

Validación de un Método Analítico para el Estudio de Estabilidad del Ungüento de Aloe

Caridad M. GARCÍA PEÑA *, Jacqueline A. ROMERO DÍAZ,
Adriana MUÑOZ CERNADA & Vivian MARTÍNEZ ESPINOSA

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM),
Ave. 26 N° 1605. Nuevo Vedado, Plaza 10600, Vedado. La Habana, Cuba

RESUMEN. En el presente trabajo se desarrolló y validó un método espectrofotométrico para el control de la calidad del ungüento de aloe al 25%. En la validación se evaluaron los parámetros de especificidad, linealidad, exactitud y precisión expresada en sus dos formas: repetibilidad y precisión intermedia. El método desarrollado resultó selectivo, lineal, preciso, robusto y exacto, en el rango de concentraciones estudiadas.

SUMMARY. "Validation of an Analytic Method for the Study of Aloe Ointment Stability". A spectrophotometric method was developed and validated for quality control of the of aloe ointment. In the validation were evaluated the following parameters: specificity, linearity, accuracy and precision expressed in their two form repeatability and intermediate precision. The developed method was selective, lineal, precise, robust and exact, in the range of the studied concentrations.

INTRODUCCIÓN

El extracto de aloe se obtiene a partir de las hojas del *Aloe vera* L., mantenidas previamente a baja temperatura y en lugar oscuro. Este extracto ejerce una acción estimulante sobre el metabolismo de los tejidos y los procesos regenerativos ¹ y en el tratamiento de dolencias rectales ejerce una acción antiinflamatoria que ayuda a la disminución del dolor asociado, así como al mejoramiento de la circulación activa sanguínea, protegiendo de esta forma la mucosa rectal. En caso de fisuras el extracto estimula el crecimiento del tejido de granulación y la epitelización contribuyendo a la cicatrización de las mismas. Es también colerético, por lo que ayuda a la evacuación intestinal ².

El Ungüento de Aloe al 25% se indica en el tratamiento del brote hemorroidal típico, en los trastornos del recto y el ano, incluyendo hemo-

roides externas e internas, inflamación anorectal, fisuras anales y prurito ³.

Estudios realizados por León Sarabia *et al.* ⁴ demostraron la acción antiinflamatoria del ungüento antihemorroidal de aloe al 25%, producido en Cuba, en el brote hemorroidal agudo, así como, cicatrizante y resolutive en la fisura anal, como resultado de este estudio se demostró que el ungüento rectal de sábila es efectivo en el tratamiento del brote hemorroidal agudo y sus resultados son similares a los encontrados con el uso de ungüentos rectales comerciales conocidos por su acción al respecto, con la particularidad que con el uso del primero no se han reportado efectos adversos por parte del paciente ³.

En el presente trabajo se emplea un método espectrofotométrico con el objetivo de determinar el contenido de manosa presente en el ungüento de aloe al 25%, método reportado por

PALABRAS CLAVE: Aloe, Espectrofotometría, Ungüento, Validación.

KEY WORDS: Aloe, Ointment, Spectrophotometry, Validation.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: caridadgp@infoemd.sld.cu

Romero Díaz *et al.* ⁵ para la cuantificación de manosa en la crema de Aloe al 50%, en el que se demostró la selectividad del método para cuantificar la manosa en presencia de otros polisacáridos presentes en el extracto de aloe .

La validación de un método es aquel proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio que su capacidad satisface los requisitos para las aplicaciones deseadas. Esta capacidad se expresa en términos de parámetros de análisis, donde se tiene en cuenta la linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud, selectividad, sensibilidad, entre otros, en dependencia del objetivo que se persiga ⁶.

En la actualidad reviste gran importancia la validación de métodos, procesos, que permitan mayor confiabilidad en los resultados, fundamentalmente cuando se trabaja con productos naturales, donde es necesario obtener datos y resultados experimentales que demuestren la aptitud para el uso que se destina. El objetivo del estudio es la validación del método espectrofotométrico desarrollado para el control de la calidad de este medicamento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material se empleó el ungüento de aloe al 25%, elaborado en el Laboratorio de Semisólidos, perteneciente a nuestro centro. A partir del producto terminado se prepararon las muestras para el proceso de validación del método espectrofotométrico para cuantificar los polisacáridos en base manosa, los cuales se describen a continuación.

Método espectrofotométrico para cuantificar polisacáridos en base manosa ⁵

Se pesaron 0.2 g de ungüento, posteriormente se disolvieron en 25 mL de solución salina (M₁), aplicándose vortex por 10 min. Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm y se trasvasaron 5 mL a un matraz aforado de 10 mL completando volumen con solución salina (M₂). Se pesaron 50 mg de manosa y se trasvasaron a un matraz aforado de 100 mL, completándose volumen con solución salina. De la solución (S₁), se tomaron alícuotas de 1 (20 mg), 2 (40 mg), 3 (60 mg), 4 (80 mg) y 5 (100 mg) mL, trasvasándose a matraces aforados de 25 mL, completándose volumen con solución salina (S₂). A continuación se mezclaron 2 mL de la solución (M₂) y 2 mL de la solución (S₂) con 1 mL de Fenol al 5 %. Posteriormente se adicionaron 5 mL de ácido Sulfúrico concentrado y se agitaron, permaneciendo en reposo durante 20

min antes de efectuar la lectura espectrofotométrica.

En la preparación del blanco se tomaron 2 mL de agua destilada, se adicionó 1 mL de Fenol al 5% y 5 mL de ácido Sulfúrico concentrado y se agitaron. Se dejaron en reposo durante 20 min y se procedió a leer en el espectrofotómetro. La determinación espectrofotométrica se realizó en un espectrofotómetro ajustado a 490 nm, empleando cubetas de vidrio con un paso óptico de 10 mm.

Los parámetros evaluados en el proceso de validación fueron los siguientes: especificidad, linealidad, precisión y exactitud.

Para el estudio de selectividad se prepararon muestras, placebos (que contenía lanolina anhidra, cera de abejas, petrolato sólido blanco - excipientes que conforman la formulación excepto el extracto de Aloe que contiene polisacáridos que son los que se evalúan en base a manosa) y analito, registrándose el espectro UV de las soluciones entre 300 y 700 nm. Simultáneamente se realizaron las lecturas de absorbancia al máximo de absorción ⁷.

La linealidad del sistema se comprobó a través de una curva de calibración en un intervalo de concentración entre 0,2 y 1,0 mg/mL incluyendo cinco concentraciones diferentes.

El estudio de repetibilidad se realizó por sextuplicado a una muestra homogénea común que representa el 100% de la cantidad teórica declarada. El estudio de precisión intermedia se realizó con igual muestra homogénea de concentración única, efectuándose las determinaciones por dos analistas, en dos días diferentes. Para su evaluación se realizó un análisis de varianza y la evaluación de la existencia o no de diferencias significativas en los resultados obtenidos por los analistas en días diferentes.

Para evaluar la exactitud se empleó el método de recuperación. Se partió de una muestra placebo y se le adicionaron cantidades crecientes de extracto acuosos de aloe para la cuantificación de los polisacáridos presentes en el extracto, en base manosa, correspondiente al 80, 100 y 120%. Simultáneamente se analizó la linealidad del método y el intervalo, así como la recuperación del mismo al añadir diferentes concentraciones de manosa. El análisis se realizó por triplicado ⁸.

Robustez

Para el estudio de robustez se realizaron cambios en las concentraciones de solución salina, se emplearon reactivos de diferentes marcas

(Merck, Riedel-de Haen, BDH) y diferentes equipos, con el objetivo de determinar si el método era capaz de ofrecer resultados reproducibles ante estos cambios.

Aplicación del método en el estudio de estabilidad

El estudio de estabilidad por vida de estante se efectuó a una temperatura de 30 ± 2 °C y 70% H.R, realizándose el análisis al inicio, 3, 6, 9 y 12 meses. Todos los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente con la ayuda del programa Statistica para Windows.

RESULTADOS

Se determinó la selectividad del método, donde al aplicar ANOVA 1, para el 95% de confianza, se obtuvo como resultado que no existían diferencias estadísticamente significativas entre el valor medio de absorbancia de la sustancia de referencia y las muestras y la del placebo, lo cual demuestra que el placebo no absorbió significativamente en la longitud de onda de trabajo, pues la absorbancia fue de 0,006, valores muy cercanos a cero.

En la Tabla 1 se reportan los resultados del estudio de linealidad del sistema y la exactitud,

Parámetros	Resultados	Límites
Linealidad del sistema	$Y = 0,034 + 3,625 x$ $r = 0,9928$	$y = b + a x$ $r \geq 0,9900$
	C.V f = 2,97%	C.V f \leq 5,0 %
	$t_{calculada} = 2,78$ $t_{tabulada} = 3,18$	$t_{calculada} < t_{tabulada}$
Exactitud	$Y = - 0,037 + 1,004 X$ $r = 0,9992$	$y = b + a x$ $r \geq 0,99000$
	C.V f = 2,49 %	C.V f \leq 5,0 %
	R = 99,67 %	R = 98,0 - 102,0 %
	$t_{calculada} = 1,35$ $t_{tabulada} = 3,18$	$t_{calculada} < t_{tabulada}$
	$G_{calculada} = 0,7619$ $G_{tabulada} = 0,9750$	$G_{calculada} < G_{tabulada}$

Tabla 1. Resultados del estudio de la linealidad del sistema y exactitud. C.V_f : coeficiente de variación de los factores de respuesta obtenidos con relación a la absorbancia/ concentración; r: coeficiente de correlación; t: estadígrafo t-Student; G: estadígrafo G Cochran.

Analista 1		Analista 2	
Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
0,237 %	0,245 %	0,249 %	0,248 %
0,242 %	0,241 %	0,247 %	0,247 %
0,233 %	0,230 %	0,231 %	0,232 %
0,245 %	0,237 %	0,237 %	0,238 %
0,237 %	0,239 %	0,245 %	0,247 %
0,241 %	0,243 %	0,235 %	0,232 %
Xmedia = 0.239%	Xmedia = 0,242%	Xmedia = 0,240%	Xmedia = 0,240%
C.V = 2.04%	C.V = 2,85%	C.V = 2,55%	C.V = 2,64%
F calculado Días= 0,96 F calculado Analistas= 0,70 F tabulado (10,10 / 0.05) = 2,97			
t calculado Días = 0,70 t calculado Analistas = 0,26 t tabulado (22 / 0.05) = 2,07			

Tabla 2. Estudio de la precisión del método analítico. X: media; CV: Coeficiente de variación; t: estadígrafo t-Student; F: estadígrafo F-Fischer.

Especificación	Inicial	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Descripción	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Identificación	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Contenido por tubo (g)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Polisacáridos (%)	0.270	0.282	0.278	0.275	0.273

Tabla 3. Resultados del estudio de estabilidad por vida de estante (30 ± 2 °C y 70% H.R).

mientras que los correspondientes a la precisión aparecen en la Tabla 2.

En el estudio de robustez se realizaron cambios en las concentraciones de solución salina, se emplearon diferentes marcas de reactivos, diferentes equipos, con el objetivo de determinar si el método era capaz de ofrecer resultados reproducibles ante estos cambios. Los resultados del estudio de robustez (Tabla 3) demostraron que los cambios en las concentraciones de solución salina, en las marcas de reactivos y en los diferentes equipos, no afectan la reproducibilidad de los resultados.

En la Tabla 3 aparece reportado el estudio de estabilidad realizado.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio de selectividad del método espectrofotométrico, indican que los excipientes que se emplean en el ungüento de aloe al 25%, lanolina anhidra, cera de abejas, petrolato sólido blanco, no interfieren en la determinación del principio activo, lo que demuestra la selectividad del método para el control de la calidad al no observarse absorbancia del placebo a la longitud de onda máxima del principio activo.

La curva de calibración del método validado resultó ser lineal. Al aplicar la prueba del intercepto, resultó no significativo ya que la t_{tabulada} fue mayor que la $t_{\text{calculada}}$ por lo que se rechaza la hipótesis nula de que el intercepto es igual a cero. En la prueba de linealidad mediante el coeficiente de variación de los factores de respuesta CV_f ; se obtuvo un coeficiente de variación menor al 5% demostrándose el cumplimiento de la linealidad en el intervalo de concentraciones estudiadas.

En el estudio de repetibilidad se obtuvo un coeficiente de variación adecuado, menor que 3,0%, lo que demuestra la buena precisión del método espectrofotométrico empleado. Los resultados obtenidos en los estudios de la precisión intermedia demostraron que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días pa-

ra una probabilidad de 0,05%, ya que los valores de $F_{\text{calculada}}$ obtenidos por los analistas en días diferentes fueron menores que la F_{tabulada} . Al realizar las prueba de t-Student, los valores calculados resultaron menores que el tabulado, lo cual demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas por analistas diferentes en días diferentes, con un nivel de significación de un 5%.

En el estudio de exactitud realizado, el valor de porcentaje de recobro estuvo dentro de los límites establecidos para los métodos espectrofotométricos (98-102%) y el valor del coeficiente de variación resultó menor que el 5%. En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud, al aplicar la prueba de Cochran, las concentraciones empleadas son equivalentes indicando que la concentración no influye en la variabilidad de estos. No existieron diferencias significativas entre las recuperaciones medias y el 100% de recuperación al aplicar la prueba de t-Student, ya que la $t_{\text{calculada}}$ fue menor que la t_{tabulada} , por lo que el método es exacto. La curva de recuperación reportada de mg teóricos contra los mg prácticos demostró un comportamiento lineal. La prueba de significación del intercepto resultó no significativo y el valor de la pendiente no difiere significativamente de la unidad. Los valores alcanzados de la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación demostraron la exactitud y linealidad del método ⁸.

En el estudio de robustez se demostró los cambios realizados no afectan la reproducibilidad de los resultados, ya que los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites de aceptación establecidos.

En el estudio de estabilidad realizado empleando el método validado para la cuantificación de polisacáridos en base manosa en el ungüento de aloe al 25%, el tiempo de vida útil fue superior a los 12 meses, encontrándose los resultados de los parámetros evaluados dentro de los límites establecidos en las especificaciones de calidad descritas en el trabajo por el fabricante del producto terminado. Las características orga-

nolépticas permanecieron inalterables durante el tiempo de experimentación lo que permitió establecer las condiciones de almacenamiento. Los parámetros de polisacáridos (mg/g%) y de contenido por tubo (g) se encontraron dentro de los límites establecidos para el producto terminado.

CONCLUSIONES

El estudio desarrollado permite afirmar que el método espectrofotométrico validado para la cuantificación de polisacáridos en base manosa, en el control de la calidad y el estudio de estabilidad del ungüento de aloe al 25% es lineal, preciso, exacto, robusto y selectivo en el rango de concentraciones estudiadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Skousen, M.B. (1980) "*Sábila: salud, belleza y vitalidad*". Universal Concepts. USA.
2. Cuba, Ministerio de Salud Pública (1992) *Guía terapéutica dispensaria de fitofármacos y apifármacos*. Ciudad de La Habana, Editorial de Ciencias Médicas.
3. Paranaud, E., & J. Letini (1986) "*Fisura anal. Temas de Coloproctología I*". Ed. Científico-Técnica. La Habana, Cuba. págs. 217 -27.
4. León Sarabia, J.E., V.P. Rosales Clares, R.A. Rosales Clares & V. Pavón Hernández (1999) *Rev. Cubana Plant. Med.* **4**: 102-5.
5. Romero Díaz, J.A., C.M. García Peña, R. Menéndez Castillo & V. Martínez Espinosa (2007) *Rev. Cubana Plant. Med.* **12** (2) (on line).
6. United States Pharmacopeial Convention (2007) *Farmacopea de los Estados Unidos - USP 30 Ed. NF- 25*. Rockville: Mack Printing, USA
7. FDA/Center for Drug Evaluation and Research (2001) "Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation". Guidance For Industry. FDA, USA.
8. International Conference on Harmonization (1995) "Technical Requirements For The Registration of Pharmaceuticals For Human Use". Validation of Analytical Procedures, ICH-Q2A, Geneva.