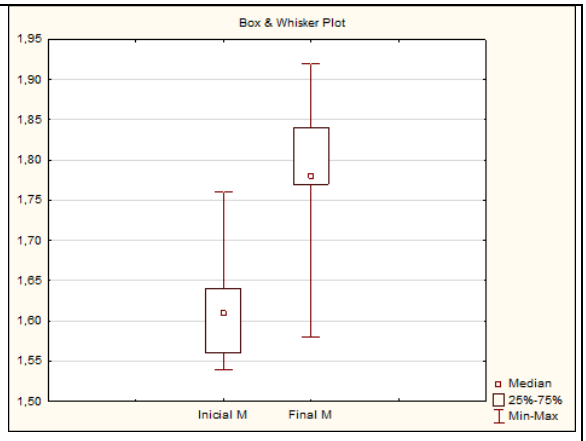
Tabla VI.5. Comportamiento del peso corporal en conejos del estudio de toxicidad dérmica de la laca blanca con Furvina®.

Producto	Animal	Sexo	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)	Incremento de peso (kg)
Laca 3	1	Machos	1,76	1,88	0,12
	2		1,24	1,54	0,3
	3		1,56	1,82	0,26
	4		1,5	1,69	0,19
	5		1,33	1,57	0,24
	6	Hembras	1,76	1,88	0,12
	7		1,68	1,78	0,1
	8		1,64	1,86	0,22
	9		1,55	1,83	0,28
	10		1,4	1,59	0,19

Al comparar estadísticamente la masa corporal inicial con la obtenida el día 14 del experimento por sexo se encontraron diferencias significativas tanto para hembras como para machos ($p \leq 0,05$) en los tres grupos experimentales correspondientes a las tres lacas, por lo que se consideró que el incremento de masa corporal en los animales durante el estudio fue ligeramente significativo, tal y como corresponde al estado somático de animales jóvenes en crecimiento mantenidos bajo condiciones de bienestar, como muestran las Figuras VI.1, VI.2 y VI.3. Los resultados de este test permitieron concluir que los conejos de ambos sexos incrementaron su masa corporal de manera significativa al finalizar el estudio con respecto al inicio, lo que demuestra que no existe una influencia negativa por la administración de cada una de las lacas en estudio.

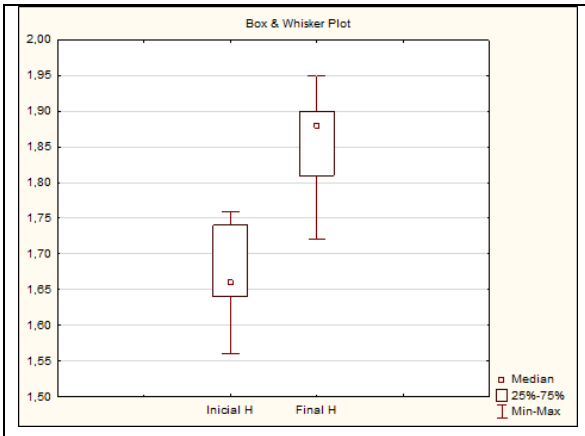


a) Comportamiento en hembras (Wilcoxon Matched Pairs test, p=0,04)

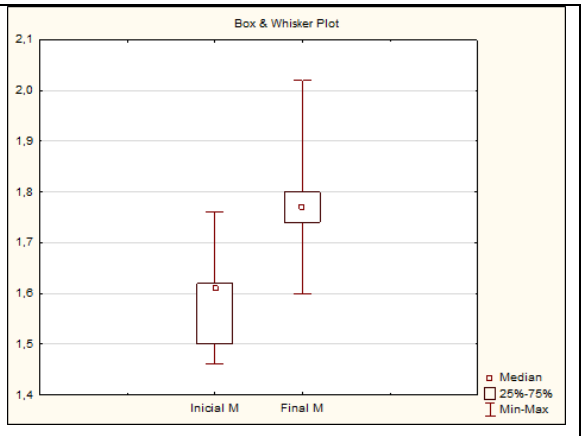


b) Comportamiento en machos (Wilcoxon Matched Pairs test, p=0,04)

Figura VI.1. Análisis del comportamiento del peso corporal de conejos tratados con laca 1 y Furvina®. Comparación del peso por sexo al inicio y fin del estudio.

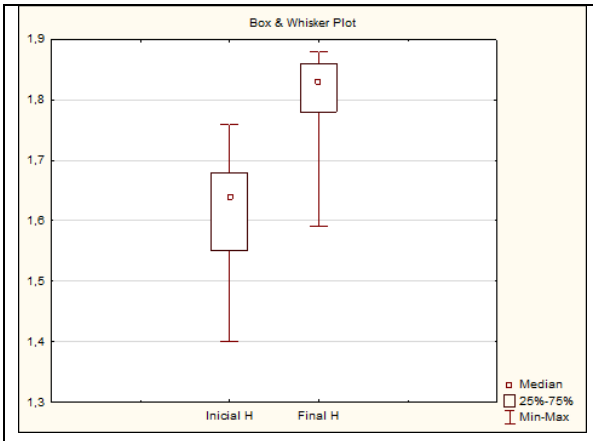


a) Comportamiento en hembras (Wilcoxon Matched Pairs test, p=0,04)

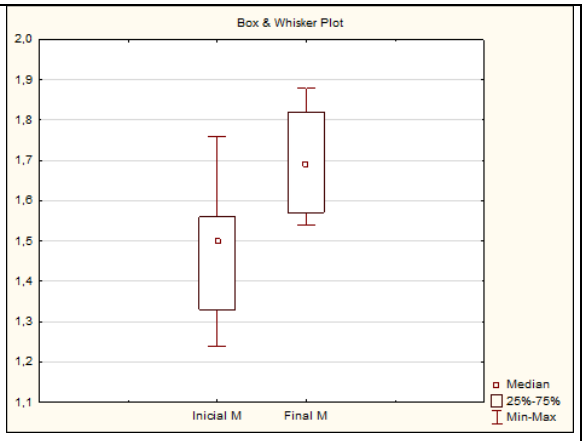


b) Comportamiento en machos (Wilcoxon Matched Pairs test, p=0,04)

Figura VI.2. Análisis del comportamiento del peso corporal de conejos tratados con laca 2 y Furvina®. Comparación del peso por sexo al inicio y fin del estudio.



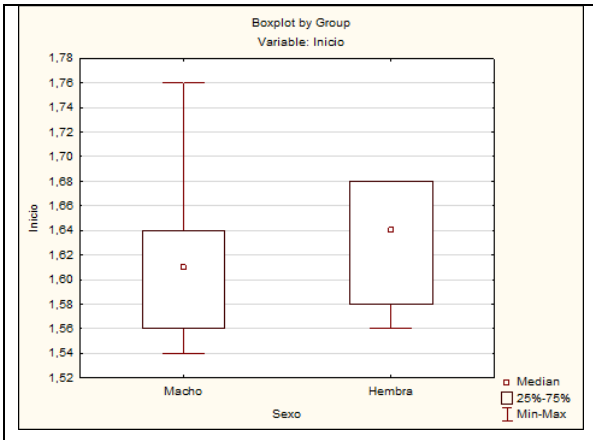
a) Comportamiento en hembras (Wilcoxon Matched Pairs Test, p=0,04)



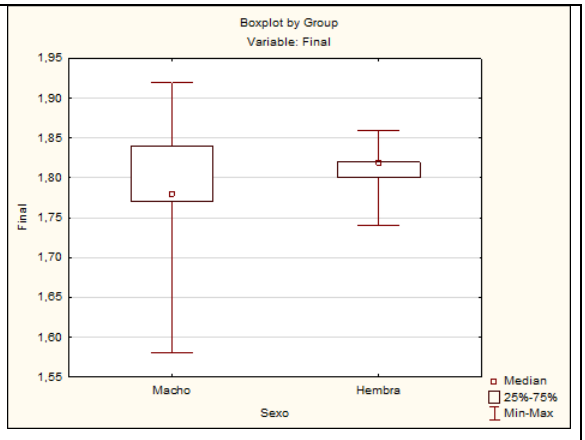
b) Comportamiento en machos (Wilcoxon Matched Pairs Test, p=0,04)

Figura VI.3. Análisis del comportamiento del peso corporal de conejos tratados con laca 3 y Furvina®. Comparación del peso por sexo al inicio y fin del estudio.

Al comparar los pesos de ambos sexos por el test de Kolmogorov-Smirnov, tanto al inicio como al final de la evaluación, no existieron diferencias estadísticas entre sexos en ninguno de los dos momentos para las tres lacas en estudio, como muestran las Figuras VI.4, VI.5 y VI.6.

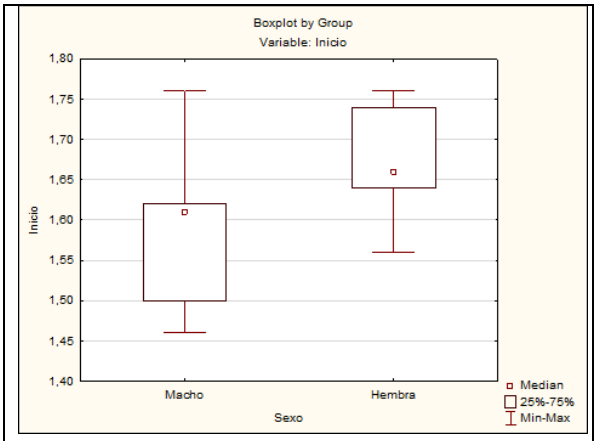


a) Peso inicial (Kolmogorov-Smirnov test, p > 0,1)

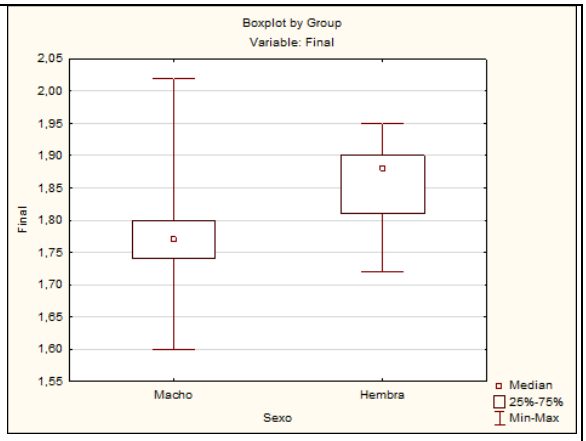


b) Peso final (Kolmogorov-Smirnov test, p > 0,1)

Figura VI.4. Análisis del comportamiento del peso corporal de conejos administrados con laca 1 y Furvina®. Comparación del peso entre sexos.

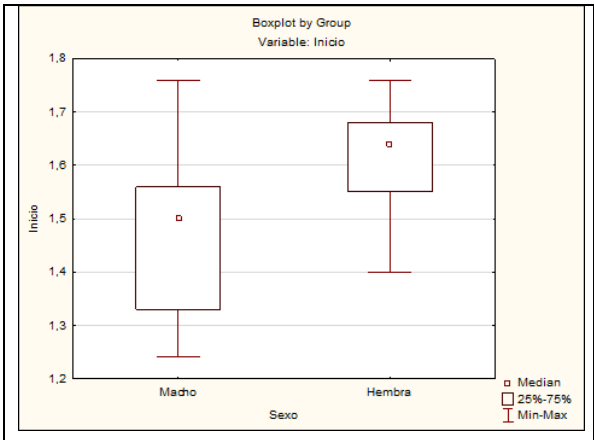


a) Peso inicial (Kolmogorov-Smirnov test, p > 0,1)

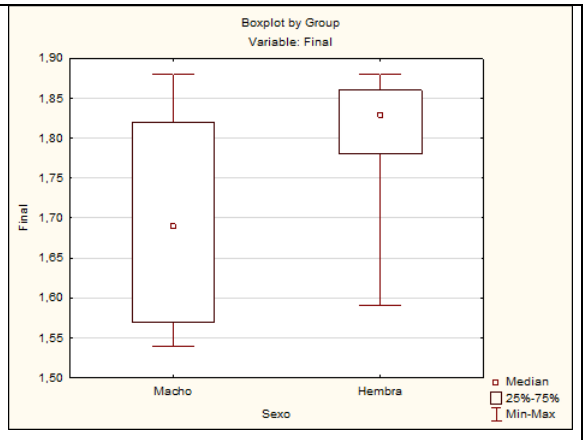


b) Peso final (Kolmogorov-Smirnov test, p > 0,1)

Figura VI.5. Análisis del comportamiento del peso corporal de conejos tratados con laca 2 y Furvina®. Comparación del peso entre sexos.



a) Peso inicial (Kolmogorov-Smirnov test, p > 0,1)



b) Peso final (Kolmogorov-Smirnov test, p > 0,1)

Figura VI.6. Análisis del comportamiento del peso corporal de conejos tratados con laca 3 y Furvina®. Comparación del peso entre sexos.

De manera general, se puede comprobar que los conejos de ambos sexos incrementaron su masa corporal de manera significativa al finalizar el estudio con respecto al inicio, lo que demuestra que no existe una influencia negativa por la administración de cada una de las lacas en estudio.

En todas las necropsias realizadas a la totalidad de los animales en estudio no se observó ninguna lesión macroscópica indicativa de procesos patológicos por administración de los tres productos.

Las demandas crecientes del mercado, la formulación de nuevos productos, y las presiones de grupos ambientalistas y defensores de un trato adecuado para los animales, han obligado al desarrollo de ensayos alternativos para la evaluación de la calidad de cosméticos y productos de higiene personal y colectiva (49). De hecho, muchos países y regiones han prohibido testar en animales los productos cosméticos. No obstante, el INHEM del Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba aún mantiene vigente las regulaciones e indicadores requeridos en lo referente a requisitos, metodología de evaluación y dictámenes de los productos objeto de Registro Sanitario para autorizar su comercialización y libre venta en el país desde el punto de vista sanitario, aplicable para alimentos, cosméticos, juguetes y otros productos de interés sanitario (8). Dicho documento establece que, atendiendo al riesgo epidemiológico, los brillos y esmaltes para uñas se clasifican de riesgo para la salud según un listado de tipos de cosméticos. Así mismo, enuncia que la evaluación sanitaria de cosméticos se establece según las normas para los cosméticos expedidas por la Food, Drugs and Cosmetics Administration de los Estados Unidos de Norteamérica, la Cosmetics, Toiletry and Fragance Association Inc. de la Unión Europea y Japón, y la norma cubana de requisitos sanitarios. Además, dicho documento aclara que, para solicitar la evaluación sanitaria, el interesado deberá presentar ante el INHEM, entre otros documentos e informaciones, los resultados de pruebas biológicas en animales de experimentación o el aval de inocuidad de los productos. Más adelante, esta normativa establece los indicadores toxicológicos para el estudio de los cosméticos y para este tipo de producto recomienda realizar fundamentalmente evaluaciones de irritabilidad dérmica y oftálmica (8).

Los productos cosméticos tienen una presencia importante en nuestras vidas. El incremento en la variedad de productos y el volumen de los mismos, orientado a la satisfacción de una demanda cada vez mayor y más especializada, y las posibles repercusiones que nuevas formulaciones puedan tener para la salud humana, obligan al establecimiento y evaluación de los riesgos inherentes en el uso de cosméticos, y la verificación continua de la calidad sanitaria y comercial mediante técnicas de control de la calidad y análisis toxicológico (50)**.**

Resulta importante como evaluadores conocer la composición de los productos en estudio. De forma particular, en el caso de las lacas para uñas, se reporta que, de los 20 productos químicos comunes para uñas que ocasionan problemas de salud, y que aparecen listados por la EPA estadounidense, 17 son dañinos para el tracto respiratorio. También, muchos de ellos ocasionan trastornos sensibilizantes en la piel del personal que

trabaja con estos productos, al igual que decoloración y verrugas. Diversos artículos científicos han informado sobre las tres sustancias químicas de los productos de uña que originan problemas de salud asociados más graves y son el ftalato de dibutilo, el tolueno y el formaldehído (51). Rutinariamente, la exposición a cantidades o dosis tóxicas de estos y otros compuestos químicos presentes en dichas formulaciones es muy poco probable, al considerar la poca cantidad que se utiliza al aplicar estos esmaltes y lacas en las uñas en las personas. Sí se debería considerar la mayor exposición que presentan las trabajadoras o manicuras al trabajar frecuentemente con estos cosméticos. Por tal razón, se decidió incluir dentro de las evaluaciones pre-clínicas de las lacas con Furvina® para uñas, un estudio en el que la exposición en la piel a los productos en estudio se utilizara a dosis única pero elevada.

De manera general, los resultados obtenidos en el estudio nos permiten afirmar que las tres lacas con Furvina® no producen toxicidad dérmica demostrable a dosis límite en conejos, por lo que dichos productos no presentan riesgos tóxicos por esta vía en humanos.

VI.3.2 Resultados del estudio de irritabilidad dérmica

Se utilizaron en el ensayo nueve conejos del sexo hembras, clínicamente sanas y aptas para este tipo de estudio. No se observó ningún síntoma clínico asociado con la aplicación de las tres lacas con Furvina® en los animales. El peso de los animales durante el estudio se comportó de manera discretamente creciente y lógica considerando el corto tiempo de duración del experimento, como indica la Tabla VI.6.

En las necropsias realizadas a la totalidad de los animales en estudio no se observó ninguna lesión macroscópica indicativa de procesos patológicos por administración del producto por vía tópica.

Tabla VI.6. Comportamiento del peso en conejos del estudio de irritabilidad dérmica.

Producto	Animal	Peso inicial (kg)	Peso a 72 h (kg)	Incremento final (kg)
Laca 1	1	1,60	1,61	0,01
	2	1,48	1,50	0,02
	3	1,66	1,67	0,01
Laca 2	1	1,6	1,63	0,03
	2	1,65	1,67	0,02
	3	1,50	1,51	0,01
Laca 3	1	1,50	1,51	0,01
	2	1,43	1,45	0,02
	3	1,57	1,58	0,01

Respecto a las lecturas secuenciales de edema y eritema cutáneos en el área de aplicación de las 3 lacas, no se observó ninguna de las alteraciones, en sus diferentes grados, en la piel de todos los animales, como demuestra la Tabla VI.7.

Con las lecturas observadas durante el estudio se calculó el IPP, se obtuvo un valor 0 para las 3 lacas estudiadas.

Las 3 lacas para uñas objeto de estudio constituyen una mezcla de la denominada laca base y el IFA Furvina®. Dichos productos se prevén utilizar como maquillaje cosmético y para tratar onicomicosis en las uñas en humanos, por lo que se deduce que entrarán en contacto con el hombre, tanto en los que lo produzcan, como en los que utilizarán dicho compuesto. Los resultados reflejados anteriormente demuestran que los productos aplicados en dosis única se clasifican como no irritantes dérmicos, pues los valores de IIP de cada uno se encuentran en el rango de 0 a 1. Los resultados fueron evaluados según se establece por las guías internacionales para este tipo de ensayo, las que establecen que cuando los valores están entre 0 y 1, la sustancia es considerada con ausencia total de este efecto tóxico (42).

Tabla VI.7. Evaluación de edema y eritema en conejos.

Producto	**Animal**	**Variable estudiada**	**Tiempo (h)**			
			1 h	24 h	72 h	Total
Laca 1	1	Edema	0	0	0	0
		Eritema	0	0	0	0
	2	Edema	0	0	0	0
		Eritema	0	0	0	0
	3	Edema	0	0	0	0
		Eritema	0	0	0	0
Laca 2	1	Edema	0	0	0	0
		Eritema	0	0	0	0
	2	Edema	0	0	0	0
		Eritema	0	0	0	0
	3	Edema	0	0	0	0
		Eritema	0	0	0	0
Laca 3	1	Edema	0	0	0	0
		Eritema	0	0	0	0
	2	Edema	0	0	0	0
		Eritema	0	0	0	0
	3	Edema	0	0	0	0
		Eritema	0	0	0	0

De manera general, los estudios de irritabilidad dérmica realizados clasifican a las tres lacas con Furvina® como seguras, es decir, no irritantes. En base a estos resultados los tres productos en estudio son aprobados para su uso sin advertencias de irritabilidad por contacto dérmico.

VI.4. CONCLUSIONES

Los estudios desarrollados demostraron que las tres lacas con Furvina®, desarrolladas en colaboración entre el CBQ y la Empresa Suchel S.A., no presentan potencial irritante dérmico y se clasifican como no irritantes para la piel. Las tres lacas para uñas con Furvina® no producen toxicidad dérmica demostrable al administrarse a una dosis límite de 2000 mg/kg en conejos. Además, las tres lacas de uñas con Furvina®

se consideran como irritantes oftálmicos a pesar de no ser evaluados en el modelo animal, ya que sus componentes son irritantes por separado, por lo que se recomienda mantenerlas alejadas de la vista.

VI.5 BIBLIOGRAFÍA

1. Benaiges A. Cosmética decorativa: Maquillajes, barras de labios y lacas de uñas. Ámbito Farmacéutico Dermofarmacia. 2004;23(3).
2. Prieto Cabezas L. Formulación y maquillaje dermatológico: la búsqueda del tercer poder. Piel. 2001;16(8):363–72.
3. Reglamento del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea (CE) No 1223/2009 de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos.
4. Morales-Moreno Y, Medina-Marrero R. Actividad in vitro de furvina frente a bacterias Gram negativas multirresistentes. Revista CENIC. 2014;45(1):45–50.
5. Díaz Díaz M, Meneses Marcel A, Medina Marrero R, Morales Helguera A, García Bernal M, Sifontes Rodríguez S. Furvina (G-1). Efectividad in vitro sobre Microorganismos Aislados de Infecciones Dérmicas en Caninos. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2016;27(3):595–606.
6. Díaz M, Meneses A, Medina R, Morales A. Furvina (G-1) in vitro effectiveness on microorganisms isolated from skin infections in dogs. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2016;27:595–606.
7. Fabbretti A, Brandi L, Petrelli D, Pon CL, Castañedo NR, Medina R, et al. The antibiotic Furvina® targets the P-site of 30S ribosomal subunits and inhibits translation initiation displaying start codon bias. Nucleic Acids Research. 2012;40(20):10366–74.
8. Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología. Registro sanitario de alimentos, cosméticos, juguetes y otros productos de interés sanitario: regulaciones e indicadores. 6ª edición. La Habana, Cuba. 2017.
9. Jiménez MR, Kuhn GR. Toxicología fundamental. 4ª edición. Ediciones Díaz de Santos, S.A. 2009.
10. Choksi NY, Truax J, Layton A, Matheson J, Mattie D, Varney T, et al. United States regulatory requirements for skin and eye irritation testing. Cutaneous and Ocular Toxicology. 2019;38(2):141-55.
11. CECMED. Requisitos para las solicitudes de Inscripción, Renovación y Modificación en el Registro de Medicamentos de uso Humano. Cuba; 2006.
12. Remirez DC. Update in pre-clinical regulatory requirements for phytromedicines in Latin America. Journal of Complementary and Integrative Medicine. 2006;3(1):1–7.

13. ICH S3A - Note for guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies. ICH Guidelines. 1994;October:15.
14. ICH Guideline on detection of toxicity to reproduction for medicinal products. Addendum to the Parent Guideline: Toxicity to male fertility. 1995; March, November.
15. Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). Test No. 414: Prenatal development toxicity study. Paris, France. 2001:4–14.
16. Químicos) AB (Centro de B. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.9.014 "Acceso y salida al área de experimentación de conejos".
17. Prevention P. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.2500 Acute Dermal Irritation. 1998.
18. Prevention P. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.1200 Acute Dermal Toxicity. 1998.
19. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.9.E21 "Alimentación de rutina para conejos". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
20. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.9.E20 "Suministro de agua de bebida para conejos". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
21. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.GB.E01 "Recepción de animales de laboratorio para ensayos". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
22. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.GB.T01 "Examen clínico de animales de laboratorio". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
23. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.GB.T14 "Manipulación del conejo". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
24. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.9.E22 "Adaptación de conejos". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
25. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.GB.T04 "Pesaje de animales de laboratorio". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
26. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.9.E04 "Aceptación de roedores y conejos de laboratorio para estudios definitivos". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
27. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.GB.E03 "Animales moribundos y encontrados muertos". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.

28. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.9.T06 “Necropsia en roedores y conejos de laboratorio”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
29. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.GB.T12 “Eutanasia de roedores y conejos de laboratorio. Método de concusión”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
30. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.GB.E02 “Alojamiento de conejos en módulos de fondo sólido”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
31. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.GB.014 “Identificación de módulos para conejos”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
32. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.GB.T06 “Aleatorización de biomodelos experimentales”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
33. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.GB.003 “Control de variables ambientales”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
34. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.9.015 “Limpieza en el área de experimentación de conejos”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
35. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.9.004 “Limpieza y fregado del material para ensayos con animales de laboratorio”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
36. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.GB.004 “Lavado de manos”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
37. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO R.01.006 “Manejo de desecho en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
38. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.9.T03 “Estudio de toxicidad a dosis única dérmica en conejos”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
39. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.9.T45 “Estudio de irritabilidad dérmica en conejos”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
40. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.9.T47 “Aplicación dérmica en animales de laboratorio”. Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.

41. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1994;82(3):377-390.
42. Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). Test No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. 2018.
43. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.9.E19 "Evolución de la ganancia de peso de roedores y conejos de laboratorio". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
44. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.11.T21 "Toma de muestras y fijación de tejidos de mamíferos para procesamiento histopatológico". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
45. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.11.T22 "Deshidratación, inclusión y confección de bloques de tejido de mamíferos para procesamiento histopatológico". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
46. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.11.T11 "Corte de tejidos incluidos en parafina para procesamiento histopatológico". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
47. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.11.T23 "Desparafinado, tinción y montaje de láminas de mamíferos para procesamiento histopatológico". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
48. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO I.11.T24 "Lectura diagnóstica de láminas histológicas". Área Biológica, Centro de Bioactivos Químicos. Cuba.
49. Gómez RF, Martínez MVL, Almaral OV, Castro NF, Pino AC, Alfonso AC, et al. Estado del registro sanitario de Cuba para alimentos y cosméticos. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. 2009;19(1):115–23.
50. Nacional A, Sanitaria DV. Guía para Evaluación de la Seguridad de Productos Cosméticos. 2003;1–46.
51. Maslin Nir S. Venenos que embellecen las uñas. The New York Times. 2015;1–4.

CONCLUSIONES

La conclusión general que se puede extraer de esta Tesis Doctoral es que las metodologías analíticas desarrolladas para la caracterización químico-farmacéutica de lacas para el tratamiento de la onicomicosis han demostrado una efectiva aplicabilidad reportando datos de gran interés en relación a los formulados conteniendo el ingrediente farmacéutico activo (IFA) Furvina®.

Las conclusiones específicas que se han obtenido en esta Tesis son:

1. El método espectrofotométrico UV/VIS propuesto para la cuantificación del IFA en diferentes lacas de uñas ha mostrado excelentes parámetros de especificidad, linealidad (1-5 µg/mL), precisión (coeficientes de variación inferiores a 5% en todos los casos), veracidad (97-103%) y sensibilidad (límite de detección (LD) y de cuantificación (LQ) igual a 0,038 y 0,156 µg/mL, respectivamente). Así, la metodología propuesta resulta una interesante herramienta de muy fácil acceso para la mayoría de los laboratorios para la determinación de Furvina®.

2. La combinación de la cromatografía líquida capilar con detección mediante diodos en serie (LCcapilar-DAD) ha demostrado gran poder de separación para una determinación selectiva del IFA. Dicha combinación instrumental ha sido aplicada al análisis de lacas y de orina humana. El método propuesto para lacas ha proporcionado valores muy favorables para los diferentes parámetros analíticos, en términos de intervalo de linealidad (0,1-10 µg/mL), precisión (coeficientes de variación inferiores a 5%), veracidad (99- 101%) y sensibilidad (0,01 y 0,035 µg/mL para LD y LQ, respectivamente). Por otro lado, la aplicación de la técnica miniaturizada microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) en el tratamiento de las muestras de orina de forma previa a su análisis mediante LCcapilar-DAD ha permitido no solo incrementar la sensibilidad de la metodología, sino que simultáneamente ha mejorado la selectividad al actuar DLLME preconcentrando el analito y limpiando la matriz de la muestra.

3. Las técnicas de difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía infrarroja (IR) y calorimetría de barrido diferencial (DSC) se han mostrado como herramientas de gran utilidad en la caracterización e identificación de Furvina® en lacas de uñas. Así, la técnica DSC ha permitido establecer las condiciones óptimas de temperatura de almacenamiento de los formulados (87,57-95,46 ºC). Los análisis obtenidos mediante SEM han mostrado cambios morfológicos y tipográficos de los cristales del IFA en los formulados,

que resultan de gran importancia a la hora de conocer su actividad farmacológica. Mediante IR se han identificado las bandas de absorción características del IFA en los formulados, corroborando su presencia en los mismos.

4. Los resultados obtenidos a través del estudio de permeabilidad han conducido a recomendar el contacto del formulado con la uña durante un periodo superior a los 11 días con objeto de garantizar el efecto deseado contra la onicomicosis.

5. La espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica y fuente continua de alta resolución (HR-CS ETAAS) ha demostrado su utilidad para el control de los elementos metálicos plomo, arsénico y cobre en las lacas de uñas transparentes, roja, blanca y en el IFA Furvina®. Los contenidos encontrados en las lacas de uñas fueron en todos los casos inferiores a los límites máximos permisibles (LMPs) establecidos por el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM) de Cuba, por lo que los productos pueden considerarse seguros y aptos en cuanto a los metales estudiados para su comercialización según las normas del INHEM.

6. Las tres lacas con Furvina®, desarrolladas entre el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) y la Empresa Suchel S.A., no presentan potencial irritante dérmico y se clasifican como no irritantes para la piel, en base a las evidencias encontradas a través de los estudios correspondientes. Además, no producen toxicidad dérmica demostrable al administrarse a una dosis límite de 2000 mg/kg en conejos. Asimismo, los tres formulados se consideran como irritantes oftálmicos a pesar de no ser evaluados en el modelo animal, ya que sus componentes son irritantes por separado, por lo que se recomienda mantenerlos alejados de los ojos.

CONCLUSIONS

The general conclusion that can be drawn from this Doctoral Thesis is that the analytical methodologies developed for the chemical-pharmaceutical characterization of lacquers for the treatment of onychomycosis have demonstrated effective applicability, reporting data of great interest in relation to formulations containing the active pharmaceutical ingredient (API) Furvina®.

The specific conclusions obtained in this Thesis are:

1. The proposed UV/VIS spectrophotometric method for the quantification of API in different nail lacquers has shown excellent parameters of specificity, linearity (1-5 µg/mL), precision (coefficients of variation less than 5% in all cases), accuracy (97-103%) and sensitivity (limit of detection (LD) and quantification (LQ) equal to 0.038 and 0.156 µg/mL, respectively). Thus, the proposed methodology is an interesting tool that is easily accessible to most laboratories for the determination of Furvina®.

2. The combination of capillary liquid chromatography with diode array detection (capillary LC-DAD) has demonstrated high separation power for selective determination of API. This instrumental combination has been applied to the analysis of lacquers and human urine. The proposed method for lacquers has provided very favourable values for the different analytical parameters, in terms of linearity range (0.1-10 µg/mL), precision (coefficients of variation less than 5%), accuracy (99-101%) and sensitivity (0.01 and 0.035 µg/mL for LD and LQ, respectively). On the other hand, the application of the miniaturized dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) technique in the treatment of urine samples prior to their analysis by capillary LC-DAD has not only allowed to increase the sensitivity of the methodology but has simultaneously improved the selectivity, as DLLME acts by preconcentrating the analyte and cleaning the sample matrix.

3. X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (IR) and differential scanning calorimetry (DSC) techniques have proven to be very useful tools for the characterisation and identification of Furvina® in nail lacquers. Thus, the DSC technique has made it possible to establish the optimum storage temperature conditions for the formulations (87.57-95.46 ºC). The analyses obtained by SEM have shown morphological and typographic changes in the API crystals in the formulations, which are of great

importance when it comes to knowing their pharmacological activity. The characteristic absorption bands of the API in the formulations have been identified by IR, corroborating its presence in them.

4. The results obtained through the permeability study have led to recommending that the formulation be in contact with the nail for a period of more than 11 days in order to guarantee the desired effect against onychomycosis.

5. High-resolution continuous source electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (HR-CS ETAAS) has proven useful for monitoring the metallic elements lead, arsenic and copper in clear, red and white nail lacquers and in the IFA Furvina®. The contents found in the nail lacquers were in all cases lower than the maximum permissible limits (MPLs) established by the National Institute of Hygiene, Epidemiology and Microbiology (INHEM) of Cuba, so the products can be considered safe and suitable for marketing in accordance with INHEM standards in terms of the metals studied.

6. The three lacquers with Furvina®, developed by the Centre for Chemical Bioactives (CBQ) and the Suchel S.A. Company, do not present dermal irritant potential and are classified as non-irritating to the skin, based on the evidence found through the corresponding studies. In addition, they do not produce demonstrable dermal toxicity when administered at a limit dose of 2000 mg/kg in rabbits. Likewise, the three formulations are considered ophthalmic irritants despite not being evaluated in the animal model, since their components are irritating separately, so it is recommended to keep them away from the eyes.

ANEXOS

ANEXO 1. Análisis de varianza a nivel bajo de concentración.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
Columna 1	6	6,100740741	1,016790123	5,8528E-05
Columna 2	6	6,397037037	1,06617284	5,8528E-05
Columna 3	6	7,211851852	1,201975309	0,00012437

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	0,110349032	2	0,055174516	685,606061	1,80701E-15	3,682320344
Dentro de los grupos	0,001207133	15	8,04755E-05			
Total	0,111556165	17				

ANEXO 2. Análisis de varianza a nivel medio de concentración.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
Columna 1	6	18,56	3,093333333	6,5844E-05
Columna 2	6	17,93777778	2,98962963	6,5844E-05
Columna 3	6	17,55259259	2,925432099	0,00012437

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	0,086133211	2	0,043066606	504,571429	1,74977E-14	3,682320344
Dentro de los grupos	0,001280293	15	8,53528E-05			
Total	0,087413504	17				

1.

ANEXO 3. Análisis de varianza a nivel alto de concentración.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
Columna 1	6	30,38222222	5,063703704	6,5844E-05
Columna 2	6	29,70074074	4,950123457	0,00012437
Columna 3	6	30,27851852	5,046419753	0,00014632

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	0,044944368	2	0,022472184	200,326087	1,51429E-11	3,682320344
Dentro de los grupos	0,00168267	15	0,000112178			
Total	0,046627039	17				

ANEXO 4

CENTRO DE BIOACTIVOS QUIMICOS

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, C.P. 54830, Cuba.

Teléf: (53 42) 281192, 281473
Email: omarrero@uclv.edu.cu

INFORME DE LA COMISIÓN DE BIOÉTICA DEL CENTRO DE BIOACTIVOS QUÍMICOS DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

El Comité de Bioética del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) ha analizado y aprobado los protocolos e informes de investigación presentados por la doctoranda Zenia Pérez Rodríguez y pertenecientes a la tesis doctoral Estudios químico-Farmacéuticos de una formulación sobre la base de Furvina®, contra la onicomicosis.

Dentro de los documentos presentados y relacionados directamente con la utilización de animales de laboratorio están:

1. Evaluación de la toxicidad a dosis única dérmica en conejos de tres lacas de uñas.
2. Determinación de los efectos irritantes y/o corrosivos dérmicos en conejos de tres lacas de uñas.

Los representantes de dicho comité de bioética, junto con los investigadores consideraron aplicar los principios de reducción del número de animales, al no tener que emplear animales controles y, además, realizar las evaluaciones de manera escalonada, de modo tal que se garantizara durante el estudio el bienestar de los animales mediante el mantenimiento de las condiciones de tenencia para la especie, la no-variabilidad en las respuestas y la validez y confiabilidad de los datos que se generaron durante el estudio. De igual manera se tuvieron en cuenta métodos aceptados de eutanasia y necropsia.

Por todo lo anterior el Comité de Bioética del Centro de Bioactivos Químicos considera que los estudios preclínicos toxicológicos en mamíferos a realizar con las lacas para uñas CUMPLEN CON LOS PRINCIPIOS ÉTICOS establecidos para el uso de animales de experimentación.

Y para que así conste, se firma el presenta Aval a los 3 días del mes de junio de 2024

Dr. MV. Osmany Marrero Chang
Presidente del Comité de Bioética CBQ

Miembros del Comité de Bioética

PhD. Alfredo Meneses Marcel.
Dr. MV. CBQ

MSc Amalia María Calvo Alonso
Control de la Calidad CBQ

PhD Miriam Díaz Díaz
Dra. MV. CBQ

PhD. Pedro de la Fe Rodríguez
Dr. MV. Facultad de Veterinaria. UCLV

Centro de Bioactivos Químicos
DIRECCIÓN GENERAL
UCLV-MES

ANEXO 5

Los resultados de la presente Tesis Doctoral han sido difundidos en diferentes Congresos Nacionales e Internacionales, así como capítulos de libro y publicaciones en revistas científicas.

1. Perez-Rodriguez Z, Rodríguez-Rodríguez Y, Rodriguez-Negrin Z, Molina-Ruiz R, Medina-Marrero R, Ancede-Gallardo E. Development of a new formulation for onychomycosis treatment using Furvina® as an active pharmaceutical ingredient. In Proceedings of the 2nd International Conference on BioGeoSciences: Modeling Natural Environments. 2019;2:191-203). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-04233-2_17

2. Perez Rodriguez Z, Campillo N, Viñas López-Pelegrín P, Hernández-Córdoba M, Rodríguez-Rodríguez Y, Álvarez O, Rodriguez Negrin Z. Determination of furvina in medicated nail lacquers for onychomycosis treatment by direct UV/Vis spectrophotometry and liquid chromatography with diode array detection. I Symposium on Chemical and Physical Science for Young Researches. Octubre, 2020. Facultad de Química de la Universidad de Murcia, Murcia, España

3. Perez Rodriguez Z, Rodriguez Negrin Z, Alvarez O, Medina Marrero R, Rodriguez-Rodriguez Y. Development of a medicated nail lacquer for onychomycosis treatment. Afinidad. 2021;78:593

4. Perez-Rodriguez Z, Alvarez O, Rodriguez-Negrin Z, Calvo AM, Valdés-Negrin HL, Perez-Rodriguez M. Comprehensive certification of the Furvina production by modeling quality control parameters. International Symposium Farmaceutical Science SicF, III Convención Científica Internacional UCLV 2021. Noviembre, 2021. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba. https://www.uclv.edu.cu/eventos/iii-convencion-cientifica-internacional-uclv-2021/

5. Perez-Rodriguez Z, Rodriguez Negrin Z, Campillo N, Viñas López-Pelegrín P, Hernández-Córdoba M, Alvarez O. Desarrollo y validación de una técnica para la determinación de Furvina en esmaltes de uñas por cromatografía líquida capilar con

detección por matriz de diodo. International Symposium Farmaceutical Science SicF, III Convención Científica Internacional UCLV 2021. Noviembre, 2021. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba. https://www.uclv.edu.cu/eventos/iii-convencion-cientifica-internacional-uclv-2021/

6. Valdés-Negrín HL, Alvarez O, Perez-Rodriguez Z, Rodriguez-Negrín Z, Perez-Rodriguez M. Analyzing thermal degradation of Furvina drug using a stability indicating spectrophotometric method and characterization studies. Chemistry Africa. 2022:5(2):305-12. https://doi.org/10.1007/s42250-021-00307-y

7. Perez-Rodriguez Z, Alvarez O, Rodriguez-Negrin Z, Calvo AM, Valdes-Negrin HL, Perez-Rodriguez M. Comprehensive certification of the Furvina production by modeling quality control parameters. Journal of Pharmaceutical Innovation. 2022:17(4); 1084-1090. https://doi.org/10.1007/s12247-021-09589-8

8. Perez Rodriguez Z, Campillo N, Viñas López-Pelegrín P, Álvarez O, Rodriguez Negrin Z. Microextracción dispersiva líquido-líquido para la determinación de Furvina® en muestras de orine mediante cromatografía líquida con detección por diodos. VIII Simposio Internacional de Químicas y Ciencias Farmacéuticas 2023. VIII Conferencia Ciencias Químicas de la Convención UCLV 2023

ABREVIATURAS

AA	Asistido por aire
AAS	Espectrometría de absorción atómica
ACN	Acetonitrilo
AES	Detección por emisión atómica
AESI	Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria
ANOVA	Análisis de la varianza
BaA	Benzo(α)antraceno
BPF	Buenas prácticas de fabricación
BPL	Buenas prácticas de laboratorio
CBQ	Centro de Bioactivos Químicos
CCD	Diseño de composición central
CE	Comisión Europea
CECMED	Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos
CENPALAB	Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio
CIDEM	Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos
CPE	Extracción en punto de nube
CSIRO	Organización de Investigación Científica e Industrial del Commonwealth
CV	Coeficiente de variación
CVAAS	Espectrofotometría de absorción atómica con vapor frio
DAD	Detección mediante diodos en serie
DLLME	Microextracción dispersiva líquido-líquido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DSDME	Microextracción en gota directamente suspendida
EC	Electroforesis capilar
ECD	Detección por captura de electrones
EDL	Lámpara de descarga sin electrodos
EDX	Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva
EF	Factor de enriquecimiento
EHT	Voltaje de aceleración
EI	Estandar interno

EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EPA	Agencia de Protección Ambiental
ETAAS	Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica
FAAS	Espectrometría de absorción atómica con atomización en llama
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FE-SEM	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo
FID	Detección por ionización en llama
FIR	Espectroscopía de infrarrojo lejano
GC	Cromatografía de gases
HCL	Lámpara de cátodo hueco
HF	Fibra hueca
HGAAS	Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HR-CS	Fuente continua de alta resolución
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
ICH	Consejo Internacional de Armonización
ICP	Plasma acoplado inductivamente
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
IIP	Índice de irritación primaria
IL	Líquido iónico
INHEM	Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología
IR	Espectroscopía infrarroja
ISO	Organización Internacional de Normalización
LA	Ablación láser
LC	Cromatografía líquida
LCcapilar	Cromatografía líquida capilar
LD	Límite de detección
LIBS	Espectrometría de ablación inducida por láser
LLE	Extracción líquido-líquido
LMPs	Límites máximos permisibles
LPME	Microextracción en fase líquida
LQ	Límite de cuantificación

MBr	Monobromado
MIR	Espectroscopía de infrarrojo medio
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida
NIOSH	Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional
NIR	Espectroscopía de infrarrojo cercano
NOAEL	Nivel de efectos adversos no observados
NSD	Detector selectivo de nitrógeno
OCSPP	Oficina de Seguridad Química y Prevención de la Contaminación
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSHA	Administración de Seguridad y Salud en el Trabajo
Ph. Eur.	Farmacopea Europea
PNO	Procedimiento normalizado de operación
PTFE	Politetrafluoroetileno
QC	Coeficiente de calidad
RSD	Desviación estándar relativa
SA	Asistido por surfactantes
S/N	Relación señal-ruido
SD	Desviación estándar
SDME	Microextracción en gota simple
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SE	Detección de electrones secundarios
SFOD	Solidificación de gota flotante
SM	Disolventes supramoleculares
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
TLC	Cromatografía en capa fina
TOF	Tiempo de vuelo
UA	Asistido por ultrasonidos

UE	Unión Europea
UFC	Unidad formadora de colonias
USP	Farmacopea estadounidense
UV/VIS	Ultravioleta-visible
VA	Asistido por agitación vórtex
XRD	Difracción de rayos X
XRF	Fluorescencia de rayos X
XRPD	Difracción de rayos X de polvo cristalino