



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Nova preparació pediàtrica per al tractament de la tuberculosi

Débora Mercadé Frutos

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

**NOVA PREPARACIÓ PEDIÀTRICA PER AL TRACTAMENT  
DE LA TUBERCULOSI**

DÉBORA MERCADÉ FRUTOS  
2018



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT EN RECERCA, CONTROL I  
DESENVOLUPAMENT DE MEDICAMENTS

**NOVA PREPARACIÓ PEDIÀTRICA PER AL TRACTAMENT  
DE LA TUBERCULOSI**

Memòria presentada per Débora Mercadé Frutos per optar al títol de Doctor per  
la Universitat de Barcelona

Directors de la tesi:

Prof. Dr. Juan Carlos Juárez Giménez

Prof. Dr. Josep Maria Suñé Negre

Doctoranda:

Débora Mercadé Frutos

Tutor:

Prof. Dr. Josep Maria Suñé Negre

DÉBORA MERCADÉ FRUTOS, 2018



## AGRAÏMENTS

Vull agrair a totes les persones que han fet possible la realització d'aquesta tesi.

En primer lloc al meu marit, en Rubén, gràcies pel teu suport incondicional, pels teus ànims, mirant sempre més enllà i encoratjant-me a assolir totes les fites que aquest repte m'ha plantejat, per confiar en mi i per fer aquest camí junts, moltes gràcies.

A la meva filla Georgina, per donar-me, sense encara tenir coneixement, la força i la motivació per finalitzar aquesta etapa.

Als meus pares, per haver confiat sempre en mi i per haver-me educat sota la cultura de la constància i l'esforç.

A la meva família, per haver-me animat i recolzat durant totes les etapes viscudes.

Al Dr. Josep Maria Suñé, moltes gràcies pel teu ajut incondicional, guia i recolzament rebut per realitzar la tesi, sense la teva direcció no hagués estat possible, transformes en fàcils les coses difícils.

Al Dr. Juan Carlos Juárez, per orientar-me en la investigació d'una problemàtica clínica, real i actual.

A la Dra. Pilar Pérez, per la teva orientació i confiança en que allò que estàvem fent sortiria endavant.

A la Dra. Encarna García, pels teus consells, tant tècnics com personals.

Al tot el personal del Departament i del SDM, per la vostra ajuda, comprensió, suport, ànims i consells. En especial al Sr. Roig, gràcies per la guia, l'orientació i la implicació en aquest projecte.

Moltes gràcies, sense vosaltres no hauria estat possible.



## **APORTACIONS RELACIONADES AMB LA TESI DOCTORAL**

- **PATENT**

Aquesta tesi doctoral ha generat una sol·licitud de patent Europea per part de la UB (veure Annex I):

**Title:** SUSPENSION FORMULATION FOR THE TREATMENT OF TUBERCULOSIS

**Submission number:** 300276892

**File number to be used for priority declarations:** EP 18382385

**Date of receipt:** 04 June 2018

**Applicant:** UNIVERSITAT DE BARCELONA

**Country:** ES

- **COMUNICACIONS A CONGRESSOS**

- 1- Mercadé Frutos D, Suñé Pou M, Nardi Ricart A, Nofrerías Roig I, García Montoya E, Pérez Lozano P, Miñarro Carmona M, Tico Grau JR, Suñé Negre JM. Application of SeDeM Diagram System for the characterization of isoniazid in relation to its direct compression viability. *2<sup>on</sup> European Conference on Pharmaceutics*. Cracòvia (Polònia), 3-4 abril 2017. (veure Annex II).

I una ponència en la següent jornada (veure Annex III )

- 2- Mercadé Frutos D. Nova preparació pediàtrica per al tractament de la tuberculosi. Comunicació oral. IX Jornada de recerca a la Facultat de Farmàcia. Barcelona. 13 de juny de 2016.





# ÍNDEX



<b>ÍNDEX</b>	
<b>OBJECTIUS</b> .....	19
<b>PART BIBLIOGRÀFICA</b> .....	23
<b>CAPÍTOL 1: TERAPÉUTICA FARMACOLÒGICA EN PEDIATRIA</b> .....	25
1.1 INTRODUCCIÓ.....	25
1.2 TUBERCULOSI.....	27
1.2.1 Definició i situació actual .....	27
1.2.2 Microbiologia.....	28
1.2.3 Transmissió .....	31
1.2.4 Signes i símptomes .....	31
1.2.5 Diagnòstic i prevenció .....	32
1.2.6 Tractaments utilitzats en pediatria .....	34
<b>CAPÍTOL 2: PRINCIPIS ACTIUS I FORMA FARMACÈUTICA D'ELECCIÓ PER L'ELABORACIÓ DE LA NOVA PREPARACIÓ PEDIÀTRICA PER AL TRACTAMENT DE LA TUBERCULOSI</b> .....	39
2.1 INTRODUCCIÓ.....	39
2.2 CARACTERITZACIÓ DELS PRINCIPIS ACTIUS.....	39
2.2.1 Rifampicina.....	39
2.2.2 Isoniazida .....	47
2.2.3 Pirazinamida .....	53
2.3 CARACTERÍSTIQUES FARMACOLÒGIQUES.....	58
2.3.1 Rifampicina.....	58
2.3.2 Isoniazida .....	60
2.3.3 Pirazinamida .....	62
2.4 VIABILITAT DE LA FORMA FARMACÈUTICA .....	63
<b>PART EXPERIMENTAL</b> .....	69
<b>CAPÍTOL 3: MATERIAL I MÈTODES</b> .....	73
3.1 ESTUDI I CARACTERITZACIÓ DELS PRINCIPIS ACTIUS.....	73
3.1.1 Material.....	73
3.1.1.1 Principis actius .....	73
3.1.1.2 Estudi de les característiques de solubilitat.....	73
3.1.1.3 Determinació de la mida de partícula.....	74
3.1.1.4 Estudi de les propietats reològiques .....	74
3.1.1.5 Espectrofotometria UV-Vis .....	75
3.1.1.6 Espectroscòpia d'infraroig (IR).....	76

3.1.1.7	Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)	76
3.1.1.8	Difracció per Raig X	76
3.1.1.9	Determinació d'incompatibilitats entre principis actius mitjançant calorimetria diferencial d'escombratge (DSC)	77
3.1.2	Mètodes	77
3.1.2.1	Estudi de les característiques de solubilitat	77
3.1.2.2	Determinació de la mida de partícula	78
3.1.2.3	Estudi de les propietats reològiques	79
3.1.2.4	Espectrofotometria UV-Vis	83
3.1.2.5	Espectroscòpia d'infraroig (IR)	84
3.1.2.6	Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)	85
3.1.2.7	Difracció per Raig X	86
3.1.2.8	Determinació d'incompatibilitats entre principis actius mitjançant calorimetria diferencial d'escombratge (DSC)	87
3.2	MÈTODE ANALÍTIC	88
3.2.1	Material	88
3.2.1.1	Primeres matèries i patrons	88
3.2.1.2	Reactius i solucions	89
3.2.1.3	Aparells i utilatge	89
3.2.2	Mètodes	91
3.2.2.1	Introducció	91
3.2.2.2	Desenvolupament del mètode d'anàlisi	97
3.2.2.3	Definició dels paràmetres de validació	105
3.2.2.4	Procediment de validació del mètode analític	107
3.3	ESTUDI DE PREFORMULACIÓ I FORMULACIÓ	118
3.3.1	Material	118
3.3.1.1	Primeres matèries	118
3.3.1.2	Material per l'elaboració i el condicionament de la fórmula	119
3.3.1.3	Material per la realització dels estudis d'eficàcia de conservació antimicrobiana (Challenge test) de la fórmula definitiva	120
3.3.2	Mètodes	121
3.3.2.1	Mètode de selecció de la fórmula òptima i de la tècnica d'elaboració més adient	121
3.3.2.2	Mètode de selecció de la fórmula amb millors propietats organolèptiques	121

3.3.2.3	Mètode de realització dels estudis d'eficàcia de conservació antimicrobiana (Challenge test) de la fórmula definitiva .....	122
3.4	ESTUDIS D'ESTABILITAT PRELIMINAR.....	123
3.4.1	Material.....	123
3.4.1.1.	Primeres matèries.....	123
3.4.1.2.	Material per l'elaboració, condicionament i anàlisi de les fórmules .....	125
3.4.2	Mètodes.....	126
3.4.2.1.	Mètode d'anàlisi de les fórmules realitzades durant els estudis d'estabilitat preliminar .....	126
3.5	ESTUDIS D'ESTABILITAT .....	127
3.5.1	Material.....	127
3.5.1.1.	Primeres matèries.....	127
3.5.1.2.	Material per l'elaboració, condicionament i anàlisi de les fórmules.....	128
3.5.2	Mètodes.....	130
3.5.2.1.	Mètode d'anàlisi de les fórmules realitzades durant els estudis d'estabilitat.....	130
3.5.2.2.	Mètode de realització dels estudis d'estabilitat.....	130
<b>CAPÍTOL 4: RESULTATS EXPERIMENTALS</b>	.....	<b>131</b>
4.1	ESTUDI I CARACTERITZACIÓ DELS PRINCIPIS ACTIUS.....	131
4.1.1	Estudi de les característiques de solubilitat .....	131
4.1.2	Determinació de la mida de partícula .....	133
4.1.3	Estudi de les propietats reològiques.....	139
4.1.4	Espectrofotometria UV-Vis .....	142
4.1.5	Espectroscòpia d'infraroig (IR) .....	144
4.1.6	Ressonància Magnètica Nuclear (RMN) .....	146
4.1.7	Difracció per Raig X.....	148
4.1.8	Determinació d'incompatibilitats entre principis actius mitjançant calorimetria diferencial d'escombratge (DSC).....	154
4.2	MÈTODE ANALÍTIC .....	159
4.2.1	Idoneïtat del sistema .....	159
4.2.2	Selectivitat .....	160
4.2.2.1.	Identificació del principi actiu .....	160
4.2.2.2.	Abscència d'interferència dels excipients de la formulació.....	162
4.2.2.3.	Abscència d'interferència dels dissolvents .....	162

4.2.2.4. Mostres sotmeses a estrès .....	163
4.2.3 Linealitat .....	174
4.2.4 Precisió.....	211
4.2.4.1. Repetibilitat del Sistema Instrumental .....	211
4.2.4.2. Repetibilitat del mètode .....	221
4.2.4.2.1. Repetibilitat de la solució patró .....	221
4.2.4.2.2. Repetibilitat de la solució problema .....	223
4.2.4.2.3. Precisió intermitja del mètode .....	225
4.2.5 Exactitud .....	231
4.2.6 Robustesa .....	234
4.2.7 Estabilitat de la solució .....	254
4.3 ESTUDIS DE PREFORMULACIÓ PER LA COMBINACIÓ RIFAMPICINA, ISONIAZIDA I PIRAZINAMIDA.....	260
4.3.1 Introducció .....	260
4.3.2 Estudis de preformulació amb excipients .....	260
4.4 ESTUDIS DE FORMULACIÓ PER LA COMBINACIÓ RIFAMPICINA, ISONIAZIDA I PIRAZINAMIDA .....	269
4.4.1 Preparació de la mescla de rifampicina, isoniazida i pirazinamida ....	269
4.4.2 Estudis de formulació amb rifampicina, isoniazida i pirazinamida ....	269
4.4.3 Estudis de millora de les propietats organolèptiques.....	284
4.4.4 Estudis d'eficàcia de conservació antimicrobiana (Challenge Test) per a la combinació de rifampicina, isoniazida i pirazinamida .....	291
4.5 ESTUDIS D'ESTABILITAT PRELIMINAR.....	295
4.5.1 Introducció .....	295
4.5.2 Estudis d'estabilitat preliminar per la combinació de rifampicina, isoniazida i pirazinamida.....	295
4.6 ESTUDIS D'ESTABILITAT .....	301
4.6.1 Introducció .....	301
4.6.2 Disseny de l'estudi.....	303
4.6.3 Paràmetres d'estudi i especificacions .....	305
4.6.4 Avaluació dels mètodes d'estudi .....	308
4.6.5 Resultats experimentals dels estudis d'estabilitat .....	309
4.6.6 Discussió dels resultats obtinguts .....	334
4.6.7 Conclusions dels estudis d'estabilitat .....	354
<b>DISCUSSIÓ GENERAL .....</b>	<b>355</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>369</b>

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	373
ANNEX I.....	391
ANNEX II.....	395
ANNEX III .....	401
ANNEX IV .....	405
ANNEX V .....	421





## SÍMBOLS I ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic
AEFI	Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria
ANOVA	Anàlisi de la variància
AOAC	<i>Association Of Analytical Chemists</i>
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>
ARN	Àcid ribonucleic
BCG	Bacil de Calmette-Guérin
BCS	<i>Biopharmaceutical Classification System</i>
BHE	Barrera hematoencefàlica
BOE	Boletín Oficial del Estado
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
CDE	Calorimetria diferencial d'escombratge
CDF	Combinació de dosi fixa
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EM	Espectroscòpia de masses
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HLB	<i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
I	Isoniazida
ICH	<i>International Council on Harmonisation</i>
IR	Espectroscòpia d'infraroig
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LAM	Lipoarabinomanà
LCR	Líquid cefaloraquidi
mAGP	Complex àcid.micòlic-arabinogalactà-peptidglucà
OMS	Organització Mundial de la Salut
ONU	Organització de les Nacions Unides
P	Pirazinamida
PNT	Procediment Normalitzat de Treball

POA	Ácid priazinoic
PPD	<i>Protein Purified Derivative</i>
R	Rifampicina
RMN	Ressonància magnètica nuclear
RPM	Revolucions per minut
S	Desviació estàndard
SDM	Servei de Desenvolupament del Medicament
SIDA	Síndrome d'Immunodeficiència Adquirida
SNC	Sistema Nerviós Central
SRD	Coefficient de variació
TB	Tuberculosi
TB-MR	Tuberculosi Multiresistent
TCM	Triglicèrids de cadena mitja
UICTER	Unió Internacional contra la Tuberculosi i les Malalties Respiratòries
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV-Vis	Ultraviolada-visible
VIH	Virus d'immunodeficiència Humana

## OBJECTIUS



## OBJECTIUS

Obtenir un nou medicament que permeti dosificar de manera conjunta, senzilla i individualitzada la combinació de tres dels principis actius (rifampicina isoniazida, i pirazinamida) més utilitzats per al tractament de la tuberculosi en població pediàtrica.

Per a la consecució d'aquest objectiu principal, és necessari assolir una sèrie d'objectius secundaris, sense els quals no seria possible l'obtenció d'aquest nou medicament. Aquests objectius són els següents:

- Investigació de les característiques químiques, físiques i tecnològiques dels principis actius motiu d'estudi (rifampicina, isoniazida i pirazinamida).
- Disseny d'una formulació robusta i adequada en concordança amb els principis actius i la seva forma farmacèutica que permeti dosificar correctament cadascun dels principis actius segons les recomanacions de les organitzacions sanitàries.
- Establiment de la tècnica d'elaboració més adient en funció dels resultats obtinguts.
- Investigació i desenvolupament d'una nova metodologia analítica adaptada a la nova formulació.
- Investigació de l'estabilitat de la fórmula definitiva.



## PART BIBLIOGRÀFICA





# CAPÍTOL 1: TERAPÉUTICA FARMACOLÒGICA EN PEDIATRIA

## 1.1 INTRODUCCIÓ

Actualment hi ha dos mil cent milions de nens al món, xifra que representa el 36% del total de la població mundial (Naciones Unidas, 2014 a). Tot i ser més d'un quart del total de la població que hi ha al món, i tenint en compte que un elevat tant per cent de nens s'hauran de tractar en algun moment de la seva etapa com a infants per pal·liar o curar patologies que requereixin tractament farmacològic de llarga durada, destacar que encara avui en dia, una elevada proporció dels medicaments que s'utilitzen no es recomanen o no especifiquen el seu possible ús per població pediàtrica (Piñeiro Pérez et al. 2013).

I és que, des d'una perspectiva psicològica, mèdica o farmacològica el nen no es pot considerar un adult petit. Els nens i els adults difereixen en capacitats fisiològiques, el perfil farmacocinètic i les característiques farmacodinàmiques. Les seves vies metabòliques, funcions orgàniques i les taxes metabòliques, són molt diferents. Les disparitats també existeixen en termes de les funcions del receptor, sistemes efectors i mecanismes homeostàtics. El seu organisme no reacciona igual als medicaments, els quals han d'estar adaptats a la seva edat, pes corporal y condicions fisiològiques (Lorenzo et al. 2008).

Ahora, cal tenir en compte que la població pediàtrica no es pot tractar com un grup únic i homogeni: des dels nounats prematurs fins als adolescents post-púbères estan compresos dins de l'edat pediàtrica però, amb una clara diferència en la seva mida, desenvolupament, maduració de les vies bioquímiques i resposta a la teràpia (Zuccotti et al. 2011).

Tot i que la societat científica té molt present aquests trets diferencials i característics d'aquest grup de població, i que a nivell de les agències regulatòries s'intenta potenciar la investigació mitjançant la creació de nous reglaments que promoguin l'estimulació de la recerca en les àrees on el coneixement és escàs i fent més medicaments disponibles per a nens (Bavdekar, 2013), (Diana et al. 2012), avui

en dia encara és tot un repte l'elaboració de medicaments per a pediatria degut a l'existència d'un seguit de barreres que condicionen de forma evident el desenvolupament de medicaments per pediatria i en conseqüència els tractaments utilitzats per les diferents patologies.

Aquestes barreres en la investigació i en el desenvolupament de medicaments per a nens són de llarga durada i inclouen diversos factors. El principal, és probablement l'interès comercial limitat, ja que la població pediàtrica és menys nombrosa i més sana que la població adulta, i per tant, les malalties són més rares i sovint de més curta durada, el que implica un mercat acotat per als medicaments pediàtrics (Bavdekar, 2013), (Zuccotti et al. 2011).

A més, tot i l'actualització a nivell de normativa per part de les agències reguladores per incentivar la investigació de medicaments per pediatria (European Commission, 2014), (European Medicines Agency, 2014), i del fet de que del nombre total de medicaments existents al mercat només es poden extrapolar les dades obtingudes dels assajos clínics realitzats en adults en un 6% d'aquests, hi ha encara dificultats en la realització d'assajos clínics en nens. El disseny de l'assaig, possibles conflictes ètics, disparitat entre el permís dels pares i el consentiment de l'infant, riscos potencials de salut que poden afectar al desenvolupament o dificultats en la determinació o predicció de la dosi són trets que condicionen la realització d'assajos clínics en pediatria (Bavdekar, 2013), (Diana et al. 2012), (Zuccotti et al. 2011).

Sovint, aquestes barreres són determinants alhora de fabricar medicaments per nens i en conseqüència, alhora d'assolir una bona adherència terapèutica per part del pacient pediàtric. S'entén com adherència o compliment terapèutic el grau en què els pacients prenen els medicaments prescrits pels seus metges; generalment es reporten com el percentatge de les dosis prescrites realment preses pel pacient durant un període de temps determinat. Cal destacar que les taxes d'adherència són típicament més altes en els pacients amb malalties agudes, en comparació amb aquells amb malalties cròniques, les quals són decebedorament més baixes, caient sobretot després dels primers sis mesos de tractament (Osterberg et al. 2005).

El fet de que els pacients pediàtrics hagin de prendre medicaments on la dosificació i la forma farmacèutica estan establertes i elaborades per la població adulta, fa que el compliment terapèutic sigui baix i com a conseqüència l'èxit del tractament i les probabilitats de curació. Així doncs una de les claus per aconseguir una bona adherència terapèutica es l'obtenció d'una forma farmacèutica adient, que s'adapti a les necessitats de la població pediàtrica tenint present l'heterogeneïtat fisiològica d'aquest grup.

## **1.2 TUBERCULOSI**

### **1.2.1 Definició i situació actual**

La tuberculosi (TB) és una infecció bacteriana causada per un micobacteri anomenat *Mycobacterium tuberculosis*. El bacteri sol envair el teixit pulmonar, però també pot difondre per diferents parts de l'organisme. La tuberculosi és caracteritzada per ser una malaltia crònica que pot persistir durant anys si no es tracta. Tot i els avenços en els mètodes utilitzats tant a nivell de prevenció com de tractament de la infecció, la tuberculosi és la segona causa mundial de mortalitat després de la Síndrome d'Immunodeficiència Adquirida (SIDA) causada per un agent infeccios (Organización Mundial de la Salud, 2014a).

Després del descobriment del bacil de la tuberculosi realitzat pel Dr. Robert Koch el 24 de març de 1882, cent trenta anys més tard i segons l'informe anual sobre tuberculosi realitzat per l'Organització Mundial de la Salut (OMS), a l'any 2013 9 milions de persones van emmalaltir de tuberculosi, dels quals 550.000 foren nens, i 1,5 milions van morir per aquesta malaltia. A més a més, es calcula que una tercera part de la població mundial té tuberculosi latent, és a dir, estan infectats pel bacil però encara no han desenvolupat la malaltia ni poden transmetre la infecció. Aquestes persones tenen un risc d'un 10% d'emmalaltir de tuberculosi al llarg de la seva vida; aquest risc augmenta en el cas de malalts VIH positius, persones amb desnutrició, fumadors i diabètics (Chen, 2000), (Organización Mundial de la Salud, 2014a).

Tot i que hi ha un increment en el desenvolupament de la tuberculosi en persones infectades pel Virus de la Immunodeficiència Humana (VIH), causant

una quarta part de les defuncions d'aquest grup, i que anualment unes 480.000 persones desenvolupen tuberculosi multiresistent (TB-MR), on els pacients presenten resistència al tractament amb rifampicina i isoniazida, a nivell mundial, el nombre aproximat de persones que emmalalteixen de tuberculosi cada any, està disminuint. Això significa que el món està en camí de complir l'Objectiu de Desenvolupament del Mil·lenni promogut per l'Organització de les Nacions Unides (ONU) consistent en aturar la propagació d'aquesta malaltia a l'any 2015 basant-se en la realització de 5 accions prioritàries:

1. Arribar als casos inadvertits.
2. Abordar la TB-MR com una crisi de salut pública.
3. Accelerar la resposta a la TB en pacients amb VIH.
4. Augmentar el finançament per a eliminar tot dèficit de recursos.
5. Garantir l'adopció ràpida d'innovacions.

I és que la taxa de mortalitat per tuberculosi ha disminuït un 45% entre 1990 i 2013 i es calcula que entre l'any 2000 i 2013 es van salvar 37 milions de vides mitjançant el diagnòstic i el tractament de la malaltia (Naciones Unidas, 2014b).

### **1.2.2 Microbiologia**

El gènere *Mycobacterium* està format per bacils gram positius aerobis, àcid alcohol resistent, immòbils i no esporulats amb una mida compresa entre 0,2-0,6 µm per 1-10 µm. La coberta es caracteritza per ser una estructura complexa constituïda per càpsula, paret cel·lular i membrana plasmàtica (Figura 1 ) (Gorocica et al. 2005).

La càpsula és la capa externa de la coberta i confereix protecció davant factors externs, per tant, té una interacció directa amb els elements encarregats de la resposta immune. Entre els principals components de la coberta es troben àcids micòlics i glicolípid fet que fa que la seva superfície sigui hidrofòbica.

La paret cel·lular es localitza just per sota de la càpsula, separada per un espai periplasmàtic, posseeix un elevat contingut en lípids (50-60%) que li confereixen

un caràcter hidròfob fent-la refractària als atacs per hidròlisi enzimàtica. És una barrera efectiva davant de molts agents antimicrobians convencionals i està constituïda pel complex macromolecular format per àcids micòlics-arabinogalactà-peptidglucà (mAGP).

La membra plasmàtica té les característiques biològiques i bioquímiques de qualsevol membrana, tot i que en el cas dels micobacteris, els derivats de fosfolípids es caracteritzen per estar altament glicosilats donant lloc a molècules com el lipoarabinomanà (LAM) el qual té un paper fonamental en la patogènesis de la tuberculosi (Gorocica et al. 2005).

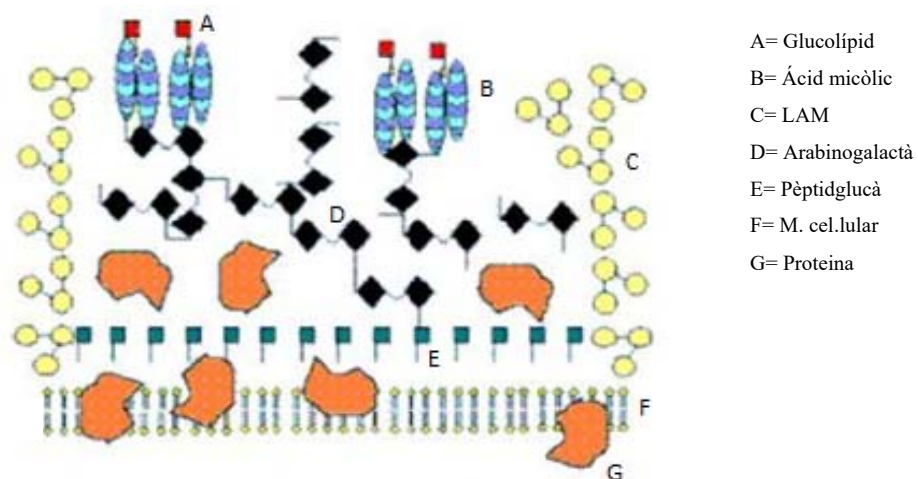


Figura 1. Coberta del gènere *Mycobacterium* (Gorocica et al. 2005).

A nivell de laboratori, els bacils, degut a aquesta coberta característica, un cop han estat tenyits no es poden decolorar amb les solucions àcides, motiu pel qual reben el nom de bacils àcid-alcohol resistents (Murray et al. 2014).

Actualment s'han descrit més de 100 espècies de micobacteris, algunes són patògenes i d'altres sapròfites. Els micobacteris que destaquen pel seu interès clínic són *Mycobacterium leprae*, causant de la lepra, *Mycobacterium bovis* responsable d'una petita fracció de les infeccions tuberculoses i *Mycobacterium tuberculosis* (bacil de Koch) patògen estricte causant de gran part de les infeccions tuberculoses. La resta d'espècies es denominen micobacteris ambientals o no tuberculoses, degut a que el seu hàbitat és ambiental. Aquests

micobacteris poden causar malalties en l'ésser humà com a patògens oportunistes (Prats, 2012).

*M. tuberculosis* (Figura 2) es caracteritza per ser un patògen intracel·lular capaç de produir infeccions de per vida. Durant el període d'exposició ingressa a les vies respiratòries, i allà, les partícules infeccioses arriben als alvèols pulmonars on són digerides pels macròfags alveolars. Aquesta estructura juntament amb les cèl·lules epitelials i les cèl·lules de Langhans formen l'anomenat granuloma, el qual impedeix la disseminació del patògen per l'organisme. En el cas de granulomes petits on hi ha pocs bacteris són destruïts i eliminats amb mínim dany tissular, però en el cas de presentar una elevada càrrega bacteriana, el granuloma gran s'encapsula amb una substància anomenada fibrina la qual confereix protecció als bacteris enfront la destrucció per part dels macròfags. Els bacteris poden romandre latents en aquesta fase durant anys. Els bacils es poden propagar per tot el cos a través del sistema limfàtic o del torrent sanguini. La reactivació generalment es produeix quan disminueix la resposta immunitària de l'hoste com a conseqüència de l'edat, per una malaltia (pacients amb VIH) o tractament immunosupressor (Chen, 2000),(Murray et al. 2014).

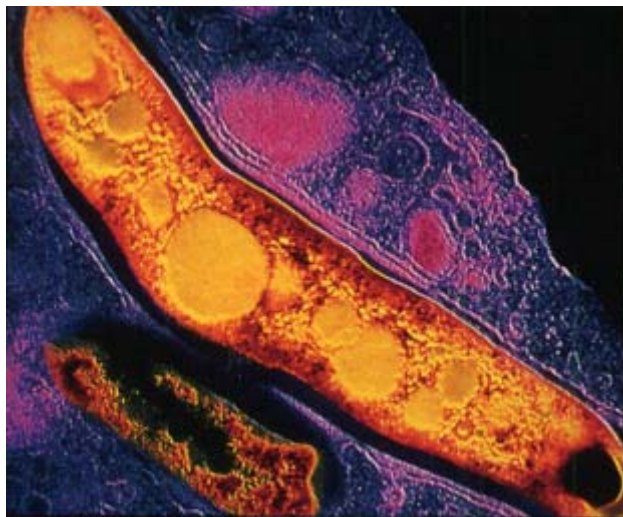


Figura 2. Bacil Gram positiu *Mycobacterium Tuberculosis* (Murray et al. 2014).

### 1.2.3 Transmissió

Tot i que la tuberculosi es pot produir en primats i animals de laboratori, l'únic reservori natural del microorganisme és l'ésser humà. La malaltia es transmet per contacte estret entre persones mitjançant la inhalació d'aerosols infecciosos d'aproximadament 10 µm de diàmetre. Les partícules més grans queden atrapades a les superfícies mucoses i són eliminades per l'acció dels cilis de l'arbre respiratori. Les partícules més petites són capaces de superar les barreres físiques naturals de la part alta de l'aparell respiratori arribant als alvèols i iniciant així la infecció.

Molts dels bacils seran eliminats immediatament, d'altres es multiplicaran a l'interior del macròfag causant la destrucció d'aquest i l'alliberació de més bacils els quals tornaran a ser ingerits per altres macròfags. Si la infecció no es controla, pot produir greus seqüeles o fins i tot la mort.

El lloc primari de la infecció es produeix sempre a nivell dels camps pulmonars mitjos i inferiors (tuberculosi pulmonar) on l'elevat nivell d'oxigen i l'existència d'una circulació limfàtica més aviat pobre afavoreixen la multiplicació bacteriana. Des del focus pulmonar el microorganisme es pot disseminar a través dels vasos limfàtics i el torrent sanguini allotjant-se en diversos òrgans com els ganglis limfàtics, els ronyons, el peritoneu, les meninges, els ovaris, els ossos, les articulacions i d'altres (tuberculosi extra pulmonar) procés conegut com bacil·lèmia.

En aquests focus els bacils poden romandre latents però viables a l'interior dels macròfags sent així font potencial d'una reactivació posterior (tuberculosis secundària). En alguns casos, aquesta disseminació pot donar lloc a un procés immediatament actiu (tuberculosis primària) (Murray et al. 2014), (Prats, 2012).

### 1.2.4 Signes i símptomes

Tot i que la tuberculosis pot afectar a qualsevol òrgan, gran part de les infeccions en pacients immunocompetents estan restringides als pulmons. La



probabilitat de que la malaltia progressi a una malaltia activa depèn tant de la dosis infecciosa com de l'estat immunològic del pacient.

Els signes i símptomes clínics de la tuberculosi són el reflex de la localització de la infecció, l'afecció primària normalment es restringeix a les vies respiratòries inferiors. La malaltia té un inici insidiós, els pacients solen tenir símptomes inespecífics com malestar general, anorèxia, pèrdua de pes, tos i suors nocturns. L'espú pot ser escàs o hemoptísic i purulent en el cas de que hi hagi destrucció tissular.

La tuberculosi extra pulmonar normalment és el resultat de la disseminació hematògena o limfàtica dels bacils durant la fase inicial de multiplicació. Pot no haver indicis de malaltia pulmonar en pacients amb tuberculosi disseminada. Els signes i símptomes de la tuberculosi extra pulmonar depenen del lloc on estigui dirigida la infecció. En el cas de que afecti a la columna vertebral generalment apareix artritis, osteomielitis i la malaltia de Pott (coneguda també com tuberculosi vertebral ja que afecta a les articulacions vertebrals). Quan l'objectiu del bacil és el sistema nerviós central (SNC), la meningitis es presenta principalment amb símptomes com cefalees, febre, nàusees i vòmits i rigidesa cervical. Altres potencials llocs diana inclouen l'aparell reproductor, el fetge, el sistema urinari i de vegades fins i tot els músculs (Chen, 2000), (Murray et al. 2014).

### **1.2.5 Diagnòstic i prevenció**

Entre les eines que permeten emetre un diagnòstic de la malaltia es troben els exàmens directes, els cultius i la prova de la tuberculina. L'examen directe de les mostres clíniques mitjançant la tinció de Ziehl-Neelsen té una sensibilitat global del 50% arribant al 70% en el cas de mostres respiratòries. Degut a que el nombre de bacils alcohol-resistents pot ser escàs, s'ha d'observar la totalitat de la preparació. L'examen directe de les mostres respiratòries és de gran utilitat alhora d'evitar futurs contagis, ja que permet detectar als malalts bacil·lífers que actuen com a font de contagi, procedint així a realitzar les mesures d'aïllament necessàries i oportunes per evitar la disseminació de la malaltia entre persones.

En el cas dels cultius, les mostres clíniques on es poden trobar flora comensal, han de ser prèviament descontaminades per agents químics de forma que s'asseguri l'eliminació de la flora acompanyant alhora que es manté la viabilitat dels micobacteris. El diagnòstic tradicional de la tuberculosi ve marcat per la lentitud dels cultius, tant a nivell d'aïllament com a nivell d'identificació del bacteri i posterior estudi de sensibilitat als diferents agents antimicrobians. Tot i els clars avantatges que ha suposat la introducció de medis líquids amb detecció automàtica de creixement, encara avui en dia són necessàries de 2 a 3 setmanes per aïllar *M. tuberculosis*.

La introducció de les tècniques basades en l'amplificació d'àcids nucleics directament a partir de la mostra clínica permet un diagnòstic etiològic ràpid de la tuberculosi en aproximadament 2 hores. Aquestes proves són molt específiques i la seva sensibilitat és molt bona en mostres on s'observen micobacteris per examen directe, a més a més, detecten simultàniament la resistència a rifampicina que s'utilitza com a marcador de multiresistència.

La prova de la tuberculina o prova de Mantoux consisteix en la inoculació intradèrmica, a la part anterior de l'avantbraç, d'un extracte proteic purificat de *M. tuberculosis* (PPD). Quan una persona ha estat infectada per aquest bacteri, independentment de que sigui asimptomàtica o tingui manifestacions clíniques de la malaltia, a les 48 hores de la inoculació del PPD apareix en el lloc d'aquesta una reacció immune infiltrant, dura, generalment envoltada d'una aurèola eritematosa que desapareix als 7 dies aproximadament. Quan una persona no ha patit una infecció per *M. tuberculosis*, no es produeix aquesta reacció immune i per tant la prova és negativa.

S'han desenvolupat mètodes més actuals, com els mètodes de detecció de producció d'interferó gamma (IGRA), els quals s'utilitzen en combinació amb la prova de la tuberculina. Les tècniques IGRA permeten discriminar als individus infectats per *M. tuberculosis* dels vacunats pel bacil de Calmette-Guérin (BCG) i es basen en la detecció de l'interferó gamma en sang, citocina fonamental en el control de la tuberculosi que s'allibera com a resposta a l'estímul *in vitro* de

cèl·lules T sensibilitzades amb antígens específics de *M. tuberculosis* (González-Martín et al. 2010).

Es poden donar casos de falsos negatius per anèrgia com succeeix en malalts de SIDA o pacients que estan rebent tractament corticosteroide. En aquests casos i/o en persones que hagin estat vacunades davant la tuberculosi es recomana la realització d'una prova equivalent a la de la tuberculina la qual consisteix en ajuntar in vitro els limfòcits T CD4 del pacient amb pèptids derivats de proteïnes de *M. tuberculosis* que no es troben ni en la vacuna ni en altres micobacteris i detectar la producció d'interferó  $\gamma$  com a índex de reacció positiva (Prats, 2012).

L'única vacuna disponible per prevenir l'aparició de la tuberculosi és l'anomenat bacil de Calmette-Guérin (BCG). Està formada per bacteris vius atenuats de *M. bovis* i s'utilitza arreu del món incloent a la població infantil com a part del programa d'immunització recomanat. La vacuna BCG s'administra mitjançant una inoculació subcutània. Tot i que la vacuna no té un cost elevat i normalment requereix una única administració, està molt lluny de ser el mètode de prevenció idoni degut a la imprevisible resposta immunitària de la població i a les complicacions derivades de la inoculació com són l'aparició d'úlceres locals o limfadenitis supuratives, sense oblidar que les persones que han estat vacunades amb BCG poden donar falsos positius en el test de la tuberculina limitant l'efectivitat d'aquest (Chen, 2000).

### **1.2.6 Tractaments utilitzats en pediatria**

L'ús de la teràpia de combinació en formulacions de dosi fixa (CDF) en un règim estàndard és l'estratègia fonamental que plantegen de manera conjunta l'OMS i la Unió Internacional contra la Tuberculosi i les Malalties Respiratòries (UICTER) per al tractament de la tuberculosi. Aquest tipus de teràpia es defineix bàsicament com el tractament amb dos o més fàrmacs. Aquesta combinació de principis actius ha demostrat tenir èxit per al tractament de malalties infeccioses com la tuberculosi, però també s'utilitza per patologies com el càncer, alteracions neurològiques o la hipertensió (Organització Mundial de la Salut, 2014b).

A més a més, s'ha demostrat que l'administració simultània de varis antituberculosos (politeràpia) és necessària per evitar l'aparició de resistències durant el tractament, i, el fet d'incloure les substàncies actives en la mateixa forma farmacèutica fa que el compliment terapèutic per part del pacient millori molt en aquest tipus de règims de llarga durada (Koch A et al. 2018), (Prats, 2012).

Dintre dels diferents tractaments per combatre la tuberculosi existeixen els de primera línia, els quals són els d'elecció quan hi ha un diagnòstic de la malaltia, i els de segona línia, utilitzats en el cas que apareguin resistències o complicacions durant l'administració dels primers. Rifampicina, isoniazida i pirazinamida estan considerats de primera línia i la combinació dels tres es dona com a pauta en la majoria d'organitzacions de salut que hi ha arreu del món (Chen, 2000).

En el quadre 1 es mostra el tipus d'activitat i el mecanisme d'acció de rifampicina, isoniazida i pirazinamida així com els principals efectes adversos que es poden presentar derivats del seu ús (Prats, 2012).

<b>Fàrmac</b>	<b>Activitat</b>	<b>Mecanisme d'acció</b>	<b>Efectes adversos</b>
<b>Rifampicina (1965)</b>	Bactericida	Inhibició de la transcripció	Molèsties gastrointestinals i afectació hepàtica
<b>Isoniazida (1952)</b>	Bactericida i bacteriostàtic	Inhibició de la síntesi d'àcids micòlics	Hepatitis i polineuritis perifèrica
<b>Pirazinamida (1970)</b>	Bactericida	Desconegut	Hepatitis i hiperuricèmia

*Quadre 1. Característiques farmacològiques de rifampicina, isoniazida i pirazinamida (Prats, 2012).*

En el quadre 2 es mostren les presentacions de rifampicina (R), isoniazida (I) i pirazinamida (P), soles o en combinació, existents a nivell de l'Estat Espanyol (Centro de información de Medicamentos On-line, 2014).

<b>Principi(s) actiu(s)</b>	<b>Forma farmacèutica</b>
<b>Rifampicina</b>	Càpsules
	Suspensió oral
	Comprimits recoberts
	Injectables
<b>Isoniazida</b>	Injectables
<b>Pirazinamida</b>	Comprimits
<b>Rifampicina+Isoniazida</b>	Comprimits recoberts
<b>Rifampicina+Isoniazida+Pirazinamida</b>	Comprimits recoberts

*Quadre 2. Presentacions nacionals de rifampicina, isoniazida i pirazinamida (Centro de información de Medicamentos On-line, 2014).*

En el quadre 3 es mostren les presentacions de rifampicina (R), isoniazida (I) i pirazinamida (P), soles o en combinació, existents a nivell internacional (*Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, 2014*).

<b>Principi(s) actiu(s)</b>	<b>Forma farmacèutica</b>
<b>Rifampicina</b>	Càpsules
	Injectables
	Suspensió oral
<b>Isoniazida</b>	Comprimits
	Injectables
<b>Pirazinamida</b>	Comprimits
<b>Rifampicina + Isoniazida</b>	Comprimits
	Comprimits recoberts
	Comprimits recoberts amb coberta pel·licular
<b>Rifampicina + Isoniazida + Pirazinamida</b>	Comprimits
	Comprimits recoberts amb coberta pel·licular

*Quadre 3. Presentacions internacionals de rifampicina, isoniazida i pirazinamida (Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, 2014).*

El medicament ideal per a ús pediàtric ha de ser relativament fàcil d'administrar, de sabor acceptable, baixa toxicitat, bona estabilitat, que no requereixi refrigeració i que pugui ser el suficientment versàtil com per poder fraccionar la dosi que cada pacient necessita. Deficiències en qualsevol de les condicions esmentades anteriorment podrien donar lloc a un incompliment terapèutic per part dels pacients i en conseqüència a la no curació de la malaltia. L'administració de comprimits o càpsules és difícil pels pacients pediàtrics i els

estudis han demostrat que molts nens a l'edat de dotze anys, fins i tot alguns adults, tenen problemes amb la deglució de les formes de dosificació sòlides. Es per això que les formulacions desitjades per aquest tipus de població són les líquides (solucions i suspensions) (European Medicines Agency, 2015).

La dosificació en pediatria s'estableix en funció del pes i això dificulta el tractament amb comprimits o càpsules comercialitzades amb dosis concretes (Mellado Peña M.J et al. 2018). L'ús de medicaments en forma de solucions o suspensions orals fa que es pugui adaptar la dosi a administrar en funció del pes del pacient. Segons l'OMS (Organización Mundial de la Salud, 2014b), les pautes de dosificació per rifampicina, isoniazida i pirazinamida són les indicades en el quadre 4 (Organización Mundial de la Salud, 2014b).

<b>Antituberculós</b>	<b>Dosis (mg/kg/dia)</b>	<b>Pauta posològica</b>	<b>Rang terapèutic (mg/kg/dia)</b>	<b>Dosi màxima (mg/dia)</b>	<b>Observacions</b>
<b>Rifampicina</b>	15	Repartits en 1 ó 2 cops al dia	10-20	600	-
<b>Isoniazida</b>	10	1 cop al dia 30 min abans dels àpats o 2 h després	10-15	300	En combinació amb rifampicina no sobrepasar els 10 mg/kg/dia per problemes d'hepatotoxicitat
<b>Pirazinamida</b>	25	1 cop al dia	20-30	2000	-

*Quadre 4. Pautes de dosificació de rifampicina, isoniazida i pirazinamida (Organización Mundial de la Salud, 2014b)*

No obstant això, com es pot observar en els quadres 2 i 3, encara avui en dia no existeix cap medicament que combini els tres principis actius on la forma farmacèutica sigui adequada per administració pediàtrica. A nivell hospitalari però, puntualment es preparen formulacions magistrals dels principis actius per separat. I és que en matèria de desenvolupament de la fórmula, emmascarar el sabor desagradable a una formulació líquida no és una tasca senzilla, a més a més, els colorants i saboritzants podrien causar reaccions al·lèrgiques en els

nens. També cal tenir en compte que les estabilitats i les biodisponibilitats dels medicaments formulats poden no ser satisfactòries i de vegades els excipients poden exacerbar les condicions anteriorment esmentades (Chen, 2000), (Diana et al. 2012).

Es per això que en el següent capítol es defineixen les característiques químiques, físiques i tecnològiques del tres principis actius amb la finalitat de poder dur a terme un disseny robust i adequat a alguna de les formes farmacèutiques utilitzades en pediatria.

## **CAPÍTOL 2: PRINCIPIS ACTIUS I FORMA FARMACÉUTICA D'ELECCIÓ PER L'ELABORACIÓ DE LA NOVA PREPARACIÓ PEDIÀTRICA PER AL TRACTAMENT DE LA TUBERCULOSI**

### **2.1 INTRODUCCIÓ**

Aquest capítol té com a objectiu principal descriure les característiques físiques, químiques i tecnològiques dels tres principis actius objecte d'estudi amb la finalitat de recopilar la màxima informació disponible i existent sobre ells per poder desenvolupar una forma farmacèutica estable i adequada als requeriments de la població pediàtrica.

Per poder dur a terme aquest objectiu, es definirà l'estructura, les característiques físiques i químiques, els espectres d'absorció i les estabilitats de rifampicina, isoniazida i pirazinamida soles i/o en combinació, tenint en compte els possibles vehicles líquids a utilitzar.

### **2.2 CARACTERITZACIÓ DELS PRINCIPIS ACTIUS**

#### **2.2.1 Rifampicina**

La rifampicina, també coneguda com a rifampina, és un antibiòtic d'origen semisintètic obtingut a partir d'un compost natural, la rifamicina. Estructuralment és caracteritzada per ser una molècula constituïda per una part cromòfora amb un nucli de dihidroxinaftalé el qual està unit, per una banda, a una llarga cadena lateral alifàtica que el rodeja per donar lloc a un anell macrocíclic, i, per altra banda, a una cadena alifàtica que conté un anell de piperazina.

Seguint el sistema de normes per a la denominació d'estructures químiques de la Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (IUPAC), la rifampicina s'anomena com el 5,6,9,17,19,21-Hexahidroxí-23-metoxi-2,4,12,16,18,20,22-heptametil-8-[N-(4-metil-1-piperazinil)formimidoil]-2,7-(epoxipentadeca[1,11,13] trienimino)napto[2,1-b]fura-1,11(2H)-diona 21-acetat. Aquesta estructura està representada en la figura 3. Tenint en compte la nomenclatura que es



segueix dintre de la família de les rifamicines, la rifampicina es denomina també com a 2- [(4-metil-1-piperazinil)imino]metil- rifamicina SV(Chen, 2000).

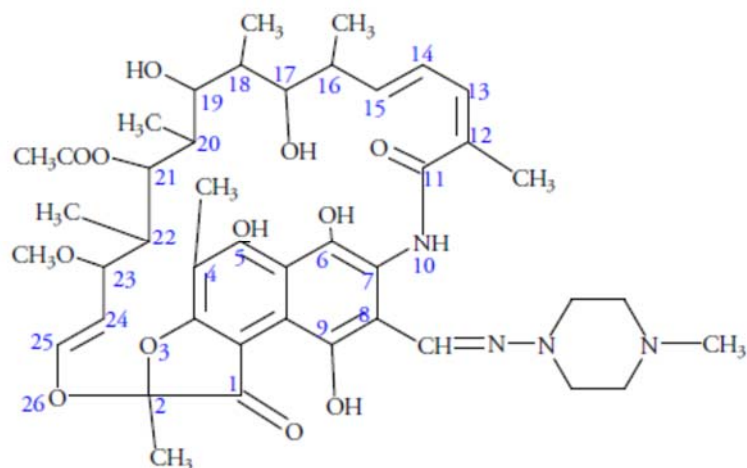


Figura 3. Estructura rifampicina seguint sistema IUPAC (European Pharmacopoeia, 2014(a)).

La rifampicina es caracteritza per presentar un aspecte de pols cristal·lina de coloració marró-vermellosa. La seva fórmula empírica és  $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ , el seu pes molecular és de 822,95 g/mol i el seu punt de fusió està comprès entre 186-189 °C. El seu pH en suspensió aquosa a l'1% oscil·la entre 4,5 i 6,5 (European Pharmacopoeia, 2014a).

En termes de solubilitat la rifampicina és una molècula soluble (es necessiten de 10 a 30 parts de solvent per dissoldre 1 part de solut) en metanol i lleugerament soluble en aigua (es necessiten de 100 a 1000 parts de solvent per dissoldre 1 part de solut), en acetona i etanol (96%) (European Pharmacopoeia, 2014a), (Woods, 1993).

Pertany a la classe II dintre del sistema de classificació biofarmacèutica (molècules de baixa solubilitat i alta permeabilitat). La seva solubilitat en aigua és pH dependent, sent més soluble a pHs àcids (en un medi a pH 2 té una solubilitat de 100 mg/ml) i disminuint progressivament a mesura que es basifica l'entorn, per la qual cosa es recomana mantenir-la per sota de pH 6 afegint àcid ascòrbic per garantir la solubilitat.

Tenint en compte l'estabilitat de la molècula, el pH de màxima estabilitat és el neutre. A pH alcalí i temperatura ambient pateix una degradació oxidativa en presència d'oxigen formant una quinona. Aquesta oxidació es pot disminuir afegint àcid ascòrbic. A pH àcid s'hidrolitza obtenint 3-formil-rifampicina i 1-amino-4-metil piperazina (Sosa et al. 2005).

Per identificar i caracteritzar l'estructura de qualsevol compost orgànic generalment s'utilitzen tècniques espectroscòpiques. Les més emprades són quatre: ultraviolada-visible (UV-Vis), espectroscòpia d'infraroig (IR), ressonància magnètica nuclear (RMN) i espectroscòpia de masses (EM). La correlació de les dades obtingudes experimentalment amb els espectres disponibles en les bases de dades existents, permet identificar als analits de la mostra amb un alt grau de confiança. A més a més també s'utilitzen anàlisis tèrmics com el punt de fusió i la calorimetria diferencial d'escombratge (CDE o més conegut per les sigles en anglès DSC) o senzills tests com la cromatografia en capa fina per confirmar la identitat i puresa de cada una de les molècules a estudiar.

A continuació es mostren els resultats obtinguts per a la molècula de rifampicina.

#### Espectroscòpia d'ultraviolada-visible (UV-Vis)

A la figura 4 es mostra l'espectre d'absorció UV-Vis per a la rifampicina, on clarament es poden observar tres pics o punts d'absorció màxima els quals es situen a 235, 255 i 335 nm respectivament (Chen, 2000).

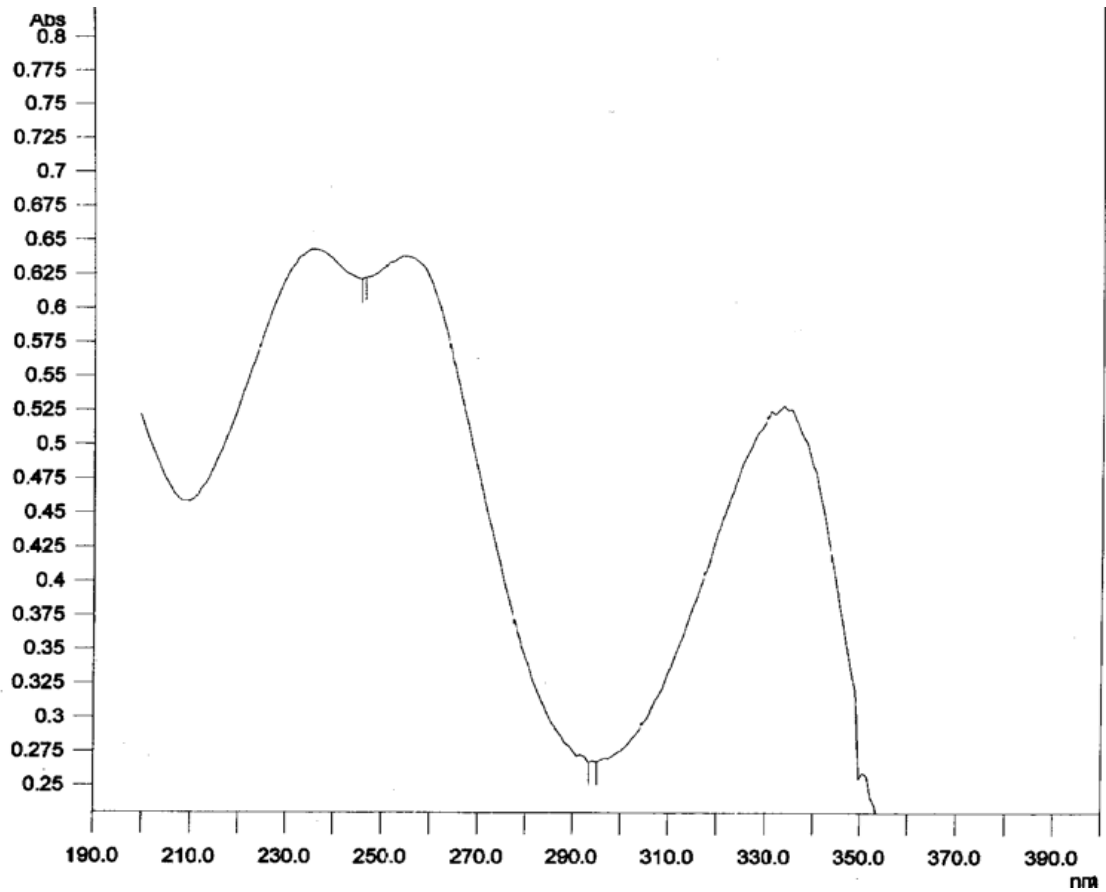


Figura 4. Espectre UV-Vis de rifampicina (Chen, 2000).

### Espectroscòpia d'infraroig (IR)

Tal i com s'observa a la figura 5 es detecten 9 bandes d'absorció per a la rifampicina les quals estan relacionades amb els grups funcionals descrits al quadre 5 (Chen, 2000).

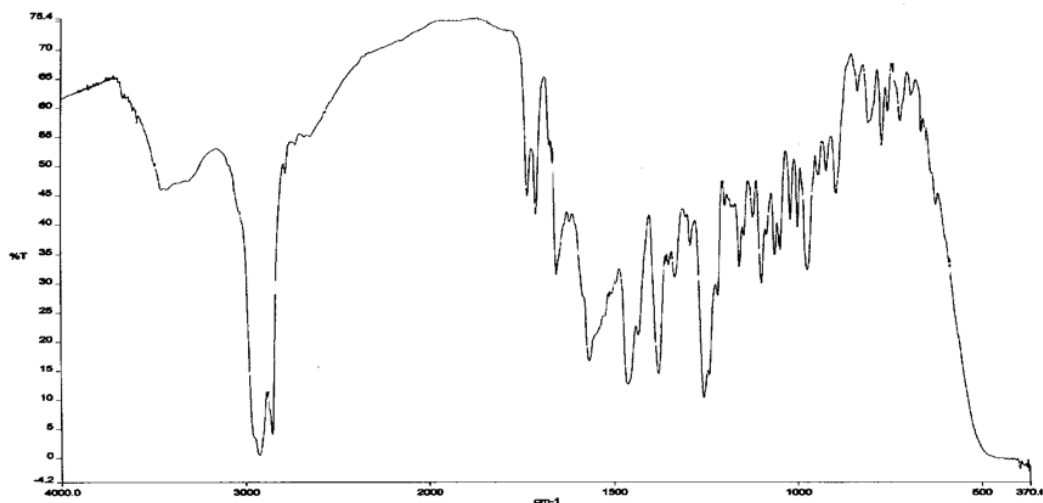


Figura 5. Espectre IR de rifampicina (Chen, 2000).

Espectre IR per Rifampicina	
Banda d'absorció IR (cm <sup>-1</sup> )	Grups funcionals (banda de vibració de l'enllaç)
3500-3000	-OH
2930	-CH <sub>3</sub>
2820	-CH <sub>3</sub> -O
2800	-CH <sub>3</sub> -N
1715-1730	-C=O
1670	-C=N-
1570	-C=C-
1400	-C-N
1255-1020	-C-O-C- (grup acetil)

Quadre 5. Resultats IR rifampicina (Chen, 2000).

### Ressonància magnètica nuclear (RMN)

Al quadre número 6 es mostren les dades de desplaçament químic dels protons presents a la rifampicina així com la multiplicitat.

Dades espectre RMN <sup>1</sup> H		
Protó representat	Multiplicitat	Ppm
NH	S	11,96
CH=N	S	8,22
CH <sub>2</sub> (2' i 6')	M	2,9-3,3
CH <sub>3</sub> (3' i 5')	M	2,4-2,8
N-CH <sub>3</sub>	S	2,34
OH (1)	S	11,4, 14
OH (4 i 8)	S	13,16
CH <sub>3</sub> (13)	S	1,82
CH <sub>3</sub> (14)	S	2,23
H (17 i 18)	M	6,3, 6,8
H (19)	Dd	5,92
H (20)	Ddq	2,26
H (21)	Dd	3,78
OH (21 i 23)	Bs	3,2, 4,2
H (22)	Ddq	1,70
H (23)	Dd	3,04
H (24)	Ddq	1,52
H (25)	Dd	4,96
H (26)	Ddq	1,22
H (27)	Dd	3,58
H (28)	Dd	5,00
H (29)	D	6,20
CH <sub>3</sub> (30)	S	2,10
CH <sub>3</sub> (31)	D	0,88
CH <sub>3</sub> (32)	D	1,01
CH <sub>3</sub> (33)	D	0,58
CH <sub>3</sub> (34)	D	-0,33
CH <sub>3</sub> (36)	S	2,06
CH <sub>3</sub> (37)	S	3,05

Quadre 6. Dades RMN <sup>1</sup>H rifampicina(Chen, 2000).

NOTA: S= singlet, Bs=broad singlet, D=doublet, M=multiplet ,Dd=doublet of doublets, Ddq= doublet of doublets of quartet, Q=quartet

Al quadre número 7 es mostren les dades de desplaçament químic de <sup>13</sup>C per a la rifampicina (Chen, 2000).

Dades espectre RMN <sup>13</sup> C			
Carboni representat	Ppm	Carboni representat	Ppm
1	138,6	23	76,7
2	105,9	24	37,6
3	111,0	25	74,4
4	147,2	26	39,5
5	112,8	27	76,7
6	174,1	28	118,7
7	120,3	29	142,6
8	169,3	30	20,7
9	104,4	31	17,8
10	117,8	32	10,9
11	195,3	33	8,5
12	108,7	34	8,8
13	21,5	35	171,9
14	7,6	36	20,7
15	169,6	37	57,0
16	129,4	1'	134,4
17	135,0	2'	50,2
18	123,2	3'	53,9
19	142,6	4'	53,9
20	38,6	5'	50,2
21	70,7	6'	45,8
22	33,4		

Quadre 7. Dades RMN <sup>13</sup>C rifampicina (Chen, 2000).

### Espectroscòpia de masses (EM)

La figura 6 mostra l'espectre per a la rifampicina obtingut mitjançant un espectròmetre de masses. Es representa l'abundància relativa (eix d'ordenades) respecte a la relació m/e (eix d'abcises). La massa patró es dona com a valor de relació m/e de 822 i correspon a la molècula de rifampicina ionitzada però sense fragmentar (M<sup>+</sup>).

El pic base apareix a valor de relació m/e de 98 i mostra la fragmentació de l'enllaç N-N de la cadena lateral de piperazina. Els pics més significatius apareixen a relació m/e de 822, 424, 398, 300 i 98 amb valors d'abundància

relativa de 2,14, 79,83, 2,43, 30,24 i 100% respectivament. La baixa abundància relativa de la molècula sense fragmentar suggereix que la rifampicina no és estable i que és fàcilment fragmentable (Chen, 2000).

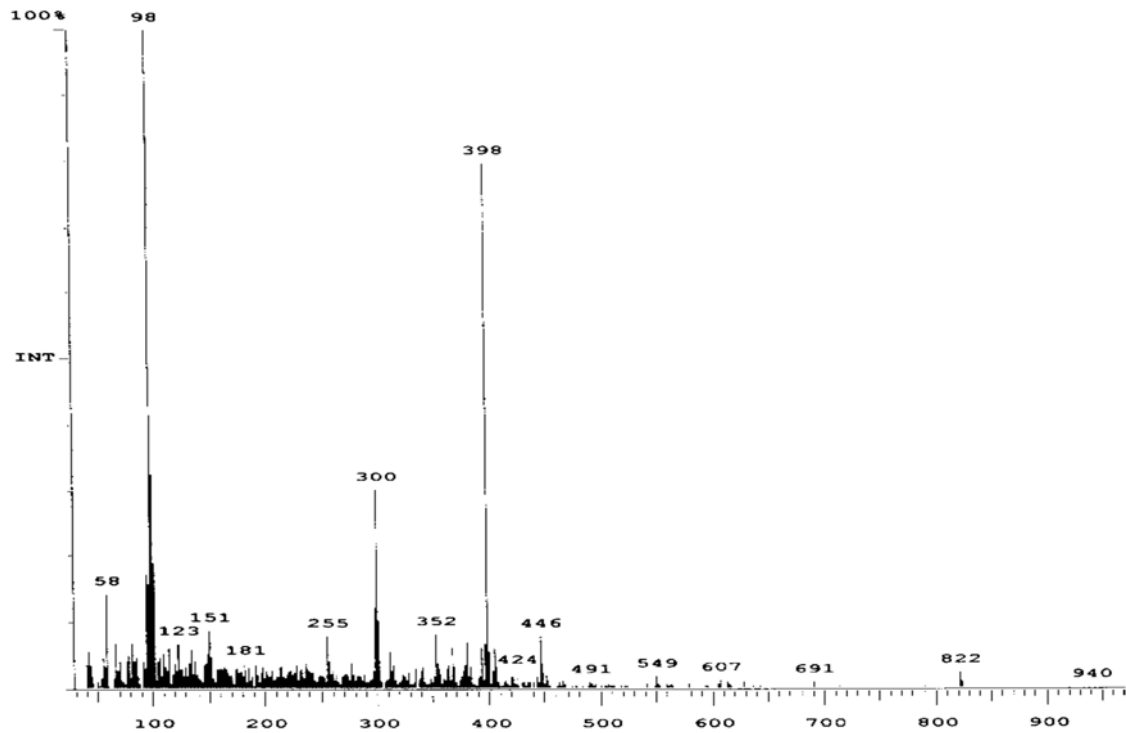


Figura 6. Espectre de masses de la rifampicina (Chen, 2000).

La figura 7 mostra la fragmentació patró de la rifampicina. S'observen les molècules obtingudes d'aquesta fragmentació amb la relació m/e i el valor d'abundància relativa corresponent.

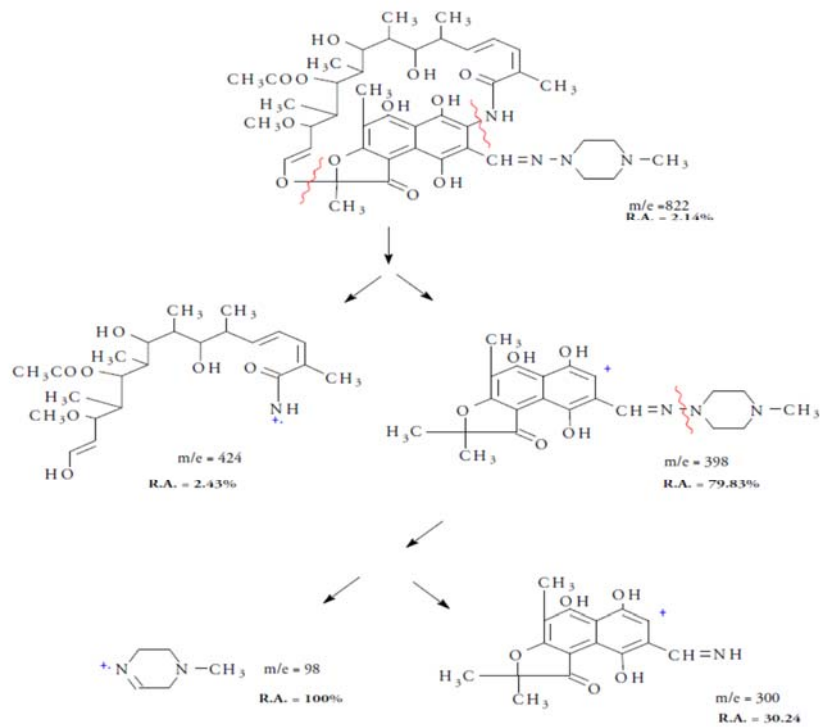


Figura 7. Fragmentació patró de la rifampicina (Chen, 2000).

### 2.2.2 Isoniazida

La isoniazida és una molècula obtinguda a partir de la nicotinamida i és el nom genèric més comunament utilitzat per denominar la 4-carbohidrazinapiridina (classificació IUPAC). Altres noms i abreviacions com isonicotinohidrazida, hidrazida de l'àcid isonicotínic, isonicotinoilhidrazina, turbazida o isoniazidium també poden ser utilitzats per anomenar aquest compost. L'estructura química de la isoniazida està representada a la figura 8 (Chen, 2000).

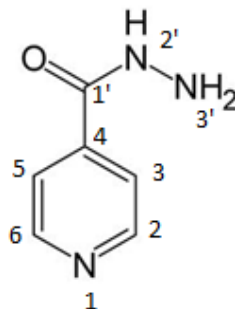


Figura 8. Estructura química isoniazida. (European Pharmacopoeia, 2014b).



La isoniazida es caracteritza per presentar un aspecte de pols cristal·lina de coloració blanca o quasi blanca tot i que també es pot trobar en forma de cristalls incoloros. La seva fórmula empírica és  $C_6H_7N_3O$ , el seu pes molecular és de 137,14 g/mol i el seu punt de fusió està comprès entre 170-174 °C. El seu pH en suspensió aquosa al 5% oscil·la entre 6,0 i 8,0 (European Pharmacopoeia, 2014b).

Referent a la solubilitat, és una molècula bastant soluble en aigua (es necessiten de 1 a 10 parts de solvent per dissoldre 1 part de solut) i escassament soluble en alcohol (es necessiten de 30 a 100 parts de solvent per dissoldre 1 part de solut) (European Pharmacopoeia, 2014b), (Woods, 1993).

Pertany a la classe I dintre del sistema de classificació biofarmacèutica (molècules d'alta solubilitat i alta permeabilitat) (Sosa et al. 2005).

Tenint en compte l'estabilitat de la molècula, la isoniazida és incompatible amb sucres, aldehids, cetones, iode, hipoclorit, sals fèrriques i agents oxidants (Martindale, 2003).

A continuació es mostren els resultats obtinguts per a la molècula de isoniazida de les tècniques espectroscòpiques més utilitzades per identificar i caracteritzar compostos orgànics.

### Espectroscòpia d'ultraviolada-visible (UV-Vis)

A la figura 9 es mostra l'espectre d'absorció UV-Vis per a la isoniazida, on clarament es pot observar un pic o punt d'absorció màxim a 265 nm (Chen, 2000).

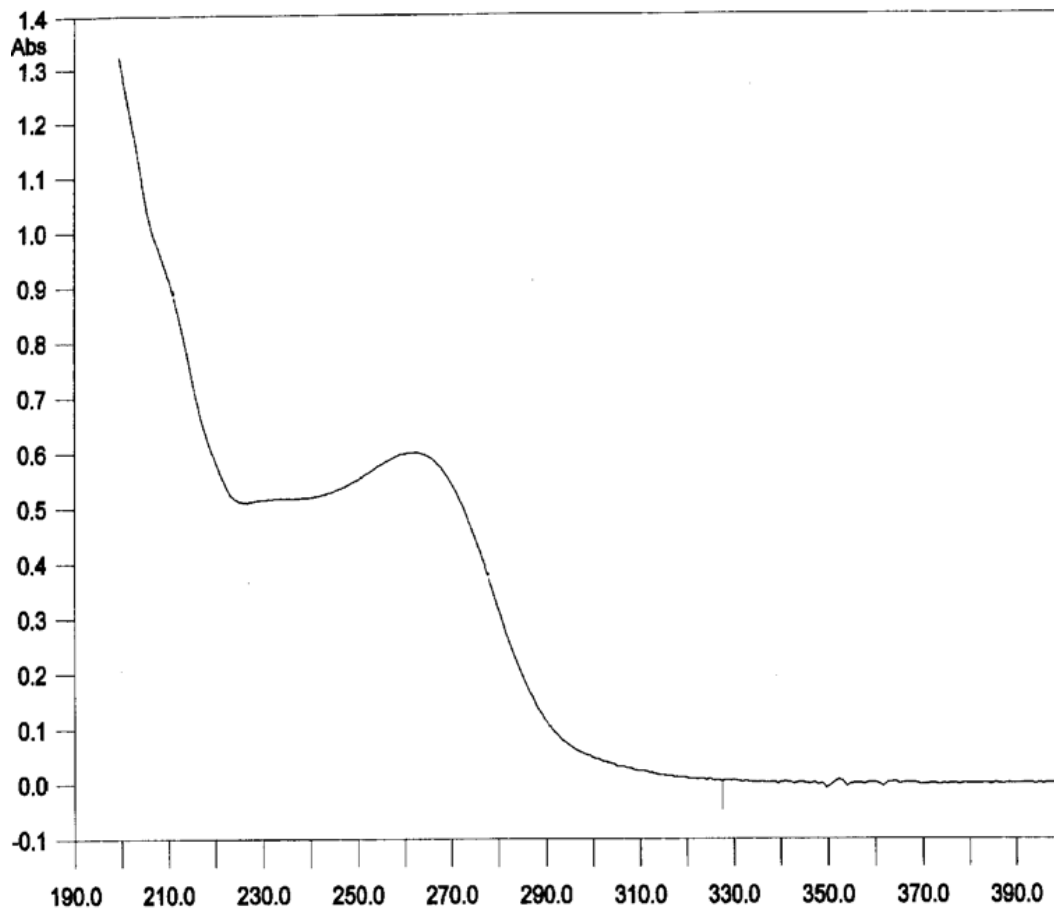


Figura 9. Espectre UV-Vis de isoniazida (Chen, 2000).

### Espectroscòpia d'infraroig (IR)

Tal i com s'observa a la figura 10 es detecten 6 bandes d'absorció per a la isoniazida, les quals estan relacionades amb els grups funcionals descrits al quadre 8.

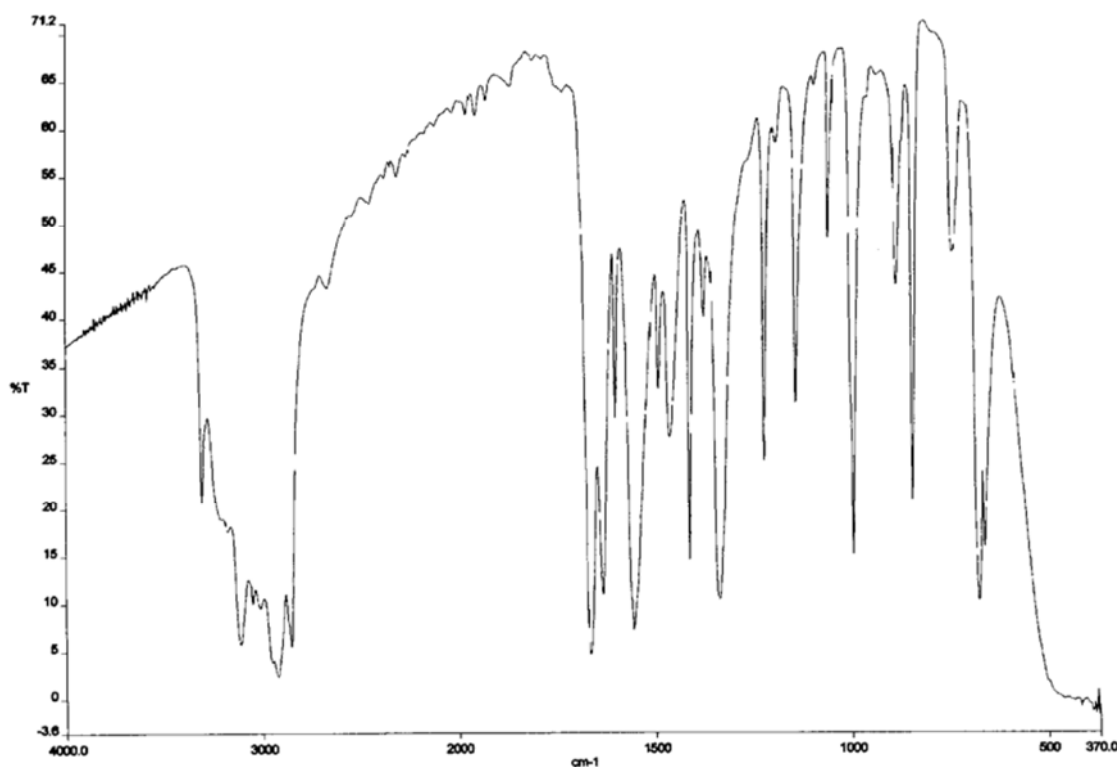


Figura 10. Espectre IR de isoniazida (Chen, 2000).

Espectre IR per Isoniazida	
Banda d'absorció IR (cm <sup>-1</sup> )	Grups funcionals (banda de vibració de l'enllaç)
3300-3000	-NH
3172	-CH aromàtics
1670	-C=O
1640, 1610	-NH <sub>3</sub>
1600	-C=N
1560, 1500, 1465	Anell aromàtic

Quadre 8. Resultats IR isoniazida (Chen, 2000).

### Ressonància magnètica nuclear (RMN)

Al quadre número 9 es mostren les dades de desplaçament químic dels protons presents a la isoniazida així com la multiplicitat.

<b>Dades espectre RMN <sup>1</sup>H</b>		
<b>Protó representat</b>	<b>Multiplicitat</b>	<b>Ppm</b>
H Hidrazino (-NH <sub>2</sub> )	S	4,60
H aromàtic	Dd	7,73, 8,70
CO-NH	S	10,15

Quadre 9. Dades RMN <sup>1</sup>H isoniazida (Chen, 2000).

NOTA: S= singlet, Dd=doublet of doublets

Al quadre número 10 es mostren les dades de desplaçament químic de <sup>13</sup>C per a la isoniazida.

<b>Dades espectre RMN <sup>13</sup>C</b>	
<b>Carboni representat</b>	<b>Ppm</b>
Hidrazino	164,1
Heteroaromàtic (C4,C3 i C5, C2 i C6)	121,4, 140,0, 150,1

Quadre 10. Dades RMN <sup>13</sup>C isoniazida (Chen, 2000).

### Espectroscòpia de masses (EM)

La figura 11 mostra l'espectre per a la isoniazida obtingut mitjançant un espectròmetre de masses. De nou, es representa l'abundància relativa (eix d'ordenades) respecte a la relació m/e (eix d'abcises). La massa patró es dona com a valor de relació m/e de 137 i correspon a la molècula d'isoniazida ionitzada però sense fragmentar (M<sup>+</sup>).

El pic base apareix a valor de relació m/e de 106. Els pics més significatius apareixen a relació m/e de 137, 106, 78 i 51 amb valors d'abundància relativa de 16,85, 100, 41,62 i 36,18% respectivament. Tot i que l'abundància relativa de la molècula sense fragmentar és major que en el cas de la rifampicina, la isoniazida es considera igualment bastant inestable (Chen, 2000).

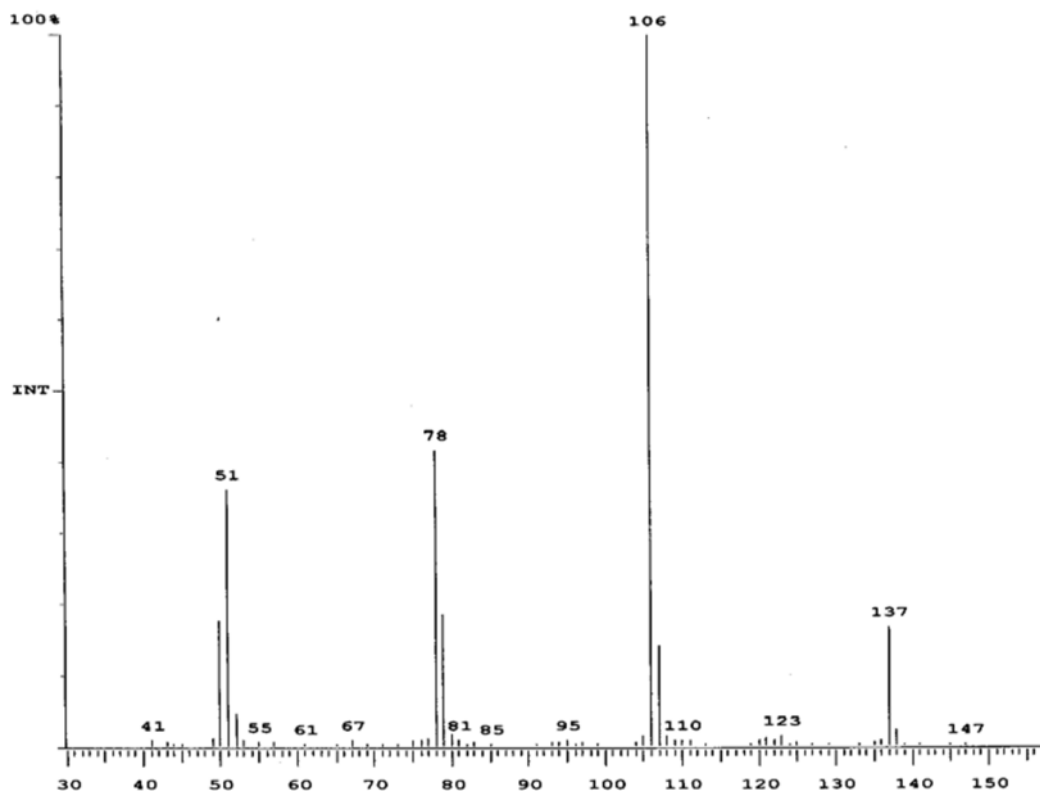


Figura 11. Espectre de masses de isoniazida (Chen, 2000).

La figura 12 mostra la fragmentació patró de la isoniazida. S'observen les molècules obtingudes d'aquesta fragmentació amb la relació m/e i el valor d'abundància relativa corresponent.

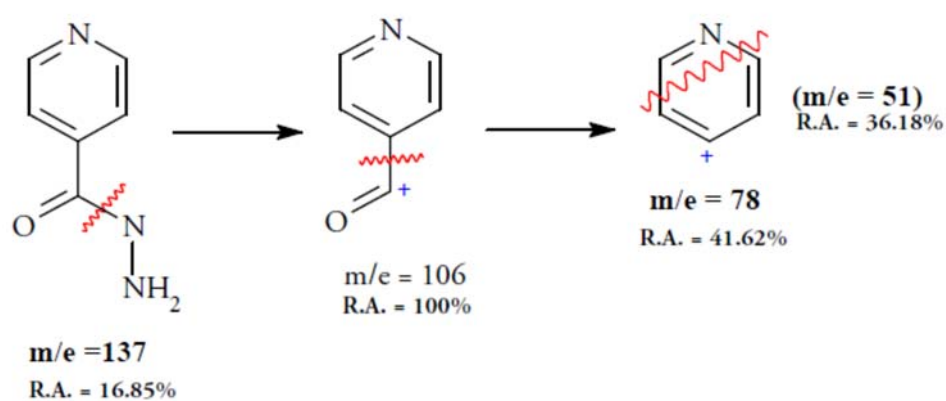


Figura 12. Fragmentació patró de la isoniazida (Chen, 2000).

### 2.2.3 Pirazinamida

La pirazinamida és el nom genèric utilitzat per denominar la pirazina-2-carboxamida (classificació IUPAC). L'estructura química de la pirazinamida està representada en la figura 13 (European Pharmacopoeia, 2014c).

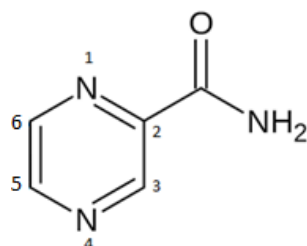


Figura 13. Estructura química pirazinamida (European Pharmacopoeia, 2014c).

La pirazinamida es caracteritza per presentar un aspecte de pols cristal·lina de coloració blanca o quasi blanca. La seva fórmula empírica és  $C_5H_5N_3O$ , el seu pes molecular és de 123,11 g/mol i el seu punt de fusió està comprès entre 188-191 °C. És caracteritza per presentar polimorfisme (European Pharmacopoeia, 2014c).

Pel que fa a termes de solubilitat, la pirazinamida és una molècula escassament soluble en aigua (es necessiten de 30 a 100 parts de solvent per dissoldre 1 part de solut), lleugerament soluble en etanol 96% i en clorur de metilè (es necessiten de 100 a 1000 parts de solvent per dissoldre 1 part de solut) (European Pharmacopoeia, 2014c), (Woods, 1993).

Aquest principi actiu, al igual que la isoniazida, pertany a la classe I dintre del sistema de classificació biofarmacèutica (molècules d'alta solubilitat i alta permeabilitat) (Sosa et al. 2005). Cal fer palès el criteri de la BCS (Biopharmaceutical Classification System) segons el qual un fàrmac es considera altament soluble si la dosi terapèutica més alta que es pot administrar del mateix es solubilitza en 250 ml d'aigua purificada en un interval de pH entre 1 i 7,5. En aquest cas, la màxima dosi diària és de 2000 mg administrada un cop al dia, la qual cosa representa 2 g de fàrmac. Segons farmacopea, en el pitjor cas caldrien 100 ml d'aigua per dissoldre 1 g de pirazinamida i, per tant, 200 ml per dissoldre 2 g. Donat que la BCS estableix la quantitat de 250 ml, és una quantitat

suficientment alta com per assolir la correcta solubilització de la pirazinamida, podent-se considerar de classe biofarmacèutica I.

A continuació es mostren els resultats obtinguts per a la molècula de pirazinamida de les tècniques espectroscòpiques més utilitzades per identificar i caracteritzar compostos orgànics.

### Espectroscòpia d'ultraviolada-visible (UV-Vis)

A la figura 14 es mostra l'espectre d'absorció UV-Vis per a la pirazinamida, on clarament es poden observar dos pics o punts d'absorció màxima a 209 i 269 nm (Chen, 2000).

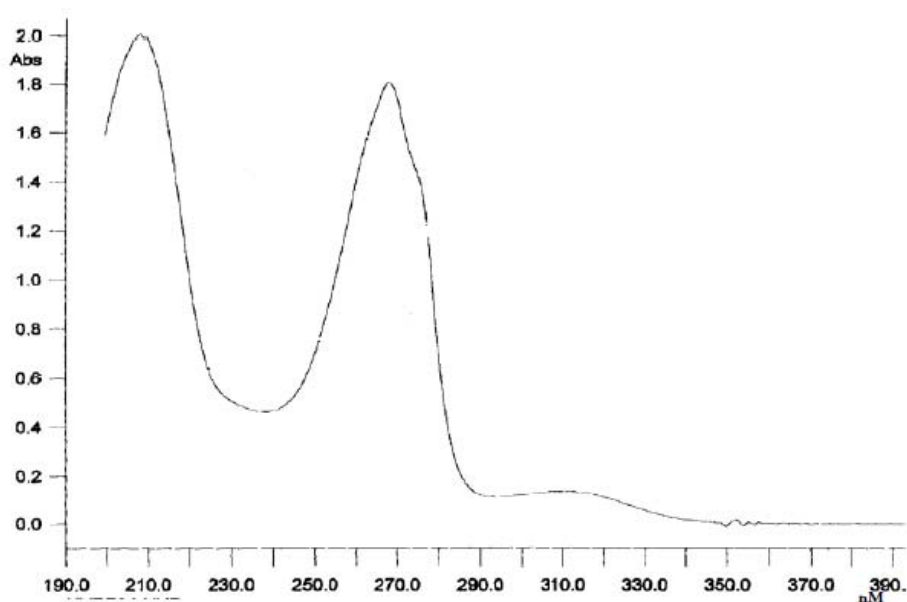


Figura 14. Espectre UV-Vis de pirazinamida (Chen, 2000).

### Espectroscòpia d'infraroig (IR)

Tal i com s'observa a la figura 15 es detecten 7 bandes d'absorció per a la pirazinamida, les quals estan relacionades amb els grups funcionals descrits al quadre 11.

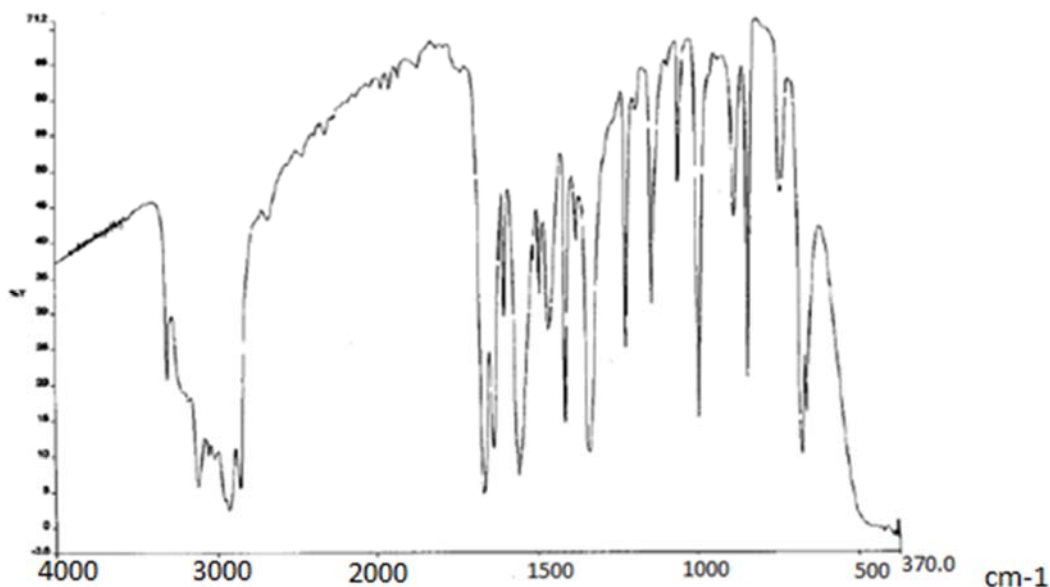


Figura 15 .Espectre IR de pirazinamida (Chen, 2000).

Espectre IR per Pirazinamida	
Banda d'absorció IR (cm <sup>-1</sup> )	Grups funcionals (banda de vibració de l'enllaç)
3425, 3290	-NH
3160	-CH aromàtics
1716	-C=O
1614	-NH <sub>3</sub>
1582	-C=N
1382	Anell aromàtic
1183-782	-CH, NH <sub>2</sub>

Quadre 11. Resultats IR pirazinamida (Chen, 2000).

### Ressonància magnètica nuclear (RMN)

Al quadre número 12 es mostren les dades de desplaçament químic dels protons presents a la pirazinamida així com la multiplicitat.



<b>Dades espectre RMN <sup>1</sup>H</b>		
<b>Protó representat</b>	<b>Multiplicitat</b>	<b>Ppm</b>
-CONH <sub>2</sub>	S	8,25, 7,88
H-5	Q	8,71
H-6	D	8,85
H-3	D	9,21

Quadre 12. Dades RMN <sup>1</sup>H pirazinamida (Chen, 2000).

NOTA: S= singlet, D=doublet, Q=quartet

Al quadre número 13 es mostren les dades de desplaçament químic de <sup>13</sup>C per a la pirazinamida.

<b>Dades espectre RMN <sup>13</sup>C</b>	
<b>Carboni representat</b>	<b>Ppm</b>
C-5	143,2
C-3	143,6
C-2	145,0
C-6	147,3
C=O	165,0

Quadre 13. Dades RMN <sup>13</sup>C pirazinamida (Chen, 2000).

### Espectroscòpia de masses (EM)

La figura 16 mostra l'espectre per a la pirazinamida obtingut mitjançant un espectròmetre de masses. De nou, es representa l'abundància relativa (eix d'ordenades) respecte a la relació m/e (eix d'abcises). La massa patró es dona com a valor de relació m/e de 123 i correspon a la molècula de pirazinamida ionitzada però sense fragmentar (M<sup>+</sup>).

El pic base apareix a valor de relació m/e de 80. Els pics més significatius apareixen a relació m/e de 123, 80, 52 i 44 amb valors d'abundància relativa de 19,84%, 100%, 33,13% i 4,81% respectivament (Chen, 2000).

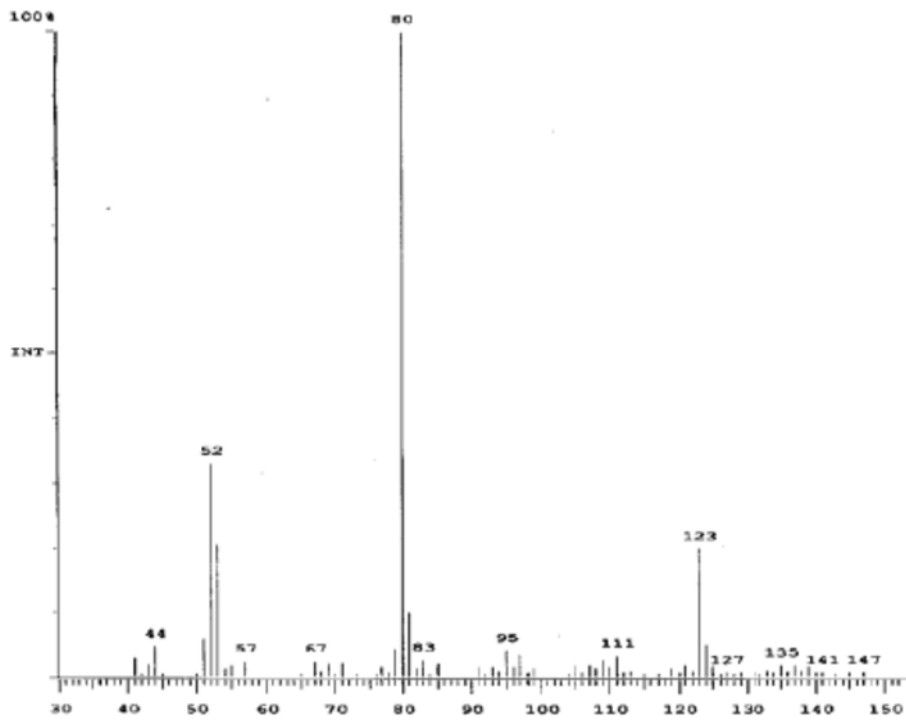


Figura 16. Espectre de masses de pirazinamida (Chen, 2000).

La figura 17 mostra la fragmentació patró de la pirazinamida. S'observen les molècules obtingudes d'aquesta fragmentació amb la relació m/e i el valor d'abundància relativa corresponent.

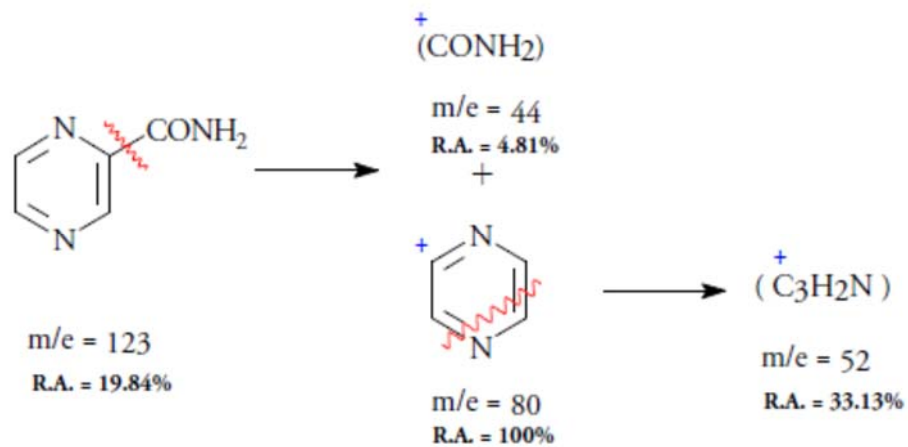


Figura 17. Fragmentació patró de la pirazinamida (Chen, 2000).

## 2.3 CARACTERÍSTIQUES FARMACOLÒGIQUES

La teràpia antituberculosa té com a principals objectius l'eliminació ràpida dels bacils i la prevenció de les recaigudes. Per assolir aquestes fites, s'administren fàrmacs antituberculosos considerats de primera línia. Aquests tipus de fàrmacs es caracteritzen per tenir un índex eficàcia/risc elevat. Dins d'aquest grup de fàrmacs és on es troben la rifampicina, la isoniazida i la pirazinamida.

Els fàrmacs antituberculosos actuen principalment generant la mort bacteriana de *Mycobacterium tuberculosis*. Dintre dels diferents mecanismes d'acció que presenten els compostos inclosos dins d'aquest grup, destacar com a més freqüents els que actuen en la fase de divisió del bacil, a nivell de freqüència de multiplicació i els que actuen sobre la seva activitat metabòlica (depenent de la concentració d'oxigen i pH del medi on es trobi el bacteri). Tenint en compte això, en un mateix organisme poden existir diferents poblacions de bacils que poden presentar sensibilitat diversa als diferents fàrmacs antituberculosos (Florez et al. 2008).

A continuació es descriuen les característiques farmacoterapèutiques dels tres principis actius objecte d'estudi.

### 2.3.1 Rifampicina

#### Activitat antibacteriana i mecanisme d'acció

La rifampicina és un antibiòtic considerat d'ampli espectre, ja que inhibeix el creixement de nombrosos micobacteris així com de bacteries grampositives i gramnegatives. Davant de la majoria d'espècies del gènere *Mycobacterium* actua com a bactericida de formes intracel·lulars i extracel·lulars.

El mecanisme d'acció d'aquest fàrmac consisteix en fixar-se de forma específica a la subunitat  $\beta$  de l'ARN-Polimerasa depenent de l'àcid desoxiribonucleic (ADN) dels bacils, de manera que inhibeix la seva activitat i suprimeix la iniciació de la formació de les cadenes d'àcid ribonucleic (ARN). Aquesta acció no es duu a terme en l'ARN-Polimerasa de les cèl·lules

eucariotes i només es dona a grans concentracions en la polimerasa mitocondrial (Brunton et.al 2007), (Florez et al. 2008), (Rang et al. 2008).

Si s'administra sola, ràpidament apareixen resistències. Diferents estudis mostren que aquest fet es desenvolupa degut a que es produeix un canvi en el gen *rpoB* de la subunitat  $\beta$  de l'ARN-Polimerasa del bacteri. (Alifano et al. 2015), (Goldstein, 2014). Però tot i això, la rifampicina segueix estant considerada com un fàrmac de primera línia dintre de la terapèutica utilitzada per al tractament de la tuberculosi, ja que aquest fenomen de resistència es pot demorar considerablement si s'administra la rifampicina en associació amb altres fàrmacs antituberculosos com la isoniazida i la pirazinamida. (Brunton et.al 2007), (Florez et al. 2008), (Rang et al. 2008).

#### Característiques farmacocinètiques

La biodisponibilitat de la rifampicina per via oral és superior al 90%, però cal tenir present que l'administració continua del fàrmac produeix inducció de l'enzim desacetilant hepàtic, fet que es tradueix en un augment de l'aclariment biliar i una disminució de l'efecte terapèutic. Per tant, per garantir l'eficàcia del tractament farmacològic convé ajustar la dosi de fàrmac.

Els aliments interfereixen en la velocitat i la intensitat d'absorció. Difon lliurement pels teixits i líquids corporals, travessa placenta i barrera hematoencefàlica (BHE). Pateix desacetilació a nivell hepàtic transformant-se en 2,5-o-desacetilrifampicina, metabòlit també actiu. S'elimina per ronyó i per bilis i pateix l'anomenat fenomen de circulació enterohepàtica. (Brunton et.al 2007), (Florez et al. 2008).

#### Reaccions adverses i interaccions

La majoria de pacients toleren la rifampicina. Les principals reaccions adverses apareixen en fases inicials del tractament, i es donen a nivell gastrointestinal en forma de molèsties, a nivell cutani amb l'aparició d'erupcions i a nivell articular amb fenòmens d'algies musculars i articulares. Destacar que la reacció més freqüent es dona a nivell hepàtic, causant fenòmens d'icterícia i

hepatitis (Florez et al. 2008), (Girling et al. 1971), (Nagarajan i Whitaker, 2018), (Rang et al. 2008).

També s'han descrit símptomes de tipus neurològic com cefalees, fatiga, somnolència, marejos, atàxia, desorientació o parestèsies, i en algunes ocasions poden aparèixer reaccions de tipus immunològiques, sobretot si l'administració del fàrmac es produeix de forma intermitent. Es freqüent que els líquids corporals adoptin una coloració vermellosa, aquest fenomen es degut a la pròpia coloració de la molècula de rifampicina (Florez et al. 2008).

S'han descrit nombroses interaccions d'interès clínic degut a que la rifampicina és un inductor enzimàtic, indueix un elevat número d'enzims metabolitzadors, actuant principalment a nivell hepàtic i d'intestí prim sobre el citocrom P450- isoenzim CYP3A4. A més a més, s'ha vist que la rifampicina indueix algunes proteïnes transportadores com la P-glicoproteïna intestinal i hepàtica (Niemi et al. 2003). Això fa que sigui necessari vigilar tant la resposta clínic com la possible aparició d'efectes adversos (Brunton et.al 2007), (Florez et al. 2008), (Rang et al. 2008).

### **2.3.2 Isoniazida**

#### Activitat antibacteriana i mecanisme d'acció

La isoniazida té activitat específica davant dels micobacteris tuberculosos. Es comporta com a bactericida contra els bacils en fase de creixement ràpid, tant extracel·lulars com intracel·lulars, en canvi, és bacteriostàtica contra els bacils en estat de repòs. La isoniazida no té activitat antibacteriana en sí, són els propis bacils qui la transformen en el compost actiu. La forma activa de la isoniazida actua inhibint una enoilreductasa que actua sobre les restes d'acils dels àcids grassos responsables de la formació de la coberta dels micobacteris (Brunton et.al 2007), (Florez et al. 2008), (Rang et al. 2008).

Estudis recents mostren que hi ha una estreta relació entre l'efecte del fàrmac i el pH del medi. A pHs àcids, l'afinitat de la isoniazida per la membrana del bacil augmenta considerablement respecte a entorns amb pHs neutres. Aquest

augment es degut a la carga positiva de la isoniazida en medi àcid la qual permet establir enllaços iònics amb els grups fosfats del cap polar dels fosfolípids situats a la membrana (Pinheiro et al. 2014).

Es considera com un dels millors compostos antimicobacterians degut al seu índex eficàcia/risc, el seu baix cost, la seva fàcil administració i l'acceptació per part dels pacients. Tot i les nombroses avantatges que presenta aquest fàrmac, degut a l'elevada freqüència d'aparició de resistències, la isoniazida mai s'administra sola, excepte en pautes profilàctiques. El 90% dels fenòmens de mutació causants de resistències es donen a nivell del gen *katG*, fet que es tradueix en un defecte en la catalasa-peroxidasa necessària per l'activació de la isoniazida, i a nivell del gen *inhA* produint una enoil reductasa activada que no es inhibida per la forma activa de la isoniazida (Benfang et al. 2000), (Florez et al. 2008).

#### Característiques farmacocinètiques

La biodisponibilitat per via oral de la isoniazida és del 90%, però poden produir-se fenòmens de primer pas. Difon lliurement pels teixits i fins i tot arriba a assolir nivells en líquid cefaloraquidi (LCR). Es metabolitza principalment al fetge mitjançant acetilació. Existeix heterogenicitat de caràcter genètic en la capacitat d'acetilar el fàrmac, fet que es tradueix en variacions de la seva semivida (Brunton et.al 2007), (Florez et al. 2008), (Rang et al. 2008).

#### Reaccions adverses i interaccions

La isoniazida es considera un fàrmac poc tòxic, tot i així, s'ha de vigilar l'aparició de fenòmens a nivell hepàtic i neurològic ja que entre les 4 i 8 primeres setmanes de tractament poden donar-se fenòmens d'hepatitis i necrosis. Les alteracions neurològiques poden ser perifèriques o centrals i guarden una estreta relació amb els nivells de piridoxina, fet que fa que s'administri conjuntament aquesta vitamina amb la isoniazida (Brunton et.al 2007), (Florez et al. 2008), (Nagarajan i Whitaker, 2018), (Rang et al. 2008).

### 2.3.3 Pirazinamida

#### Activitat antibacteriana i mecanisme d'acció

La pirazinamida es caracteritza per mostrar activitat antituberculosa únicament en medis àcids, és per això que la seva màxima eficàcia es presenta sobretot a nivell de bacils intracel·lulars (macròfags). Tot i això està considerada com un fàrmac de primera línia associada amb rifampicina i isoniazida (Brunton et.al 2007), (Florez et al. 2008), (Rang et al. 2008).

Si s'utilitza sola es desenvolupen resistències molt ràpidament. L'aparició d'aquestes resistències està associada a mutacions en el gen *pncA*, el qual codifica per la pirazinamidasa, enzim encarregat de catalitzar la reacció de pirazinamida a àcid pirazinoic (POA) (molècula activa) (Miotto et al. 2014).

#### Característiques farmacocinètiques

S'absorbeix bé per via oral, té una bona distribució tissular i arriba a elevades concentracions a nivell de líquid cefaloraquídi (LCR). Es metabolitza a nivell hepàtic i s'elimina per orina (Florez et al. 2008), (Rang et al. 2008).

#### Reaccions adverses i interaccions

La reacció adversa més freqüent es dona a nivell digestiu amb l'aparició de nàusees i vòmits (Brunton et.al 2007), (Florez et al. 2008). Estudis recents mostren que l'hepatotoxicitat de la pirazinamida es deu principalment a la formació d'un metabòlit derivat de la hidroxilació de l'àcid pirazinoic, l'àcid 5-hidroxi-pirazinoic. Per tant, també és necessari vigilar la funció hepàtica, sobretot en pacients amb politeràpia, ja que en combinació amb isoniazida pot augmentar el grau d'aparició d'hepatotoxicitat (Nagarajan i Whitaker, 2018), (Tung-Yuan et al. 2013).

## 2.4 VIABILITAT DE LA FORMA FARMACÉUTICA

Per desenvolupar una fórmula que contingui els tres principis actius objecte d'estudi i que alhora sigui adequada per a la població pediàtrica, s'han de valorar d'una forma molt acurada i estudiada els possibles vehicles a utilitzar i el procés tecnològic que permeti combinar les tres molècules sense afectar a l'estabilitat de les mateixes.

L'ordre de sensibilitat a la degradació dels tres principis actius és rifampicina > isoniazida > pirazinamida, podent-ne considerar aquest últim, com a un principi actiu pràcticament estable. El quadre 14 mostra els principals productes de degradació per a cadascun dels compostos de forma individual i en funció del medi (Saranjit et al. 2001).



<b>Rifampicina</b>	
<b>Condicions</b>	<b>Productes de degradació</b>
pH 2-3, 20-22 °C	3-formil rifampicina
0,1N HCl, 37 °C	3-formil rifampicina
pH 8,2, 20-22 °C	Rifampicin-quinona
pH 8,2, 60-70 °C	25-desacetil rifampicina
	25-desacetil-21-acetil rifampicina
	25-desacetil-23-acetil rifampicina
NaOH 5% en etanol-aigua (1:1) 20-22 °C	25-desacetil rifampicina
<b>Isoniazida</b>	
<b>Condicions</b>	<b>Productes de degradació</b>
pH 3,1, condicions anaeròbiques	Àcid isonicotínic
Condicions alcalines i aeròbiques	Àcid isonicotínic
	Isonicotinamida
	1,2-diisonicotinoil hidrazona
Condicions alcalines i anaeròbiques	Àcid isonicotínic
	1,2-diisonicotinoil hidrazona
Condicions alcalines i anaeròbiques amb EDTA	Àcid isonicotínic
<b>Pirazinamida</b>	
<b>Condicions</b>	<b>Productes de degradació</b>
En estat sòlid en atmosfera seca o humida	Estable
Amb llum natural	
Infusions intravenoses autoclavades	Àcid pirazinoic
En presència d'aigua	

Quadre 14. Productes de degradació rifampicina, isoniazida i pirazinamida (Saranjit et al. 2001).

A més a més, pel que fa a productes en CDF, l'estabilitat de la rifampicina encara es veu més minvada degut a la presència dels altres principis actius, i és que la combinació dels tres compostos afecta de manera directa a l'estabilitat de la rifampicina. El quadre 15 mostra la degradació dels tres principis actius en suspensió de forma individual i en combinació (Saranjit et al. 2001).

Principis Actius (API)	pH	Concentració (mg/ml)	Quantitat	Quantitat	Quantitat
			restant d'API als 28 dies a 4 °C (%)	restant d'API als 28 dies a 24 °C (%)	restant d'API als 28 dies a 40 °C (%)
<b>APIs individuals</b>					
Rifampicina	4,05	5,88	91	96	91
Isoniazida	5,65	5,88	69	56	54
Pirazinamida	6,10	11,76	89	80	56
<b>Combinació de 2 APIs</b>					
Rifampicina	5,45	5,88	14	-	-
Isoniazida		5,88	54	-	-
Rifampicina	4,22	5,88	100	-	-
Pirazinamida		11,76	99	-	-
<b>Combinació de 3 APIs</b>					
Rifampicina		5,88	3	-	2
Isoniazida	5,23	5,88	54	-	29
Pirazinamida		11,76	95	-	95

Quadre 15. Estabilitat rifampicina, isoniazida i pirazinamid en suspensió (Saranjit et al. 2001).

Segons els resultats que s'observen al quadre 15, la degradació de rifampicina és gairebé insignificant quan està sola o en combinació amb pirazinamida, però quan es troba en combinació amb isoniazida pateix degradació en un grau molt elevat (Saranjit et al. 2001).

En termes d'estabilitat, els resultats obtinguts de la realització d'estudis in-vitro i in-vivo mostren que la presència d'isoniazida augmenta la descomposició de la rifampicina en medi àcid. (Shisho et al. 2001), (Sosa et al. 2005). A més a més, en condicions in-vivo s'ha de tenir en compte que aquest procés de degradació es veu afavorit en situació de dejú, on el pH de l'estómac es situa entre 1,4 i 2,1 (Saranjit et al. 2001).

Sota condicions àcides es forma la 3-formil rifampicina, la qual interacciona amb la isoniazida donant, a través d'una reacció de segon ordre, una hidrazona. Aquesta hidrazona, degut a la seva inestabilitat en un entorn àcid, es regenera a isoniazida i 3-formil rifampicina mitjançant una reacció de pseudo-primer ordre.

Com que la reacció de segon ordre és més ràpida que la inicial (rifampicina cap a 3-formil rifampicina) i la de primer ordre (hidrazona cap a isoniazida i 3-formil rifampicina), la reacció global afavoreix la formació de la hidrazona. Com a resultat s'observa la degradació de rifampicina i la seva conseqüent disminució en l'estabilitat i biodisponibilitat (Saranjit et al. 2001).

A la figura 18 s'observa la reacció entre rifampicina i isoniazida en medi àcid.

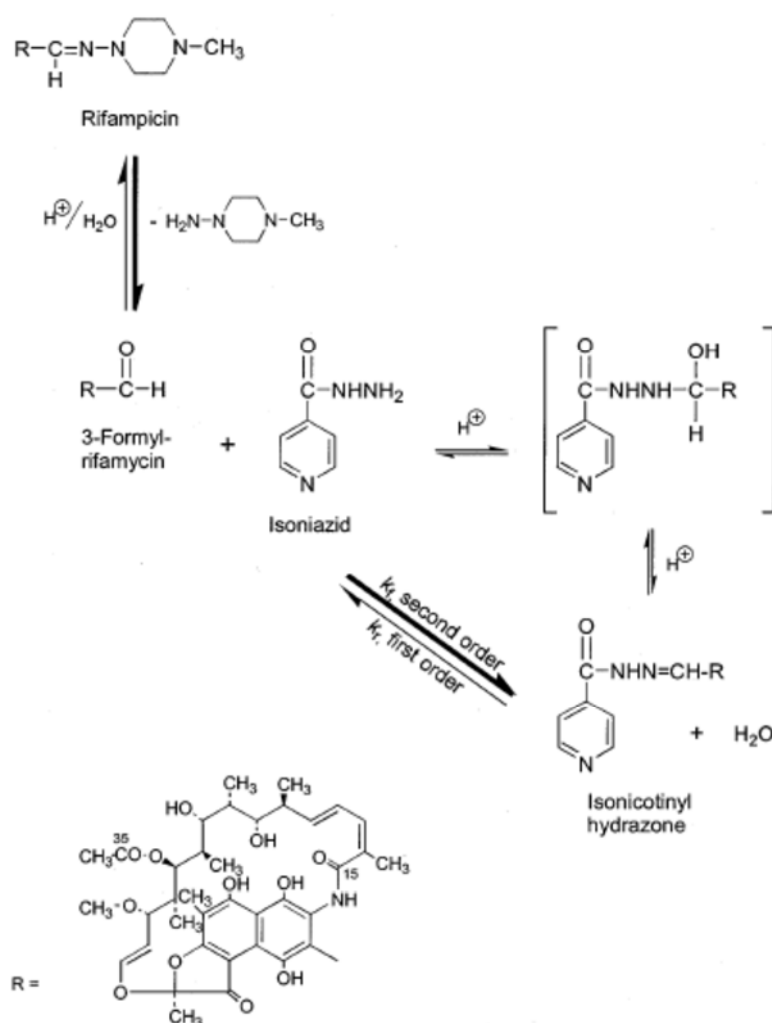


Figura 18. Mecanisme de degradació de rifampicina en presència d'isoniazida (Saranjit et al. 2001).

A més a més, l'addició de pirazinamida a una formulació que contingui els altres dos principis actius, augmenta la degradació de la rifampicina degut a que la

pirazinamida catalitza la reacció que es dona per formar la hidrazona. Aquest efecte catalitzador es degut a que intervé directament a nivell de transferència de protons intramoleculars (Bhutani et al. 2005), (Saranjit et al. 2001) i (Seifart et al. 1991).

Tenint en compte aquestes alteracions físico-químiques que es donen entre els principis actius, es planteja com a possible solució el recobriment entèric d'un dels compostos. S'aconsella recobrir la rifampicina, ja que és molt més sensible que la isoniazida a la degradació àcida, fet que es dona fins i tot sense haver patit interacció amb cap dels altres components de la formulació.

Una altra possible solució que es planteja és elevar el pH gàstric mitjançant l'addició d'una substància alcalinitzant. En un entorn bàsic la rifampicina estaria en la seva forma mes insoluble, fet que produiria una menor descomposició del principi actiu. Com a substància alcalinitzant es recomana el bicarbonat sòdic i es desaconsella l'ús d'antiàcids que continguin substàncies adsorbents ja que produirien una disminució en la biodisponibilitat de la rifampicina (Saranjit et al. 2001).

Un altre camí a considerar és l'elaboració d'una forma farmacèutica líquida on el vehicle a utilitzar sigui de caràcter oliós. Diferents articles i patents mostren els bons resultats obtinguts alhora d'elaborar formes farmacèutiques líquides utilitzant medis oliosos amb principis actius amargs, susceptibles d'hidròlisi (Roig, 2004) o sensibles a entorns àcids (Cano Corral, 2012).

Com a vehicles oliosos s'utilitzen bàsicament olis vegetals (oli de sèsam o de soja) i/o triglicèrids de cadena mitja (TCM), sent aquests últims els més utilitzats degut a la seva baixa aportació calòrica i a la poca susceptibilitat que presenten al enranciment. Aquesta baixa sensibilitat a oxidar-se és deguda a que els àcids grassos que contenen són saturats, i per tant, no presenten dobles enllaços que puguin reaccionar amb l'oxigen produint aldehids, agents causants del enranciment. (Cano Corral, 2012), (Roig, 2004).

També és important tenir en compte determinats factors alhora de formular. Estudis realitzats a diferents pHs (2-10) i en presència i absència de solució

reguladora de fosfats per determinar el perfil d'estabilitat i solubilitat dels tres principis actius utilitzant diferents tensioactius (poloxamer 188, poloxamer 407 i sorbitols), agents de suspensió (carbopol 934 i carbopol 974F) i ciclodextrines, permet concloure que no es recomana l'ús dels agents citats per a la elaboració d'un medicament que contingui rifampicina, isoniazida i piraziamida degut a que afecten a l'estabilitat dels principis actius (Chen, 2000).

Un altre factor a tenir present alhora de formular el medicament és que tot i que la isoniazida és estable en medi àcid, en presència de sucres reduïts com la galactosa, la lactosa, la glucosa o la manosa, forma hidrazones, les quals es caracteritzen per ser difícilment absorbibles a nivell de tracte gastrointestinal (Saranjit et al. 2001).

Altres estudis recomanen aprofitar el caràcter hidròfil de la isoniazida i la pirazinamida respecte al caràcter lipòfil de la rifampicina per elaborar un medicament que contingui els tres principis actius d'una forma estable. En aquests estudis es proposa la microencapsulació en un entorn hidròfil de isoniazida i pirazinamida mitjançant polímers per formar microesferes suspeses en una fase lipídica la qual conté rifampicina dissolta. Aquestes microesferes evitarien així la interacció i la consegüent hidròlisi entre els principis actius (Chen, 2000).

Així doncs, segons tota la informació cercada, el medicament a elaborar, haurà de complir, com a mínim, les premisses esmentades en els paràgrafs anteriors per poder garantir l'estabilitat i la biodisponibilitat de la rifampicina, la isoniazida i la pirazinamida, tenint especial atenció en la primera, degut a l'alt grau de sensibilitat a la degradació que pateix en medi àcid i en presència d'isoniazida.

## PART EXPERIMENTAL



## INTRODUCCIÓ

Es pretén desenvolupar un preparat líquid d'administració oral que contingui rifampicina, isoniazida i pirazinamida a les concentracions de 20 mg/ml, 13,3 mg/ml i 33,3 mg/ml respectivament, seguint així les pautes de dosificació de l'OMS (Organización Mundial de la Salud, 2014b).

La reactivitat entre els principis actius en medi aquós a pH àcid, marca d'una forma molt clara i evident els límits alhora de plantejar una fórmula viable per a la població pediàtrica. Tenint en compte les premisses esmentades en el capítol anterior, un dels camins que es planteja es l'elaboració d'una forma farmacèutica líquida amb TCM com a vehicle oliós.

Atenent les propietats dels principis actius i dels TCM, i tenint en compte la població a la qual va destinada el medicament, cal afegir els excipients necessaris per millorar les propietats físiques i les característiques organolèptiques de la fórmula.

Un cop realitzat el desenvolupament galènic i seleccionat el procés de fabricació es realitzen els estudis d'estabilitat pertinents que permetran avaluar l'estabilitat de la proposta de fórmula. Per valorar la viabilitat de la forma farmacèutica i per poder determinar l'estabilitat de la fórmula final, es dur a terme de forma simultània el desenvolupament analític.

Prèviament, es realitza un estudi de les característiques químiques, físiques i tecnològiques dels tres principis actius motiu d'estudi per obtenir la informació necessària que permeti desenvolupar una fórmula robusta, estable i adequada per administrar a la població pediàtrica.





## CAPÍTOL 3: MATERIAL I MÈTODES

### 3.1 ESTUDI I CARACTERITZACIÓ DELS PRINCIPIS ACTIUS

#### 3.1.1 Material

A continuació es descriuen els materials i els mètodes emprats per realitzar la caracterització dels tres principis actius objecte d'estudi.

##### 3.1.1.1 Principis actius

En tots els casos s'han utilitzat els mateixos números de lot. El quadre 16 mostra els proveïdors, els lots i les caducitats de cadascun d'ells.

Compost	Proveïdor	Número de lot	Data de caducitat
Rifampicina	Fagron Iberica	14A21-B01 29414	01/2016
Isoniazida	Acros Organics	A0351069	08/2019
Pirazinamida	Acros Organics	A0343319	01/2019

Quadre 16. Proveïdors, número de lot i caducitat dels principis actius.

##### 3.1.1.2 Estudi de les característiques de solubilitat

El quadre 17 mostra els compostos utilitzats per determinar la solubilitat, amb el proveïdor, número de lot i la data de caducitat corresponent.

Compost	Proveïdor	Número de lot	Data de caducitat
Triglicèrids de cadena mitja	Fagron Iberica	L14110164	09/2016
Àcid ortofosfòric	Panreac	15948402	01/2016
NaOH concentrat	Panreac	0000483336	03/2020
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Panreac	0000629636	08/2021
KOH	Fagron Iberica	L11040162	09/2016
KCl	Panreac	0000477154	01/2020
HCl 37%	Panreac	0000674981	10/2021
NaCl	Panreac	0000557564	02/2021
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Panreac	0000509563	07/2020
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Panreac	0000838422	05/2022

Quadre 17. Número de lot i caducitat dels compostos utilitzats per determinar solubilitat.

El quadre 18 mostra els equips utilitzats per determinar la solubilitat dels principis actius.

<b>Equip</b>	<b>Marca</b>	<b>Model</b>
Balança	Mettler toledo	AB104
Placa agitadora	P-Selecta	Agimatic-N
pHímetre	Crison	LB4
	Microph2002	

*Quadre 18. Equips utilitzats per determinar les solubilitats.*

### 3.1.1.3 Determinació de la mida de partícula

L'aparell utilitzat és l'equip de difracció làser *Malvern Master-Sizer 2000*. Aquest equip està format per una doble font de llum, per una banda una font d' He-Ne i per l'altra, una font de llum blava addicional de baixa longitud d'ona. A més a més, permet la possibilitat de realitzar les determinacions tant per via humida com per via seca, en funció de les característiques dels compostos a analitzar (IESMAT, 2016).

Alhora i amb la finalitat de corroborar les dades obtingudes amb difracció làser, s'utilitza el microscopi òptic Leica DM 1000 LED amb el software Las Ez 3.0.

### 3.1.1.4 Estudi de les propietats reològiques

Per poder realitzar totes les proves reològiques de les pólvores de cada principi actiu correctament s'ha seguit el PNTlab01906 (Diagrama SeDeM) del Servei de Desenvolupament del Medicament (SDM) de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. El quadre 19 mostra el material utilitzat durant la realització de les proves.

<b>Material</b>	<b>Marca</b>	<b>Model</b>
Balança	Mettler Toledo	AB104
Embut	Anorsa	X-7705
Embut	Anorsa	X-5992
Suport embut	-	-
Cronòmetre	Hanhart	Stopstart2
Plantilla mil·limetrada	-	-
Tub metàl·lic 7 cm	-	-
Peu de rei	Mitutoyo	CD-15CP
Volumenòmetre	Dr. Schleuniger-pharmaton	JV 2000
Proveta 100 ml	Anorsa	-
Proveta 25 ml	Anorsa	-
Vibrador de tamisos	CISA	-
Tamisos	CISA	0,355, 0,212, 0,1, 0,05
Estufa	P-Selecta	-
Dessecador amb sílica gel	Pyrex	-
Humectador 76% HR	Pyrex	-

*Quadre 19. Material necessari per realització SeDeM.*

### 3.1.1.5 Espectrofotometria UV-Vis

La lectura de les mostres es realitza per triplicat en l'espectrofotòmetre Specor 205 UV-Vis. El quadre 20 mostra el material utilitzat per realitzar la determinació.

<b>Material</b>	<b>Marca / Número lot</b>	<b>Model / Caducitat</b>
Balança	Sartorius	bp211d
Metanol	0000690751	12/2019
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	L12060045-OF-039484	03/2016
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0000629636	08/2021
NaCl	0000557564	02/2021

*Quadre 20. Material necessari per realització de l'UV-Vis.*

#### 3.1.1.6 Espectroscòpia d'infraroig (IR)

La determinació de l'espectre per infraroig s'ha realitzat a la Unitat de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona segons el mètode general 2.2.24 de Farmacopea Europea. L'equip emprat és el FTIR Perkin Elmer model 1600. Es realitza l'assaig amb la finalitat de comprovar la puresa de la substància, així com de verificar la seva identitat mitjançant l'espectre infraroig.

#### 3.1.1.7 Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

L'obtenció de l'espectre  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  RMN s'ha realitzat a la Unitat de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Les dades han estat registrades per l'equip Varian Gemini-400 (100 MHz). Els desplaçaments químics expressats en ppm respecte al pic central del dissolvent:  $\text{CDCl}_3$  d, 7,26 (H) ó  $\text{DMSO-d}_6$  d, 2,49 (H) com a patrons interns.

#### 3.1.1.8 Difracció per Raig X

S'utilitza el Difractòmetre PANalytical X'Pert PRO MPD amb goniòmetre  $\theta/\theta$  de 240 mm de radi, configuració del feix convergent amb mirall el·líptic i geometria de transmissió i mostra plana encapsulada entre làmines de material poc absorbent en les següents condicions:

- Radiació  $\text{K}\alpha$  del Cu ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ).
- Potència de treball: 45 kV – 40 mA.
- Finestres en el feix incident que determinen l'alçada del feix a 0.4 mil·límetres.
- Finestres Soller de 0.02 radians en el feix incident i en el feix difractat. Detector PIXcel amb longitud activa de  $3.347^\circ$ .
- Escorbrat  $\theta/2\theta$  de  $2$  a  $60^\circ 2\theta$  amb mida de pas de  $0.026^\circ$  i temps de mesura de 300 segons per pas.

### 3.1.1.9 Determinació d'incompatibilitats entre principis actius mitjançant calorimetria diferencial d'escombratge (DSC)

L'aparell utilitzat ha estat el DSC 821e Mettler Toledo amb software STAR<sup>e</sup> SW 8.10 del serveis científico-tècnics i tecnològics (CCiT) de la Universitat de Barcelona.

## 3.1.2 Mètodes

### 3.1.2.1 Estudi de les característiques de solubilitat

Es determina la solubilitat de rifampicina, isoniazida i pirazinamida en medi oliós i medi aquós a pH 1, 3, 5, 7 i 9 a les concentracions prèviament establertes tenint en compte les pautes de dosificació de l'OMS (20 mg/ml, 13,3 mg/ml i 33,3 mg/ml respectivament).

Es realitza sempre en un volum de medi de 100 ml, per tant es pesen 2,00 g de rifampicina, 1,33 g de isoniazida i 3,33 g de pirazinamida en cada cas. S'afegeix el principi actiu directament al medi el qual es troba sota agitació magnètica constant i a temperatura ambient ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Es deixa en aquestes condicions durant 5 minuts. Un cop transcorregut el temps, es determina la solubilitat en funció de la presència o absència de partícules en suspensió i de la formació d'aglomerats.

Per a la preparació de les solucions reguladores a pH= 3, 5, 7 i 9 es segueixen les pautes de preparació de solucions reguladores de la Farmacopea Europea (European Pharmacopoeia, 2015a). Per a la preparació de la solució reguladora a pH=1 es segueixen les pautes de preparació de solucions reguladores de la USP (United States Pharmacopeia, 2015).

### 3.1.2.2 Determinació de la mida de partícula

Es realitza un anàlisi de la mida de partícula dels tres principis actius mitjançant difracció làser. Aquesta tècnica està basada en el fenomen de que les partícules dispersen llum en totes direccions amb un patró d'intensitat que es depenent de la mida de partícula. Mitjançant una transformació de les dades de mesura d'intensitat, a dades de volum, s'obté el valor de la mida de partícula. Com les partícules no són homogènies, aquesta tècnica segueix el principi de "la teoria de l'esfera equivalent", basada en assimilar les partícules a una esfera.

La determinació de la rifampicina es realitza per via humida amb aigua com a medi de dissolució. En el cas de la isoniazida i la pirazinamida la determinació es realitza per via seca degut a la solubilització dels principis actius esmentats en els diferents medis de dissolució (aigua i etanol).

La tècnica de difracció permet obtenir dades exactes de la mida de partícula dels compostos objecte d'estudi, però tot i això, s'estudien els tres principis actius a través de la microscopia òptica. L'adquisició d'imatges mitjançant aquesta tècnica, tot i no ser tant precisa alhora d'aconseguir valors de mida de partícula, permet obtenir informació de les substàncies a estudiar d'una forma molt visual, senzilla i ràpida, alhora que complementa les dades numèriques i en conseqüència les gràfiques obtingudes mitjançant difracció. Alhora, permet visualitzar la forma de la partícula, és a dir, les seves característiques morfològiques, que poden afectar a les característiques galèniques de la substància.

Per poder realitzar la correcta visualització dels tres principis actius en el microscopi òptic, es preparen suspensions de cadascun d'ells amb parafina líquida, medi en el qual els tres són totalment insolubles. És col·loca una gota de cada preparació al portaobjectes i es tapa amb un cobreobjectes. La mostra es visualitza al microscopi a 40X. La visualització és realitza per triplicat.

### 3.1.2.3 Estudi de les propietats reològiques

Per determinar les propietats reològiques dels tres principis actius es realitza un diagrama SeDeM. Aquest mètode permet caracteritzar les pólvores per determinar el seu comportament i estudiar la reproductibilitat del procés amb previsió a la industrialització del producte mitjançant la determinació dels següents paràmetres:

- Densitat aparent sense compactar ( $D_a$ )
- Densitat aparent compactada ( $D_c$ )
- Velocitat de lliscament ( $t'$ )
- Índex de Hausner (IH)
- Angle de repòs ( $\alpha$ )
- Índex d'homogeneïtat ( $\theta$ )
- % Partícules fines  $< 50 \mu\text{m}$  (%Pf)
- Pèrdua per dessecació
- % Higroscopicitat (%H)

Aquests paràmetres es determinen mitjançant un seguit d'equacions conegudes i alhora amb proves experimentals reproduïbles i degudament validades (Aguilar et al. 2014), (Pérez et al. 2006), (Suñé et al. 2005), (Suñé et al. 2011).

- Metodologia aplicada als assajos SeDeM

- Densitat aparent sense compactar ( $D_a$ ) i densitat aparent compactada ( $D_c$ ) (Ph. Eur. 2.9.34) (European Pharmacopoeia, 2015b).

Es determinen els volums aparents abans i després de sedimentar, la capacitat de sedimentació i les densitats aparents dels sòlids dividits. Per fer-ho es necessari l'ús del volumenòmetre i una proveta de 250 ml. Es pesen 100 g de la mostra i es dipositen dins de la proveta, es determina el volum aparent sense realitzar cap



tractament a la mostra. Posteriorment es realitzen 10, 490, 750 i 1250 cops consecutivament fins realitzar un total de 2500 cops anotant en cada cas els volums aparents obtinguts. A través dels valors obtinguts i mitjançant les següents fórmules es calculen la densitat aparent i la densitat compactada.

$$\delta_0 = m/V_0 \text{ (g/ml)}$$

On  $m$  és la quantitat de mostra pesada expressada en grams i  $V_0$  el volum aparent sense compactar expressat en ml.

$$\delta = m/V_{1250} \text{ (g/ml)} \text{ ó } \delta = m/V_{2500} \text{ (g/ml)}$$

On  $V_{1250}$  i  $V_{2500}$  són volum aparent compactat als 1250 cops i 2500 cops expressat en ml.

- Temps de lliscament ( $t'$ ) (Ph. Eur. 2.9.16) (European Pharmacopoeia, 2015c).

Es mesura el temps que triga en caure tota la pols dipositada en l'embut adequat. El material necessari per a la realització d'aquesta prova és un embut X-7705, un suport metàl·lic, una pinça i un cronòmetre.

Per realitzar l'assaig es pesen 100 g de la mostra a examinar, es tapa la boca de l'embut amb cinta adhesiva i s'omple l'embut amb la mostra. A continuació es retira la cinta adhesiva i es determina el temps que triga en lliscar la mostra per l'embut. Es realitza la prova per triplicat. La velocitat de lliscament s'expressa en segons i dècimes de segon en relació als 100 g de mostra. Si la mostra no cau completament s'expressa com a temps infinit.

- Índex de Hausner (IH) (Ph. Eur. 2.9.36) (European Pharmacopoeia, 2015d).

Permet conèixer la facilitat per fluir de la mostra objecte d'estudi. Es calcula a partir de les mitjanes obtingudes en les determinacions de la densitat aparent ( $D_a$ ) i la densitat compactada ( $D_c$ ).

$$IH = D_c/D_a$$

- Angle de repòs ( $\alpha$ ) (Ph. Eur. 2.9.36) (European Pharmacopoeia, 2015d).

Un altre prova utilitzada per determinar la capacitat de lliscament de les pólvores és la de l'angle de repòs. En aquest cas el material necessari és un embut X-5992, un tub metàl·lic de 7 cm, una pinça, un peu de rei i paper mil·limetrat.

Es col·loca l'embut en una pinça de suport metàl·lic ubicant el centre del paper mil·limetrat just a sota de la boca inferior de l'embut. S'utilitza el tub metàl·lic per col·locar l'embut a una distancia de 7 cm respecte el paper mil·limetrat. A continuació, es tapa la part inferior de l'embut amb cinta adhesiva i s'omple amb la mostra. S'enrasa amb l'ajuda d'una espàtula. Tot seguit es retira la cinta adhesiva i es deixen lliscar les pólvores, en el cas de que no llisquessin amb facilitat, es colpeja l'embut de manera suau amb l'ajuda d'una espàtula. Es determinen els quatre radis i l'alçada del con format mitjançant el peu de rei. Es calcula l'angle de repòs mitjançant la següent fórmula:

$$A = (\text{antitg } H / r)$$

On H és l'alçada i r la mitja dels quatre radis.

- Índex d'homogeneïtat ( $\theta$ ) (Ph. Eur. 2.9.12) (European Pharmacopoeia, 2015e).

Es realitza mitjançant una cascada de tamisos. Per fer-ho es necessita el vibrador de tamisos amb els tamisos descrits en el quadre 19 i una balança. Es pesen 100 g de la mostra i es col·loquen al tamís superior. Es sotmet a la cascada de tamisos a una vibració d'intensitat 10 durant 10 minuts.

Un cop finalitzat el temps establert es calcula el % de mostra retinguda en cada tamís mitjançant el pes que hi ha en cadascun d'ells. Per fer-ho s'ha d'haver tarat prèviament el tamís.

A partir de les dades obtingudes s'aplica la següent equació:

$$I\theta = F_m/100 + (d_m - d_{m-1})F_{m-1} + (d_{m+1} - d_m)F_{m+1} + (d_m - d_{m-2})F_{m-2} + (d_{m+2} - d_m)F_{m+2} + \dots + (d_m - d_{m-n})F_{m-n} + (d_{m+n} - d_m)F_{m+n}$$

On :

$I\theta$ : Índex d'homogeneïtat relativa. Homogeneïtat de la mida de partícules en l'interval de fraccions considerades.

$F_m$ : Tant per cent de partícules compreses en l'interval majoritari.

$F_{m-1}$ : Tant per cent de partícules compreses en l'interval immediatament inferior al majoritari.

$F_{m+1}$ : Tant per cert de partícules compreses en l'interval immediatament superior al majoritari.

$n$ : Número d'ordre de la fracció considerada dins d'una sèrie amb respecte a la majoria.

$d_m$ : Diàmetre mig de les partícules de la fracció majoritària.

$d_{m-1}$ : Diàmetre mig de les partícules de la fracció de l'interval immediatament inferior al majoritari.

$d_{m+1}$ : Diàmetre mig de les partícules de la fracció de l'interval immediatament superior al majoritari.

- % Partícules fines < 50  $\mu\text{m}$  (%Pf) (Ph. Eur. 2.9.12) (European Pharmacopoeia, 2015e).

Aplicant el mètode descrit en l'apartat anterior es determina el tant per cent de partícules que passen pel tamís de 0,05 mm.

- Pèrdua per dessecació (%HR) (Ph. Eur. 2.2.32) (European Pharmacopoeia, 2015f).

Es pesa 1 g de la mostra en un pesafiltres amb tapa prèviament tarat. Es fica a l'estufa a 105 °C destapat durant 3 hores. Un cop transcorregut el

temps, es tapa i es manté durant 15 minuts en un dessecador. Tot seguit es pesa. La diferència entre el pes inicial i el pes final és el tant per cent d'humitat relativa de la mostra.

- % Higroscopicitat (%H)

Es determina l'augment de pes de la mostra mantinguda en un humectador en un ambient de 76% ( $\pm 2\%$ ) d'humitat relativa i temperatura de 22 °C ( $\pm 2$  °C) durant 24 h.

#### 3.1.2.4 Espectrofotometria UV-Vis

L'electroscòpia UV/Vis es fa servir habitualment per determinar de forma qualitativa i quantitativa les diverses substàncies. Per poder dur-ho a terme, s'utilitzen paràmetres com la longitud d'ona ( $\lambda$ ) expressada en nanòmetres (nm) i l'absorbància. La longitud d'ona a la que la mostra absorbeix la major quantitat de llum es denomina punt màxim d'absorció ( $\lambda_{\max}$ ) i normalment es deu a la presència de grups cromòfors en la molècula. Aquest grups cromòfors tindran el seu màxim d'absorció a una longitud d'ona determinada la qual serà característica per a cada compost. El valor d'absorbància obtingut a una longitud d'ona fixa es pot relacionar de manera directa amb la concentració de la substància mitjançant l'equació de Lambert-Beer (Valls, 1998).

S'analitzen els principis actius seguint les pautes descrites a Farmacopea Europea 8.0 segons monografia de cadascuna de les substàncies. En el cas de la rifampicina es pesen 50 mg i es dilueixen en 50 ml de metanol, s'agafa 1 ml d'aquesta mateixa solució i es porta a 50 ml amb una solució de fosfats a pH= 7,4. Es realitza un escombratge en un interval d'absorció comprès entre 220-500 nm (European Pharmacopoeia, 2014a).

Per la pirazinamida es prepara una solució mare (a) pesant 50 mg d'aquesta i diluint-los en 100 ml amb aigua purificada. A partir de la

solució mare es preparen dues solucions més. La primera (b) s'obté agafant 1 ml de la solució mare i portant-lo fins a 10 ml d'aigua purificada, la segona (c) s'obté agafant 2 ml de la solució mare i portant-los fins a 100 ml amb aigua purificada. Es realitza un escombratge en un interval d'absorció comprès entre 290-350 nm per a la solució b, i de 230-290 nm per a la solució c (European Pharmacopoeia, 2014b).

La monografia de la isoniazida no indica com realitzar determinacions mitjançant UV-Vis (European Pharmacopoeia, 2014c), així doncs, es realitza una recerca bibliogràfica per poder dur a terme la lectura. En el cas de la isoniazida, es pesen 100 mg i es dissolen en 100 ml en una solució de metanol:aigua purificada (2:8). S'agafa 1 ml de la solució anterior i es porta a 100 ml de la mescla de metanol:aigua. Es realitza un escombratge en un interval d'absorció comprès entre 200-400 nm (Chen, 2000).

#### 3.1.2.5 Espectroscòpia d'infraroig (IR)

L'espectroscòpia d'infraroig s'utilitza sola o en combinació amb altres tècniques per identificar un compost o investigar la composició d'una mostra, ja que dóna informació dels tipus d'enllaç presents en aquesta.

Els fotons de la radiació infraroja produeixen canvis en les vibracions dels enllaços covalents de les molècules i, depenent de la freqüència de vibració s'associarà amb un tipus particular d'enllaç. Per tant, l'anàlisi de la llum infraroja que travessa (o absorbeix) una substància, permet determinar les freqüències corresponents als enllaços que les han absorbit, i en conseqüència, identificar la molècula en estudi.

La regió de l'infraroig correspon a longituds d'ona que van des de 14.000 a 10  $\text{cm}^{-1}$ , i s'expressa en números d'ona ( $\text{cm}^{-1}$ ). La porció infraroja de l'espectre electromagnètic es divideix en tres regions, l'infraroig proper, el mitjà i el llunyà, així anomenats per la seva relació amb l'espectre visible. D'aquest tres, l'infraroig mitjà (aproximadament

4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) és el que s'utilitza per estudiar les vibracions fonamentals i l'estructura rotacional/vibracional en l'espectroscòpia IR.

En un espectre infraroig s'observa una escala de freqüències expressades en número d'ona respecte al percentatge de transmitància (relació entre el flux radiant que ha travessat la mostra i l'incident) o absorbància (Valls et al. 1998).

### 3.1.2.6 Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

La Ressonància Magnètica Nuclear és una tècnica espectroscòpica basada en les propietats magnètiques dels nuclis atòmics. A nivell pràctic, la RMN sobre àtoms d'hidrogen ( $^1\text{H}$ ) o de carboni ( $^{13}\text{C}$ ) és la que té més rellevància, ja que aquests es troben presents en la majoria de molècules.

La RMN de  $^{13}\text{C}$  és complementària a la de  $^1\text{H}$ . Aquesta última s'utilitza per deduir l'estructura de l'esquelet carbonat observant els entorns magnètics dels àtoms d'hidrogen, mentre que l'espectroscòpia de  $^{13}\text{C}$  determina l'entorn magnètic dels àtoms de carboni. A la natura aproximadament l'1% dels àtoms de carboni són d'isòtop  $^{13}\text{C}$ , fet que fa que la RMN de  $^{13}\text{C}$  sigui menys sensible que la de  $^1\text{H}$ .

El principi bàsic és que, si bé les propietats magnètiques de cada àtom depenen principalment de la composició del seu nucli (nombre de protons i de neutrons), l'ambient al voltant d'aquest àtom també hi té un efecte (apantallament electrònic i desdoblament de spin). Això fa possible que cada àtom (o grup d'àtoms equivalents) en una molècula doni un senyal diferent en l'espectre (Rabi et al. 1998).

La senyal obtinguda en l'espectre permet obtenir informació característica com el tipus de grup funcional al qual pertany l'àtom, mitjançant la magnitud del desplaçament químic, el número de protons presents en cada grup, mitjançant la intensitat d'absorció i quins grups funcionals es troben entrelaçats entre si mitjançant la multiplicitat.

L'obtenció de tota aquesta informació fa que la RMN es situï com una de les tècniques espectroscòpiques que proporcionen dades més detallades sobre l'estructura de les molècules, convertint-se així en una eina de gran importància i molt eficaç en la identificació qualitativa de compostos orgànics. A més a més, també permet obtenir informació des d'un punt de vista quantitatiu mitjançant la integració de les bandes d'absorció (Valls, 1998).

En un espectre RMN hi ha una escala que permet detectar el valor dels desplaçaments químics ( $\delta$ ) de cada màxim d'absorció expressada en parts per milió (ppm). El valor dels  $\delta$  del  $^{13}\text{C}$  és de 15 a 20 cops més gran que en el cas de  $^1\text{H}$  degut al tipus d'àtoms als que es troba unit el carboni respecte als que es troba unit l'hidrogen. A més a més, les senyals de l'espectre del carboni són línies verticals degut a que no hi ha desdoblament de spin, a diferència de les senyals de l'hidrogen on s'observen fenòmens de multiplicitat (Pavia et al. 2008).

### 3.1.2.7 Difracció per Raig X

Els raig X constitueixen un petit interval de freqüències de l'espectre general de radiacions electromagnètiques amb longituds d'ona compreses entre 0,1 i 100 Å. El fenomen d'absorció dels raig X per la matèria depèn no només de la natura del absorbent, sinó també de l'energia o longitud d'ona de la radiació incident. Aquesta tècnica es basa principalment en produir l'excitació de la mostra o emissor secundari mitjançant un emissor primari de forma que, la radiació de fluorescència excitada dels diferents àtoms de la mostra arribi al sistema òptic per ser analitzada i seguidament detectada i registrada gràficament en el espectre. Cada substància té un espectre característic.

De les múltiples aplicacions de la difracció de raig X, cal destacar-ne dues de rellevants, la identificació i l'anàlisi quantitativa d'estructures cristal·lines i la determinació d'estructures cristal·lines. Qualsevol espècie cristal·lina produeix sempre un diagrama de difracció característic el qual pot ser considerat com una empremta dactilar.

Aquest fet fa que la identificació de les substàncies es pugui realitzar de forma inequívoca (Valls, 1998).

L'obtenció de l'espectre de difracció per Raig X s'ha realitzat a la Unitat de Difracció de Raig X dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona – CCiTUB. L'estudi és del tipus cristal·lització i diferenciació de polimorfs mitjançant l'anàlisi per difracció de Raigs X pel mètode de la pols. S'introdueix part del material en pols en capil·lars de vidre Lindemann de 0,7 mm de diàmetre.

#### 3.1.2.8 Determinació d'incompatibilitats entre principis actius mitjançant calorimetria diferencial d'escombratge (DSC)

Una de les tècniques més emprades per determinar incompatibilitats entre compostos en estat sòlid és la calorimetria diferencial d'escombratge (DSC). Aquesta tècnica termoanalítica permet determinar el calor de transformació i els canvis d'entalpia d'un producte concret, mostrant el comportament del compost quan està exposat a elevades temperatures durant un període de temps determinat (Valls, 1998).

L'estudi s'ha realitzat a la Unitat de Polimorfisme i Calorimetria dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB). S'analitzen els tres principis actius per separat i de manera conjunta. Per fer-ho, es preparen mostres de cada principi actiu per separat i amb mescles binàries en proporció 1:1. Cadascuna d'elles es sotmet a temperatures de fins a 300 °C aproximadament durant 28 minuts. Els resultats obtinguts s'expressen mitjançant termogrames.

L'anàlisi comparativa dels termogrames obtinguts dels productes individuals en relació als obtinguts de les mescles binàries entre principis actius, permet detectar de manera ràpida, possibles interaccions químiques i físiques a partir de les modificacions produïdes en els esdeveniments tèrmics (Balasubramanian i Pampalia, 2001), (Ford i Timmins, 1989) i (Wissing et al. 2000).



## 3.2 MÈTODE ANALÍTIC

### 3.2.1 Material

A continuació es descriuen els materials i equips utilitzats per realitzar el desenvolupament i la validació del mètode d'anàlisi.

#### 3.2.1.1 Primeres matèries i patrons

Els proveïdors, números de lot i caducitats dels patrons i de les primeres matèries utilitzades per realitzar la recerca del mètode analític i la seva posterior validació es mostren en el quadre 21.

Primeres matèries	Proveïdor	Número de lot	Caducitat
Rifampicina	European Pharmacopeia reference standard	2.0	-
Isoniazida	European Pharmacopeia reference standard	1.2	-
Pirazinamida	European Pharmacopeia reference standard	2.1	-
Rifampicina primera matèria	Fagron Iberica	15D14-B03- 307143	03/2019
Isoniazida primera matèria	Acros Organics	A0351069	08/2019
Pirazinamida primera matèria	Merck	S4743850542	12/2020
Triglicèrids de cadena mitja	Fagron Iberica	L17030214- OF-221626	01/2020
Aerosil®R-792	Evonik Industries	334121112	12/2018
Cremophor®RH-40	Fagron Iberica	L17070058- DF-22103	04/2019
Dow-Corning®Q7- 2243	Dow Corning	0005057284	08/2017
Sucralosa	Merck KGaA	K93648494607	12/2018
Mentol	Fagron Iberica	11C07-B05	10/2018
Essència de xocolata	Givaudan	DV00552489	06/2018

Quadre 21. Proveïdors, números de lot i caducitat de primeres matèries i patrons.

### 3.2.1.2 Reactius i solucions

Els proveïdors, números de lot i caducitats dels reactius utilitzats per realitzar el desenvolupament i la validació del mètode d'anàlisi es mostren en el quadre 22.

Reactiu	Proveïdor	Número de lot	Caducitat
Clorur de tetrametilamoni	Sigma-aldrich	MKBW3155V	05/2018
Àcid orto-fosfòric	Scharlau	R151G32	11/2019
Di-hidrògen fosfat de sodi	Panreac AppliChem	0000509563	07/20
HCl 37%	Panreac	0000674981	10/2021
Pelets d'hidròxid sòdic	Panreac AppliChem	131687.1211	01/2023
Peròxid d'hidrogen 33%	Panreac AppliChem	141077.1214	06/2020
Metanol grau HPLC	Panreac AppliChem	221091.1612	10/2021

*Quadre 22. Proveïdors, números de lot i caducitat reactius.*

A més a més es prepara la següent solució tal i com es descriu a continuació:

Solució reguladora 0,05% pH= 3,5: Afegir a 2L d'aigua purificada sota agitació magnètica 1 ml d'àcid orto fosfòric concentrat i 1 gram de clorur de tetrametilamoni. Agitar fins homogeneïtzar, ajustar a pH= 3,5 i filtrar.

### 3.2.1.3 Aparells i utilitatge

El quadre 23 mostra els aparells i/o utilitatge utilitzats per realitzar el desenvolupament i la validació del mètode d'anàlisi.

<b>Aparell/utillatge</b>	<b>Marca</b>	<b>Codi</b>
Columna Kromasil C18 15cmx 4.6mm 5 µm	Teknokroma	211
Columna Zorbax SB-Phenil 25cmx 4.6mm 5 µm	Agilent Technologies	207
Columna Luna C <sub>18</sub> 25cm x 4.6mm 5 µm	Phenomenex	296
Columna Zorbax Eclipse plus Phenyl-Hexyl 4,6x150 mm 5 µm	Agilent Technologies	269
Balança analítica	Precisa 600C	PE7
Espàtules d'acer inoxidable	-	-
Paper d'un sol ús	-	-
Vasos de precipitats	-	-
Provetes de vidre	-	-
pHímetre	Crison Microph2002	LB4
Agitador	Heidolph	CG40
High-performance liquid chromatography (HPLC)*	Dionex Ultimate 3000	CQ52
High-performance liquid chromatography (HPLC)**	Agilent 1200	CQ33
Bany d'ultrasons 9L	Selecta	-
Pipetes aforades Blau brand	Brand	-
Vials incolorers per HPLC 32 x 11,6	Clean Pack	-
Taps vials de hplc	FisherBrand	-
Xeringes 10 ml cono luer	BD Discardit II	-
Capsuladora de vials manual 11mm	Hewlett Packard	CQ18
Filtres vials HPLC	Agilent Technologies	-
Làmpada llum UV	Uvatom	CQ 23
Làmpada llum IR	Infra-tester	CQ24
Ampolla vidre transparent	Wheaton	-
Tap de plàstic blanc	Wheaton	-

*Quadre 23. Aparells i utillatge utilitzats.*

\* Aquest HPLC està format per un forn de columna, una bomba quaternària, un injector automàtic i un detector de red de diode (DAD), controlat per un software Chromeleon datasystem versió 6.80.

\*\* Aquest HPLC està format per un forn de columna, una bomba quaternària, un injector automàtic i un detector de red de diode (DAD), controlat per un software Chemstation versió B04.02.

### 3.2.2 Mètodes

Es desenvolupa i valida una nova metòdica analítica per poder realitzar un anàlisi qualitatiu i quantitatiu dels tres principis actius objecte d'estudi simultàniament a partir de la forma farmacèutica definitiva.

#### 3.2.2.1 Introducció

La validació es defineix com l'establiment documentat d'evidències que proporcionen un alt grau de confiança de que un procés específic produeix un producte que compleix amb les seves especificacions predeterminades i atributs de qualitat i les seguirà produint en un futur si es mantenen els paràmetres de treball (Food and Drug Administration, 2015), (Dalmau et al. 1989). També es pot definir com la obtenció de proves convenientment documentades, demostratives que un mètode de fabricació o control, és suficientment fiable com per produir el resultat previst dintre d'uns intervals definits (Boletín Oficial del Estado, 1985).

Una definició més específica de la validació analítica (Pérez y Pujol, 2001), indica que és l'establiment de l'evidència documental de que un procediment analític conduirà, amb un elevat grau de seguretat, a l'obtenció de resultats precisos i exactes, dintre de les especificacions i atributs de qualitat prèviament establerts.

Els requisits previs a l'inici d'una validació analítica consisteixen en treballar segons les normes corresponents a les Bones Pràctiques de Laboratori; per altra banda el procediment analític a validar ha d'estar ben desenvolupat, provat i documentat per assegurar-se que la validació serà satisfactòria al final de l'estudi. També s'ha de tenir present que

els instruments que s'utilitzin pel desenvolupament del mètode d'anàlisi i posterior validació, han d'estar qualificats i calibrats.

Abans d'endinsar-se en la realització de l'estudi de validació i en el desenvolupament dels diferents paràmetres d'estudi, es important reflexionar sobre la importància de la validació. Una de les principals preguntes a realitzar es per què s'ha de validar un mètode analític. La primera resposta és que el mètode validat compleix amb les exigències legals de registre de medicaments i amb les BPL (Bones Pràctiques de Laboratori), amb la finalitat d'assegurar la qualitat i eficàcia del producte. Però, la resposta ha d'anar més lluny i pensar que la raó de perquè es valida, es per obtenir més informació del mètode en estudi i així obtenir informació de fiabilitat dels resultats obtinguts, és a dir, si no existeix fiabilitat és impossible assegurar que el medicament compleix amb les especificacions exigides i per tant que la seva qualitat sigui la adequada. Per altra banda, si un mètode està validat es minimitza el nombre d'errades i repeticions, permetent així un important estalvi en costos (Pérez y Pujol, 2001).

Una altra reflexió a tenir present és quan i què s'ha de validar. Un mètode analític s'ha de validar després d'haver sigut desenvolupat i provat i, d'aquesta manera, tenir un coneixement previ d'ell abans d'utilitzar-ho en rutina. Per això en el desenvolupament previ es recomanable realitzar l'estudi de robustesa (Pérez y Pujol, 2001) per garantir la bondat del procediment analític que es vol validar. Per altra banda, s'ha de validar tot aquell mètode que de forma rutinària sigui utilitzat per la determinació d'alguna de les especificacions establertes pel medicament o per les primeres matèries. Aquests mètodes es poden classificar de la següent forma:

- Assajos d'identificació
- Assajos per la determinació de l'analit
- Assajos per la determinació de característiques farmacotècniques inherents
- Assajos de límits d'impureses i de quantificació de les mateixes

- Assajos microbiològics

Per realitzar la validació s'han de seguir o bé les pautes establertes per les ICH (*International Council on Harmonisation*, 2018c), (*International Council on Harmonisation*, 2018d), o bé les establertes per la USP 40 (*United States Pharmacopeia*, 2018), les quals estaran descrites en el protocol de validació. Si bé són directrius que no descriuen específicament com realitzar cadascun dels paràmetres a estudiar, ni tampoc els límits a tenir en compte, van encaminades a marcar el nombre de mostres a analitzar per cada paràmetre, deixant la porta oberta a la preparativa de les mostres. Degut a que cap de les directrius citades anteriorment especifiquen els límits que han de complir els paràmetres d'estudi, aquests es marquen segons el sistema de qualitat implantant al laboratori. Destacar que la majoria de laboratoris segueixen uns criteris comuns per uniformitzar els límits establerts.

L'estudi de validació realitzat estarà en vigor fins que es realitzi alguna modificació en el mètode o fins que es compleixi el període de validesa establert pel protocol de validació.

Aquestes reflexions mostren la importància que té l'estudi de validació d'un mètode analític.

En el desenvolupament d'un mètode d'anàlisi i posterior validació, s'han de seguir tot un seguit de fases (Pérez y Pujol, 2001), (Instituto Químico de Sarrià, 2000) les quals es descriuen a continuació:

a) Característiques de practicabilitat

Alhora de desenvolupar un mètode s'ha de tenir present les característiques que avaluen la possibilitat d'implementació en rutina del mètode analític. Aquestes característiques són el temps d'elució, cost, mida de mostra necessària, equip, qualificació del personal, condicions de seguretat, etc. Si totes elles no es

consideren, el desenvolupament d'una mètode analítica per aplicar-la posteriorment en rutina, no té sentit.

b) Estudis d'estabilitat de la mostra

Una altra fase prèvia a l'inici de l'estudi de validació i que s'estudia durant el desenvolupament de la mètode, és l'estabilitat de les diferents solucions que es preparen i que formen part de la mètode d'estudi. Al desenvolupar aquest estudi s'obté una informació molt valuosa pel que fa al temps que les solucions preparades poden romandre inalterades, abans de considerar-les com a no aptes.

c) Característiques d'idoneïtat

La idoneïtat és un altre paràmetre a tenir present en el desenvolupament d'un mètode d'anàlisi. Les característiques d'idoneïtat, es refereixen a un conjunt de paràmetres que garanteixen que el sistema respongui als requisits fixats i que s'han de mantenir durant l'ús de la mètode analítica. Per definir aquestes característiques, s'utilitza l'estudi de robustesa (Boletín Oficial del Estado, 1985), que per una banda s'utilitza per optimitzar el mètode i per l'altre per veure la criticitat del valor dels paràmetres abans de validar. Aquestes característiques d'idoneïtat queden recollides dins de l'assaig d'idoneïtat o "system suitability test".

d) Característiques de fiabilitat

La darrera fase a considerar es refereix a les característiques de fiabilitat, característiques que demostren la capacitat d'un mètode analític per mantenir en el temps els criteris fonamentals de validació: selectivitat, linealitat, precisió, exactitud i sensibilitat; criteris que donen peu als diferents paràmetres de validació. La selectivitat determina la capacitat d'un mètode per determinar l'analit sense interferències de cap tipus. La linealitat i interval donen informació sobre la proporcionalitat entre la concentració d'analit i la resposta obtinguda. Un altre paràmetre fonamental de la

validació és la precisió, que informa de la dispersió que existeix entre els resultats obtinguts al voltant del valor central o valor mig. Molt relacionat amb la precisió, és l'exactitud, que expressa la diferència entre el valor trobat en l'anàlisi i el valor teòric. Per últim la sensibilitat del mètode, que està relacionada amb la quantitat mínima d'analit necessària per obtenir un resultat significatiu (Pérez y Pujol, 2001).

A partir d'aquí es desenvolupen els diferents paràmetres de validació que depenen del tipus d'assaig que es vulgui validar. En aquest aspecte, tant les guies USP 40 (United States Pharmacopeia, 2018), com les guies ICH (International Council on Harmonisation , 2018c), classifiquen aquests assajos en diferents categories i en funció d'aquestes categories es defineixen els diferents paràmetres a realitzar, necessaris per cadascun dels assajos.

Segons la USP 40, els mètodes d'anàlisi es poden dividir en 4 categories per cadascuna de les quals es realitzarà uns o altres paràmetres de validació (quadre 24). La categoria 1 ve referida als mètodes d'anàlisi per la quantificació de components majoritaris, tant en primeres matèries com en producte acabat. En la categoria 2 queden inclosos aquells mètodes d'anàlisi destinats a la determinació d'impureses i productes de degradació. Dins d'aquesta categoria s'inclouen tant els assajos de quantificació com els assajos de test límit. En la categoria 3 s'inclouen tots aquells mètodes destinats a la realització de proves de comportament galènic. Per últim la categoria 4, es refereix als tests destinats exclusivament a la identificació de qualsevol component.



Tipus d'assajos					
Paràmetres de validació	Categoria 1	Categoria 2		Categoria 3	Categoria 4
		Quantitatiu	Test límit		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisió	SI		NO	SI	NO
Especificitat	SI	SI	SI	*	SI
Límit de detecció	NO	NO	SI	*	NO
Límit de quantificació	NO	SI	NO	*	NO
Linealitat	SI	SI	NO	*	NO
Interval	SI	SI	*	*	NO
Robustesa	SI	SI	SI	SI	SI

Quadre 24. Classificació de les categories dels assajos i paràmetres de validació segons la USP 40.

\* Pot ser necessari en funció de la naturalesa de l'assaig.

Segons queda descrit en les guies ICH Q2A, els mètodes d'anàlisi es divideixen en 3 categories. Una primera categoria d'assajos d'identificació, una segona categoria que inclou la determinació d'impureses i productes de degradació que es subdivideix en assajos quantitatius i tests límit. La última categoria inclou tots els assajos de valoració, ja siguin de contingut o d'un assaig de dissolució. Per cadascun d'aquests assajos es determinen els paràmetres de validació necessaris segons queda reflectit en el quadre 25.

Tipus d'assajos				
Paràmetres de validació	Identificació	Impureses		Valoració
		Quantitatiu	Test límit	
Exactitud	NO	SI	NO	SI
Precisió				
Repetibilitat	NO	SI	NO	SI
Precisió intermitja	NO	SI	NO	SI
Selectivitat	SI	SI	NO	SI
Límit de detecció	NO	*	SI	NO
Límit de quantificació	NO	SI	SI	NO
Linealitat	NO	SI	NO	SI
Interval	NO	SI	NO	SI

Quadre 25. Classificació de les categories dels assajos i paràmetres de validació segons les guies ICH.

\* Pot ser necessari en funció de la naturalesa de l'assaig

El mètode desenvolupat per l'anàlisi de la suspensió oliosa permet realitzar l'assaig de valoració dels principis actius. Aixó permet obtenir tant resultats rutinaris de producte acabat com avaluar l'evolució del contingut dels principis actius en els estudis d'estabilitat.

El mètode ha estat validat amb la finalitat d'obtenir un mètode ràpid i fiable seguint les directrius marcades per les guies ICH i la USP 40, garantint el compliment de totes les característiques citades prèviament, (característiques de practicabilitat, fiabilitat i idoneïtat) i assegurant així la validesa dels resultats obtinguts.

### 3.2.2.2 Desenvolupament del mètode d'anàlisi

Per trobar un mètode que permeti l'anàlisi conjunt dels tres principis actius mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució es realitza una recerca bibliogràfica en la qual es troben tot un seguit d'articles relacionats amb el tema. De tota la informació cercada es selecciona un article que aparentment permet encabir l'assoliment dels objectius proposats amb els recursos disponibles.

Les condicions d'anàlisi proposades en el article són les següents (Mariappan et al. 2000):

Columna: Supelcosil LC-18-DB 25cm x 4,6mm 5µm.

Condicions cromatogràfiques: Gradient obtingut de la mescla de Metanol grau HPLC i solució reguladora (composta per 0.01M de dihidrogen fosfat de sodi i 0.05% p/v de clorur de tetrametilamoni. Ajustada a pH= 3.5 amb àcid fosfòric). El gradient proposat es mostra al quadre 26.

Temps (minuts)	% Metanol	% Solució reguladora
0	4	96
2	4	96
17	52	48
40	67	33
47	67	33
48	4	96
63	4	96

Quadre 26. Condicions de gradient proposades per l'anàlisi conjunt dels tres principis actius.

Volum injecció: Sense especificar

Temperatura columna: 25 °C

Longitud ona: 254nm

Flux: 1 ml/min

Duració del cromatograma: 63 min

Preparativa de la mostra: S'agafen alíquotes del test de dissolució (HCl 0.1M a 37 °C) i s'analitzen després de realitzar una dilució apropiada.

Concentracions obtingudes:

Rifampicina: 0,25 mg/ml

Isoniazida: 0,16 mg/ml

Pirazinamida: 0,83 mg/ml

El cromatograma obtingut a l'article es mostra a la figura 19.

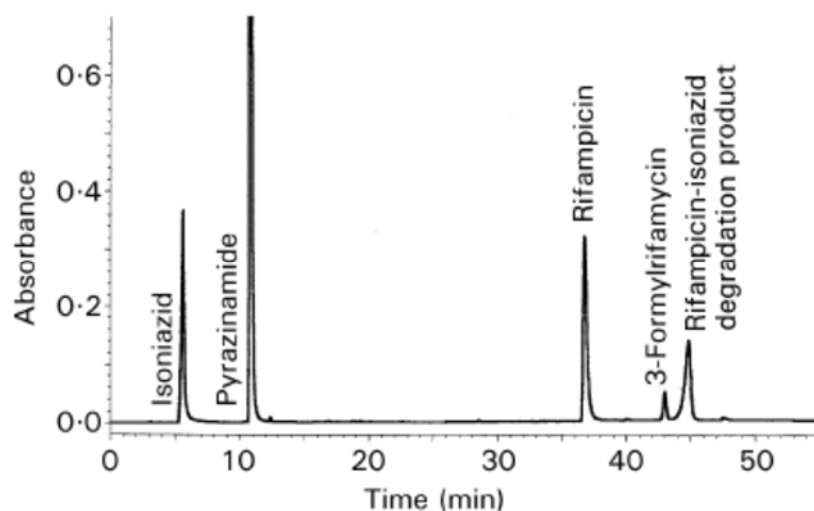


Figura 19. Cromatograma dels tres principis actius (Mariappan et al. 2000).

Considerant tota la informació obtinguda a través de la publicació, es decideix partir de les condicions d'aquesta fent proves en els següents factors amb la finalitat d'optimitzar el mètode. Les proves es realitzen amb una fase estacionària Kromasil C18 15cmx 4.6mm 5 µm:

#### 1. Preparativa de la mostra

A diferència de la formulació de la publicació, no es parteix d'un preparat sòlid oral, sinó d'una suspensió oliosa, per tant no es requereix realitzar un test de dissolució. Igualment es decideix preparar la mostra dissolent els principis actius en HCl 0,1 M tal i com ho fan en la documentació trobada. D'aquesta prova es conclou que els tres principis actius es dissolen bé en àcid, el temps de preparació de mostres és bastant elevat degut a que es genera molta escuma en la preparativa i l'estabilitat de les mostres és baixa ja que l'àcid degrada a la isoniazida. Tenint en compte els resultats obtinguts de les proves de solubilitat realitzades als principis actius (veure *capítol 4 Resultats*) i considerant els resultats obtinguts amb HCl 0,1 M, es decideixen fer proves de solubilitat de la mostra amb les diferents proporcions de gradient metanol:solució reguladora trobades en la publicació. Finalment s'arriba a la conclusió que la proporció òptima per dissoldre la mostra és 34:66 (metanol:solució reguladora). S'estableix que es necessari sonicar la solució durant 2 minuts. Alhora amb aquesta proporció es fan proves de precipitació per comprovar que no es produeix cap precipitat al mesclar

la mostra en condicions 34:66 amb les condicions inicials de fase mòbil (4:96). L'absència de precipitats permet establir el següents procediments com procediments rutinaris de preparativa del patró i de la mostra:

- Preparativa del patró : Pesar 20 mg de rifampicina, 13,3 mg de isoniazida i 33,3 mg de pirazinamida i dissoldre en 34 ml de metanol grau HPLC. Sonicar durant 2 minuts i enrasar a 100 ml amb solució reguladora.
- Preparativa de la mostra: Pesar 1 g de suspensió oliosa i dissoldre en 34 ml de metanol grau HPLC. Sonicar durant 2 minuts i enrasar a 100 ml amb solució reguladora.

Obtenint en ambdós casos les següents concentracions de principis actius:

Rifampicina: 0,20 mg/ml

Isoniazida: 0,13 mg/ml

Pirazinamida: 0,33 mg/ml

S'estableix també la preparativa de la mostra per l'anàlisi de productes de degradació:

- Preparativa de la mostra per productes de degradació: Pesar 1 g de suspensió oliosa i dissoldre en 3,4 ml de metanol grau HPLC. Sonicar durant 2 minuts i enrasar a 10 ml amb solució reguladora.

## 2. Volum d'injecció

Amb les mostres ja preparades es decideixen fer les proves per determinar el volum d'injecció. Es punxen 10 µl i 20µl en les mateixes condicions que esmenta l'article (gradient de metanol:solució reguladora composta per 0.01M de dihidrogen fosfat de sodi i 0.05% p/v de clorur de tetrametilamoni. Ajustada a pH= 3.5 amb àcid fosfòric).

Després de fer un anàlisi de les característiques dels tres pics obtinguts (àrees i simetries) es decideix que el volum d'injecció òptim és el de 20 µl. El cromatograma obtingut amb la identitat dels pics i els temps de retenció corresponents es mostra a la figura 20.

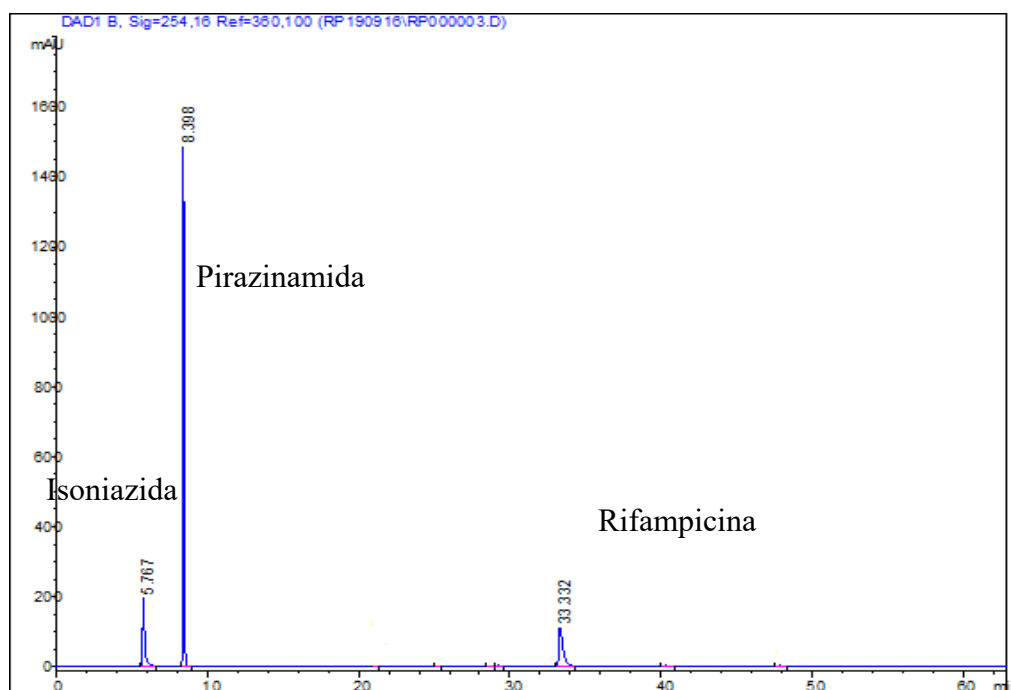


Figura 20. Cromatograma dels tres principis actius amb volum d'injecció 20 µl.

Durant les proves realitzades, s'observa que tot i haver estat condicionant la columna durant 2 hores, la línia base del cromatograma obtingut de la primera punxada sempre surt amb un elevat nombre de petits pics d'àrees inferiors a 5. En condicions de gradient es freqüent que apareguin aquesta mena de fenòmens (Dolan, 2013), per tant es considera la primera punxada com a part del condicionament de la columna i es descarta alhora de treure resultats. En conseqüència s'incorpora com a rutina la realització de 3 punxades del blanc, a l'inici de cada seqüència, garantint així la completa estabilització de la columna.

Alhora es decideixen fer proves per intentar embrutar al mínim la columna de treball. Es canvia el dihidrogen fosfat de sodi (fosfats en forma de sal) de la solució reguladora, per àcid ortofosfòric (fosfats en forma d'àcid) el qual embruta molt menys la columna i evita l'aparició

de possibles problemes de precipitació de les sals (*Advance Chromatography Technologies*, 2016). Amb el canvi proposat, no s'observen diferències i/o alteracions en els pics obtinguts pels tres principis actius, per tant s'estableix l'àcid ortofosfòric a concentració de 0,05% com a component de la solució reguladora.

Un altre camí triat per evitar embrutar la columna és la supressió del de tetrametilamoni de la solució reguladora. Al treure aquest compost, com es pot apreciar a les figures 21 i 22, hi ha un empitjorament en la simetria dels pics i en canvi no hi ha una millora considerable en la línia base del cromatograma, per això es decideix mantenir el clorur de tetrametilamoni en la solució reguladora.

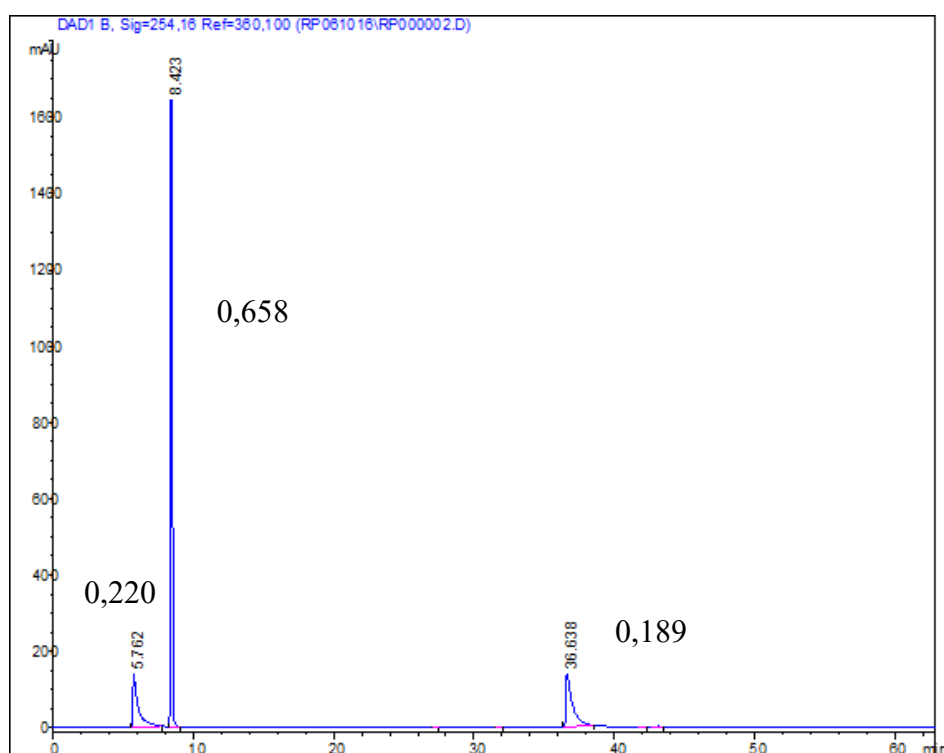


Figura 21. Cromatograma dels tres principis actius amb les corresponents simetries sense clorur de tetrametilamoni.

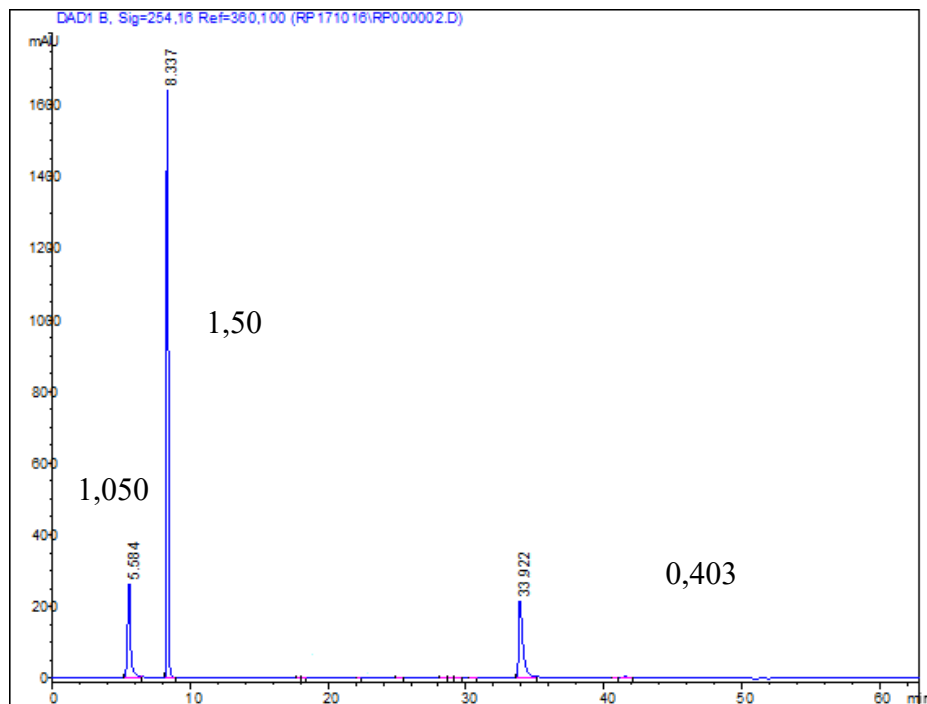


Figura 22. Cromatograma dels tres principis actius amb les corresponents simetries amb clorur de tetrametilamoni.

### 3. Columna

Es decideix optimitzar el mètode canviant la columna per una que permeti millorar la separació entre pics. Per fer-ho es realitza un estudi de cribatge de les fases estacionàries en les que s'inclouen les següents columnes:

- Columna Zorbax SB-Phenil 25cmx 4.6mm 5  $\mu$ m
- Columna LUNA C18 25cm x 4.6mm 5  $\mu$ m
- Columna Zorbax Eclipse plus Phenyl-Hexyl 4,6x150 mm 5  $\mu$ m

S'analitza una mostra que conté els tres principis actius amb cadascuna de les fases estacionàries i seguint el mateix mètode d'anàlisi. S'avalua la resolució entre els pics d'isoniazida i pirazinamida ( $> 2$ ), la simetria dels pics dels tres principis actius (al voltant o igual a 1) i el temps de retenció d'acetona i uracil, el qual interessa que sigui baix per disminuir al màxim el temps del cromatograma.

Es selecciona la columna Zorbax Eclipse plus Phenyl-Hexyl 4,6x150 mm 5  $\mu$ m perquè és la que ofereix major resolució entre els pics de isoniazida i pirazinamida ( $> 10$ ), millors simetries (al voltant de 1) i



temps de retenció d'acetona i uracil més baixos (3,2 i 1,8 minuts respectivament).

#### 4. Gradient d'elució

Es decideix optimitzar el gradient d'elució per intentar disminuir el temps de retenció de rifampicina i obtenir així cromatogrames més curts. Es realitzen diferents proves amb les proporcions de metanol grau HPLC i solució reguladora. Finalment es troba un gradient que millora la resolució entre els pics d'isoniazida i pirazinamida i disminueix el temps de retenció de rifampicina, arribant a obtenir cromatogrames de 25 minuts. El quadre 27 mostra el gradient proposat.

Temps (minuts)	% Metanol	% Solució reguladora
0	2	98
2	2	98
10	75	25
15	75	25
17	2	98
25	2	98

Quadre 27. Condicions de gradient optimitzades per l'anàlisi conjunt dels tres principis actius.

La figura 23 mostra els cromatogrames obtinguts amb les condicions cromatogràfiques definitives.

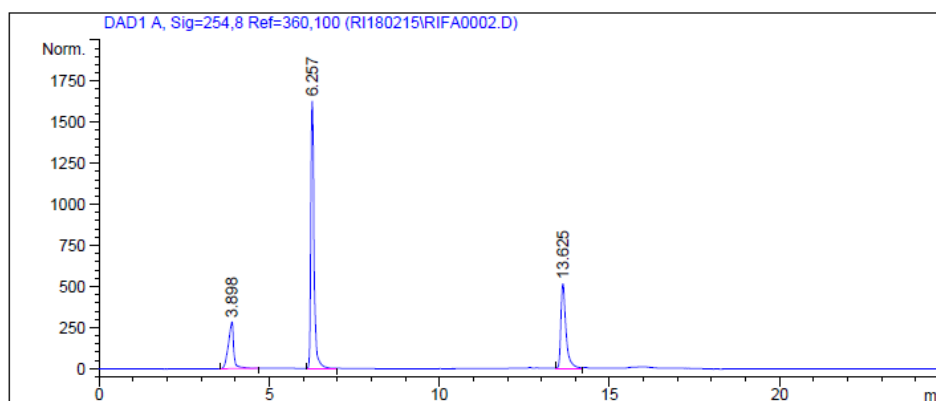


Figura 23. Cromatograma obtingut en condicions definitives

A continuació es descriuen les condicions cromatogràfiques del mètode desenvolupat:

Columna: Zorbax Eclipse plus Phenyl-Hexyl 4,6x150 mm 5 µm

Volum injecció: 20 µl

Temperatura columna: 25 °C

Longitud ona: 254nm

Flux: 1 ml/min

Duració del cromatograma: 25 min

Amb la preparativa de la mostra establerta i les condicions cromatogràfiques optimitzades, es procedeix a la validació del mètode d'anàlisi.

### 3.2.2.3 Definició dels paràmetres de validació

#### Selectivitat

Capacitat d'un mètode d'anàlisi per mesurar els principis actius objecte d'estudi sense interferències dels components de la mostra, productes de degradació, impureses i dissolvents.

#### Linealitat

Capacitat d'un procediment analític per obtenir, dintre d'un interval determinat, resultats directament proporcionals a la concentració (quantitat) d'analit en la mostra.

#### Precisió

És el paràmetre que expressa el grau de concordància (grau de dispersió) entre una sèrie de mesures obtingudes de preses múltiples a partir d'una mateixa mostra homogènia en les condicions prescrites.

L'objectiu de l'estudi de precisió es conèixer la variabilitat o el més-menys del mètode d'assaig. Aquesta variabilitat es deguda a errors aleatoris inherents a tot el mètode d'assaig. Com a conseqüència de l'existència d'aquests errors, les anàlisis realitzades sobre mostres idèntiques, en les mateixes circumstàncies, no condueixen generalment

a resultats idèntics. Els factors susceptibles d'influir sobre els resultats d'un assaig no poden ser sempre controlats (analista, equip instrumental, reactius, temps, etc.) d'aquí la importància de l'estudi de precisió (Boletín Oficial del Estado, 1985).

La precisió inclou diferents tipus d'estudis:

#### *Repetibilitat dels sistema instrumental*

Capacitat de l'instrument per reproduir les seves pròpies mesures. Relacionat amb el grau de precisió de l'instrument. Es demostra amb resultats d'injeccions consecutives de la mateixa mostra.

#### *Repetibilitat del mètode*

Grau de precisió entre els resultats individuals de l'assaig, realitzat repetidament sobre una mostra homogènia. Cadascun dels resultats individuals obtinguts prové d'una anàlisi complerta. Es demostra amb injeccions consecutives de diferents mostres.

#### *Precisió intermitja*

Grau de precisió de les dades obtingudes per un mateix analista en diferents dies i per analistes diferents. Es comprova amb injeccions consecutives de mostres preparades dies diferents per un mateix analista i injeccions de mostres preparades per dos analistes.

#### Exactitud

Capacitat del sistema per oferir resultats propers al veritable. És una mesura de rigor del mètode d'anàlisi i reflecteix els possibles errors sistemàtics del mètode. Amb aquest paràmetre s'estableix la capacitat de recuperació que presenta la metòdica analítica aplicada.

### Interval

Interval màxim i mínim de concentració de l'analit en la mostra (incloent aquestes concentracions màximes i mínimes), dins del qual es demostren criteris de precisió, exactitud, linealitat, verificant que el mètode funciona correctament.

### Robustesa

Grau de reproductibilitat dels resultats obtinguts en l'anàlisi de les mateixes mostres sota una varietat de condicions normals. S'expressa com la falta d'influència de les variables operacionals sobre els resultats. Els resultats obtinguts amb diferents condicions han de ser relacionables entre sí (sense diferències estadísticament significatives).

### Idoneïtat del sistema

Comprovació efectuada en un sistema cromatogràfic per verificar que la resolució i la reproductibilitat del sistema són adequades per l'anàlisi que s'ha de realitzar.

#### 3.2.2.4 Procediment de validació del mètode analític

La validació es realitza seguint les directrius de les normatives ICH (*International Council on Harmonisation, 2018c*), (*International Council on Harmonisation, 2018d*) i s'estableixen les especificacions segons l'AOAC (*Association Of Analytical Chemists, 2018*).

### Idoneïtat del sistema

Es prepara una solució que conté la concentració de treball dels principis actius (200 µg/ml de rifampicina, 133 µg/ml d'isoniazida i 333 µg/ml de pirazinamida) tal i com està descrit en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*. S'injecta en el cromatògraf prèviament filtrada per filtes de PVDF de 0,45 µm segons mètdica analítica descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode*

*d'anàlisi*. Els paràmetres que s'estudien són el factor de capacitat, factor de cua, plats teòrics i resolució entre pics.

### Selectivitat

L'estudi de selectivitat es divideix en diferents apartats, tots ells encaminats a demostrar que els principis actius elueixen a uns temps de retenció que cap altra substància ho faci, ja siguin excipients, substàncies relacionades o productes de degradació.

#### *Identificació del principi actiu*

Per realitzar aquest assaig es preparen dues solucions a les concentracions de treball establertes per a cada principi actiu (200 µg/ml de rifampicina, 133 µg/ml d'isoniazida i 333 µg/ml de pirazinamida) seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*. La primera solució conté rifampicina, isoniazida i pirazinamida provinents de les primeres matèries i la segona solució conté rifampicina, isoniazida i pirazinamida provinents de patrons de referència de Ph. Eur. S'injecten en el cromatògraf sota les condicions establertes en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi* prèviament filtrades per filtres de PVDF de 0,45 µm. Es comparen els resultats obtinguts.

#### *Absència d'interferència dels excipients en la formulació*

Per la realització d'aquest assaig es preparen dues solucions. Una d'elles conté la quantitat corresponent de placebo (1g) i l'altre una mescla de rifampicina, isoniazida i pirazinamida a la concentració de treball establerta (200 µg/ml de rifampicina, 133 µg/ml d'isoniazida i 333 µg/ml de pirazinamida) i la quantitat corresponent de placebo (933,4 mg). Totes dues es preparen i s'injecten, prèvia filtració amb filtres de PVDF de 0,45 µm, seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*. Amb aquestes solucions es pretén demostrar que no existeixen interferències per part dels components del placebo amb la elució dels principis actius.

### *Absència d'interferència dels dissolvents*

Per la realització d'aquest assaig es preparen tants vials com dissolvents utilitzats per dur a terme l'anàlisi. En aquest cas es prepara un vial amb metanol grau HPLC i un vial amb solució reguladora pH=3,5, tots dos prèviament filtrats per filtres de PVDF de 0,45 µm. S'injecten seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*. Amb aquest assaig es pretén demostrar que no existeixen interferències per part dels dissolvents amb l'elució dels principis actius.

### *Mostres sotmeses a estrès*

Aquest assaig es realitza per observar els possibles productes de degradació que es poden generar derivats dels principis actius i del placebo quan es sotmeten a una sèrie de condicions forçades, demostrant així la selectivitat del mètode. Es preparen les següents mostres:

a) Producte acabat sotmès a tractament en medi àcid

Es prepara una solució amb el producte acabat tal i com es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi* però afegint 25 ml d'HCl 0,1 M en detriment de la solució reguladora. Es deixa actuar 24 h. Un cop ha transcorregut el temps, les mostres s'enrasen amb solució reguladora, es filtren per filtres de PVDF de 0,45 µm i s'injecten seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

b) Producte acabat sotmès a tractament en medi bàsic

Es prepara una solució amb el producte acabat tal i com es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi* però afegint 25 ml de NaOH 0,1 M en detriment de la solució reguladora. Es deixa actuar 24 h. Un cop ha transcorregut el temps les mostres s'enrasen amb solució reguladora, es filtren per filtres

de PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  i s'injecten seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

c) Producte acabat sotmès a temperatura

Es pesa la quantitat de producte acabat que es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*, però en excès (>1g). Es deixa 24 h sotmès a una temperatura de 105 °C. Un cop ha transcorregut el temps, es pesa 1 g d'aquest producte acabat sotmès a estrès i es prepara la solució de producte acabat; es filtra per filtres de PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  i s'injecta seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

d) Producte acabat sotmès a tractament oxidant

Es prepara una solució amb el producte acabat tal i com es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi* però afegint 25 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 33% en detriment de la solució reguladora. Es deixa actuar 24 h. Un cop ha transcorregut el temps les mostres s'enrasen amb solució reguladora, es filtren per filtres de PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  i s'injecten seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

e) Producte acabat sotmès a llum IR

Es pesa la quantitat de producte acabat que es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*, però en excès (>1g). Es deixa 24 h sota llum IR. Un cop ha transcorregut el temps, es pesa 1 g d'aquest producte acabat sotmès a estrès i es prepara la solució de producte acabat; es filtra per filtres de PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  i s'injecta seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

f) Producte acabat sotmès a llum UV

Es pesa la quantitat de producte acabat que es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*, però en excès (>1g). Es deixa 24 h sota llum UV. Un cop ha transcorregut el temps, es

pesa 1 g d'aquest producte acabat sotmès a estrès i es prepara la solució de producte acabat; es filtra per filtres de PVDF de 0,45 µm i s'injecta seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

g) Producte acabat sotmès a llum visible

Es pesa la quantitat de producte acabat que es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*, però en excès (>1g). Es deixa 10 dies sota llum visible. Un cop ha transcorregut el temps, es pesa 1 g d'aquest producte acabat sotmès a estrès i es prepara la solució de producte acabat; es filtra per filtres de PVDF de 0,45 µm i s'injecta seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

h) Placebo sotmès a tractament en medi àcid

Es prepara una solució amb placebo tal i com es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi* però afegint 25 ml d'HCl 0,1 M en detriment de la solució reguladora. Es deixa actuar 24 h. Un cop ha transcorregut el temps, les mostres s'enrasen amb solució reguladora, es filtren per filtres de PVDF de 0,45 µm i s'injecten seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

i) Placebo sotmès a tractament en medi bàsic

Es prepara una solució amb placebo tal i com es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi* però afegint 25 ml de NaOH 0,1 M en detriment de la solució reguladora. Es deixa actuar 24 h. Un cop ha transcorregut el temps les mostres s'enrasen amb solució reguladora, es filtren per filtres de PVDF de 0,45 µm i s'injecten seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.



j) Placebo sotmès a temperatura

Es pesa la quantitat de placebo que es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*, però en excès (>1g). Es deixa 24 h sotmès a una temperatura de 105 °C. Un cop ha transcorregut el temps, es pesa 1 g d'aquest placebo sotmès a estrès i es prepara la solució de placebo; es filtra per filtres de PVDF de 0,45 µm i s'injecta seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

k) Placebo sotmès a tractament oxidant

Es prepara una solució amb placebo tal i com es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi* però afegint 25 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 33% en detriment de la solució reguladora. Es deixa actuar 24 h. Un cop ha transcorregut el temps les mostres s'enrasen amb solució reguladora, es filtren per filtres de PVDF de 0,45 µm i s'injecten seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

l) Placebo sotmès a llum IR

Es pesa la quantitat de placebo que es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*, però en excès (>1g). Es deixa 24 h sota llum IR. Un cop ha transcorregut el temps, es pesa 1 g d'aquest placebo sotmès a estrès i es prepara la solució de placebo; es filtra per filtres de PVDF de 0,45 µm i s'injecta seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

m) Placebo sotmès a llum UV

Es pesa la quantitat de placebo que es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*, però en excès (>1g). Es deixa 24 h sota llum UV. Un cop ha transcorregut el temps, es pesa 1 g d'aquest placebo sotmès a estrès i es prepara la solució de placebo; es filtra per filtres de PVDF de 0,45 µm i s'injecta seguint

la metòdica descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

n) Placebo sotmès a llum visible

Es pesa la quantitat de placebo que es descriu en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*, però en excès (>1g). Es deixa 10 dies sota llum visible. Un cop ha transcorregut el temps, es pesa 1 g d'aquest placebo sotmès a estrès i es prepara la solució de placebo; es filtra per filtres de PVDF de 0,45 µm i s'injecta seguint la metòdica descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*.

A més a més s'injecten tots els dissolvents per descartar qualsevol pic que correspongui als propis dissolvents.

Linealitat

Per realitzar la linealitat es té en compte que el 100% de les concentracions de treball, segons el que està descrit a l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi* corresponen a 200 µg/ml de rifampicina, 133 µg/ml de isoniazida i 333 µg/ml de pirazinamida. A partir d'aquest valor nominal es realitzen tres linealitats que comprenen les següents concentracions en el cas de rifampicina: 140 µg/ml, 160 µg/ml, 180 µg/ml, 200 µg/ml, 220 µg/ml, 240 µg/ml, 260 µg/ml que corresponen al 70, 80, 90, 100, 110, 120, i 130% de la concentració de treball.

En el cas de la isoniazida les concentracions són les següents: 93 µg/ml, 106 µg/ml, 118 µg/ml, 133 µg/ml, 146 µg/ml, 160 µg/ml, 173 µg/ml que corresponen al 70, 80, 90, 100, 110, 120, i 130% de la concentració de treball.

En el cas de la pirazinamida les concentracions són les següents: 233 µg/ml, 266 µg/ml, 300 µg/ml, 333 µg/ml, 366 µg/ml, 400 µg/ml, 433

µg/ml que corresponen al 70, 80, 90, 100, 110, 120, i 130% de la concentració de treball.

Aquestes concentracions s'obtenen per pesades individuals de cada principi actiu per separat per cada nivell de concentració. Les mostres es preparen i es punxen seguint la metodologia analítica descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi* prèvia filtració per filtres de PVDF de 0,45 µm.

Els resultats experimentals es representen gràficament obtenint la resultant corba de calibració i els paràmetres d'estudi d'aquesta.

### Precisió

#### *Repetibilitat del Sistema Instrumental*

Les solucions obtingudes per a cada principi actiu en la linealitat corresponents al 70, 100 i 130% s'injecten 10 cops de forma consecutiva en el cromatògraf per observar la possible variabilitat existent entre injecció i injecció i comprovar, d'aquesta forma, el bon funcionament del sistema cromatogràfic. Aquestes mateixes solucions s'injecten 10 cops més un altre dia diferent, comprovant d'aquesta manera que el sistema cromatogràfic funciona correctament d'un dia per l'altre.

#### *Repetibilitat del mètode*

Dintre d'aquest apartat es realitzen els assajos de repetibilitat de la solució patró, repetibilitat de la solució problema i l'assaig de precisió intermitja del mètode.

#### *Repetibilitat de la solució patró*

Per realitzar aquest assaig es preparen 9 solucions de cada principi actiu. Tres corresponen al 100% de la concentració de treball, les altres tres al 130% de la concentració de treball i per últim, tres que corresponen al 70% de la concentració de treball. Les mostres es preparen i es punxen seguint la metodologia analítica descrita en l'apartat 3.2.2.2

*Desenvolupament del mètode d'anàlisi* prèvia filtració per filtres de PVDF de 0,45 µm. Es realitza un tractament estadístic de les dades obtingudes amb la finalitat de veure si hi ha variació significativa entre les diferents mostres de la mateixa concentració de treball preparades per a cada principi actiu.

#### *Repetibilitat de la solució problema*

Per realitzar aquest assaig es punxen al cromatògraf 7 solucions individuals de solució problema preparades per un únic analista. Les mostres es preparen i es punxen seguint la metodologia analítica descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi* prèvia filtració per filtres de PVDF de 0,45 µm. Es realitza un tractament estadístic de les dades obtingudes amb la finalitat de veure si hi ha variació significativa entre les diferents mostres de solució problema preparades pel mateix analista.

#### *Precisió intermitja del mètode*

La metodologia a seguir en aquest assaig és la mateixa que per l'assaig de repetibilitat de la solució problema. En aquest cas es tracta de comparar per una banda els resultats obtinguts en dies diferents per un mateix analista, i per l'altra banda els resultats obtinguts per dos analistes diferents que segueixen el mateix procediment. D'aquesta manera es pretén demostrar la variabilitat existent quan es treballa en dies diferents o bé quan són dos persones diferents les que treballen sobre un mateix producte.

#### Exactitud

Per la realització d'aquest assaig es preparen 3 solucions que continguin una mescla dels principis actius i la quantitat de placebo corresponent per obtenir el 100% de la concentració de treball, 3 solucions que continguin una mescla dels principis actius i la quantitat de placebo corresponent per obtenir el 70% de la concentració de treball i 3 solucions que continguin una mescla dels principis actius i la quantitat

de placebo corresponent per obtenir el 130% de la concentració de treball. El quadre 28 mostra les quantitats necessàries per obtenir les concentracions de treball indicades.

	<b>Pes principi actiu (mg)</b>	<b>Pes placebo (mg)</b>
<b>100 %</b>		
Rifampicina	20	
Isoniazida	13,3	933,4
Pirazinamida	33,3	
<b>70 %</b>		
Rifampicina	14	
Isoniazida	9,3	953,4
Pirazinamida	23,3	
<b>130 %</b>		
Rifampicina	26	
Isoniazida	17,3	913,4
Pirazinamida	43,3	

Quadre 28. Quantitats necessàries per obtenir les concentracions de treball indicades

Les mostres es preparen i es punxen seguint la metodologia analítica descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi* prèvia filtració per filtres de PVDF de 0,45 µm. Amb les dades obtingues es fa un tractament estadístic per demostrar si hi ha variació entre el % de recuperació obtingut per a cada solució problema preparada.

### Robustesa

Per l'estudi de la robustesa es preparen 3 solucions problemes i una solució patró tal com s'indica en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi*, es filtren per filtres de PVDF de 0,45 µm i s'analitzen seguint la metodologia descrita en aquest mateix apartat.

Aquestes mostres es sotmeten a petites però intencionades variacions en les condicions cromatogràfiques tal i com mostra el quadre 29.

<b>Condicions cromatogràfiques</b>	<b>Per sobre del valor nominal</b>	<b>Valor nominal</b>	<b>Per sota del valor nominal</b>
Longitud d'ona (nm)	257	254	251
Temperatura (°C)	28	25	22
Cabal (ml/min)	1,2	1	0,8
Volum d'injecció (µl)	15	20	25

Quadre 29. Resum de les variacions realitzades en les condicions cromatogràfiques per l'estudi de robustesa

Es calcula la riquesa obtinguda per cada mostra sotmesa a les diferents variacions i a partir d'aquí es realitzen càlculs estadístics mitjançant el test ANOVA per veure si existeixen o no diferències estadísticament significatives entre les variacions realitzades a cada condició cromatogràfica.

#### Estabilitat de la solució

Per l'estudi d'estabilitat de la solució es preparen 4 solucions, tres corresponents a la solucions patró de cada principi actiu per separat i l'altre corresponent a la solució problema, totes quatre preparades a la concentració de treball. Les mostres es preparen i es punxen seguint la metodologia analítica descrita en l'apartat 3.2.2.2 *Desenvolupament del mètode d'anàlisi* prèvia filtració per filtres de PVDF de 0,45 µm.

Aquestes solucions s'injecten a temps 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48 i 72 h fins a 5 dies a 25 °C. S'estudia l'estabilitat dels principis actius tant en el producte acabat com en les solucions patró mitjançant càlculs estadístics.

### **3.3 ESTUDI DE PREFORMULACIÓ I FORMULACIÓ**

#### **3.3.1 Material**

A continuació es descriuen els materials i equips utilitzats per realitzar els estudis experimentals de preformulació i formulació.

##### **3.3.1.1 Primeres matèries**

Els proveïdors, números de lot i caducitats de les primeres matèries utilitzades per realitzar els estudis de preformulació i formulació es mostren en el quadre 30.

<b>Material</b>	<b>Proveïdor</b>	<b>Número de lot</b>	<b>Caducitat</b>
Rifampicina	Fagron Iberica	15D14-B03- 307143	03/2019
Isoniazida	Acros Organics	A0351069	08/2019
Pirazinamida	Merck	S4743850542	12/2020
Triglicèrids de cadena mitja	Fagron Iberica	L15090006	06/2017
Compritol-ATO888®	Gattefossé SAS	161165	10/2019
Gelucire® 50/13	Gattefossé SAS	132701	12/2016
Monoestearat de gliceril	Fagron Iberica	L10030434	10/2017
Aerosil® R-792	Evonik Industries	334121112	12/2017
Topcithin® 300	Cargill	2960046	12/2016
Span® 20	Fagron Iberica	0702619	12/2016
Cremophor® RH-40	Fagron Iberica	L15080090	01/2018
Dow-Corning® Q7-2243	Dow Corning	0005057284	02/2017
Sucralosa	Merck KGaA	K93648494607	12/2018
Mentol	Fagron Iberica	11C07-B05	10/2018
Essència de xocolata	Givaudan	DU00512404	02/2017
Essència de maduixa	Givaudan	D9A0006537	02/2018
Essència de coco	Givaudan	D9M0069233	07/2016

*Quadre 30. Proveïdors, números de lot i caducitat matèries primeres.*

### 3.3.1.2 Material per l'elaboració i el condicionament de la fórmula

El quadre 31 mostra els equips i/o materials utilitzats per a l'elaboració i el condicionament de la fórmula.



<b>Equip / Material</b>	<b>Marca</b>	<b>Codi</b>
Balança analítica	Precisa 600C	PE7
Balança granatària	Precisa 300C	PE1
Balança analítica	Sartorius R200D	bp211d
Tamís 100 µm	Cisa	060159.2
Espàtules	Biolab	-
Morter i mà de morter	Haldenwarger	-
Paper d'un sol ús	Tork	-
Placa calefactora	P-selecta Agimatic-N	CG6
Agitador hèlix	Velp Scientifica	LQ10
Vasos de precipitats	Pyrex	-
Provetes de vidre	Anorsa	-
Termòmetre	SLW	TM61
Viscosímetre	Brookfield Cap 2000+	CG32
Agitador	Heildolph	CG40
Centrífuga	P-selecta Meditronic-BL	CQ32
Tubs centrífuga	Thermo Fisher Scientific	-
Vials de vidre	Vidrio soplado Manuel Pérez S.A.	-
Taps de cautxú	West Pharmaceutical Services	-
Difractor làser	Malvern Master-sizer 2000	CG42
Nevera	Liebherr Medline	MP8
Estufa 40°C	Memmert	SE22
Ampolla vidre transparent	Wheaton	-
Tap de plàstic blanc	Wheaton	-

*Quadre 31. Material utilitzat per l'elaboració i condicionament de la fórmula.*

### 3.3.1.3 Material per la realització dels estudis d'eficàcia de conservació antimicrobiana (Challenge test) de la fórmula definitiva.

El quadre 32 mostra els equips i/o materials utilitzats per a la realització dels estudis d'eficàcia de conservació antimicrobiana (Challenge test). Aquests estudis s'han realitzat al Departament de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona.

<b>Material</b>	<b>Lot</b>
Agar TSA	1175859
Agar Sabouraud dextrosa	1179175
Solució de NaCl peptona tamponada	3350007
Diluent de Beerens	102825
Polisorbat 80	11671

*Quadre 32. Material utilitzat per la realització del Challenge Test.*

### 3.3.2 Mètodes

#### 3.3.2.1 Mètode de selecció de la fórmula òptima i de la tècnica d'elaboració més adient

La tecnologia de fabricació i la selecció de la fórmula es detallen en el capítol 4 *Resultats experimentals*.

#### 3.3.2.2 Mètode de selecció de la fórmula amb millors propietats organolèptiques

S'elabora un test d'avaluació sensorial amb la finalitat d'obtenir informació sobre les expectatives dels pacients, tenint en compte la població a la qual va destinada (vegeu test complert a l'Annex IV). (*Guía para la evaluación sensorial de alimentos, 2016*). Es realitzen proves de preferència i acceptabilitat per determinar quina és la formulació òptima del producte.

Per a la realització de l'avaluació es segueixen les següents pautes: (*Guía para la evaluación sensorial de alimentos, 2016*).

- Desconeixement de la identitat del producte per part dels panelistes.
- L'ordre de les mostres s'assigna de forma aleatòria a cada panelista.
- Degut al baix número de mostres, es proven totes en la mateixa sessió.
- Entre mostra i mostra es recomana esbandir la boca amb una mica d'aigua.
- El temps per realitzar l'avaluació de les mostres ve determinat pel que consideri necessari cada panelista.

- L'administració de la mostra es realitza amb culleres de 2 ml.
- S'utilitza una cullera diferent per l'anàlisi de cada referència.

Un cop finalitzada l'avaluació s'exposa per part dels panelistes les possibles propostes de millora de les propietats organolèptiques de les referències que es considerin pertinents.

Es puntuen els resultats obtinguts en el test d'avaluació, per cadascuna de les referències, seguint la puntuació establerta en el *test d'avaluació sensorial puntuat* (vegeu Annex IV).

### 3.3.2.3 Mètode de realització dels estudis d'eficàcia de conservació antimicrobiana (Challenge test) de la fórmula definitiva

Es prenen com a referència les directrius microbiològiques establertes en la Farmacopea Europea 8.8 i s'aplica la tècnica descrita en el procediment normalitzat de treball (PNT) intern del laboratori de la Unitat de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona, que és on es realitza l'assaig.

L'assaig consisteix en la contaminació deliberada de la preparació, amb un inòcul preestablert de microorganismes adequats, el manteniment de la temperatura determinada, la presa de mostres a intervals de temps específics i el recompte dels microorganismes presents en la mostra. Es considera que les propietats conservants de la preparació són adequades si, en condicions d'assaig, es produeix un descens significatiu o, segons el cas, no es dona un increment del nombre de microorganismes presents a la preparació inoculada en els períodes de temps i a les temperatures establertes.

La mostra proporcionada es fracciona, dipositant 10 g de producte en envasos estèrils, i inoculant 100 µl de la suspensió microbiana a assajar. A temps establerts, es determina el nombre de microorganismes viables per recompte en placa, prèvia inactivació específica per eliminar activitat antimicrobiana residual del producte.

## **3.4 ESTUDIS D'ESTABILITAT PRELIMINAR**

### **3.4.1 Material**

A continuació es descriuen els materials i equips utilitzats per realitzar els estudis d'estabilitat preliminar a la suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida.

#### **3.4.1.1. Primeres matèries**

Els proveïdors, números de lot i caducitats de les primeres matèries utilitzades per realitzar els estudis d'estabilitat preliminar es mostren en el quadre 33.

<b>Material</b>	<b>Proveïdor</b>	<b>Número de lot</b>	<b>Caducitat</b>
Rifampicina	Fagron Iberica	15D14-B03- 307143	03/2019
Isoniazida	Acros Organics	A0351069	08/2019
Pirazinamida	Merck	S4743850542	12/2020
Triglicèrids de cadena mitja	Fagron Iberica	L15090006	06/2017
Aerosil®R-792	Evonik Industries	334121112	12/2017
Cremophor®RH-40	Fagron Iberica	L15080090	01/2018
Dow-Corning®Q7-2243	Dow Corning	0005057284	08/2017
Sucralosa	Merck KGaA	K93648494607	12/2018
Mentol	Fagron Iberica	11C07-B05	10/2018
Essència de xocolata	Givaudan	DV00552489	06/2018
Trometamol	Fisher Scientific	152695	No disponible
Citrat sòdic	Fagron Iberica	L16020092	No disponible
Clorur de tetrametilamoni	Sigma- aldrich	MKBW3155V	05/2018
Àcid orto-fosfòric	Scharlau	R151G32	11/2019
Pelets d'hidròxid sòdic	Panreac AppliChem	131687.1211	01/2023
Hidròxid sòdic 0,1 mol/l	Panreac AppliChem	181693.1211	05/2018
Metanol grau HPLC	Panreac AppliChem	221091.1612	10/2021

*Quadre 33. Proveïdors, números de lot i caducitat matèries primeres.*

3.4.1.2. Material per l'elaboració, condicionament i anàlisi de les fórmules

El quadre 34 mostra els equips i/o materials utilitzats per a l'elaboració, el condicionament i l'anàlisi de les fórmules realitzades durant els estudis d'estabilitat preliminar.

<b>Equip / Material</b>	<b>Marca</b>	<b>Codi</b>
Balança analítica	Precisa 600C	PE7
Balança granatària	Precisa 300C	PE1
Balança analítica	Sartorius R200D	bp211d
Tamís 100 µm	Cisa	060159.2
Espàtules	-	-
Morter i mà de morter	-	-
Paper d'un sol ús	-	-
Placa calefactora	P-selecta Agimatic-N	CG6
Agitador hèlix	-	-
Vasos de precipitats	-	-
Provetes de vidre	-	-
Termòmetre	SLW	TM61
pHímetre	Crison Microph2002	LB4
Agitador	Heildolph	CG40
Nevera	Liebherr Medline	MP8
Ampolla vidre transparent	-	-
Tap de plàstic blanc	-	-
High-performance liquid chromatography (HPLC)	Dionex Ultimate 3000	CQ52
Columna Zorbax Eclipse plus Phenyl-Hexyl 4,6x150 mm 5 µm	Agilent Technologies	269
Pipetes aforades Blau brand	Brand	-
Vials incoloros per HPLC 32 x 11,6	Clean Pack	-
Taps vials de hplc	FisherBrand	-
Xeringes 10 ml cono luer	BD Discardit II	-
Capsuladora de vials manual 11mm	Hewlett Packard	CQ18
Filtres vials HPLC	Agilent Technologies	-

Quadre 34. Material utilitzat per l'elaboració, condicionament i anàlisi de les fórmules

## 3.4.2 Mètodes

### 3.4.2.1. Mètode d'anàlisi de les fórmules realitzades durant els estudis d'estabilitat preliminar

El detall del mètode d'anàlisi utilitzat en les fórmules realitzades durant els estudis d'estabilitat preliminar es detalla en el l'apartat 3.2 *Mètode d'anàlisi*.

A continuació es descriuen les condicions cromatogràfiques del mètode desenvolupat:

Columna: Zorbax Eclipse plus Phenyl-Hexyl 4,6x150 mm 5 µm

Volum injecció: 20 µl

Temperatura columna: 25 °C

Longitud ona: 254nm

Flux: 1 ml/min

Duració del cromatograma: 25 min

## **3.5 ESTUDIS D'ESTABILITAT**

### **3.5.1 Material**

A continuació es descriuen els materials i equips utilitzats per realitzar els estudis d'estabilitat a les diferents referències de la suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida.

#### **3.5.1.1. Primeres matèries**

Els proveïdors, números de lot i caducitats de les primeres matèries utilitzades per realitzar els estudis d'estabilitat es mostren en el quadre 35.



Material	Proveïdor	Número de lot	Caducitat
Rifampicina	Fagron Iberica	15D14-B03- 307143	03/2019
Isoniazida	Acros Organics	A0351069	08/2019
Pirazinamida	Merck	S4743850542	12/2020
Triglicèrids de cadena mitja	Fagron Iberica	L17030214- OF-221626	01/2020
Aerosil®R-792	Evonik Industries	334121112	12/2018
Cremophor®RH-40	Fagron Iberica	L17070058- DF-22103	04/2019
Dow-Corning®Q7-2243	Dow Corning	0005057284	08/2017
Sucralosa	Merck KGaA	K93648494607	12/2018
Mentol	Fagron Iberica	11C07-B05	10/2018
Essència de xocolata	Givaudan	DV00552489	06/2018
Clorur de tetrametilamoni	Sigma- aldrich	MKBW3155V	05/2018
Àcid orto-fosfòric	Scharlau	R151G32	11/2019
Pellets d'hidròxid sòdic	Panreac AppliChem	131687.1211	01/2023
Hidròxid sòdic 0,1 mol/l	Panreac AppliChem	181693.1211	05/2018
Metanol grau HPLC	Panreac AppliChem	221091.1612	10/2021

Quadre 35. Proveïdors, números de lot i caducitat matèries primeres

### 3.5.1.2. Material per l'elaboració, condicionament i anàlisi de les fórmules

El quadre 36 mostra els equips i/o materials utilitzats per a l'elaboració, el condicionament i l'anàlisi de les diferents referències fabricades per dur a terme els estudis d'estabilitat.

<b>Equip / Material</b>	<b>Marca</b>	<b>Codi</b>
Balança analítica	Precisa 600C	PE7
Balança granatària	Precisa 300C	PE1
Balança analítica	Sartorius R200D	bp211d
Tamís 100 µm	Cisa	060159.2
Espàtules	Biolab	-
Morter i mà de morter	Haldenwarger	-
Paper d'un sol ús	Tork	-
Placa calefactora	P-selecta Agimatic-N	CG6
Agitador hèlix	Velp Scientifica	LQ10
Vasos de precipitats	Pyrex	-
Provetes de vidre	Anorsa	-
Termòmetre	SLW	TM61
Viscosímetre	Brookfield Cap 2000+	CG32
pHímetre	Crison Microph2002	LB4
Agitador	Heildolph	CG40
Centrífuga	P-selecta Meditronic-BL	CQ32
Tubs centrífuga	Thermo Fischer Scientific	-
Nevera	Liebherr Medline	MP8
Ampolla vidre	Wheaton	-
Tap de plàstic blanc	Wheaton	-
Pipetes aforades Blau brand	Brand	-
High-performance liquid chromatography (HPLC)	Dionex Ultimate 3000	CQ52
Vials incolor per HPLC 32 x 11,6	Clean Pack	-
Taps vials de HPLC	FisherBrand	-
Xeringes 10 ml cono luer	BD Discardit II	-
Capsuladora de vials manual 11mm	Hewlett Packard	CQ18
Filtres vials hplc	Agilent Technologies	-
Columna Zorbax Eclipse plus Phenyl-Hexyl 4,6x150 mm 5 µm	Agilent Technologies	269

*Quadre 36. Material utilitzat per l'elaboració, condicionament i anàlisi de les fórmules.*

## 3.5.2 Mètodes

### 3.5.2.1. Mètode d'anàlisi de les fórmules realitzades durant els estudis d'estabilitat

El mètode d'anàlisi de les fórmules realitzades durant els estudis d'estabilitat es detalla en el l'apartat 3.2 *Mètode d'anàlisi* i en el capítol 4 *Resultats experimentals*.

A continuació es descriuen les condicions cromatogràfiques del mètode desenvolupat:

Columna: Zorbax Eclipse plus Phenyl-Hexyl 4,6x150 mm 5 µm

Volum injecció: 20 µl

Temperatura columna: 25 °C

Longitud ona: 254nm

Flux: 1 ml/min

Duració del cromatograma: 25 min

### 3.5.2.2. Mètode de realització dels estudis d'estabilitat

El mètode que es segueix per realitzar els estudis d'estabilitat es detalla en el capítol 4.6 *Estudis d'estabilitat*.

## CAPÍTOL 4: RESULTATS EXPERIMENTALS

### 4.1 ESTUDI I CARACTERITZACIÓ DELS PRINCIPIS ACTIUS

La caracterització dels principis actius té com a principal finalitat la identificació dels mateixos pel que fa a puresa i a estructura química. Però aquestes dades també són d'utilitat per identificar possibles problemes d'incompatibilitats que poden aparèixer durant el desenvolupament de la fórmula així com conèixer les seves característiques galèniques per tal d'obtenir una formulació viable, estable i de qualitat.

#### 4.1.1 Estudi de les característiques de solubilitat

S'han estudiat les solubilitats dels tres principis actius en medi oliós i medi aquós a pHs 1, 3, 5, 7 i 9 mitjançant la preparació de solucions reguladores, a les concentracions de formulació establertes segons les pautes de dosificació de l'OMS. A continuació es descriuen els resultats obtinguts.

##### Determinació de la solubilitat en medi oliós (TCM)

En les tres mesclures obtingudes de principi actiu en medi oliós s'observen partícules en suspensió. En el cas de la rifampicina s'observa una lleugera coloració vermella del medi, fet que indica que una part del principi actiu s'ha solubilitzat, però la gran majoria roman com a partícules en suspensió. En el cas de la isoniazida i la pirazinamida a més a més s'observa la formació d'aglomerats.

Es conclou doncs que tots tres principis actius són INSOLUBLES en TCM.

##### Determinació de la solubilitat en medi aquós a pH 1

Rifampicina: s'observa una solució de coloració vermella completament transparent, sense presència de partícules en suspensió. És SOLUBLE.

Isoniazida: s'observa una solució completament transparent, sense presència de partícules en suspensió. És SOLUBLE.

Pirazinamida: s'observen partícules en suspensió. És INSOLUBLE.

#### Determinació de la solubilitat en medi aquós a pH 3

Rifampicina: s'observen partícules en suspensió que s'agrupen per formar aglomerats. És INSOLUBLE.

Isoniazida: s'observa una solució completament transparent, sense presència de partícules en suspensió. És SOLUBLE.

Pirazinamida: s'observen partícules en suspensió. És INSOLUBLE.

#### Determinació de la solubilitat en medi aquós a pH 5

Rifampicina: s'observen partícules en suspensió que s'agrupen per formar aglomerats. És INSOLUBLE.

Isoniazida: s'observa una solució completament transparent, sense presència de partícules en suspensió. És SOLUBLE.

Pirazinamida: s'observen partícules en suspensió. És INSOLUBLE.

#### Determinació de la solubilitat en medi aquós a pH 7

Rifampicina: s'observen partícules en suspensió que s'agrupen per formar aglomerats. És INSOLUBLE.

Isoniazida: s'observa una solució completament transparent, sense presència de partícules en suspensió. És SOLUBLE.

Pirazinamida: s'observen partícules en suspensió. És INSOLUBLE.

#### Determinació de la solubilitat en medi aquós a pH 9

Rifampicina: s'observen partícules en suspensió que s'agrupen per formar aglomerats. És INSOLUBLE.

Isoniazida: s'observa una solució completament transparent, sense presència de partícules en suspensió. És SOLUBLE.

Pirazinamida: s'observen partícules en suspensió. És INSOLUBLE.

Tots tres principis actius demostren ser insolubles en medi oliós, per la qual cosa donaran lloc a una suspensió en aquest tipus de medi.

Per altra banda, en medi aquós la isoniazida es demostra soluble a la concentració estudiada (dosi terapèutica) independentment del pH de la dissolució, ben al contrari que la pirazinamida, que demostra ser insoluble en medi aquós independentment del pH.

Per altra banda la rifampicina és soluble a la concentració de treball en medi aquós a pH = 1, però insoluble als pHs de 3, 5, 7 i 9, la qual cosa fa concloure que el seu comportament de solubilitat en medi aquós és pH dependent, essent necessari un pH molt àcid per la seva correcta solubilització.

#### 4.1.2 Determinació de la mida de partícula

El quadre 37 mostra els resultats obtinguts de la determinació de la mida de partícula per rifampicina, isoniazida i pirazinamida.

<b>Principi actiu</b>	<b>d 0,1 (µm)</b>	<b>d 0,5 (µm)</b>	<b>d 0,9 (µm)</b>
Rifampicina	0,094	0,193	73,938
Isoniazida	54,778	180,715	442,220
Pirazinamida	25,053	72,747	226,505

*Quadre 37. Resultats mida de partícula*

Les figures 24, 25 i 26 mostren les dades obtingues sobre la distribució de la mida de partícula per rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament.

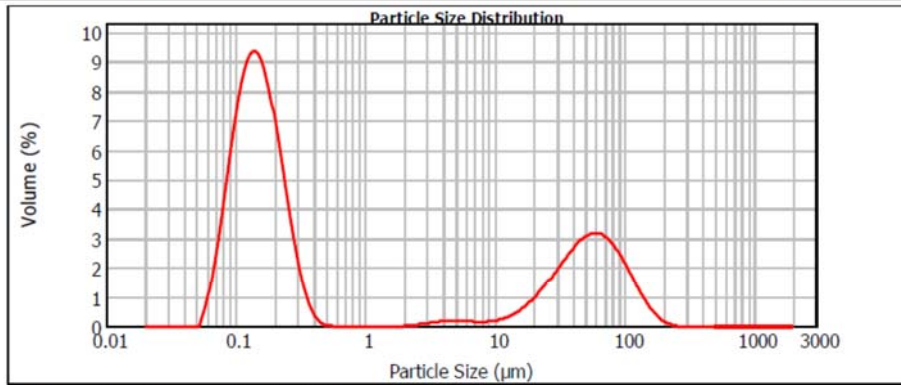


# MASTERSIZER 2000

## Result Analysis Report

<b>Sample Name:</b> Rifampicina - Average	<b>SOP Name:</b> SDM_acido ursodesoxicolico_hydro	<b>Measured:</b> miércoles, 28 de octubre de 2015 11:51:02	
<b>Sample Source &amp; type:</b>	<b>Measured by:</b> SDM-Mastersizer	<b>Analysed:</b> miércoles, 28 de octubre de 2015 11:51:04	
<b>Sample bulk lot ref:</b> 14A21-B01 29414	<b>Result Source:</b> Averaged		
<b>Particle Name:</b> Polystyrene latex	<b>Accessory Name:</b> Hydro 2000SM (A)	<b>Analysis model:</b> General purpose	<b>Sensitivity:</b> Enhanced
<b>Particle RI:</b> 1.590	<b>Absorption:</b> 0	<b>Size range:</b> 0.020 to 2000.000 um	<b>Obscuration:</b> 12.61 %
<b>Dispersant Name:</b> Water	<b>Dispersant RI:</b> 1.330	<b>Weighted Residual:</b> 2.443 %	<b>Result Emulation:</b> Off
<b>Concentration:</b> 0.0201 %Vol	<b>Span :</b> 382.507	<b>Uniformity:</b> 105	<b>Result units:</b> Volume
<b>Specific Surface Area:</b> 29.8 m <sup>2</sup> /g	<b>Surface Weighted Mean D[3,2]:</b> 0.201 um	<b>Vol. Weighted Mean D[4,3]:</b> 20.492 um	

d(0.1): 0.094 um      d(0.5): 0.193 um      d(0.9): 73.938 um



Rifampicina - Average, miércoles, 28 de octubre de 2015 11:51:02

Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %
0.030	0.00	0.142	32.35	1.002	66.14	7.006	67.16	50.238	92.05	355.656	100.00
0.022	0.00	0.159	39.34	1.125	66.14	7.662	67.27	56.368	94.42	306.052	100.00
0.025	0.00	0.178	45.90	1.262	66.14	8.634	67.38	63.246	96.82	447.744	100.00
0.028	0.00	0.200	51.66	1.416	66.14	10.024	67.51	70.963	98.18	502.377	100.00
0.032	0.00	0.224	56.46	1.589	66.14	11.247	67.67	79.621	91.42	563.677	100.00
0.036	0.00	0.252	60.15	1.783	66.14	12.619	67.87	89.337	93.46	632.456	100.00
0.040	0.00	0.283	62.78	2.000	66.14	14.159	68.14	100.237	95.25	709.627	100.00
0.045	0.00	0.317	64.47	2.244	66.14	15.887	68.51	112.468	96.73	796.214	100.00
0.050	0.00	0.356	65.44	2.519	66.17	17.825	68.99	126.191	97.89	893.367	100.00
0.056	0.03	0.399	65.91	2.825	66.22	20.000	69.62	141.569	98.75	1002.374	100.00
0.063	0.72	0.448	66.09	3.170	66.29	22.440	70.42	158.866	99.34	1124.683	100.00
0.071	2.06	0.502	66.14	3.567	66.39	25.179	71.42	178.250	99.70	1261.915	100.00
0.080	4.46	0.564	66.14	3.991	66.51	28.251	72.64	200.000	99.90	1415.892	100.00
0.089	8.04	0.632	66.14	4.477	66.64	31.698	74.09	224.404	99.98	1588.656	100.00
0.100	12.94	0.710	66.14	5.024	66.78	35.596	75.77	251.785	100.00	1782.502	100.00
0.112	18.70	0.796	66.14	5.637	66.92	39.905	77.68	282.508	100.00	2000.000	100.00
0.126	25.33	0.893	66.14	6.325	67.04	44.774	79.78	316.979	100.00		

Operator notes:

Figura 24. Dades obtingudes sobre la distribució mida de partícula rifampicina



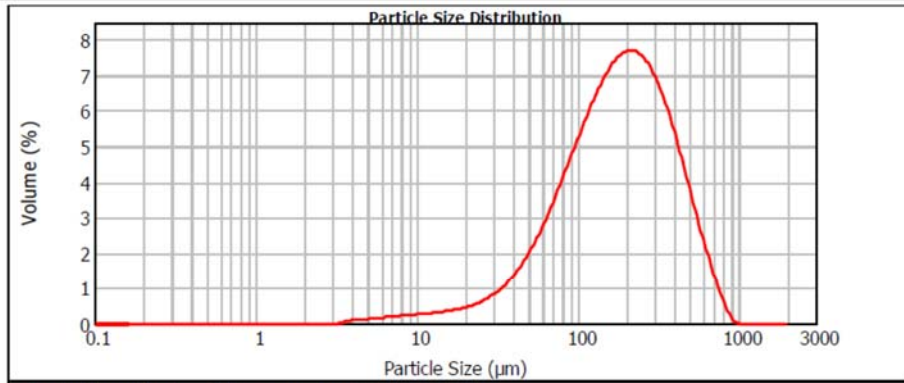
# MASTERSIZER



## Result Analysis Report

<b>Sample Name:</b> Isoniazida	<b>SOP Name:</b> SDM_PROSOLV	<b>Measured:</b> miércoles, 04 de noviembre de 2015 16:52:55	
<b>Sample Source &amp; type:</b>	<b>Measured by:</b> SDM-Mastersizer	<b>Analysed:</b> miércoles, 04 de noviembre de 2015 16:52:57	
<b>Sample bulk lot ref:</b> A0351069	<b>Result Source:</b> Measurement		
<b>Particle Name:</b> Polystyrene latex	<b>Accessory Name:</b> Scirocco 2000	<b>Analysis model:</b> General purpose	<b>Sensitivity:</b> Enhanced
<b>Particle RI:</b> 1.590	<b>Absorption:</b> 0	<b>Size range:</b> 0.020 to 2000.000 um	<b>Obscuration:</b> 1.97 %
<b>Dispersant Name:</b>	<b>Dispersant RI:</b> 1.000	<b>Weighted Residual:</b> 1.115 %	<b>Result Emulation:</b> Off
<b>Concentration:</b> 0.0062 %Vol	<b>Span :</b> 2.144	<b>Uniformity:</b> 0.664	<b>Result units:</b> Volume
<b>Specific Surface Area:</b> 0.062 m <sup>2</sup> /g	<b>Surface Weighted Mean D[3,2]:</b> 96.748 um	<b>Vol. Weighted Mean D[4,3]:</b> 219.359 um	

d(0.1): 54.778 um                      d(0.5): 180.715 um                      d(0.9): 442.220 um



Isoniazida, miércoles, 04 de noviembre de 2015 16:52:55

Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %
0.020	0.00	0.142	0.00	1.002	0.00	7.096	0.59	50.228	8.78	355.656	82.30
0.022	0.00	0.159	0.00	1.125	0.00	7.962	0.75	56.368	10.45	366.052	86.83
0.025	0.00	0.178	0.00	1.262	0.00	8.994	0.92	63.246	12.48	447.744	90.37
0.028	0.00	0.200	0.00	1.416	0.00	10.024	1.10	70.963	14.90	502.377	93.47
0.032	0.00	0.224	0.00	1.586	0.00	11.247	1.30	79.621	17.74	563.677	95.92
0.036	0.00	0.252	0.00	1.783	0.00	12.619	1.52	89.337	21.01	632.456	97.73
0.040	0.00	0.283	0.00	2.000	0.00	14.150	1.76	100.237	24.73	709.627	98.96
0.045	0.00	0.317	0.00	2.244	0.00	15.887	2.02	112.468	29.00	798.214	99.68
0.050	0.00	0.355	0.00	2.518	0.00	17.825	2.30	126.191	33.48	892.967	99.97
0.056	0.00	0.399	0.00	2.825	0.00	20.000	2.62	141.569	38.40	1002.374	100.00
0.063	0.00	0.448	0.00	3.170	0.00	22.440	2.99	158.986	43.76	1124.883	100.00
0.071	0.00	0.502	0.00	3.567	0.01	25.179	3.42	178.250	49.32	1261.915	100.00
0.080	0.00	0.564	0.00	3.991	0.07	28.251	3.93	200.000	55.06	1415.802	100.00
0.089	0.00	0.632	0.00	4.477	0.14	31.668	4.55	224.404	60.86	1588.656	100.00
0.100	0.00	0.710	0.00	5.024	0.23	35.566	5.30	251.755	66.61	1782.502	100.00
0.112	0.00	0.796	0.00	5.637	0.33	39.905	6.23	282.508	72.18	2000.000	100.00
0.126	0.00	0.893	0.00	6.325	0.45	44.774	7.37	316.979	77.45		

Operator notes:

Figura 25. Dades obtingudes sobre la distribució mida de partícula isoniazida

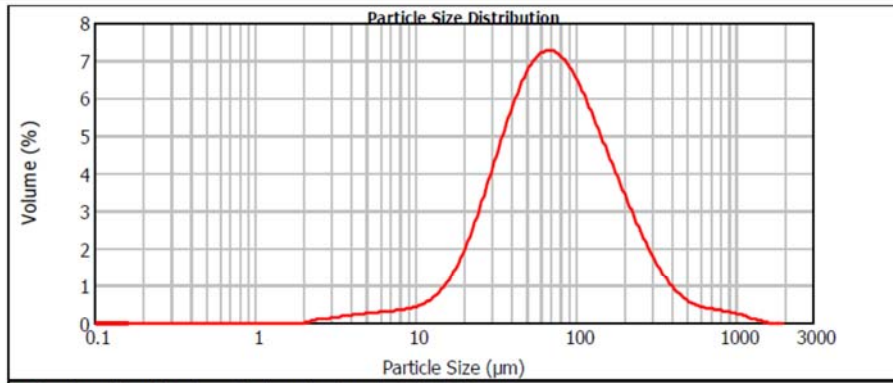




### Result Analysis Report

<b>Sample Name:</b> Pirazinamida	<b>SOP Name:</b> SDM_PROSOLV	<b>Measured:</b> miércoles, 04 de noviembre de 2015 16:36:42	
<b>Sample Source &amp; type:</b>	<b>Measured by:</b> SDM-Mastersizer	<b>Analysed:</b> miércoles, 04 de noviembre de 2015 16:36:43	
<b>Sample bulk lot ref:</b> A0343319	<b>Result Source:</b> Measurement		
<b>Particle Name:</b> Polystyrene latex	<b>Accessory Name:</b> Scirocco 2000	<b>Analysis model:</b> General purpose	<b>Sensitivity:</b> Enhanced
<b>Particle RI:</b> 1.590	<b>Absorption:</b> 0	<b>Size range:</b> 0.020 to 2000.000 um	<b>Obscuration:</b> 0.87 %
<b>Dispersant Name:</b>	<b>Dispersant RI:</b> 1.000	<b>Weighted Residual:</b> 0.486 %	<b>Result Emulation:</b> Off
<b>Concentration:</b> 0.0013 %Vol	<b>Span :</b> 2.769	<b>Uniformity:</b> 0.959	<b>Result units:</b> Volume
<b>Specific Surface Area:</b> 0.13 m <sup>2</sup> /g	<b>Surface Weighted Mean D[3,2]:</b> 46.234 um	<b>Vol. Weighted Mean D[4,3]:</b> 111.120 um	

d(0.1): 25.053 um                      d(0.5): 72.747 um                      d(0.9): 226.505 um



— Pirazinamida, miércoles, 04 de noviembre de 2015 16:36:42

Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %	Size (µm)	Vol Under %
0.020	0.00	0.142	0.00	1.002	0.00	7.096	1.45	50.238	32.78	365.656	96.01
0.022	0.00	0.150	0.00	1.125	0.00	7.962	1.69	56.368	37.96	390.052	96.84
0.025	0.00	0.178	0.00	1.282	0.00	8.934	1.95	63.246	43.35	447.744	97.47
0.028	0.00	0.200	0.00	1.416	0.00	10.024	2.24	70.963	48.82	502.377	97.96
0.032	0.00	0.224	0.00	1.589	0.00	11.247	2.58	79.621	54.28	563.677	98.35
0.036	0.00	0.252	0.00	1.783	0.00	12.619	3.00	89.337	59.55	632.456	98.67
0.040	0.00	0.283	0.00	2.000	0.00	14.159	3.54	100.237	64.82	709.627	98.96
0.045	0.00	0.317	0.00	2.244	0.01	15.887	4.25	112.466	69.37	796.214	99.22
0.050	0.00	0.356	0.00	2.518	0.06	17.825	5.19	126.191	73.77	893.367	99.45
0.056	0.00	0.399	0.00	2.825	0.14	20.000	6.43	141.589	77.78	1002.374	99.65
0.063	0.00	0.448	0.00	3.170	0.24	22.440	8.05	158.966	81.36	1124.683	99.81
0.071	0.00	0.502	0.00	3.657	0.35	25.179	10.10	178.250	84.59	1261.915	99.92
0.080	0.00	0.564	0.00	3.991	0.49	28.251	12.63	200.000	87.40	1415.882	99.99
0.089	0.00	0.632	0.00	4.477	0.65	31.696	15.68	224.404	89.82	1588.656	100.00
0.100	0.00	0.710	0.00	5.024	0.82	35.666	19.25	251.785	91.87	1782.502	100.00
0.112	0.00	0.796	0.00	5.637	1.02	39.905	23.33	282.508	93.56	2000.000	100.00
0.126	0.00	0.893	0.00	6.325	1.23	44.774	27.85	316.979	94.93		

Operator notes:

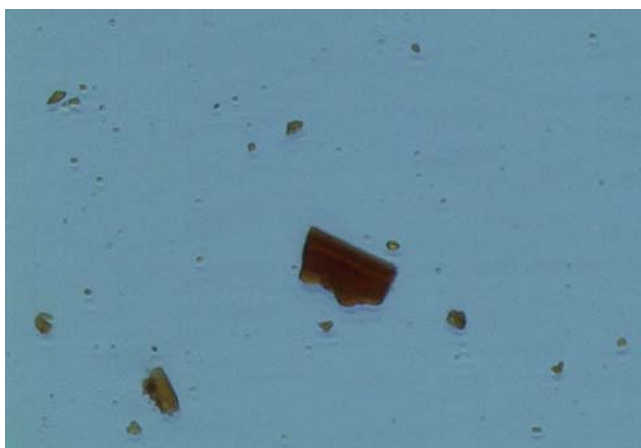
Figura 26. Dades obtingudes sobre la distribució mida de partícula pirazinamida

De les dades obtingudes, s'observa que la rifampicina és la que té una mida de partícula més petita, al contrari que la isoniazida, la qual té la mida de partícula més gran. En el cas de la rifampicina, a més a més, cal destacar la presència de dues poblacions en la mostra, fet que no succeeix en els altres dos principis actius i que permet afirmar que les mostres de pirazinamida i isoniazida són més homogènies, ja que només tenen una sola població de partícules.

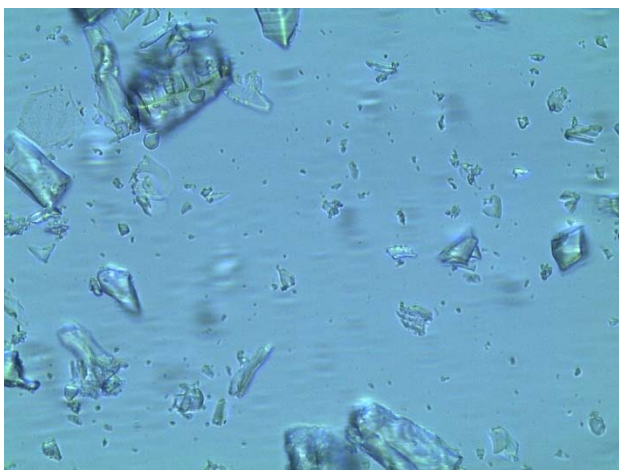
En referència a la mida de partícula es troba que el 50% de les partícules de la mostra tenen una mida per sota de  $180,715 \mu\text{m}$  en el cas de la isoniazida,  $72,747 \mu\text{m}$  en el cas de la pirazinamida i  $0,193 \mu\text{m}$  en el cas de la rifampicina, sent aquesta última, característica, perquè tot i havent-hi dues poblacions, la gran majoria té una mida de partícula per sota d'aquest valor, la qual cosa demostra que es troba micronitzada.

Aquesta variabilitat en la mida de partícula entre els tres principis actius és un inconvenient a l'hora d'elaborar una suspensió de tots tres, la qual cosa fa aconsellable la tamisació d'isoniazida i pirazinamida per assolir una major homogeneïtat entre tots tres fàrmacs que afavoreixi la seva incorporació al vehicle líquid de la suspensió.

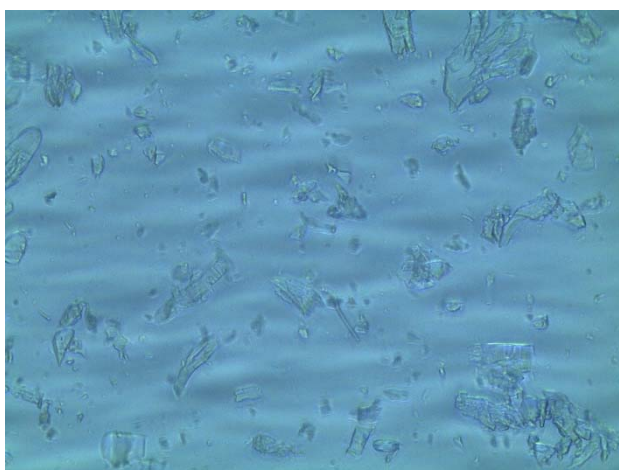
Les figures 27, 28 i 29 mostren les imatges obtingudes mitjançant el microscopi òptic de rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament.



*Figura 27. Imatge microscopi òptic rifampicina*



*Figura 28. Imatge microscopi òptic isoniazida*



*Figura 29. Imatge microscopi òptic pirazinamida*

Les imatges corroboren i complementen les dades obtingudes mitjançant difracció làser. En el cas de la rifampicina s'aprecien les dues poblacions de partícules presents en els resultats de difracció. En la imatge de la isoniazida s'observa la presència de cristalls grans, aquesta substància és la que té valors superiors de mida de partícula. Alhora també es poden apreciar petits cristalls, però deriven del trencament d'aquests durant la preparació de la mostra. En el cas de la pirazinamida, s'observa que aquesta és la que té una mida de partícula intermèdia respecte a les altres dues, coincidint així amb els resultats numèrics.

Pel que fa a la morfologia dels cristalls, tant la rifampicina com la isoniazida presenten cristalls prismàtics, amb angles pronunciats, que faran

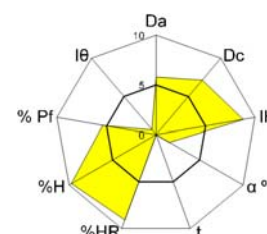
pensar en l'existència d'unes característiques reològiques deficients. Pel que fa a la pirazinamida, els cristalls són de forma variable, existint cristalls de tipus acicular, romboèdric i alguna forma prismàtica irregular; en qualsevol cas, aquestes formes també fan preveure l'existència d'unes característiques reològiques deficients.

Tenint en compte tota la informació obtinguda respecte a la mida de partícula, es conclou que per poder elaborar una suspensió estable i homogènia convé realitzar el tamisatge previ de les pólvores per uniformitzar la mida de partícula.

#### 4.1.3 Estudi de les propietats reològiques

Les figures 30, 31 i 32 mostren els resultats obtinguts amb el diagrama SeDeM parcial per a l'estudi reològic, corresponent a les diferents proves realitzades a rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament.

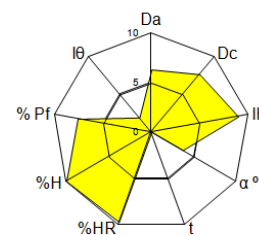
INCIDENCIA	Parámetro	siglas	unidad	valores experimentales (V)	(f)	media incidencia
Dimensiones	Densidad aparente	Da	g/ml	0,579	5,79	6,48
	Densidad compactada	Dc	g/ml	0,716	7,16	
Deslizamiento / Fluidéz	Índice de Hausner	IH	-	1,237	8,82	3,44
	Ángulo de reposo	( $\alpha$ )	°	42,435	1,51	
	Tiempo de deslizamiento	t	seg	NA	0,00	
Lubrificació / Estabilidad	Humedad relativa	%HR	%	0,909	9,09	9,42
	Higroscopicidad	%H	%	0,518	9,74	
Dosificació / Lubrificació	Partículas finas (<50 $\mu$ )	% Pf	$\mu$	22,984	5,40	3,03
	Índice de Homogeneidad	(I $\theta$ )		0,0013	0,65	



ÍNDICE PARAMÉTRICO	0,67
PERFIL PARAMÉTRICO (media de todos los radiales)	5,35
ÍNDICE DE BUENA GRANULACIÓN (IGC)	5,09

Figura 30. Diagrama SeDeM rifampicina

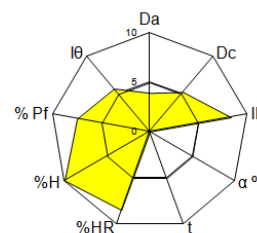
INCIDENCIA	Parámetro	siglas	unidad	valores experimentales (V)	(f)	media incidencia
Dimensiones	Densidad aparente	Da	g/ml	0,632	6,32	6,97
	Densidad compactada	Dc	g/ml	0,762	7,62	
Deslizamiento / Fluidez	Índice de Hausner	IH	-	1,206	8,97	4,22
	Ángulo de reposo	( $\alpha$ )	°	31,588	3,68	
	Tiempos de deslizamiento	t	seg	NA	0,00	
Lubricación/ Estabilidad	Humedad relativa	%HR	%	0,305	9,70	9,85
	Higroscopicidad	%H	%	0,000	10,00	
Dosisificación / Lubricación	Partículas finas (<math>\leq 0,4\mu</math>)	% Pf	$\mu$	11,836	7,63	4,77
	Índice de Homogeneidad	(I $\theta$ )		0,0038	1,90	



ÍNDICE PARAMÉTRICO	0,67
PERFIL PARAMÉTRICO (media de todos los radiales)	6,20
ÍNDICE DE BUENA GRANULACIÓN (IGG)	5,90

Figura 31. Diagrama SeDeM isoniazida

INCIDENCIA	Parámetro	siglas	unidad	valores experimentales (V)	(f)	media incidencia
Dimensiones	Densidad aparente	Da	g/ml	0,394	3,94	4,59
	Densidad compactada	Dc	g/ml	0,524	5,24	
Deslizamiento / Fluidez	Índice de Hausner	IH	-	1,330	8,35	2,78
	Ángulo de reposo	( $\alpha$ )	°	51,076	0,00	
	Tiempos de deslizamiento	t	seg	NA	0,00	
Lubricación/ Estabilidad	Humedad relativa	%HR	%	1,492	8,51	9,25
	Higroscopicidad	%H	%	0,000	10,00	
Dosisificación / Lubricación	Partículas finas (<math>\leq 0,4\mu</math>)	% Pf	$\mu$	12,412	7,52	6,61
	Índice de Homogeneidad	(I $\theta$ )		0,0114	5,70	



ÍNDICE PARAMÉTRICO	0,67
PERFIL PARAMÉTRICO (media de todos los radiales)	5,47
ÍNDICE DE BUENA GRANULACIÓN (IGG)	5,21

Figura 32. Diagrama SeDeM pirazinamida

De l'anàlisi dels tres principis actius mitjançant el diagrama SeDeM es pot concloure :

En el cas de la rifampicina la diferència entre la densitat aparent sense compactar (0,579 g/ml) i la densitat compactada (0,716 g/ml) és baixa, amb

valors de densitat alts. Com a conseqüència d'aquest fet es donen tot un seguit d'avantatges alhora de treballar amb aquest tipus de pólvores, ja que, per una banda, el fet de tenir densitats elevades permet que la manipulació d'aquest compost sigui fàcil i doni pocs problemes alhora de treballar a nivell industrial; i per l'altre, el fet de tenir valors elevats de densitats, facilita l'estabilitat de les suspensions, ja que la possibilitat d'incorporar aire és més baixa i per tant, també ho és la formació de suspensions excessivament floculades.

En el cas de la isoniazida els valors de densitats encara són més elevats i la diferència entre densitat aparent (0,632 g/ml) i densitat compactada (0,762 g/ml) encara és més baixa, per tant els beneficis esmentats alhora de treballar amb la rifampicina també es donaran alhora de treballar amb pólvores de isoniazida.

En el cas de la pirazinamida, els valors de densitats són una mica més baixos que en els dos altres principis actius (0,394 i 0,524 g/ml), fet que dificultarà una mica més la manipulació de les pólvores i l'estabilitat de la suspensió.

Els paràmetres corresponents a lliscament i fluïdesa són deficients en els tres principis actius, amb uns valors de radi nuls ( $r = 0$ ) en el paràmetre de temps de lliscament i valors molt baixos o també nuls en el paràmetre d'angle de repòs ( $r = 1,51$  per a rifampicina, 3,68 per a isoniazida i 0 per a pirazinamida). Es demostra així que tots tres tenen unes propietats reològiques bastant dolentes, fet que dificultarà l'elaboració de la fórmula a nivell industrial. Aquestes característiques es poden correlacionar amb les característiques morfològiques de les partícules observades en l'estudi microscòpic de les mateixes (veure apartat 4.1.2).

Els paràmetres relatius a la humitat i la higroscopicitat són excel·lents en tots tres casos, presentant un contingut d'humitat baix (0,909, 0,305 i 1,492 per a rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament) i una higroscopicitat molt baixa (0,518 per a rifampicina i nul·la en el cas de

isoniazida i pirazinamida). Aquests valors permeten deduir que les pólvores són prou estables front a la humitat ambiental.

Finalment, interessa de cara a una suspensió tenir un elevat nombre de partícules fines ( $<50 \mu\text{m}$ ). Els resultats obtinguts mostren que tot i que en tots tres casos s'assoleixen un valors de radi per sobre de 5, la distribució granulomètrica dels tres principis actius és bastant àmplia, fet que pot afectar a la mescla final en termes d'homogeneïtat, la qual cosa referma el fet d'haver d'uniformitzar la mida de partícula de tots tres fàrmacs mitjançant la tamisació d'aquests.

#### 4.1.4 Espectrofotometria UV-Vis

Les figures 33, 34, 35 i 36 mostren l'espectre UV-Vis per a rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament.

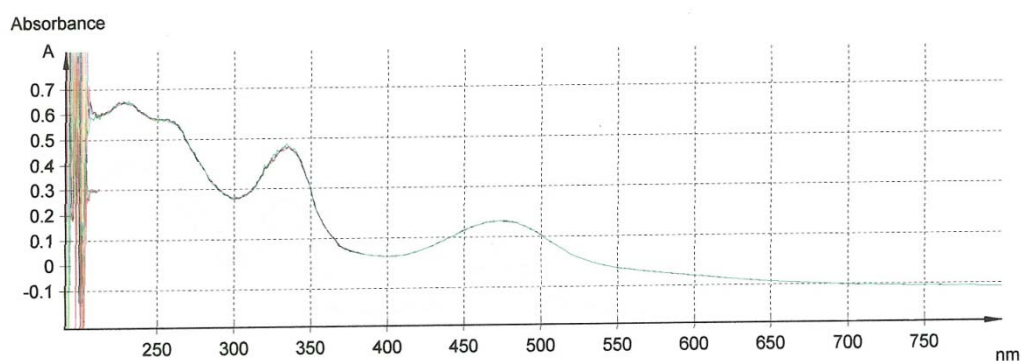


Figura 33. UV-Vis rifampicina

Es detecten els punts màxims d'absorció descrits a Farmacopea Europea (237, 254, 334 i 475 nm).



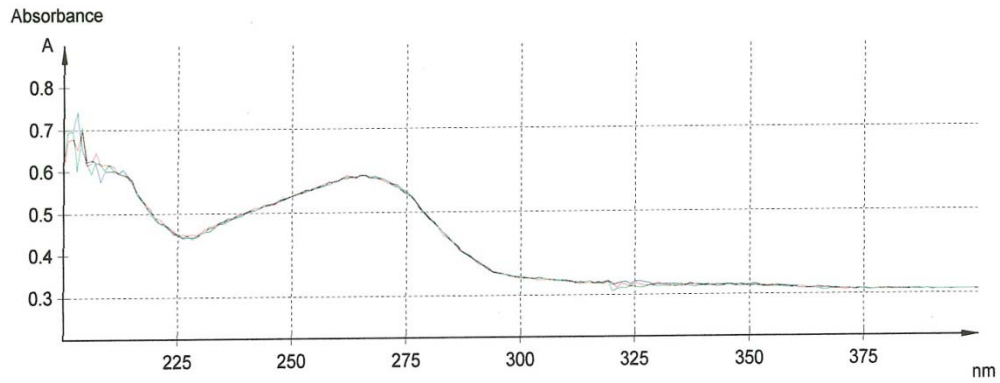


Figura 34. UV-Vis isoniazida

En el cas de la isoniazida no hi ha cap mètode descrit a Farmacopea Europea que permeti identificar-la mitjançant UV-Vis, per tant, es segueix el mètode descrit en l'article cercat per a la part bibliogràfica (Chen, 2000). S'observa un pic a 264 nm (valor teòric 265 nm).

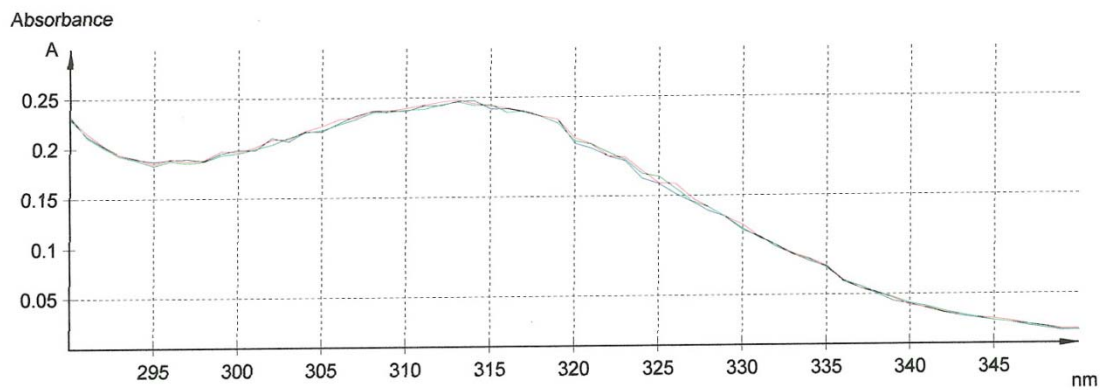


Figura 35. UV-Vis pirazinamida

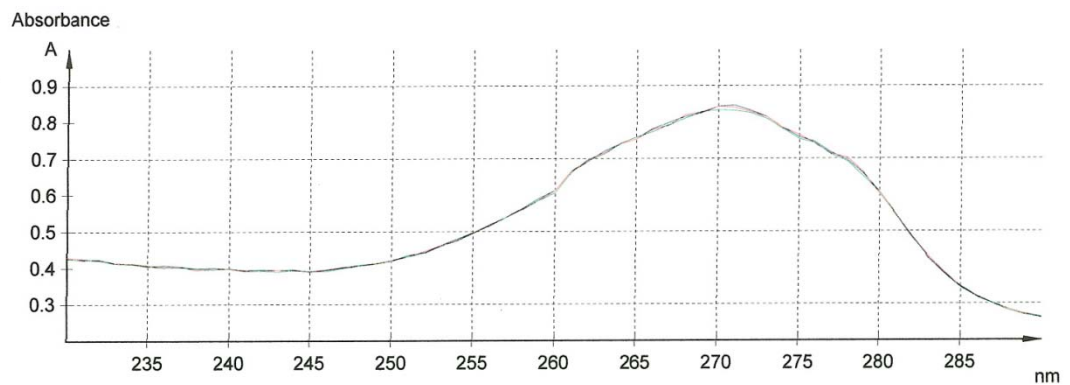


Figura 36. UV-Vis pirazinamida



La monografia de Farmacopea Europea per a la pirazinamida descriu que s'han de fer dos preparacions diferents per detectar els dos màxims d'absorció. Degut a aquest motiu s'obtenen dos espectres per a aquest compost. En tots dos s'obté un pic màxim a valor de 314 i 271 nm respectivament, coincidint així amb els teòrics descrits a farmacopea (311 i 268 nm).

#### 4.1.5 Espectroscòpia d'infraroig (IR)

Les figures 37, 38 i 39 mostren l'espectre d'infraroig per a rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament.

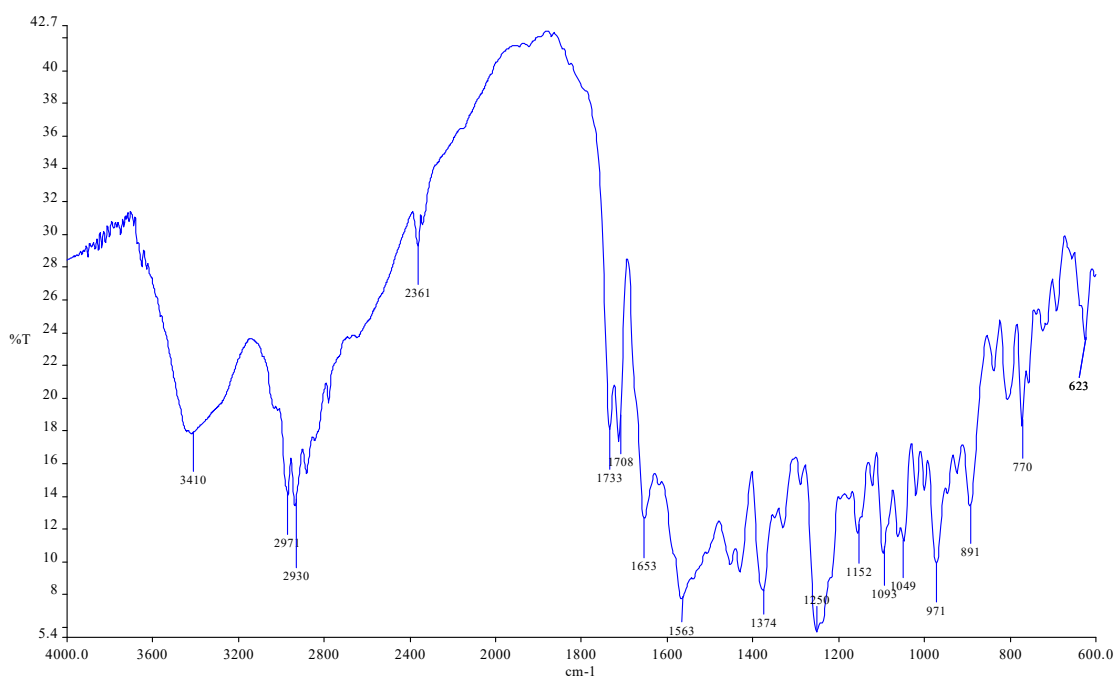


Figura 37. IR rifampicina

L'espectre IR de la rifampicina mostra que al voltant dels 3500  $\text{cm}^{-1}$  es poden verificar els pics d'absorció identificatius del grup hidroxil (-OH), un pic d'absorció a 2971  $\text{cm}^{-1}$  característic de l'enllaç -CH<sub>3</sub>-O, i a 2930  $\text{cm}^{-1}$  característic de l'enllaç -CH<sub>3</sub>-N. També es mostra una banda d'absorció identificativa el grup cetona -C=O vora els 1733  $\text{cm}^{-1}$ , així com del grup imino -C=N- i del grup amino -C-N al voltant dels 1653 i 1374  $\text{cm}^{-1}$  respectivament. Per últim destacar el pic d'absorció que apareix vora els 1250  $\text{cm}^{-1}$  identificatiu del grup acetil -C-O-C-.

L'espectre IR obtingut permet confirmar la puresa de la substància analitzada i la seva identificació positiva com rifampicina (Moffat et al. 2004). Segons Moffat (2004), els pics principals identificatius corresponen a pics a 1250, 1567, 976, 1098, 1064 i 1650, equivalents als obtinguts a 1250, 1563, 971, 1093, 1049 i 1653.

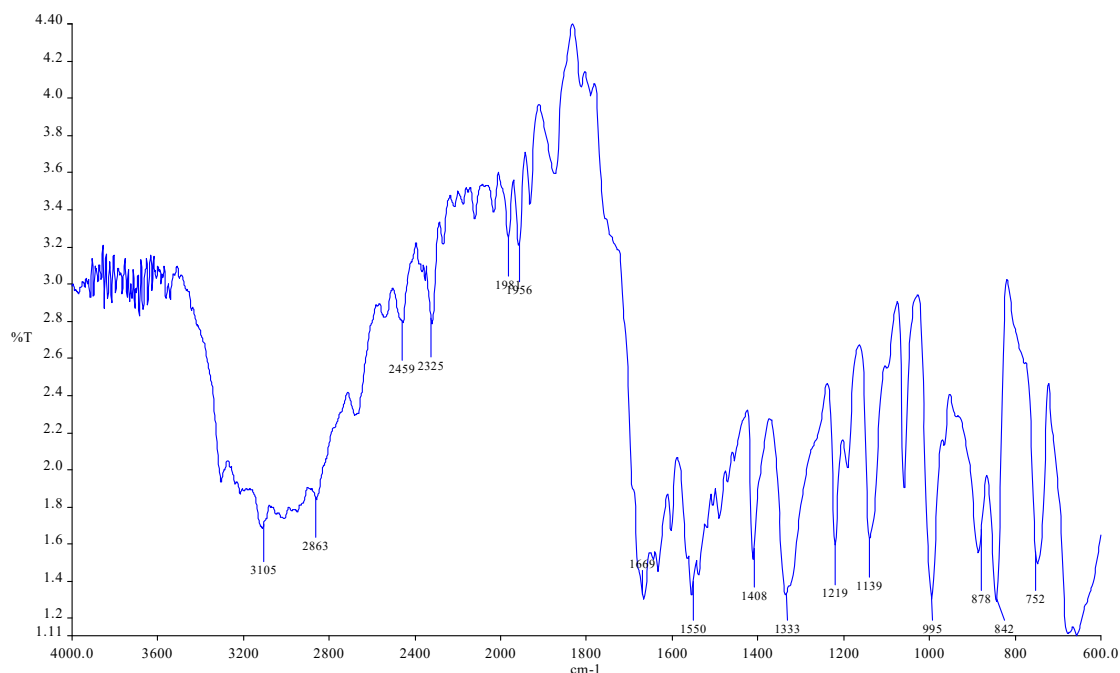


Figura 38. IR isoniazida

En el cas de la isoniazida destacar de l'espectre IR els pics d'absorció que apareixen vora  $3105\text{ cm}^{-1}$  els quals són identificatius de l'enllaç  $\text{-NH}$ , a  $2863\text{ cm}^{-1}$  els característics dels  $\text{-CH}$  aromàtics. Les bandes d'absorció que apareixen al voltant de  $1669\text{ cm}^{-1}$  són identificatives del grup  $\text{-C=O}$ , les que apareixen vora  $1550\text{ cm}^{-1}$  del grup  $\text{-NH}_2$  i les que apareixen al voltant de  $1408\text{ cm}^{-1}$  del grup  $\text{-C=N}$ . Destacar també els pics d'absorció identificatius de l'anell aromàtic a voltant del  $1333\text{ cm}^{-1}$ .

L'espectre IR obtingut permet confirmar la puresa de la substància analitzada i la seva identificació positiva com isoniazida (Moffat et al. 2004). Segons Moffat (2004) els pics principals identificatius corresponen a pics a 1653, 1541, 1621, 992 i 845, equivalents als obtinguts a 1669, 1550, 1620, 995 i 842.

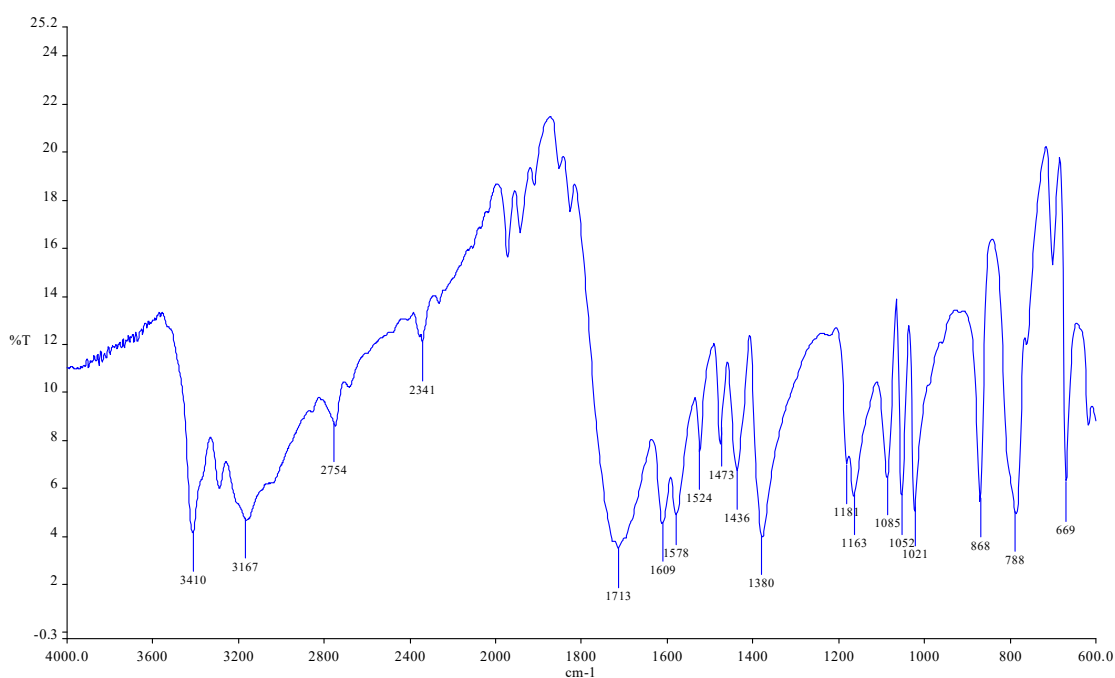


Figura 39. IR pirazinamida

De l'espectre IR de la pirazinamida destacar les bandes d'absorció relacionades amb el grup funcional  $\text{-NH}$  a  $3410\text{ cm}^{-1}$  a  $3167\text{ cm}^{-1}$  identificatives de  $\text{-CH}$  aromàtics, a  $1713\text{ cm}^{-1}$  del grup  $\text{-C=O}$ , a  $1609\text{ cm}^{-1}$  del grup  $\text{-NH}_3$ , a  $1524\text{ cm}^{-1}$  del grup  $\text{-C=N}$ , a  $1380$  de l'anell aromàtic i les bandes que apareixen a  $788\text{ cm}^{-1}$  indicatives del grup  $\text{NH}_2$ .

L'espectre IR obtingut permet confirmar la puresa de la substància analitzada i la seva identificació positiva com pirazinamida (Chen, 2000). Segons Chen (2000) els pics principals identificatius corresponen a pics a  $3425$ ,  $3290$ ,  $3160$ ,  $1716$ ,  $1614$ ,  $1582$ ,  $1382$ ,  $1183$  i  $782$  equivalents als obtinguts a  $3410$ ,  $3300$ ,  $3167$ ,  $1713$ ,  $1609$ ,  $1578$ ,  $1380$ ,  $1181$  i  $788$ .

#### 4.1.6 Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

Les figures 40, 41 i 42 mostren els espectres RMN obtinguts per rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament.

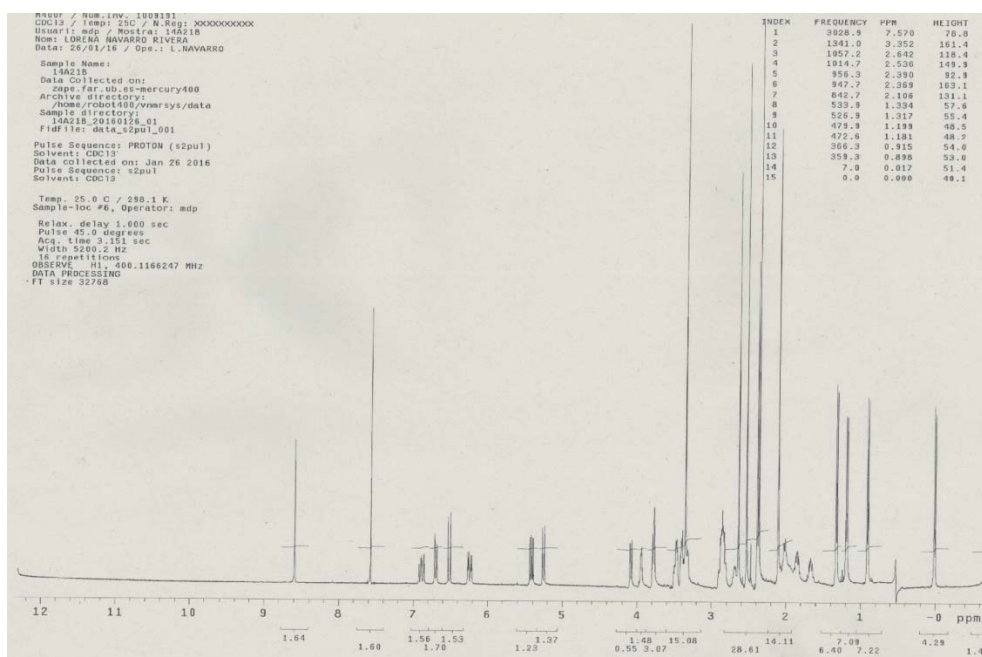


Figura 40. RMN rifampicina

En el cas de la rifampicina, es confirma la presència del grup aromàtic dihidroxinaftalè, de l'anell de piperazina, del grup acetil (C-O-C), del grup imino (CH=N) i dels demés grups (CH-OH) que componen la molècula de rifampicina.

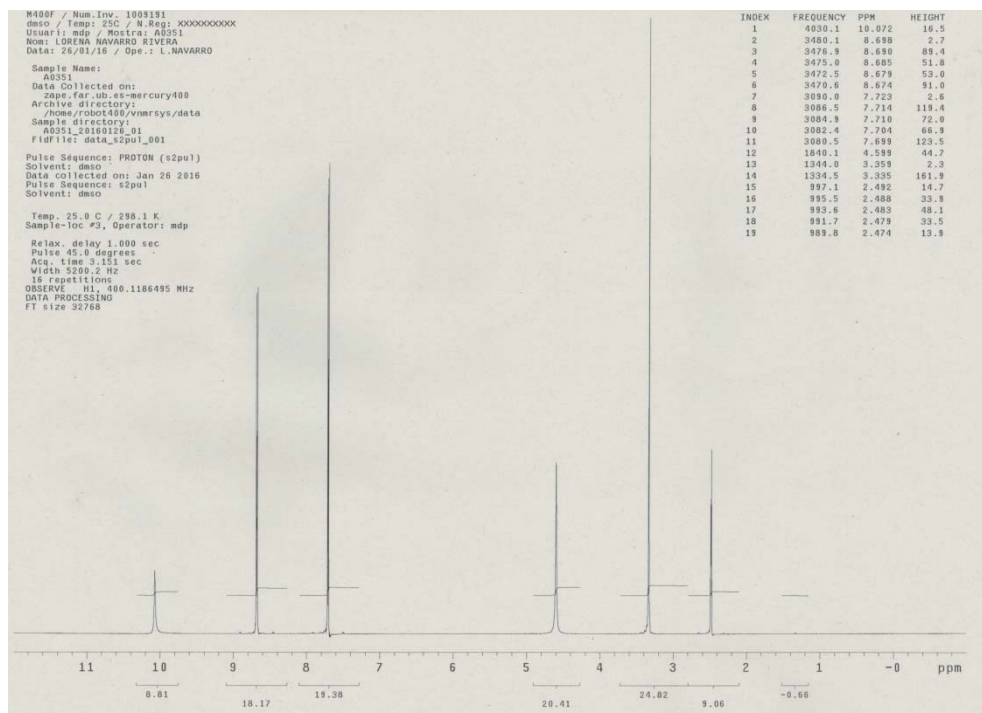


Figura 41. RMN isoniazida.

En el cas de la isoniazida, es confirma la presència del grup hidrazina (NH-NH<sub>2</sub>), del grup amida (CONH) i de l'anell aromàtic de piridina.

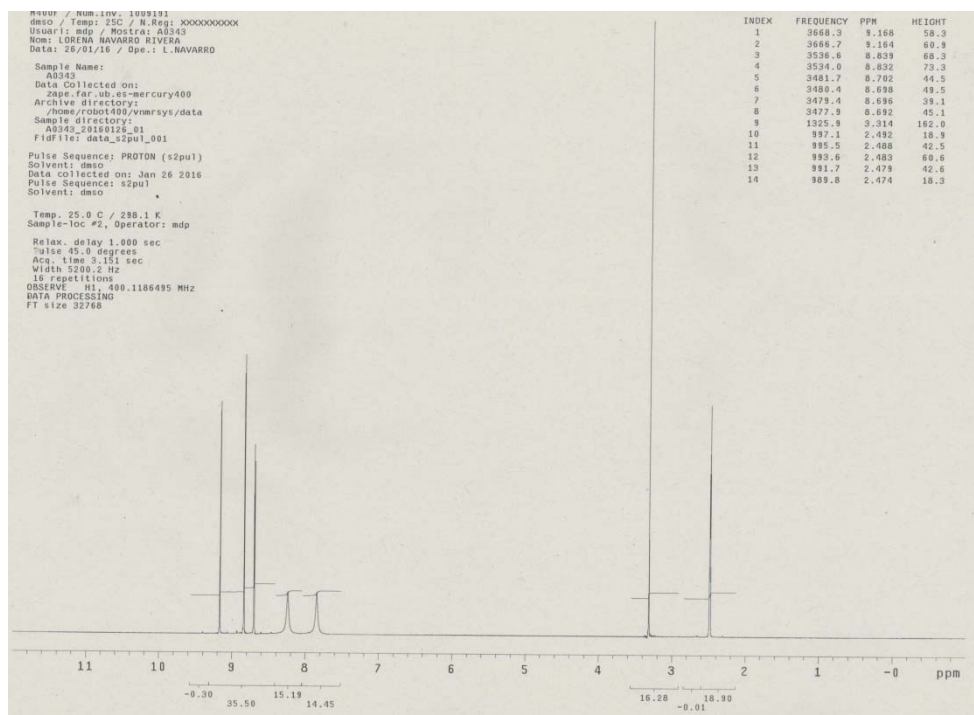


Figura 42. RMN pirazinamida

En el cas de la pirazinamida, es confirma la presència del grup funcional amida (CONH<sub>2</sub>) i de l'anell aromàtic de pirazina.

#### 4.1.7 Difracció per Raig X

Les figures 43, 44 i 45 mostren els difractogrames obtinguts per cada principi actiu.

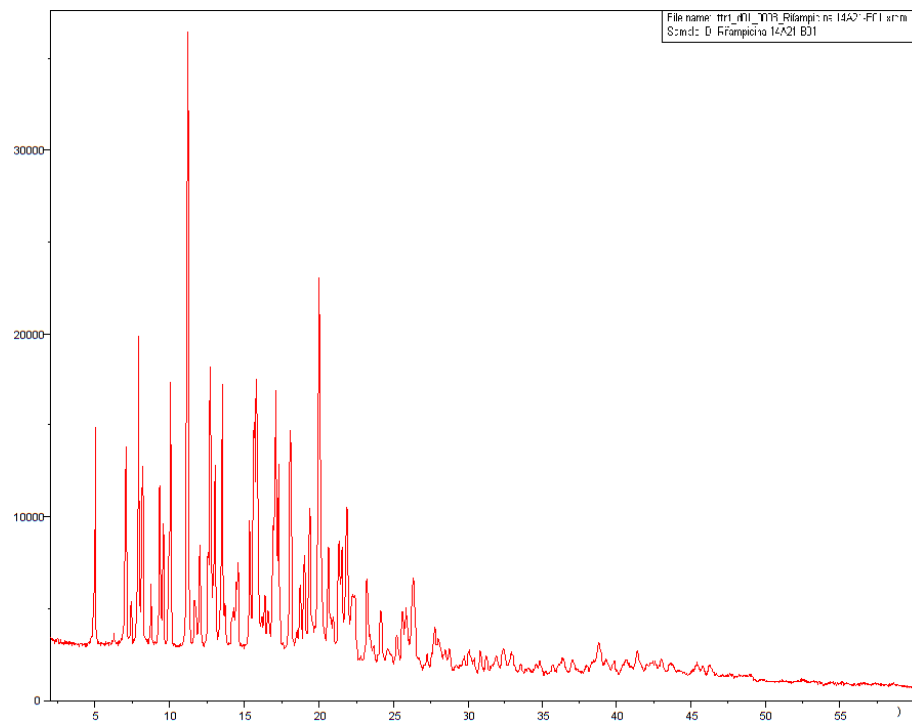


Figura 43. Difractometre rifampicina

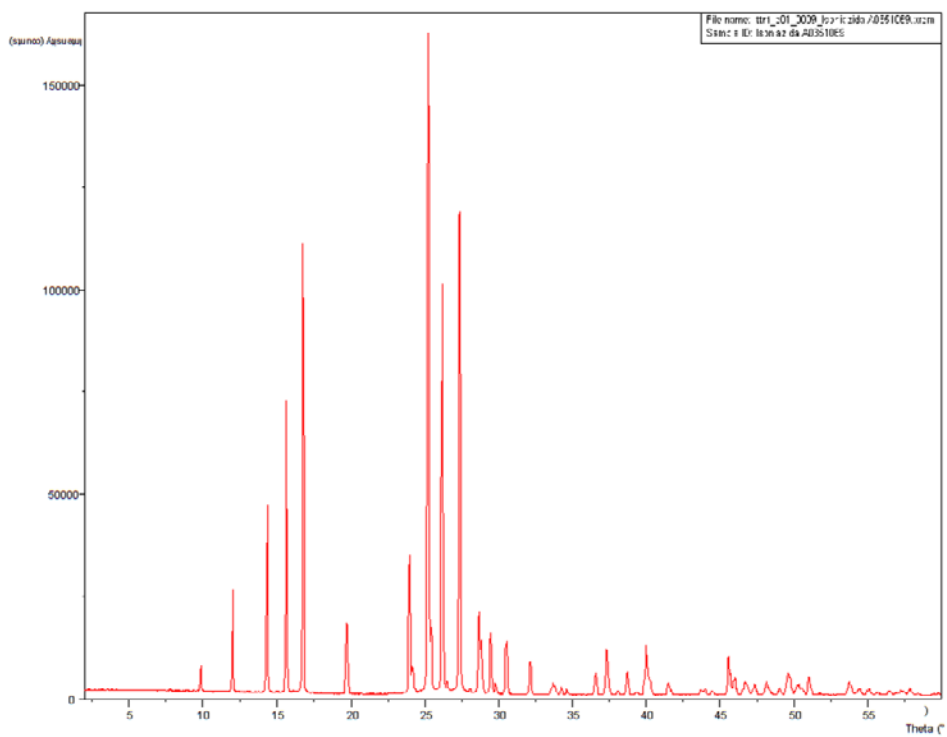


Figura 44. Difractometre isoniazida.

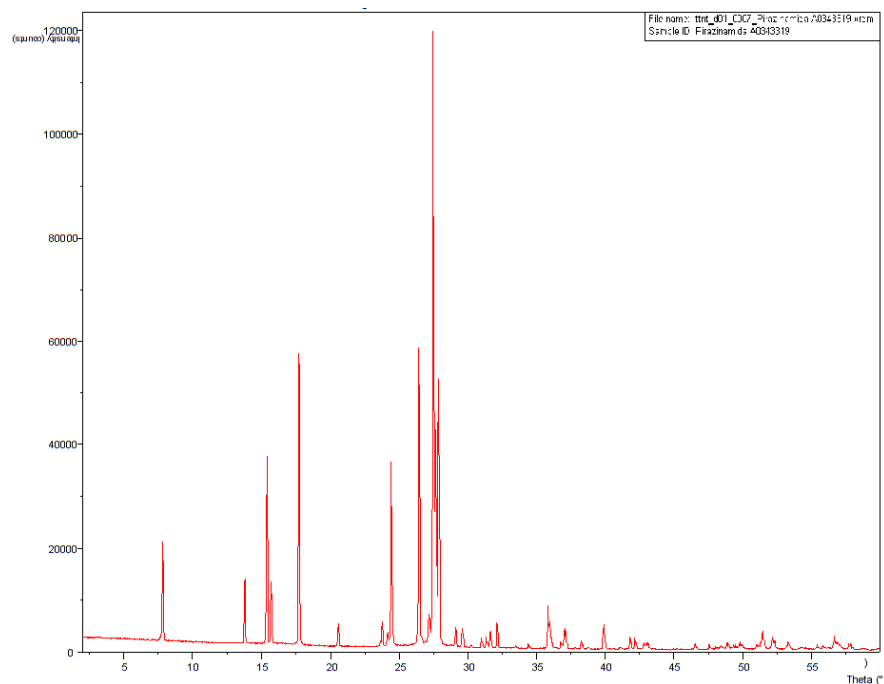


Figura 45. Difractòmetre pirazinamida.

Els difractogrames dels tres principis actius mostren nombroses línies d'alta intensitat, la qual cosa indica que les mostres analitzades estan en estat cristal·lí. Les figures representen els diagrames de difracció de cada principi actiu obtingut en el rang angular principal de 2 a 60 °2θ. Els quadres 38, 39 i 40 relacionen els pics observats en el mateix rang angular per a rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament.

Pos. [°2θ]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]
4.9910	17.70589	36.27
6.2487	14.14483	1.28
7.0404	12.55588	32.92
7.3866	11.96813	6.77
7.8762	11.22521	51.48
8.1431	10.85790	27.98
8.7309	10.12817	9.55
9.3138	9.49560	27.17
9.5431	9.26799	20.34
10.0269	8.82188	47.52
11.1892	7.90794	100.00
11.6507	7.59567	7.47
12.0102	7.36917	16.47
12.5298	7.06471	13.92
12.6991	6.97090	47.60
13.0094	6.80533	29.64
13.4962	6.56092	44.09
13.6957	6.46578	5.62
14.1370	6.26495	4.33
14.2458	6.21734	6.22
14.4202	6.14255	10.46
14.5629	6.08267	13.35
15.3393	5.77649	21.11
15.6101	5.67688	36.07
15.7698	5.61974	45.17
15.8910	5.57715	29.76
16.1429	5.49071	4.75
16.3550	5.41995	8.17
16.5724	5.34936	5.90
16.8939	5.24825	19.68
17.0850	5.18998	43.57
17.2883	5.12942	30.61
18.0735	4.90831	36.70
18.4834	4.80037	2.27
18.7248	4.73903	9.83
18.9982	4.67144	14.91
19.3595	4.58507	23.13
19.9745	4.44526	64.14
20.6099	4.30964	17.40
20.9262	4.24520	5.40
21.3153	4.16858	18.56
21.5162	4.13010	17.38
21.8453	4.06863	25.05
22.2282	3.99939	10.61
22.3906	3.97075	10.32
23.1894	3.83575	13.99
23.4150	3.79929	4.21
23.6397	3.76369	2.50
24.1270	3.68876	8.57
24.5254	3.62974	2.06
25.2156	3.53194	4.56
25.5677	3.48410	8.97
25.8023	3.45295	9.68
26.2678	3.39280	14.34
26.7257	3.33570	1.44

Quadre 38. Llistat de pics observats en el diagrama de difracció de Raig X de rifampicina



Pos. [°2θ]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]
7.7727	11.37458	0.18
9.8185	9.00861	4.06
11.9794	7.38802	15.51
14.3031	6.19253	28.60
15.6103	5.67682	44.14
16.7346	5.29786	67.03
19.6852	4.50994	11.02
22.7458	3.90954	0.05
23.9155	3.72091	20.42
24.1307	3.68821	3.73
25.1773	3.53722	100.00
25.4122	3.50505	9.05
26.1276	3.41068	62.49
26.4645	3.36802	1.31
27.3042	3.26633	75.54
28.0134	3.18522	0.22
28.6797	3.11273	10.83
28.8645	3.09321	6.64
29.4670	3.03132	8.95
29.7933	2.99887	1.41
30.5228	2.92883	7.62
32.1422	2.78488	5.17
33.6673	2.66213	1.60
34.2479	2.61832	1.13
34.6193	2.59108	0.72
35.4767	2.53039	0.05
36.5342	2.45954	3.42
37.3136	2.40994	6.99
38.0820	2.36306	0.55
38.6706	2.32844	3.28
39.3331	2.29073	0.29
39.9804	2.25513	7.50
40.2686	2.23965	2.14
41.4549	2.17826	1.74
43.6632	2.07308	0.68
43.9900	2.05673	0.86
44.4361	2.03880	0.58
45.5503	1.99149	5.74
45.9882	1.97354	2.41
46.6556	1.94685	1.76
46.9590	1.93498	0.44
47.3144	1.92127	1.52
48.1214	1.89092	1.76
49.0070	1.85880	0.72
49.4052	1.84322	1.04
49.5581	1.83790	3.06
49.7093	1.83721	2.59
50.1721	1.81683	1.20
50.3112	1.81664	1.31
50.5420	1.80440	0.85
50.9696	1.79026	2.55
51.1179	1.78985	1.27
51.7408	1.76538	0.27
52.1607	1.75215	0.08

Quadre 39. Llistat de pics observats en el diagrama de difracció de Raig X de isoniazida

Pos. [°2θ]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]
7.8031	11.33028	15.71
13.7569	6.43715	10.87
15.3497	5.77260	31.41
15.6762	5.65308	10.77
16.4340	5.39407	0.09
17.6989	5.01134	49.81
20.5491	4.32224	3.72
23.7357	3.74868	3.40
24.1346	3.68763	2.04
24.3902	3.64956	29.77
26.3951	3.37672	50.67
27.1081	3.28951	4.54
27.4250	3.25221	100.00
27.6272	3.22887	29.84
27.8316	3.20562	43.68
28.7720	3.10295	0.15
29.1338	3.06523	3.02
29.6172	3.01630	2.91
30.2414	2.95544	0.43
30.9964	2.88515	1.52
31.3488	2.85352	1.66
31.6427	2.82769	2.80
32.1329	2.78566	4.08
33.4877	2.67599	0.48
34.4154	2.60596	0.72
35.8271	2.50645	7.30
36.7760	2.44393	1.10
37.0052	2.42730	2.91
37.1204	2.42204	3.12
37.7922	2.38051	0.14
38.2515	2.35298	1.47
38.7237	2.32537	0.22
39.8656	2.25949	3.91
39.9904	2.25832	1.84
40.5681	2.22197	0.05
41.1209	2.19336	0.33
41.7757	2.16049	2.01
42.1337	2.14295	1.79
42.7942	2.11140	1.07
42.9574	2.10375	1.00
43.1101	2.09665	0.94
45.5699	1.98903	0.05
46.5098	1.95100	1.01
46.6513	1.95025	0.47
47.5364	1.91124	0.70
48.0046	1.89368	0.20
48.3914	1.87944	0.39
48.5538	1.87819	0.30
48.8288	1.86363	0.99
48.9847	1.86268	0.57
49.2732	1.84786	0.58
49.4229	1.84261	0.45
49.7491	1.83128	1.19
49.9184	1.83001	0.60
50.9715	1.79020	0.63

Quadre 40. Llistat de pics observats en el diagrama de difracció de Raig X de pirazinamida

#### 4.1.8 Determinació d'incompatibilitats entre principis actius mitjançant calorimetria diferencial d'escombratge (DSC)

Les figures 46, 47, 48, 49, 50 i 51 mostren els resultats obtinguts per cada principi actiu analitzat de forma individual i de les mescles entre ells.

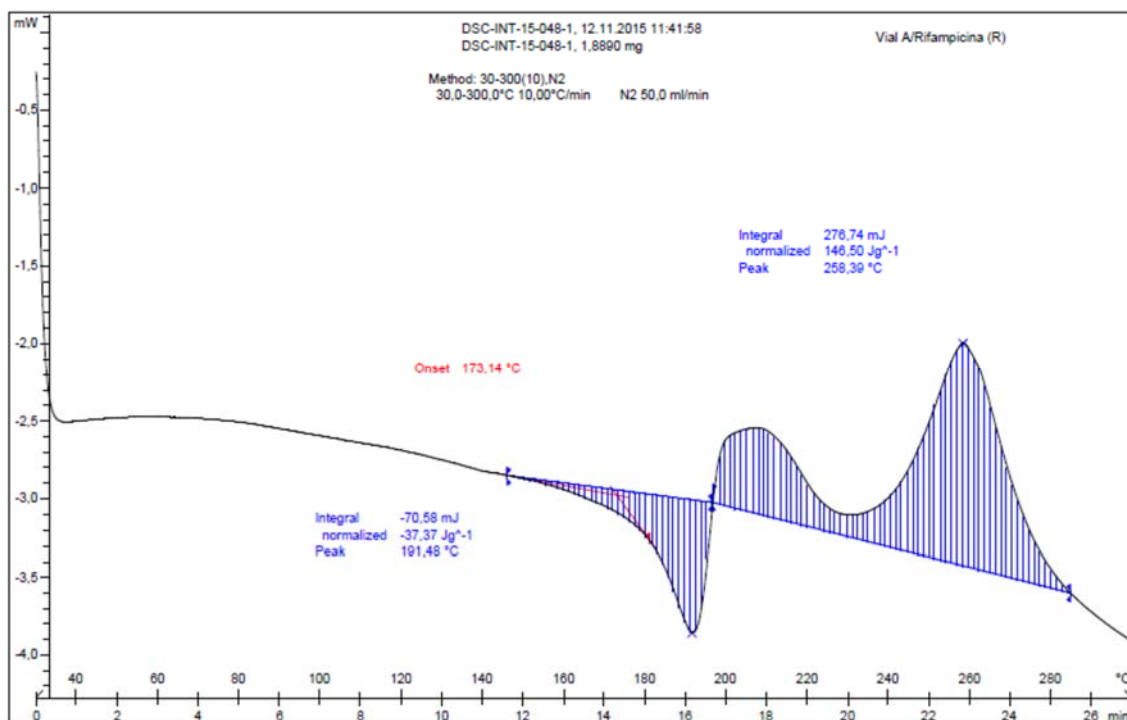


Figura 46. DSC rifampicina

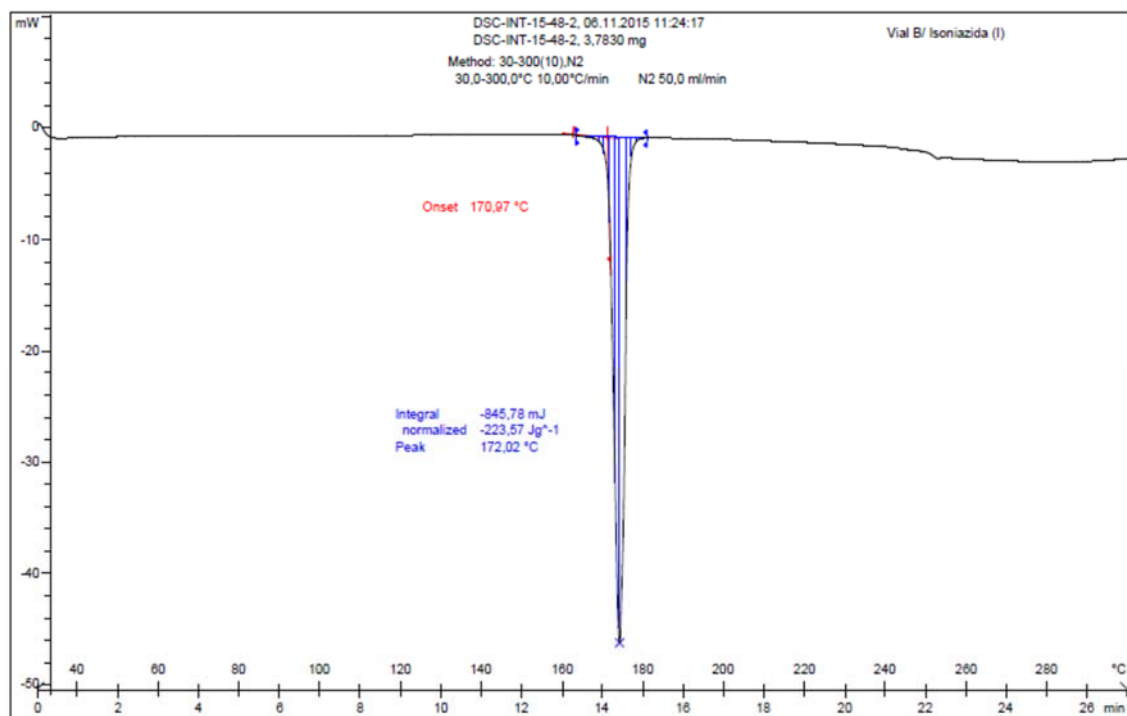


Figura 47. DSC isoniazida

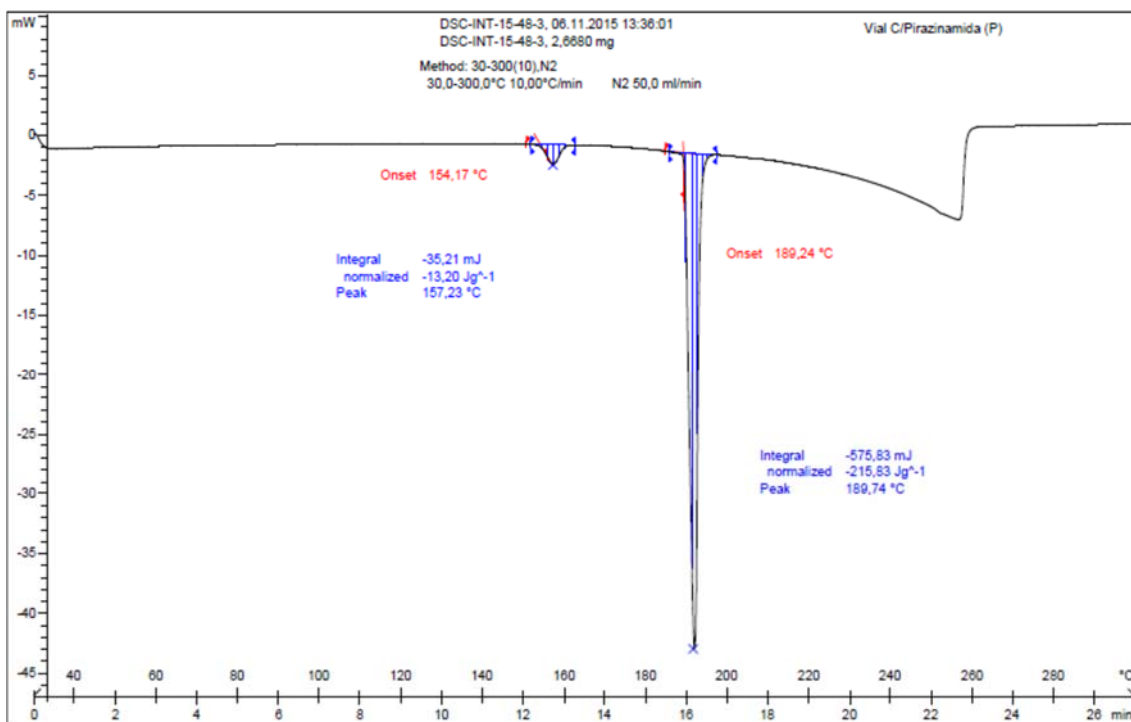


Figura 48. DSC pirazinamida

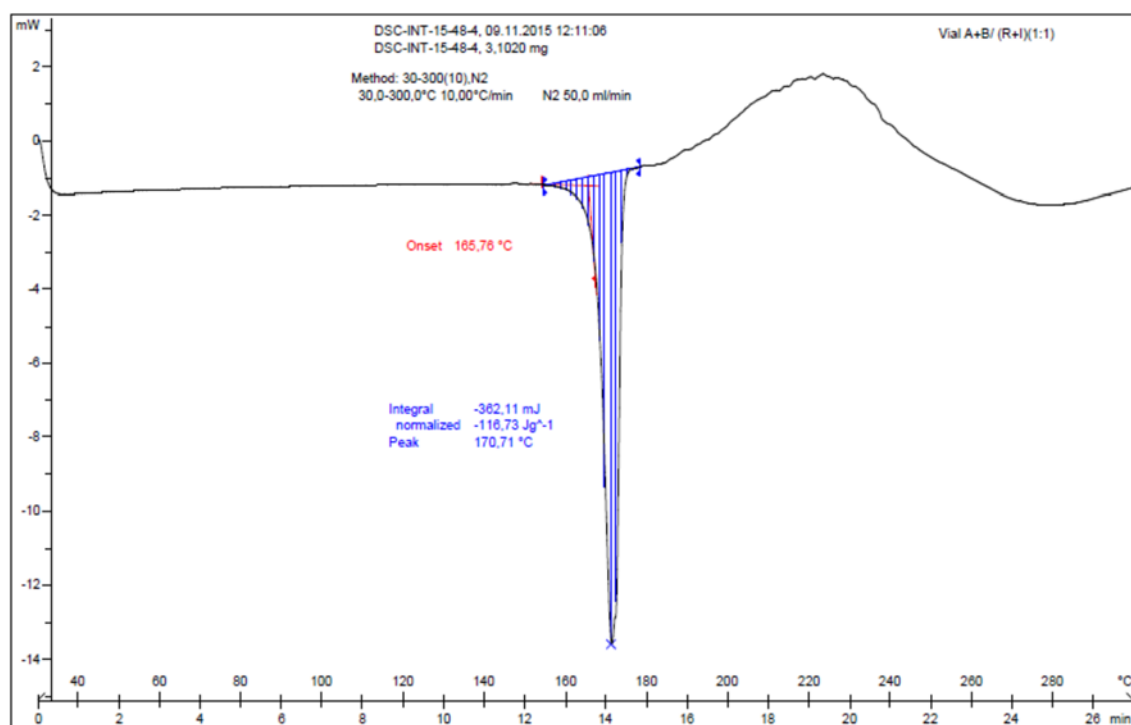


Figura 49. DSC mescla rifampicina + isoniazida

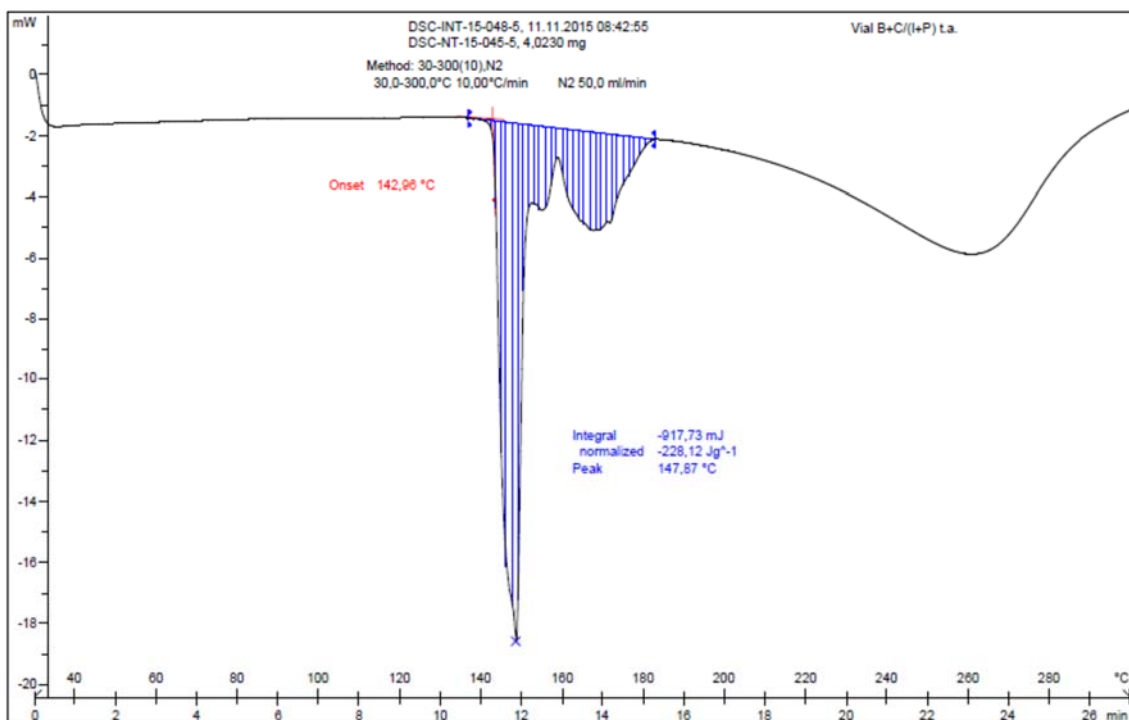


Figura 50. DSC mescla pirazinamida + isoniazida

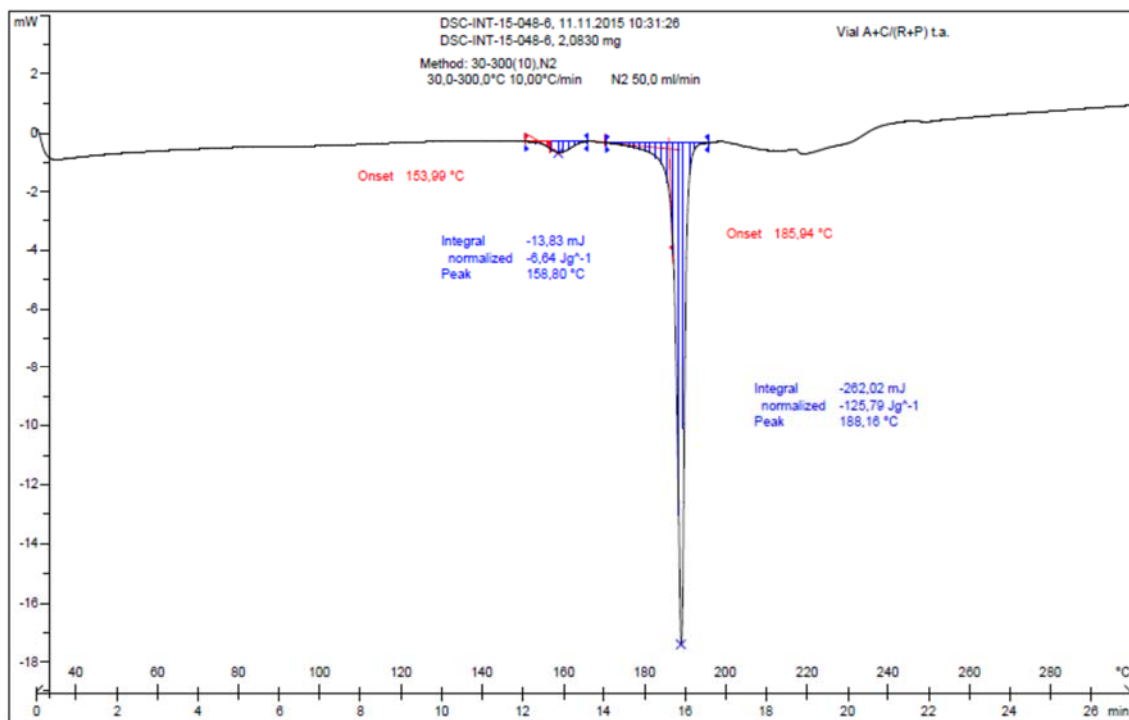


Figura 51. DSC mescla rifampicina + pirazinamida

Dels termogrames obtinguts dels tres principis actius analitzats de forma individual es mostren endotermes definides que corresponen als processos de fusió o de fusió/descomposició. Pel cas de la rifampicina s'observa la presència d'un pic amb valors d'integral positius, indicatius d'una reacció exotèrmica. Aquest fet indica que s'ha generat una substància nova, és a dir, un producte de degradació; per tant, la rifampicina sotmesa a elevades temperatures es degrada. En canvi, en el cas de la isoniazida i la pirazinamida, els termogrames mostren que totes dues es mantenen estables en les condicions d'anàlisi.

El registre de DSC de la mescla rifampicina:isoniazida 1:1 no mostra alteracions apreciables en els pics característics dels principis actius. El senyal característic de la rifampicina es troba minimitzat i desplaçat per solapament degut a la generada per la isoniazida. Aquests canvis són característics de l'existència de fenòmens físics que no són indicatius d'interaccions de caràcter químic. Per altra banda, no es produeixen nous pics exotèrmics derivats de la generació de possibles productes de degradació, la qual cosa indica que no cal esperar cap incompatibilitat química entre ambdues substàncies quan es troben en estat sòlid.

El registre de DSC de la mescla isoniazida:pirazinamida 1:1 no mostra alteracions apreciables en els pics característics dels principis actius. En les mescles existeix una disminució apreciable de l'entalpia en tots els pics, aquest fet es degut a que hi ha menor quantitat de substància en la mescla que quan s'analitza individualment. Per altra banda, no es produeixen nous pics exotèrmics derivats de la generació de possibles productes de degradació. Aquests canvis són característics de l'existència de fenòmens físics que no són indicatius d'interaccions de caràcter químic.

El registre de DSC de la mescla rifampicina:pirazinamida 1:1 no mostra alteracions apreciables en els pics característics dels principis actius. EL senyal característic de la rifampicina es troba de nou minimitzat i desplaçat per solapament degut a la generada per la pirazinamida. Per altra banda, no es produeixen nous pics exotèrmics derivats de la generació de possibles

productes de degradació. Aquests canvis són característics de l'existència de fenòmens físics que no són indicatius d'interaccions de caràcter químic.

Dels termogrames obtinguts de les mescles binaries es conclou que no hi ha cap incompatibilitat entre els tres principis actius en estat sòlid.

## 4.2 MÈTODE ANALÍTIC

A continuació s'exposen els resultats obtinguts en la validació del mètode desenvolupat per l'anàlisi de rifampicina, isoniazida i pirazinamida. Per la realització de la validació d'aquest mètode analític s'han utilitzat dos equips diferents per tal de demostrar la robustesa del mètode.

### 4.2.1 Idoneïtat del sistema

Els paràmetres estudiats són el factor capacitat, factor cua, nombre de plats teòrics i resolució entre pics. El quadre 41 mostra els resultats experimentals obtinguts pels diferents paràmetres estudiats.

Producte	Factor capacitat	Factor cua	Plats teòrics	Resolució	Temps de retenció
Rifampicina	2,732	1,680	49295	36,41	13,625
Isoniazida	0,068	0,897	3382	-	3,898
Pirazinamida	0,714	1,398	24902	11,04	6,257

Quadre 41. Resultats obtinguts idoneïtat del sistema

Les especificacions establertes tant en la Ph.Eur. (European Pharmacopeia, 2017) com en les monografies de la AEFI (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001) corresponents a la validació de mètodes d'anàlisi són les següents:

*Factor de capacitat:  $\geq 0,5$*

*Factor de cua: 0,8-2*

*Plats teòrics:  $> 2000$*

*Resolució:  $\geq 1$*

Tenint en compte els resultats obtinguts i segons les especificacions establertes, es conclou que tots els paràmetres estudiats són correctes. Destacar que el valor obtingut pel factor de capacitat de la isoniazida és l'únic que no compleix amb l'interval establert, això significa que és una molècula que no es retinguda pel tipus de columna seleccionada, però com



que no s'observa cap interferència a nivell de cromatograma i les particularitats intrínseques de la columna permeten una bona separació dels tres pics, es considera com a fora d'especificació no crítica i es conclou que l'estudi d'idoneïtat dels sistema és correcte.

## 4.2.2 Selectivitat

### 4.2.2.1. Identificació del principi actiu

El quadre 42 mostra els temps de retenció obtinguts per rifampicina, isoniazida i pirazinamida primera matèria i els obtinguts pels estàndards de referència de Ph.Eur.

<b>Principi Actiu</b>	<b>Temps de retenció</b>
Rifampicina estàndard	13,45
Isoniazida estàndard	4,30
Pirazinamida estàndard	6,19
Rifampicina primera matèria	13,43
Isoniazida primera matèria	4,34
Rifampicina primera matèria	6,21

*Quadre 42. Temps de retenció dels principis actius estàndard i primeres matèries*

Les figures 52 i 53 mostren els cromatogrames obtinguts pels estàndards de referència i per les primeres matèries.

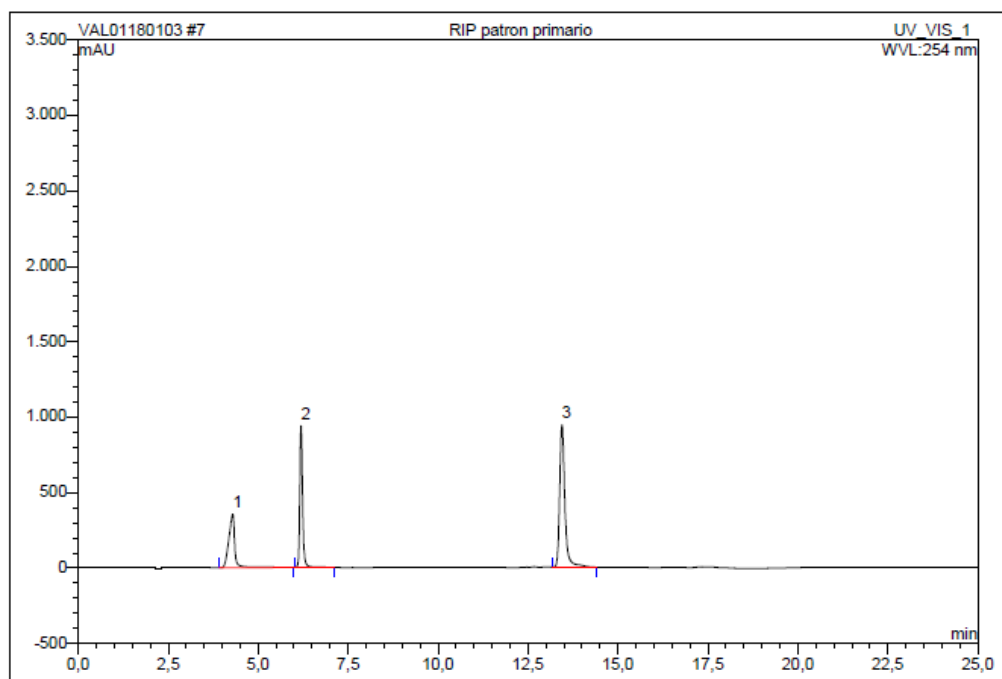


Figura 52. Cromatograma principis actius estàndard

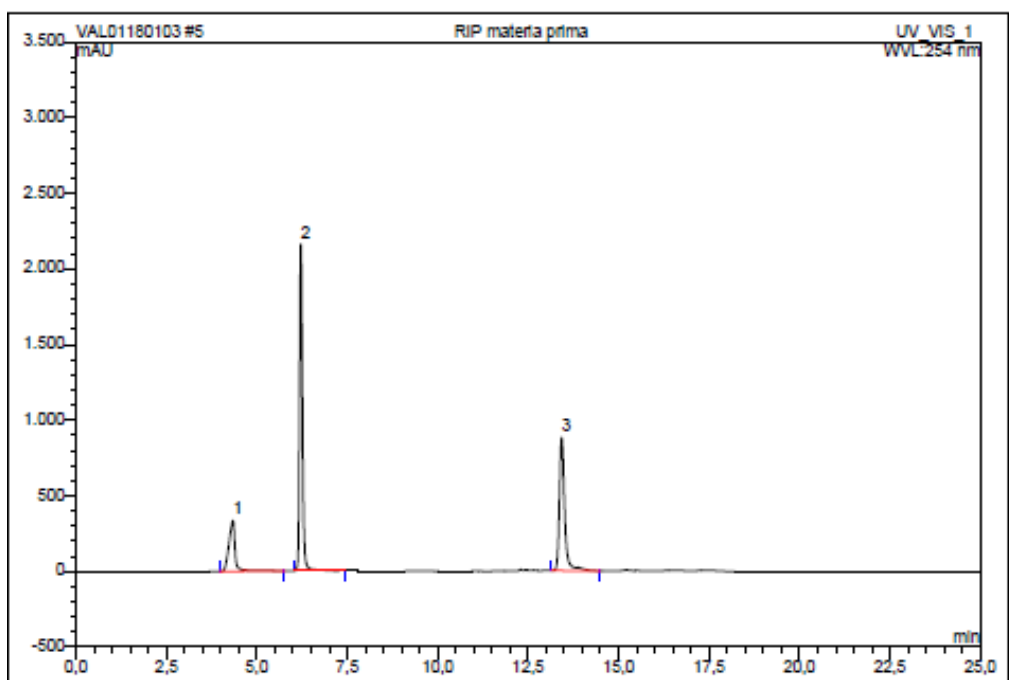


Figura 53. Cromatograma principis actius primeres matèries

Considerant els resultats obtinguts, la identificació dels tres principis actius utilitzats com a primeres matèries respecte als corresponents estàndards de referència de Ph.Eur. és positiva.

#### 4.2.2.2. Absència d'interferència dels excipients de la formulació

La figura 54 i la figura 55 mostren els cromatogrames obtinguts de l'anàlisi del placebo i de l'anàlisi de la solució problema respectivament.

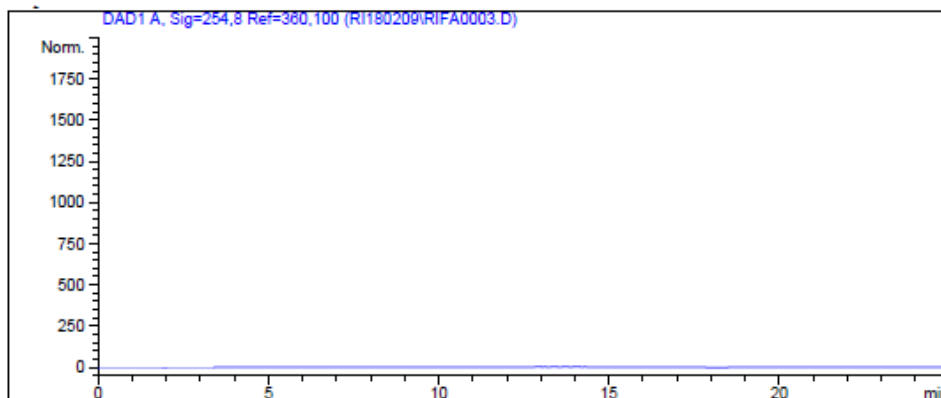


Figura 54. Cromatograma obtingut del placebo

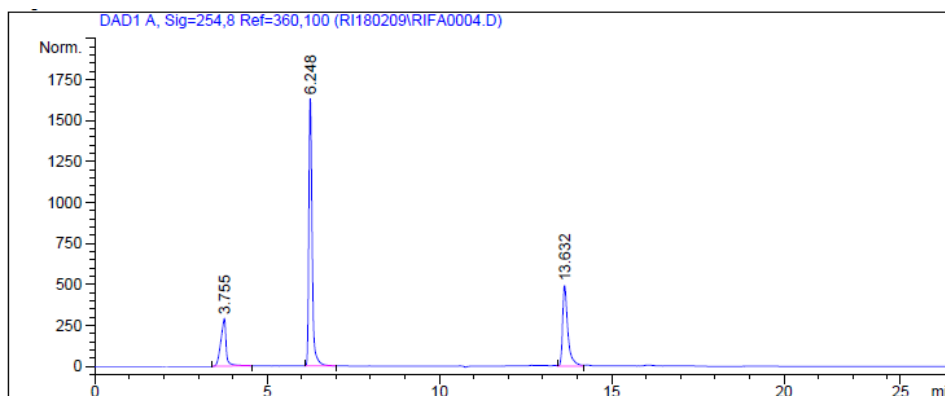


Figura 55. Cromatograma obtingut del placebo i dels principis actius

Les dues figures estan a la mateixa escala, fet que permet comparar-les i concloure que no existeixen interferències per part dels excipients de la formulació respecte als pics de rifampicina, isoniazida i pirazinamida.

#### 4.2.2.3. Absència d'interferència dels dissolvents

La figura 56 i la figura 57 mostren els cromatogrames obtinguts per metanol grau HPLC i solució reguladora respectivament, tots dos dissolvents utilitzats per l'anàlisi dels principis actius.

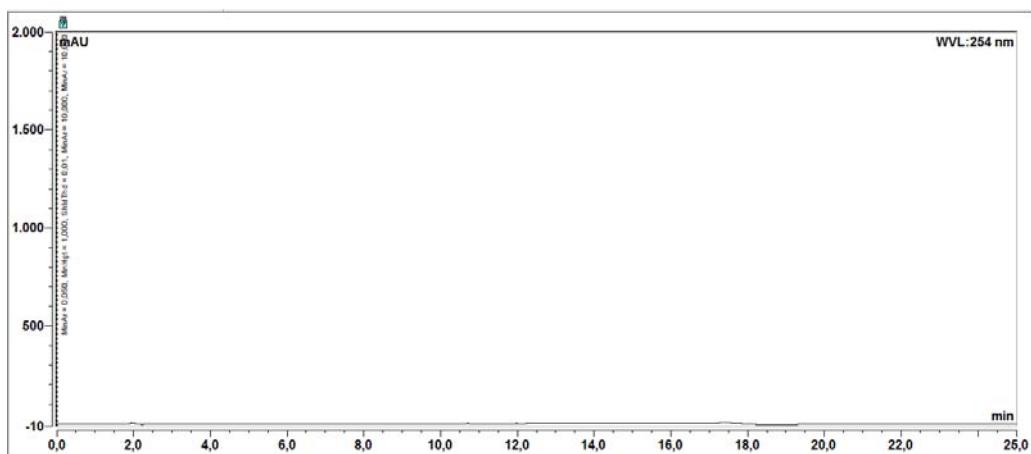


Figura 56. Cromatograma obtingut de l'anàlisi de metanol

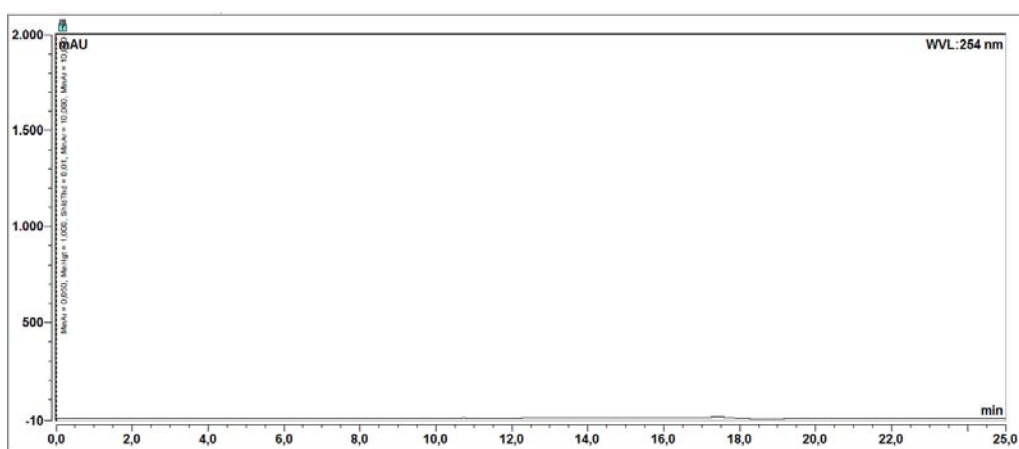


Figura 57. Cromatograma obtingut de l'anàlisi de la solució reguladora

Les dues figures estan a la mateixa escala. Considerant els cromatogrames obtinguts es conclou que no existeixen interferències per part dels dissolvents emprats per l'anàlisi respecte als pics de rifampicina, isoniazida i pirazinamida.

#### 4.2.2.4. Mostres sotmeses a estrès

A continuació es mostren els resultats obtinguts per a cada condició d'estrès a la qual s'han sotmès les mostres problema i les mostres placebo. Les figures 58, 59 i 60 mostren els espectres dels tres principis actius objecte d'estudi obtinguts sota condicions d'estrès, concretament sotmeses a llum IR. La identificació dels pics principals mitjançant els espectres és una eina molt útil en l'anàlisi dels productes de degradació ja que permet identificar i/o descartar pics secundaris.

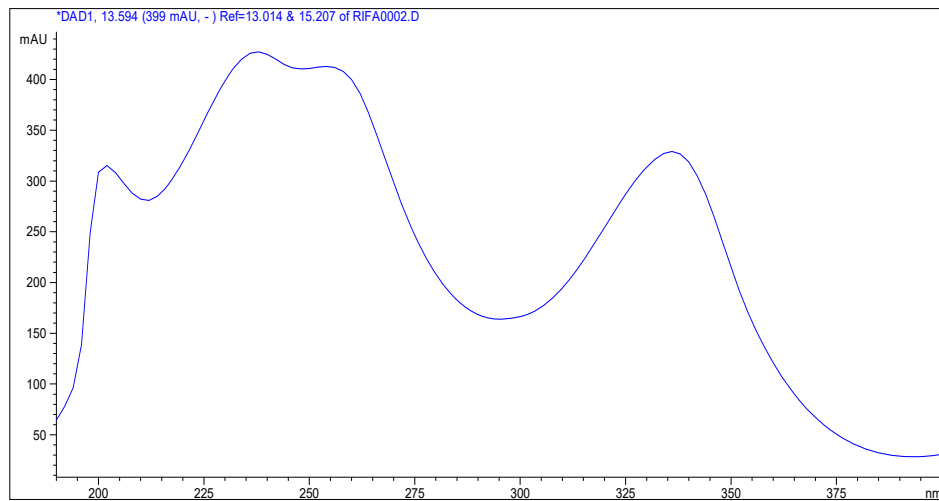


Figura 58. Espectre rifampicina

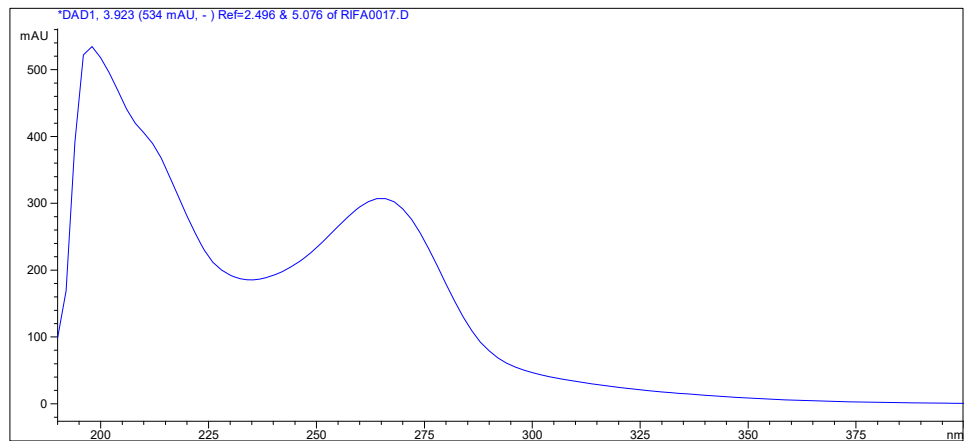


Figura 59. Espectre isoniazida

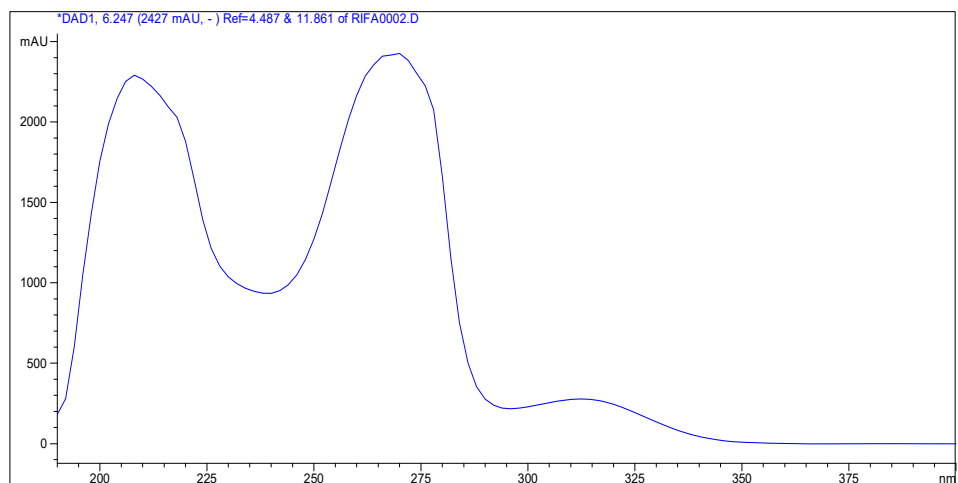


Figura 60. Espectre pirazinamida

## Tractament àcid

La figura 61 mostra el cromatograma obtingut del producte acabat sotmès a condicions àcides. En aquesta figura s'aprecien els pics corresponents als principis actius: rifampicina ( $t_R = 13,597$ ), isoniazida ( $t_R = 3,840$ ) i pirazinamida ( $t_R = 6,247$ ). Alhora també s'observa l'aparició de 4 pics secundaris ( $t_{R1} = 3,154$ ,  $t_{R2} = 3,493$ ,  $t_{R3} = 15,936$  i  $t_{R4} = 16,177$ ). Els dos primers es consideren també isoniazida ja que al observar l'espectre coincideix amb el de la isoniazida en tots dos casos (figura 62), això es degut a que la isoniazida en condicions àcides es dissocia i dona 3 pics. Els altres dos pics ( $t_{R3} = 15,936$  i  $t_{R4} = 16,177$ ) es consideren productes de degradació derivats dels principis actius ja que com s'aprecia a la figura 63, la qual mostra el cromatograma obtingut del placebo sotmès a condicions àcides, no apareix cap pic derivat de la mostra placebo.

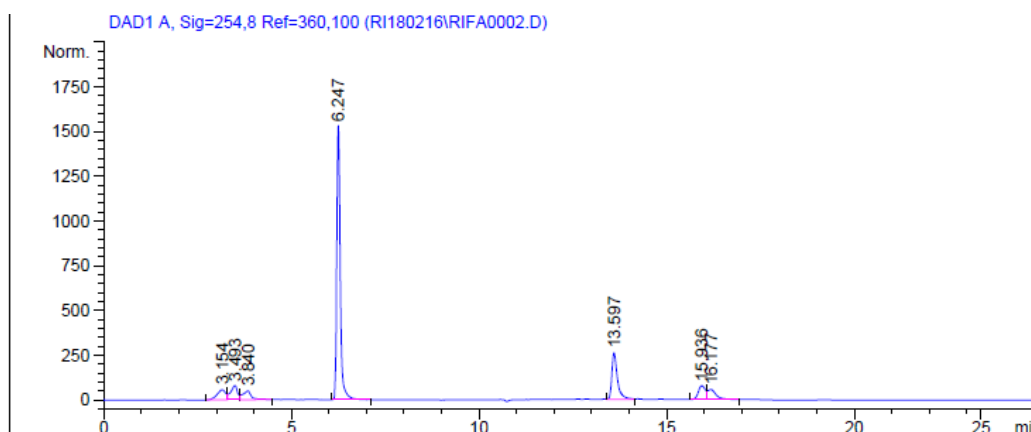


Figura 61. Producte acabat sotmès a condicions àcides

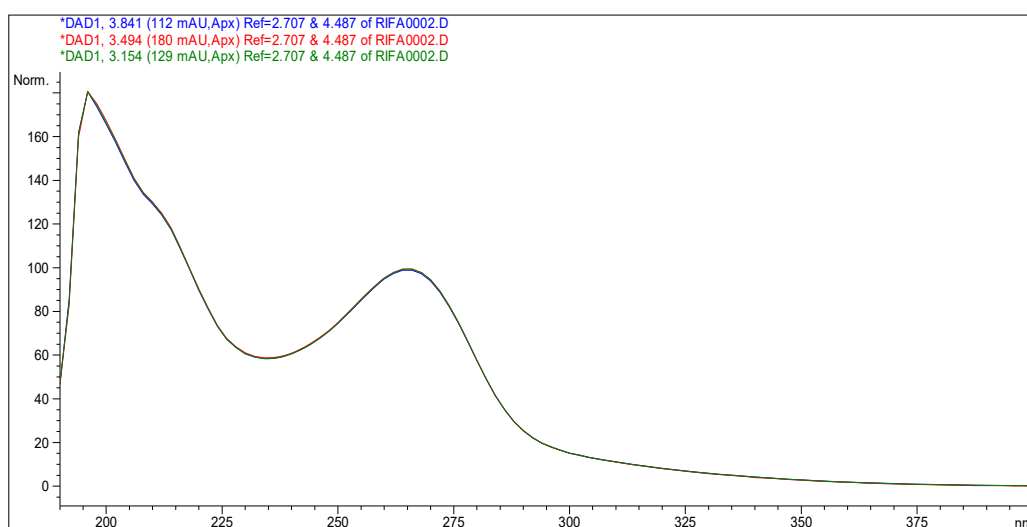


Figura 62. Espectre isoniazida dissociada en condicions àcides

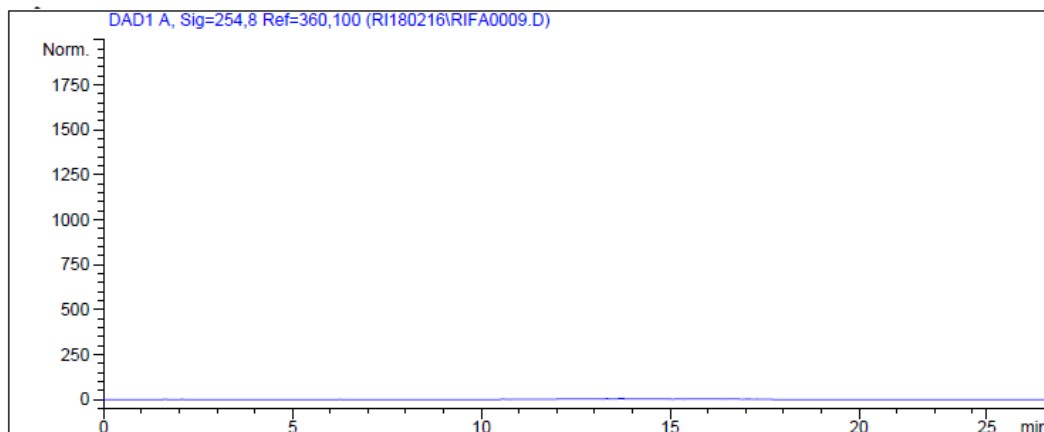


Figura 63. Mostra placebo sotmesa a condicions àcides

### Tractament bàsic

La figura 64 mostra el cromatograma obtingut del producte acabat sotmès a condicions bàsiques. En aquesta figura s'aprecien els pics corresponents als principis actius: rifampicina ( $t_R = 12,839$ ), isoniazida ( $t_R = 4,041$ ) i pirazinamida ( $t_R = 6,243$ ). Alhora també s'observa l'aparició de 2 pics secundaris ( $t_{R1} = 2,057$ ,  $t_{R2} = 13,624$ ). El primer pic secundari ( $t_{R1} = 2,057$ ) no es considera producte de degradació derivat dels principis actius ja que com s'aprecia a la figura 65, la qual mostra el cromatograma obtingut del blanc, apareix també en el blanc. En canvi, el segon pic secundari ( $t_{R2} = 13,624$ ) no apareix ni en el blanc ni en la mostra placebo (figura 66) i per tant es considera com a producte de degradació derivat dels principis actius.

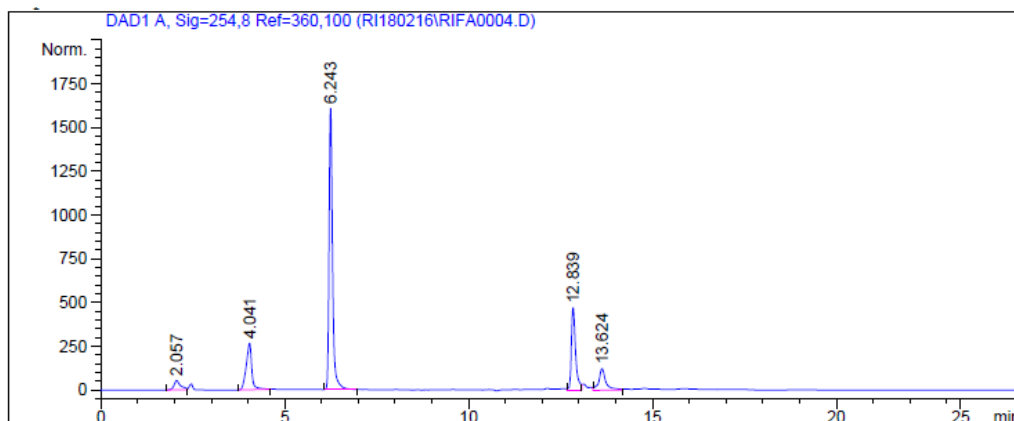


Figura 64. Producte acabat sotmès a condicions bàsiques

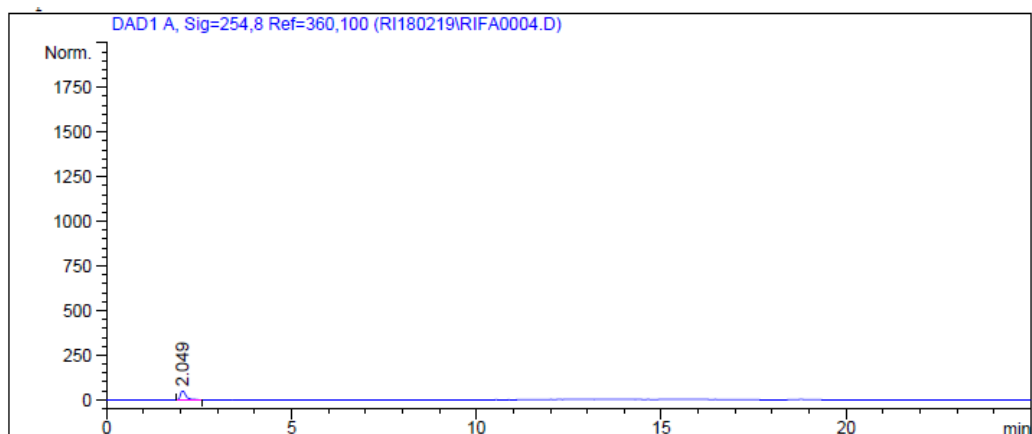


Figura 65. Blanc condicions bàsiques

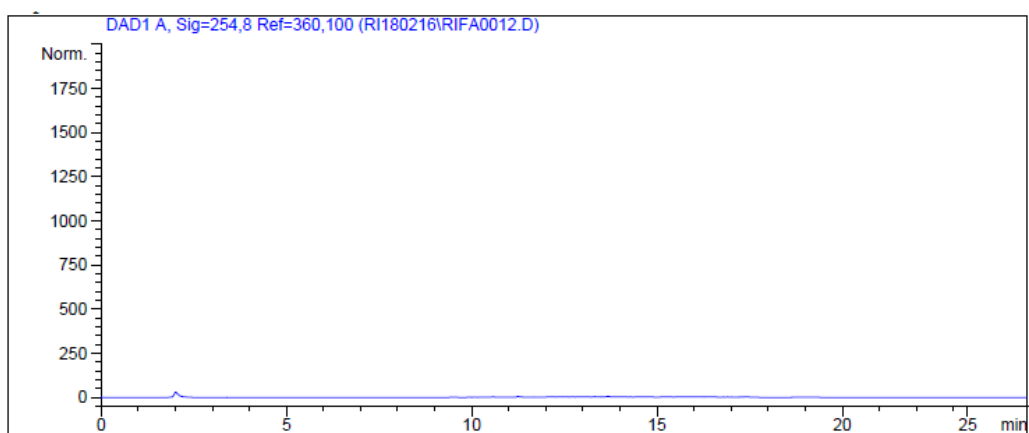


Figura 66. Mostra placebo sotmesa a condicions bàsiques

### Temperatura

La figura 67 mostra el cromatograma obtingut del producte acabat sotmès a temperatura. En aquesta figura s'aprecien únicament els pics de isoniazida ( $t_R = 3,834$ ) i pirazinamida ( $t_R = 6,240$ ), i per tant es dedueix que la rifampicina s'ha degradat amb la temperatura. La isoniazida s'identifica pel seu espectre, el qual es mostra a la figura 68, ja que en el cromatograma s'aprecia un pic molt petit degut a que també ha patit degradació per la temperatura. Alhora també s'observa l'aparició de 3 pics secundaris ( $t_{R1} = 4,850$ ,  $t_{R2} = 8,023$ ,  $t_{R3} = 8,136$ ). Aquests pics es consideren productes de degradació derivats dels principis actius ja que com s'aprecia a la figura 69, la qual mostra el cromatograma obtingut del placebo sotmès a temperatura, no apareix cap pic derivat de la mostra placebo.



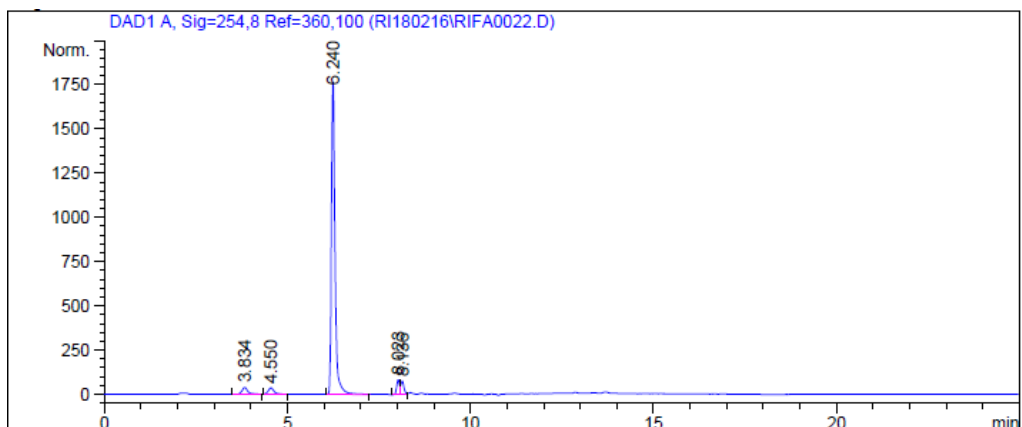


Figura 67. Producte acabat sotmès a temperatura

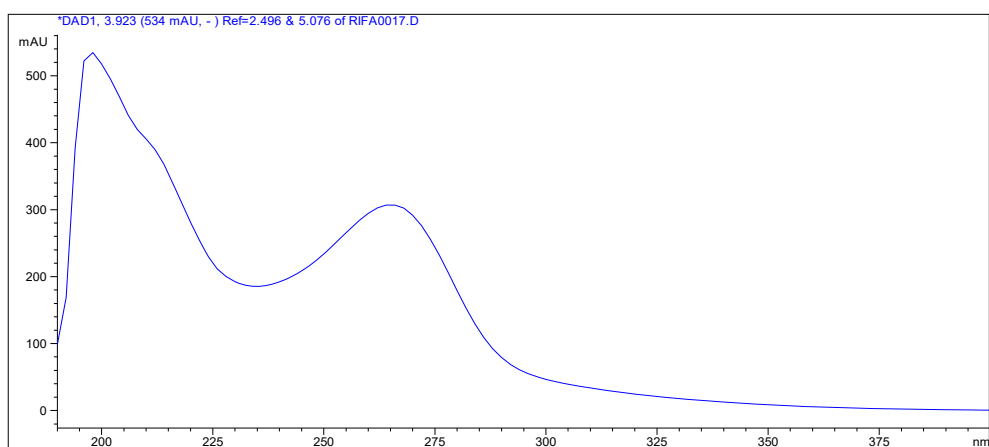


Figura 68. Espectre d'isoniazida sotmesa a condicions de temperatura

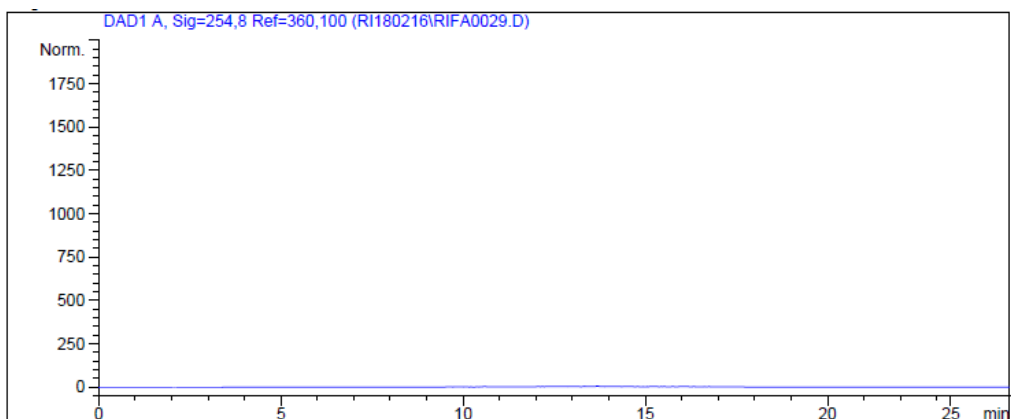


Figura 69. Mostra placebo sotmesa a temperatura

### Tractament oxidant

La figura 70 mostra el cromatograma obtingut del producte acabat sotmès a condicions oxidants. En aquesta figura s'aprecien els pics corresponents als principis actius: rifampicina ( $t_R = 13,621$ ), isoniazida ( $t_R =$

3,901) i pirazinamida ( $t_R= 6,246$ ). Alhora també s'observa l'aparició de 4 pics secundaris ( $t_{R1}= 1,687$  ,  $t_{R2}= 14,690$ ,  $t_{R3}= 14,868$  i  $t_{R4}= 15,811$ ). El primer pic secundari ( $t_{R1}= 1,687$ ) no es considera producte de degradació derivat dels principis actius ja que com s'aprecia a la figura 71, la qual mostra el cromatograma obtingut del blanc, apareix també en el blanc. En canvi, els altres tres pics secundaris no apareixen ni en el blanc ni en la mostra placebo (figura 72) i per tant es consideren com a productes de degradació derivats dels principis actius. Tenint en compte l'espectre dels pics  $t_{R2}= 14,690$ ,  $t_{R3}= 14,868$ , tal i com s'observa a la figura 73, es dedueix que són el mateix producte, per tant sota condicions oxidants s'aprecia l'aparició de dos productes de degradació.

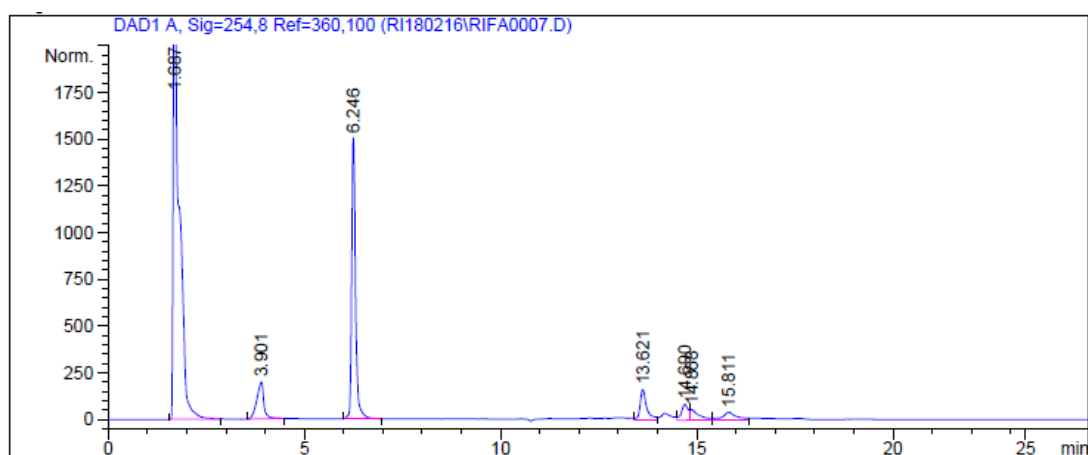


Figura 70. Producte acabat sotmès a condicions oxidants

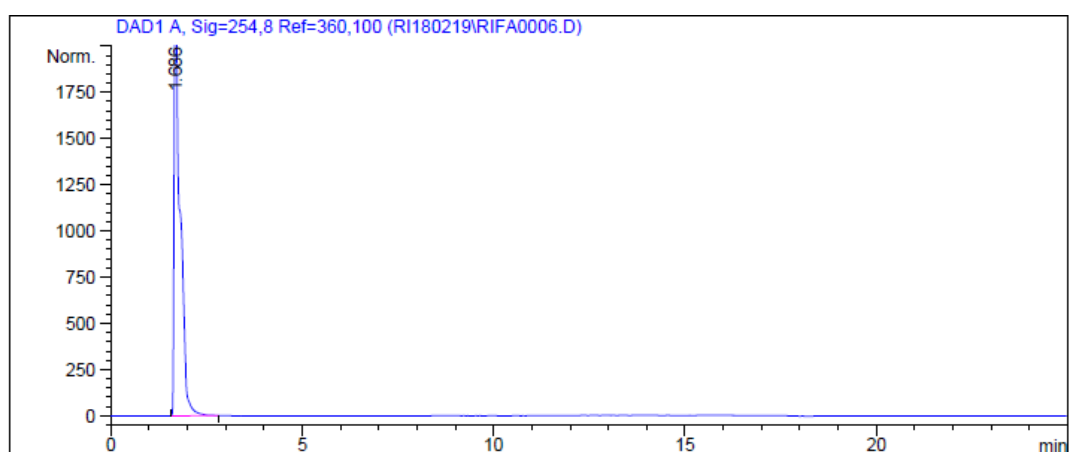


Figura 71. Blanc condicions oxidants

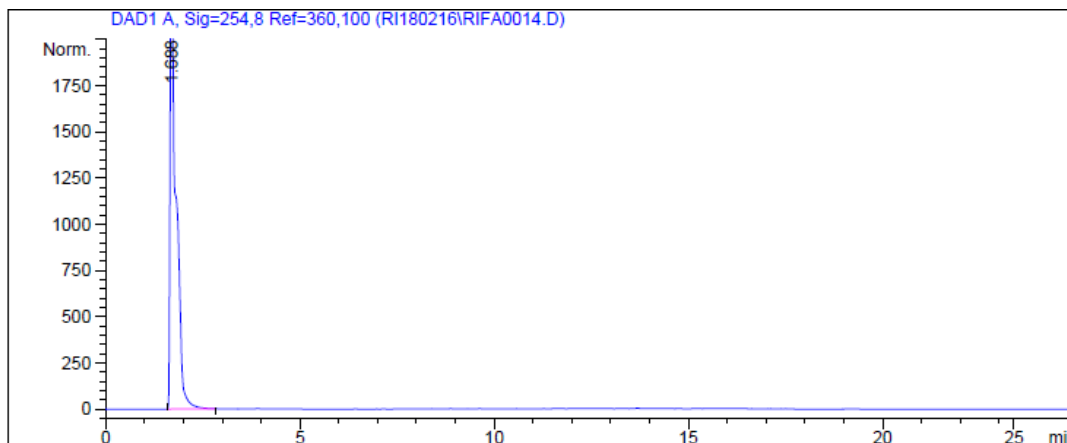


Figura 72. Mostra placebo sotmesa a condicions oxidants

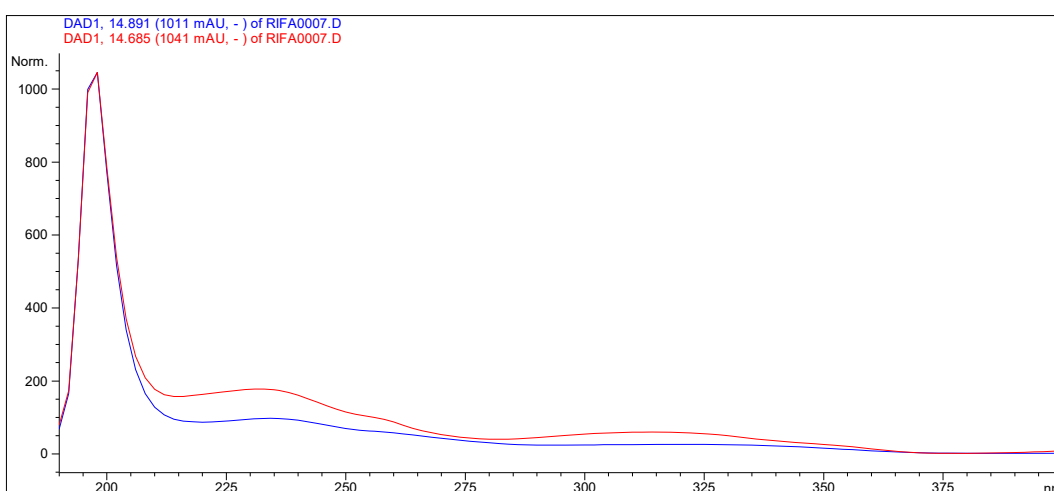


Figura 73. Espectre dels pics  $t_{R2}= 14,690$ ,  $t_{R3}= 14,868$

### Llum IR

La figura 74 mostra el cromatograma obtingut del producte acabat sotmès a llum IR. En aquesta figura s'aprecien els pics corresponents als principis actius: rifampicina ( $t_R= 13,605$ ), isoniazida ( $t_R= 3,925$ ) i pirazinamida ( $t_R= 6,239$ ). Alhora també s'observa l'aparició d'1 pic secundari ( $t_{R1}= 15,731$ ). Aquest pic es consideren producte de degradació derivat dels principis actius ja que com s'aprecia a la figura 75, la qual mostra el cromatograma obtingut del placebo sotmès a llum IR, no apareix cap pic derivat de la mostra placebo.

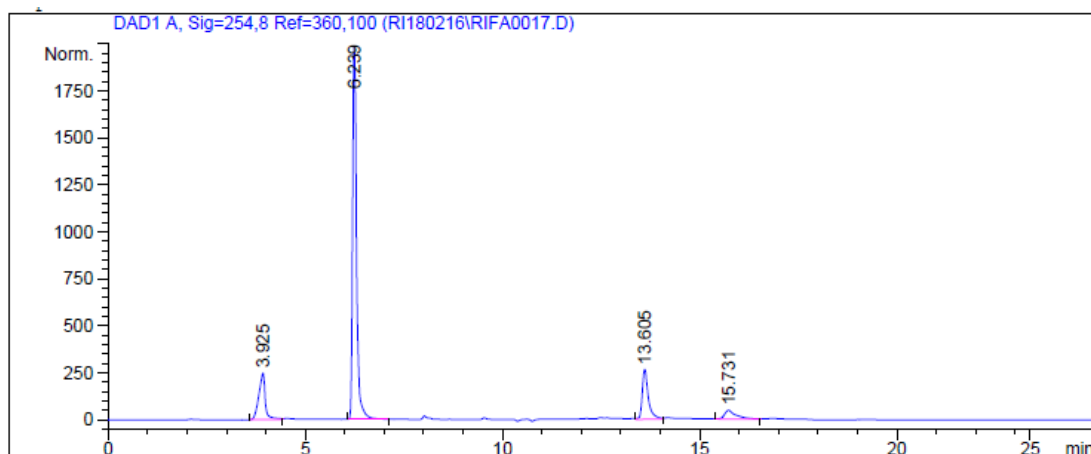


Figura 74. Producte acabat sotmès a llum IR

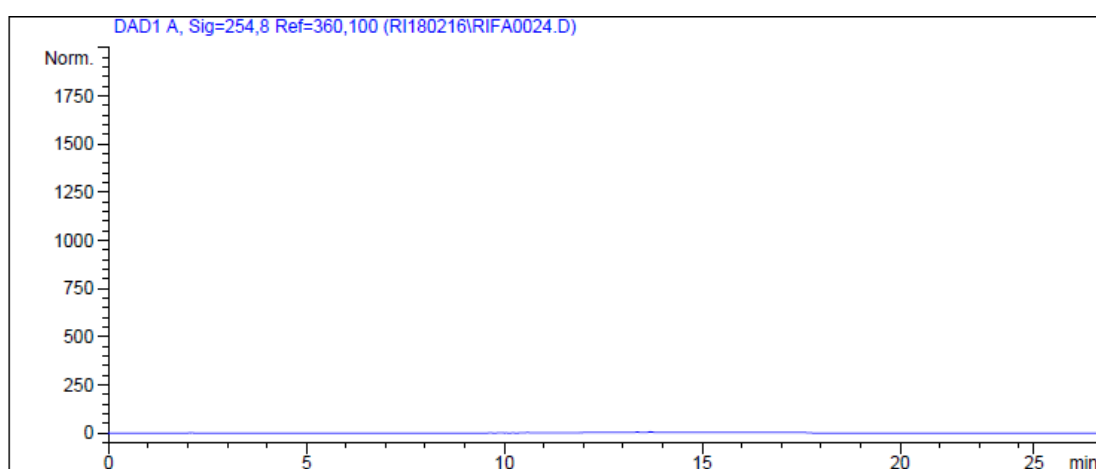


Figura 75. Mostra placebo sotmesa a llum IR

### Llum UV

La figura 76 mostra el cromatograma obtingut del producte acabat sotmès a llum UV. En aquesta figura s'aprecien els pics corresponents als principis actius: rifampicina ( $t_R = 13,599$ ), isoniazida ( $t_R = 3,928$ ) i pirazinamida ( $t_R = 6,238$ ). Alhora també s'observa l'aparició d'un pic secundari ( $t_{R1} = 15,724$ ). Aquest pic es considera producte de degradació derivat dels principis actius ja que com s'aprecia a la figura 77, la qual mostra el cromatograma obtingut del placebo sotmès a llum UV, no apareix cap pic derivat de la mostra placebo.

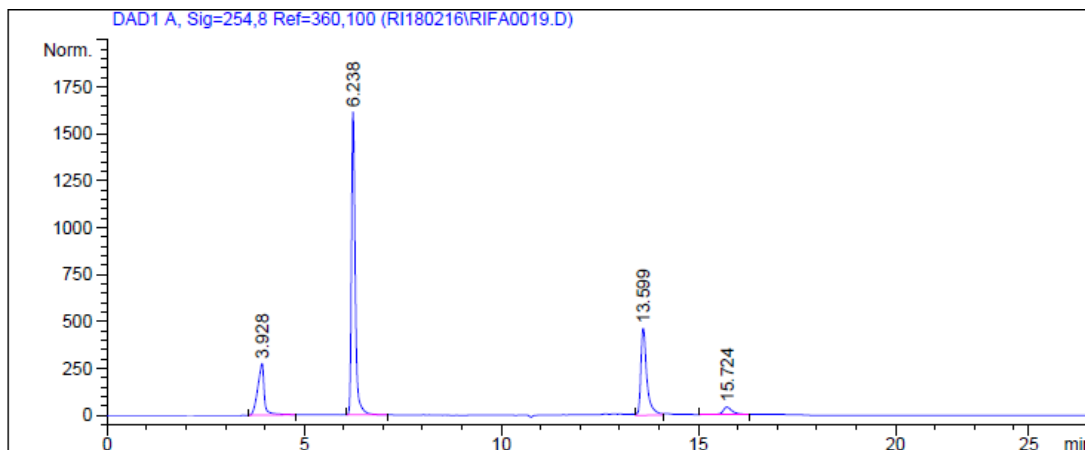


Figura 76. Producte acabat sotmès a llum UV

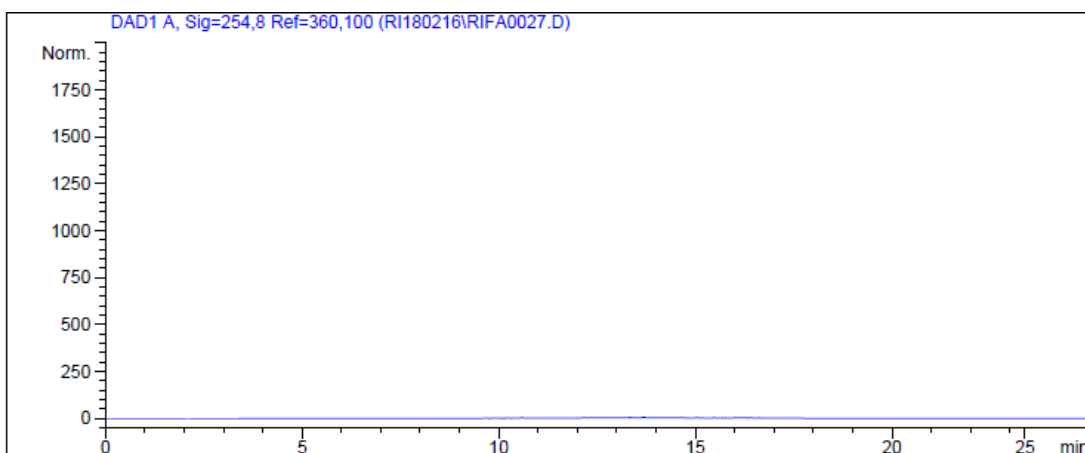


Figura 77. Mostra placebo sotmesa a llum UV

### Llum visible

La figura 78 mostra el cromatograma obtingut del producte acabat sotmès a llum visible. En aquesta figura s'aprecien els pics corresponents als principis actius: rifampicina ( $t_R = 13,617$ ), isoniazida ( $t_R = 3,861$ ) i pirazinamida ( $t_R = 6,234$ ). Alhora també s'observa l'aparició d'1 pic secundari ( $t_{R1} = 16,055$ ). Aquest pic es considera producte de degradació derivat dels principis actius ja que com s'aprecia a la figura 79, la qual mostra el cromatograma obtingut del placebo sotmès a llum visible, no apareix cap pic derivat de la mostra placebo.

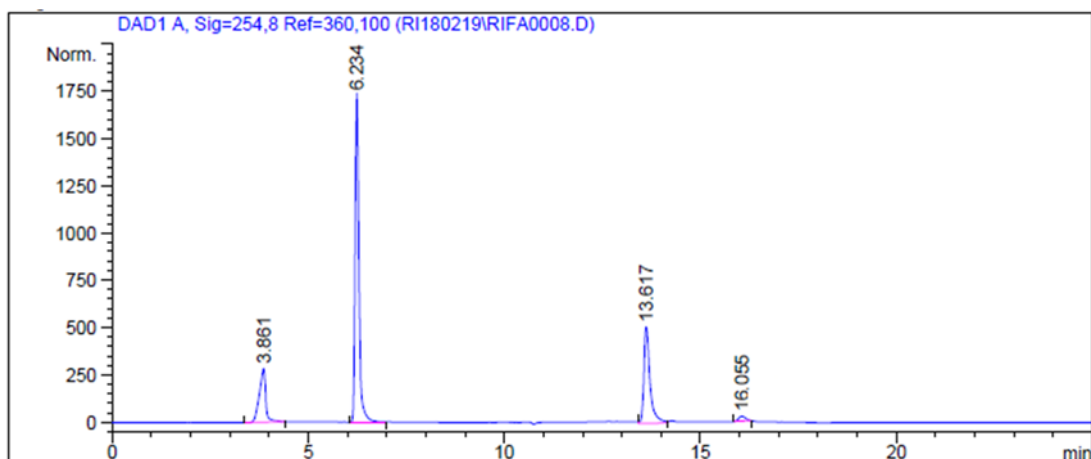


Figura 78. Producte acabat sotmès a llum visible

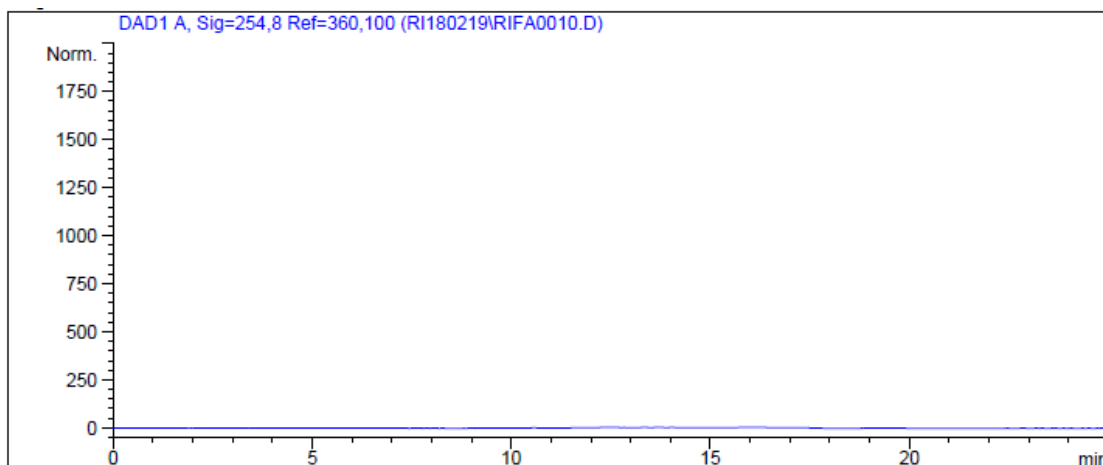


Figura 79. Mostra placebo sotmesa a llum visible

### Conclusions productes de degradació

Segons les dades obtingudes mitjançant la realització dels estudis d'estrès, s'identifiquen 11 productes de degradació. D'aquests 11 es realitza un estudi dels espectres de cadascun d'ells amb la finalitat d'identificar-los, del qual es dedueix que els pics que apareixen a  $t_R=15,936$  en condicions àcides,  $t_R=15,731$  en condicions de llum IR,  $t_R=15,724$  en condicions de llum UV i  $t_R=16,055$  en condicions de llum visible, són el mateix producte. La figura 80 mostra els espectres obtinguts del producte en condicions àcides, de llum IR, de llum UV i de llum visible, on s'observa que l'espectre obtingut per a cada condició és el mateix i per tant es tracta d'un únic producte. En el cas del visible (línia de color blau) s'aprecien petites diferències en l'espectre, però són degudes a la baixa concentració en la qual es troba el producte.

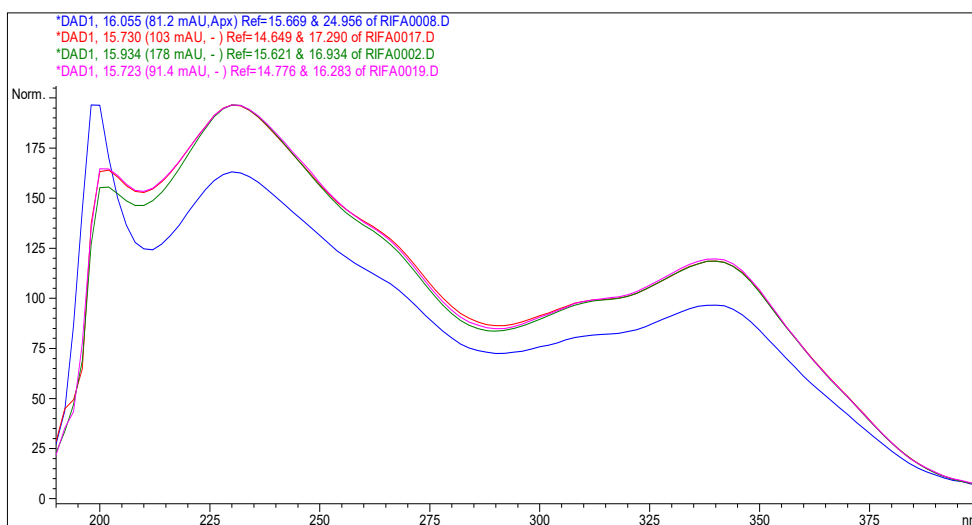


Figura 80. Espectres obtinguts del producte en condicions àcides, de llum IR, de llum UV i de llum visible

Per tant, considerant les dades obtingudes, s'identifiquen 8 productes de degradació per la suspensió de rifampicina, isoniazida i pirazinamida, no interferint cap d'ells en els senyals cromatogràfics de cap dels fàrmacs, per la qual cosa es pot afirmar que el mètode analític és selectiu.

#### 4.2.3 Linealitat

La relació de linealitat obtinguda entre les àrees dels pics de rifampicina, isoniazida i pirazinamida i les concentracions corresponents es representa mitjançant l'equació de la recta de regressió. Les dades obtingudes s'analitzen a través de l'estudi estadístic dels valors resultants.

##### Rifampicina

El quadre 43 mostra els resultats estadístics dels valors de la linealitat total per rifampicina (linealitat mitjana de 3 linealitats individuals).

<b>RIFAMPICINA Linealitat total</b>		
<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (Y/X)</b>
263,800	197,34	0,75
240,600	181,22	0,75
220,000	164,91	0,75
201,900	153,13	0,76
179,000	133,64	0,75
160,000	120,10	0,75
141,900	105,26	0,74
261,600	196,22	0,75
241,000	181,90	0,75
219,300	168,63	0,77
200,800	150,91	0,75
180,000	133,65	0,74
160,600	120,22	0,75
140,400	104,75	0,75
260,4	194,87	0,75
240,8	181,82	0,76
219,1	165,16	0,75
200	151,20	0,76
179	133,65	0,75
159,8	118,70	0,74
140,1	104,44	0,75
<b>Coef. De correlació R</b>	0,9993	
<b>Coef. De determinació R<sup>2</sup></b>	0,9987	<b>Mitjana: 0,75</b>
<b>Pendent</b>	0,7619	<b>S.D: 0,01</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-2,197	<b>RSD: 0,83 %</b>

Quadre 43. Resultats estadístics linealitat total rifampicina



L'equació de la recta obtinguda és la següent:

$$Y = 0,7619 X - 2,197$$

Prenent com a criteris d'acceptació: *RSD factor resposta* < 2 %

$$R > 0,995$$

Els resultats obtinguts compleixen.

La figura 81 mostra la recta de regressió ajustada per l'equació obtinguda.

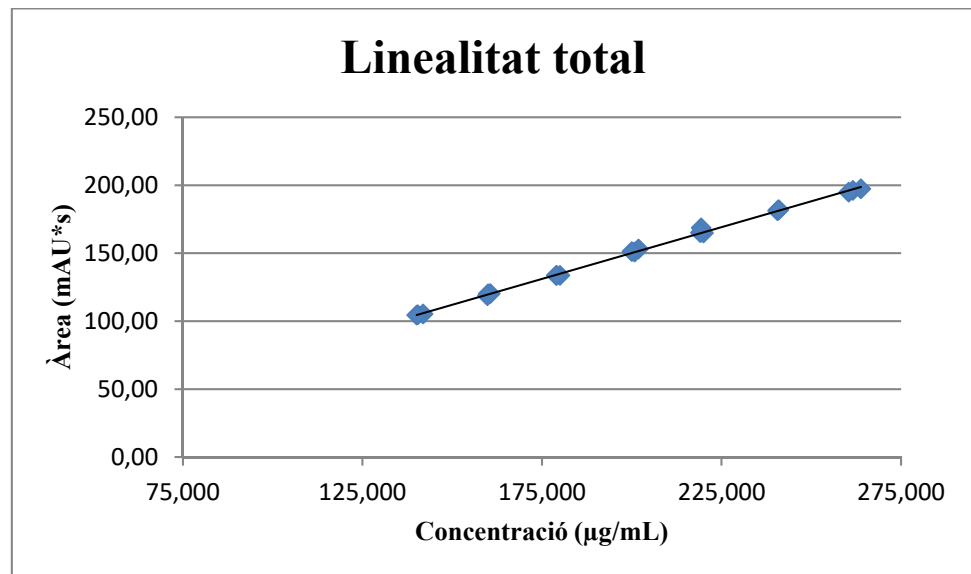


Figura 81. Corba de regressió ajustada

La figura 82 mostra el tractament estadístic aplicat per a la linealitat total.

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99933261
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99866566
R <sup>2</sup> ajustado	0,99859543
Error típico	1,18180756
Observaciones	21

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	19860,93487	19860,93487	14220,21501	8,85433E-29
Resíduos	19	26,53671286	1,396669098		
Total	20	19887,47159			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-2,1969898	1,306684262	-1,681347088	0,109060218	-4,931911371	0,537931813	-4,931911371	0,537931813
Variable X 1	0,76194408	0,006389546	119,248543	8,85433E-29	0,748570609	0,775317557	0,748570609	0,775317557

Figura 82. Tractament estadístic de les dades

El coeficient de correlació obtingut ( $R= 0,9993$ ), indica que existeix una elevada correlació entre la concentració assajada i la resposta obtinguda, fet que permet concloure que la relació lineal és bona. De l'anàlisi de variància també es pot deduir que hi ha una bona proporcionalitat entre els resultats obtinguts, ja que el valor de  $f$  és molt superior al valor obtingut per a  $f$  teòrica i per tant es compleix la hipòtesi de que els resultats presenten diferències entre ells. Per altra banda, els valors de confiança de la intercepció inclouen el valor 0, la qual cosa és un resultat molt significatiu, ja que permet establir l'ús d'un patró al 100% en la rutina analítica. Aquestes conclusions apliquen tant a l'anàlisi de la linealitat total com a l'anàlisi individual de cada linealitat. Amb tot això es pot concloure que la metodologia analítica proposada per l'anàlisi de rifampicina és lineal.

A tall d'exemple, a les figures 83 a 89 es mostren els cromatogrames obtinguts en l'estudi de la linealitat 1 per rifampicina, on s'observa l'augment d'àrea i intensitat dels pics a mesura que la concentració de l'analit va augmentant.

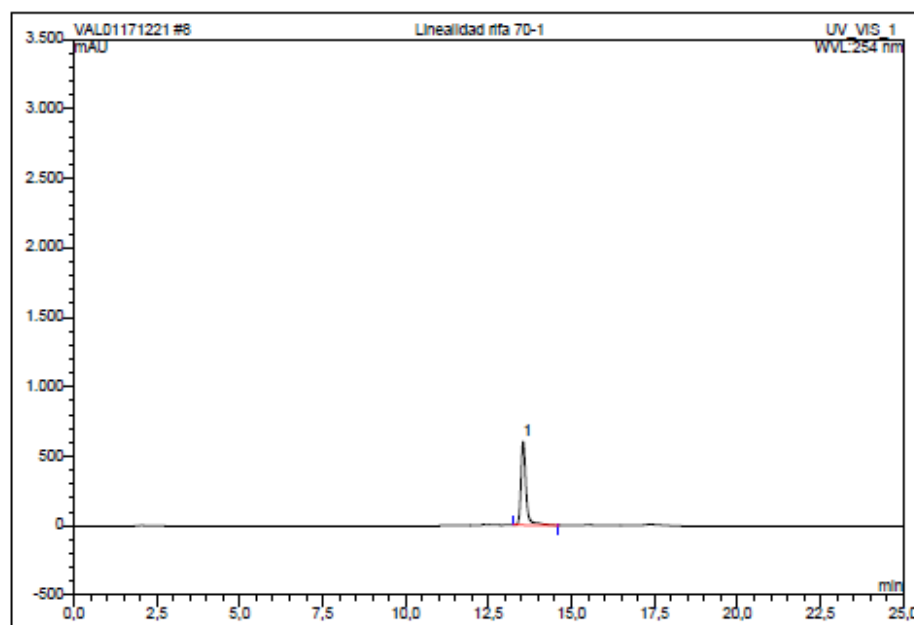


Figura 83. Linealitat rifampicina 70%

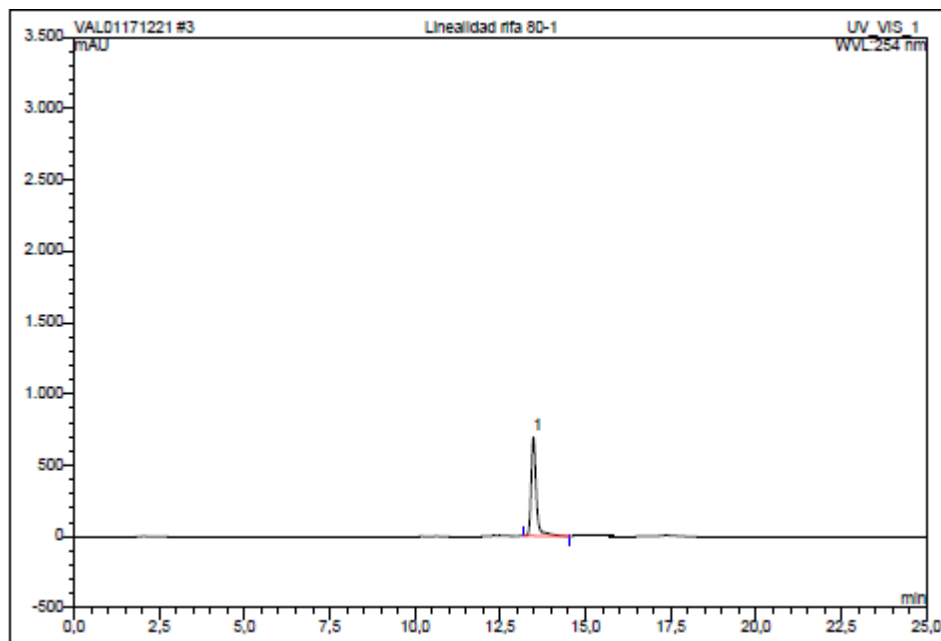


Figura 84. Linealitat rifampicina 80%

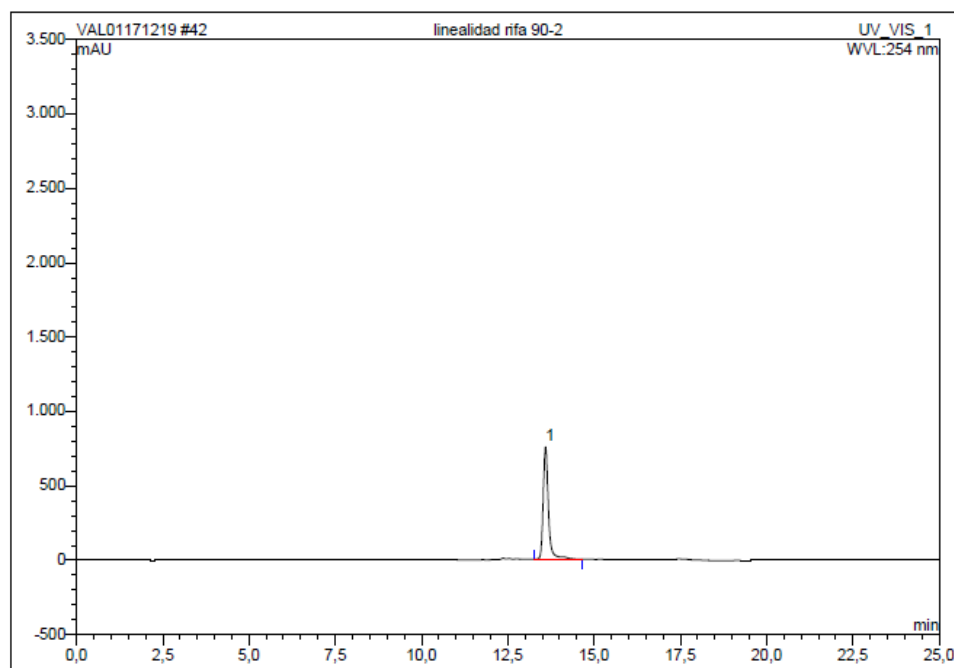


Figura 85. Linealitat rifampicina 90%

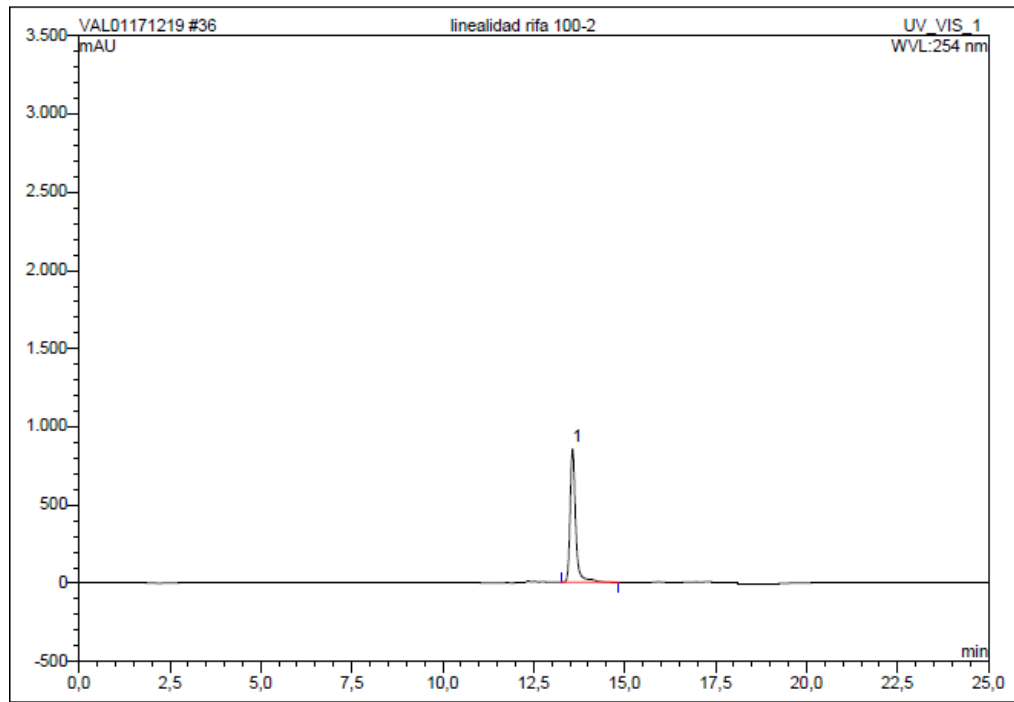


Figura 86. Linealitat rifampicina 100%

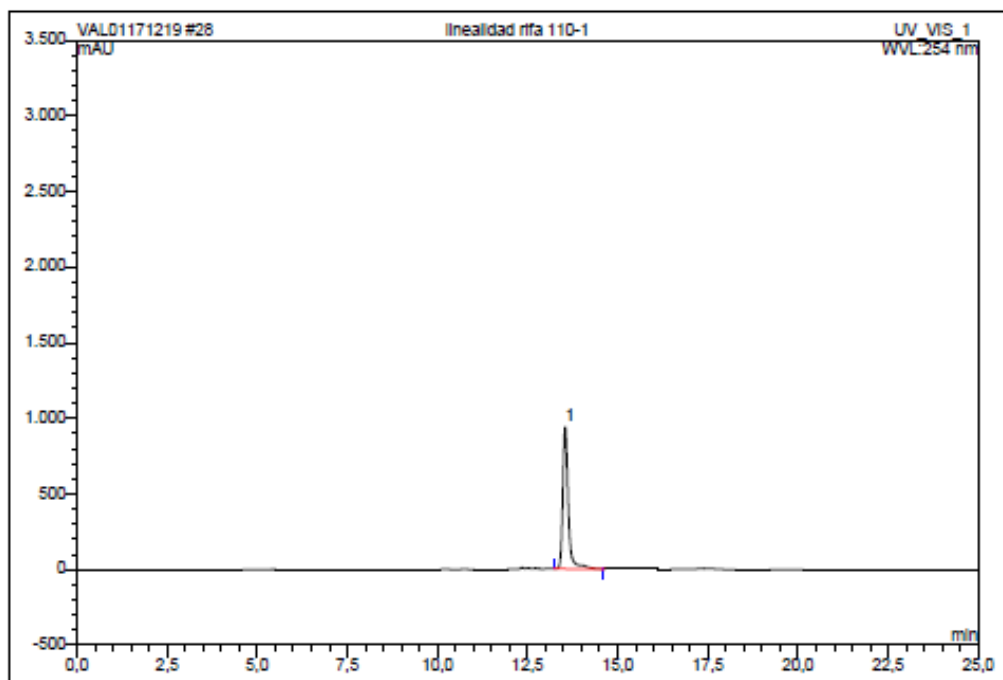


Figura 87. Linealitat rifampicina 110%

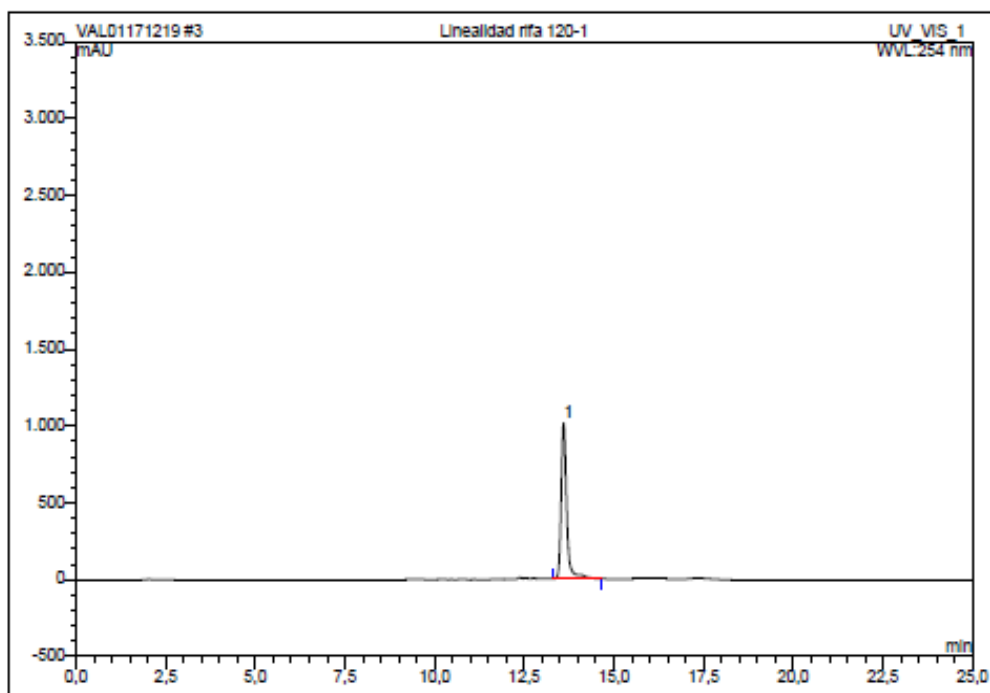


Figura 88. Linealitat rifampicina 120%

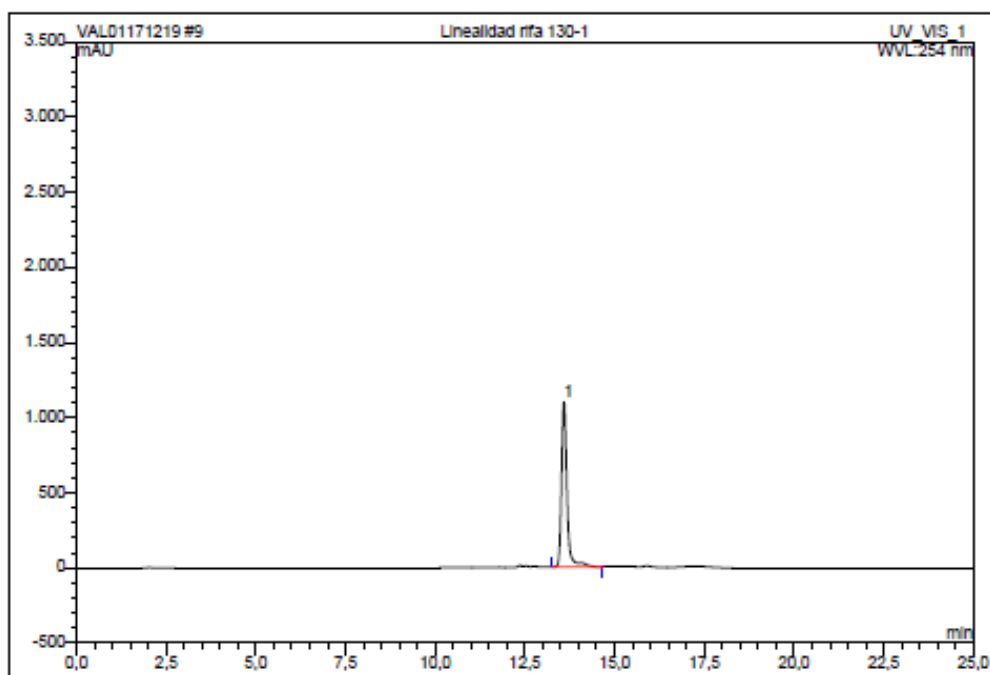


Figura 89. Linealitat rifampicina 130%

### Linealitat 1

El quadre 44 mostra els resultats estadístics dels valors de la linealitat 1 per rifampicina.

<b>RIFAMPICINA linealitat 1</b>		
<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (Y/X)</b>
263,800	197,34	0,75
240,600	181,22	0,75
220,000	164,91	0,75
201,900	153,13	0,76
179,000	133,64	0,75
160,000	120,10	0,75
141,900	105,26	0,74
<b>Coef. De correlació R</b>	0,9996	
<b>Coef. De determinació R<sup>2</sup></b>	0,9992	<b>Mitjana: 0,75</b>
<b>Pendent</b>	0,7566	<b>S.D: 0,01</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-1,3071	<b>RSD: 0,70 %</b>

Quadre 44. Resultats estadístics linealitat 1 rifampicina

L'equació de la recta obtinguda és la següent:

$$Y = 0,7566 X - 1,3071$$

Prenent com a criteris d'acceptació: *RSD factor resposta* < 2 %

$$R > 0,995$$

Els resultats obtinguts compleixen.

La figura 90 mostra la recta de regressió ajustada per l'equació obtinguda.

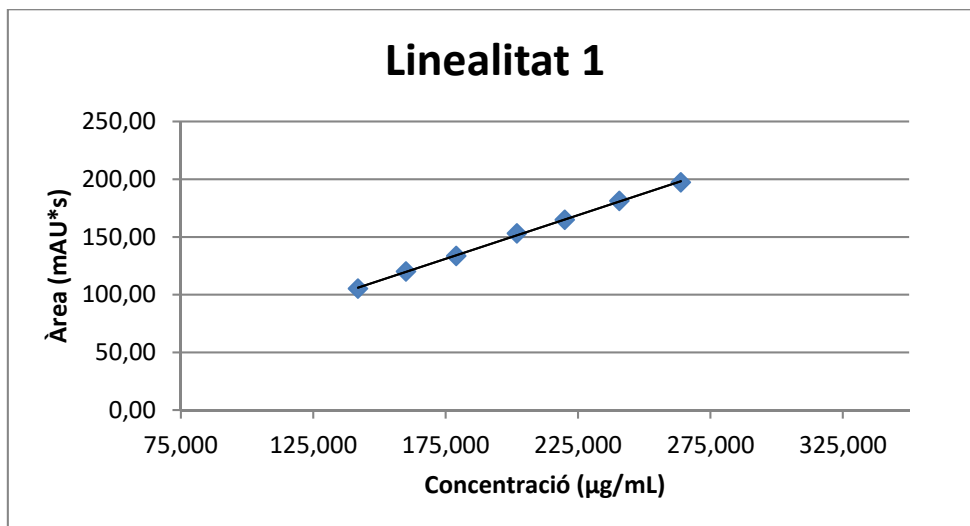


Figura 90. Corba de regressió ajustada

La figura 91 mostra el tractament estadístic aplicat per a la linealitat 1.

Resumen

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999621
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,9992422
R <sup>2</sup> ajustado	0,9990907
Error típico	1,0006539
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	6602,03762	6602,03762	6593,412086	5,3681E-09
Residuos	5	5,00654102	1,0013082		
Total	6	6607,04416			

	Coefficiente s	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-1,3071	1,91105306	-0,6839685	0,524399766	-6,21961837	3,60541818	-6,21961837	3,60541818
Variable X 1	0,7566481	0,00931835	81,1998281	5,36813E-09	0,73269452	0,78060167	0,73269452	0,78060167

Figura 91. Tractament estadístic de les dades

Linealitat 2

El quadre 45 mostra els resultats estadístics dels valors de la linealitat 2 per rifampicina.

<b>RIFAMPICINA linealitat 2</b>		
<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (Y/X)</b>
261,600	196,22	0,75
241,000	181,90	0,75
219,300	168,63	0,77
200,800	150,91	0,75
180,000	133,65	0,74
160,600	120,22	0,75
140,400	104,75	0,75
<b>Coef. De correlació R</b>	0,9988	
<b>Coef. De determinació R<sup>2</sup></b>	0,9976	<b>Mitjana: 0,75</b>
<b>Pendent</b>	0,7672	<b>S.D: 0,01</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-2,9453	<b>RSD: 1,13 %</b>

Quadre 45. Resultats estadístics linealitat 2 rifampicina

L'equació de la recta obtinguda és la següent:

$$Y = 0,7672 X - 2,9453$$

Prenent com a criteris d'acceptació: *RSD factor resposta* < 2 %

$$R > 0,995$$

Els resultats obtinguts compleixen.

La figura 92 mostra la recta de regressió ajustada per l'equació obtinguda.



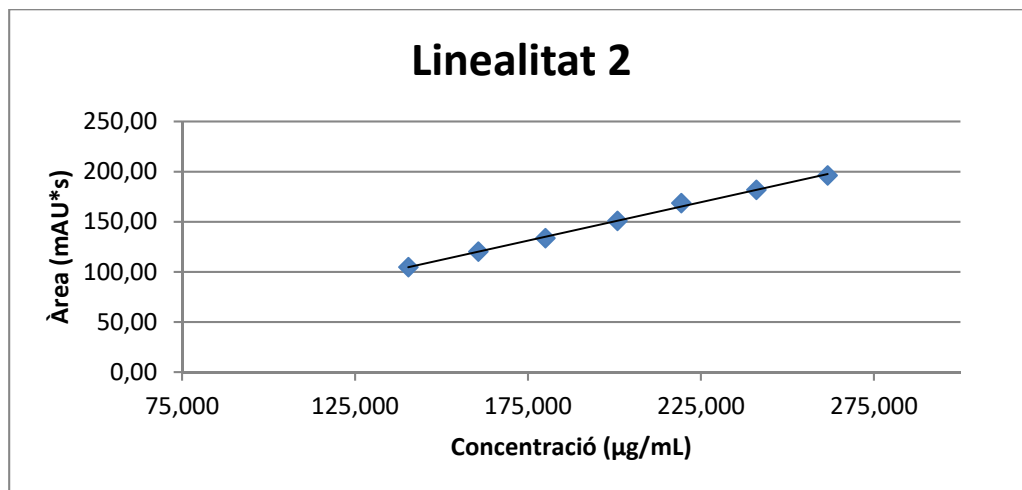


Figura 92. Corba de regressió ajustada

La figura 93 mostra el tractament estadístic aplicat per a la linealitat 2.

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99882577
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99765292
R <sup>2</sup> ajustado	0,99718351
Error típico	1,77300806
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	6681,0365	6681,0365	2125,310684	9,069E-08
Residuos	5	15,7177879	3,14355757		
Total	6	6696,75429			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-2,94533127	3,40368944	-0,8653349	0,426415808	-11,6947935	5,80413098	-11,6947935	5,80413098
Variable X 1	0,76718481	0,01664136	46,101092	9,06903E-08	0,72440684	0,80996279	0,72440684	0,80996279

Figura 93. Tractament estadístic de les dades

### Linealitat 3

El quadre 46 mostra els resultats estadístics dels valors de la linealitat 3 per rifampicina.

<b>RIFAMPICINA linealitat 3</b>		
<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (Y/X)</b>
260,400	194,87	0,75
240,800	181,82	0,76
219,100	165,16	0,75
200,000	151,20	0,76
179,000	133,65	0,75
159,800	118,70	0,74
140,100	104,44	0,75
<b>Coef. De correlació R</b>	0,9997	
<b>Coef. De determinació R<sup>2</sup></b>	0,9994	<b>Mitjana: 0,75</b>
<b>Pendent</b>	0,7621	<b>S.D: 0,01</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-2,3534	<b>RSD: 0,69 %</b>

Quadre 46. Resultats estadístics linealitat 3 rifampicina

L'equació de la recta obtinguda és la següent:

$$Y = 0,7621 X - 2,3534$$

Prenent com a criteris d'acceptació: *RSD factor resposta* < 2 %

$$R > 0,995$$

Els resultats obtinguts compleixen.

La figura 94 mostra la recta de regressió ajustada per l'equació obtinguda.

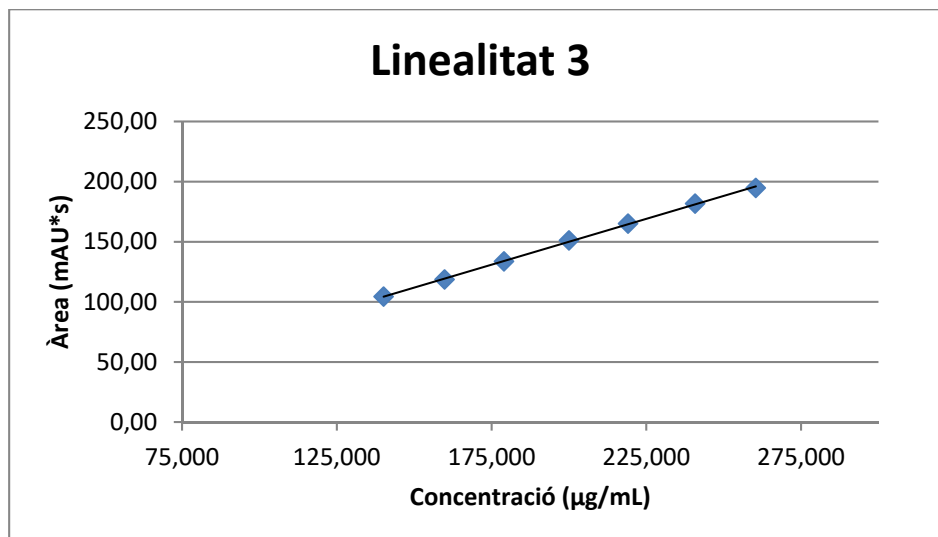


Figura 94. Corba de regressió ajustada

La figura 95 mostra el tractament estadístic aplicat per a la linealitat 3.

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9996802
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,9993605
R <sup>2</sup> ajustado	0,9992326
Error típico	0,91738303
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de	F	Valor crítico
			los cuadrados		de F
Regresión	1	6575,88394	6575,88394	7813,627994	3,5122E-09
Residuos	5	4,20795816	0,84159163		
Total	6	6580,0919			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior	Superior	Inferior	Superior
					95%	95%	95,0%	95,0%
Intercepción	-2,35338862	1,75783329	-1,33880081	0,238277913	-6,87204294	2,16526569	-6,87204294	2,16526569
Variable X 1	0,76208706	0,00862141	88,3947283	3,51218E-09	0,73992503	0,7842491	0,73992503	0,7842491

Figura 95. Tractament estadístic de les dades

### Isoniazida

El quadre 47 mostra els resultats estadístics dels valors de la linealitat total per isoniazida (linealitat mitjana de 3 linealitats individuals).

<b>ISONIAZIDA Linealitat total</b>		
<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (Y/X)</b>
171,700	93,82	0,55
160,900	86,05	0,53
145,600	77,58	0,53
132,500	70,18	0,53
119,500	63,94	0,54
107,100	57,47	0,54
92,700	48,19	0,52
176,400	94,67	0,54
161,700	87,07	0,54
145,000	78,41	0,54
132,400	70,28	0,53
117,800	63,96	0,54
107,500	58,20	0,54
93,100	49,33	0,53
173,600	92,11	0,53
160,000	84,05	0,53
144,900	76,59	0,53
132,800	71,66	0,54
118,900	62,73	0,53
106,000	55,05	0,52
93,700	49,60	0,53
<b>Coef. De correlació R</b>	0,9983	
<b>Coef. De determinació R<sup>2</sup></b>	0,9966	<b>Mitjana: 0,53</b>
<b>Pendent</b>	0,5445	<b>S.D: 0,01</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-1,4368	<b>RSD: 1,35 %</b>

Quadre 47. Resultats estadístics linealitat total isoniazida

L'equació de la recta obtinguda és la següent:

$$Y = 0,5445 X - 1,4368$$

Prenent com a criteris d'acceptació: *RSD factor resposta* < 2 %

$$R > 0,995$$

Els resultats obtinguts compleixen.

La figura 96 mostra la recta de regressió ajustada per l'equació obtinguda.

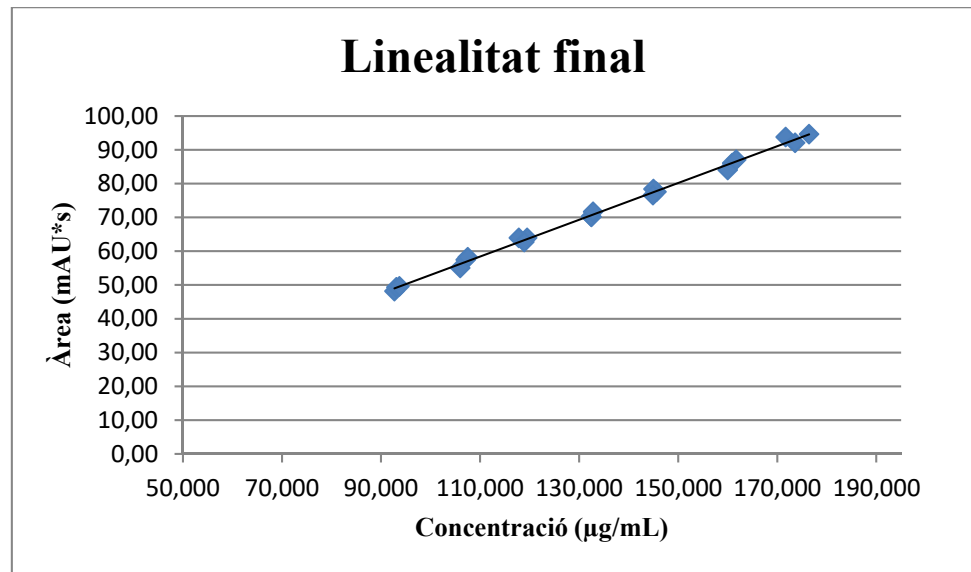


Figura 96. Corba de regressió ajustada

La figura 97 mostra el tractament estadístic aplicat per a la linealitat total.

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99829289
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99658869
R <sup>2</sup> ajustado	0,99640915
Error típico	0,90181383
Observaciones	21

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	4514,21472	4514,21472	5550,70862	6,6111E-25
Residuos	19	15,4520955	0,81326818		
Total	20	4529,66682			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-1,4368016	0,99193801	-1,44847922	0,163785831	-3,51295173	0,63934853	-3,51295173	0,63934853
Variable X 1	0,54445659	0,00730784	74,5030779	6,6111E-25	0,52916111	0,55975208	0,52916111	0,55975208

Figura 97. Tractament estadístic de les dades

El coeficient de correlació obtingut ( $R= 0,9985$ ) indica que existeix una elevada correlació entre la concentració assajada i la resposta obtinguda, fet que permet concloure que la relació lineal és bona. De l'anàlisi de variància també es pot deduir que hi ha una bona proporcionalitat entre els resultats obtinguts, ja que el valor de  $f$  és molt superior al valor obtingut per a  $f$  teòrica i per tant es compleix la hipòtesi de que els resultats presenten diferències entre ells. Per altra banda, els valors de confiança de la intercepció inclouen el valor 0, la qual cosa és resultat molt significatiu, ja que permet establir l'ús d'un patró al 100% en la rutina analítica. Aquestes conclusions apliquen tant a l'anàlisi de la linealitat total com a l'anàlisi individual de cada linealitat. Amb tot això es pot concloure que la metodica analítica proposada per l'anàlisi d'isoniazida és lineal.

A tall d'exemple, a les figures 98 a 104 es mostren els cromatogrames obtinguts en l'estudi de la linealitat 1 per isoniazida, on s'observa l'augment d'àrea i intensitat dels pics a mesura que la concentració de l'analit va augmentant.

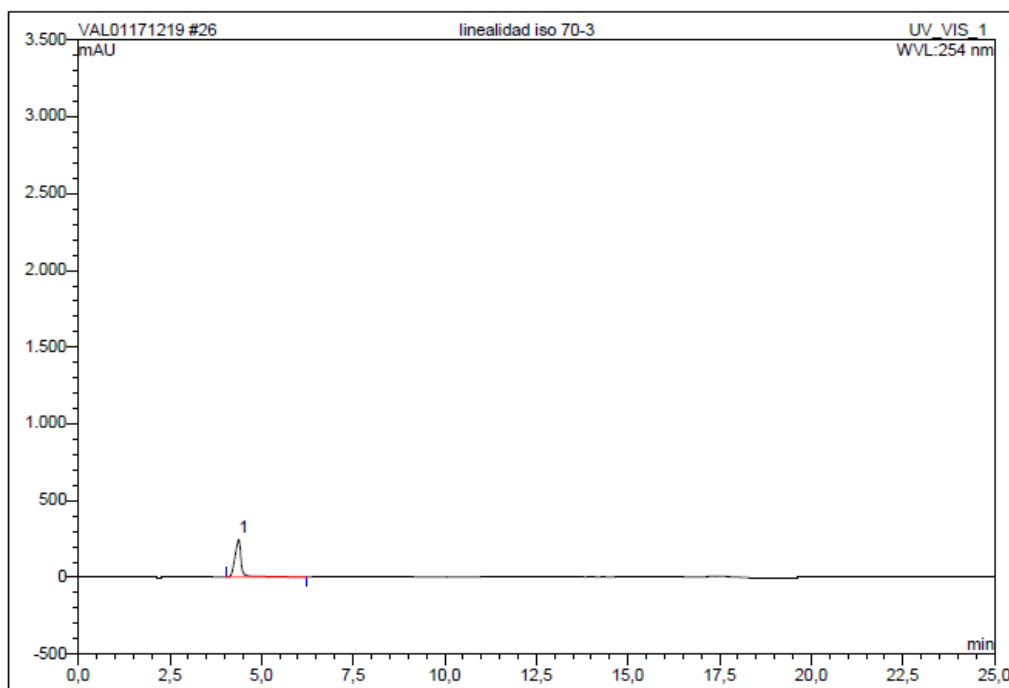


Figura 98. Linealitat isoniazida 70%

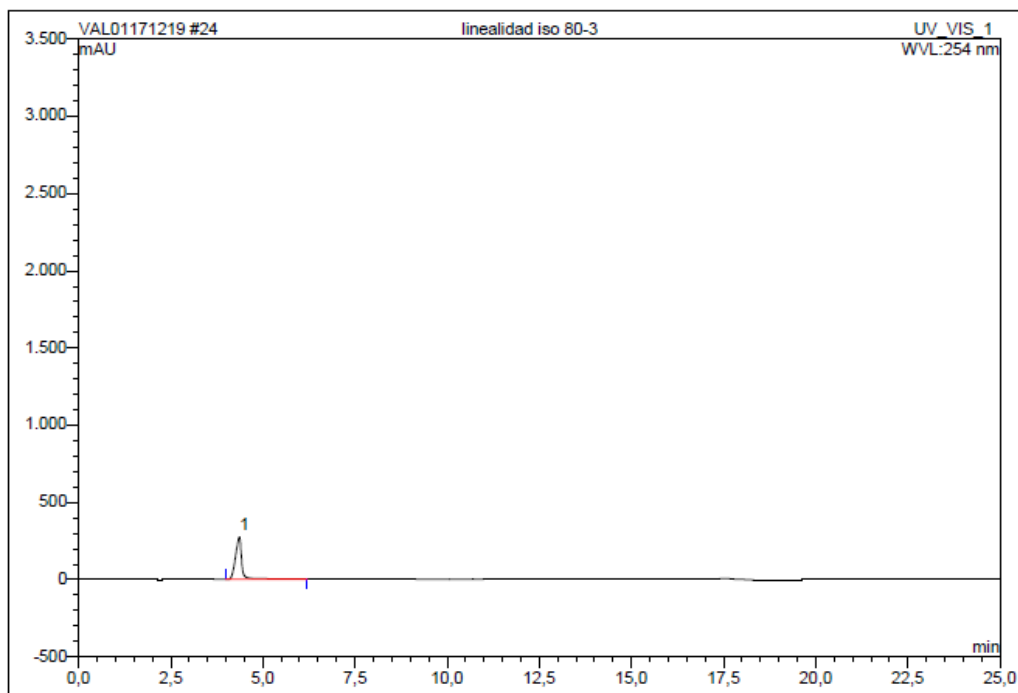


Figura 99. Linealitat isoniazida 80%

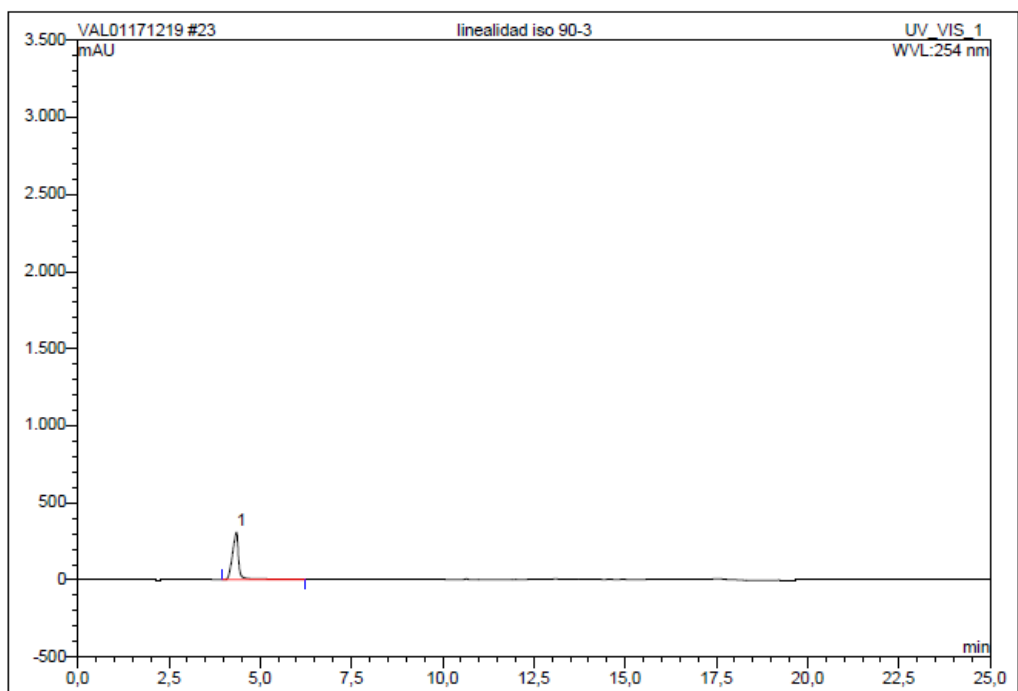


Figura 100. Linealitat isoniazida 90%

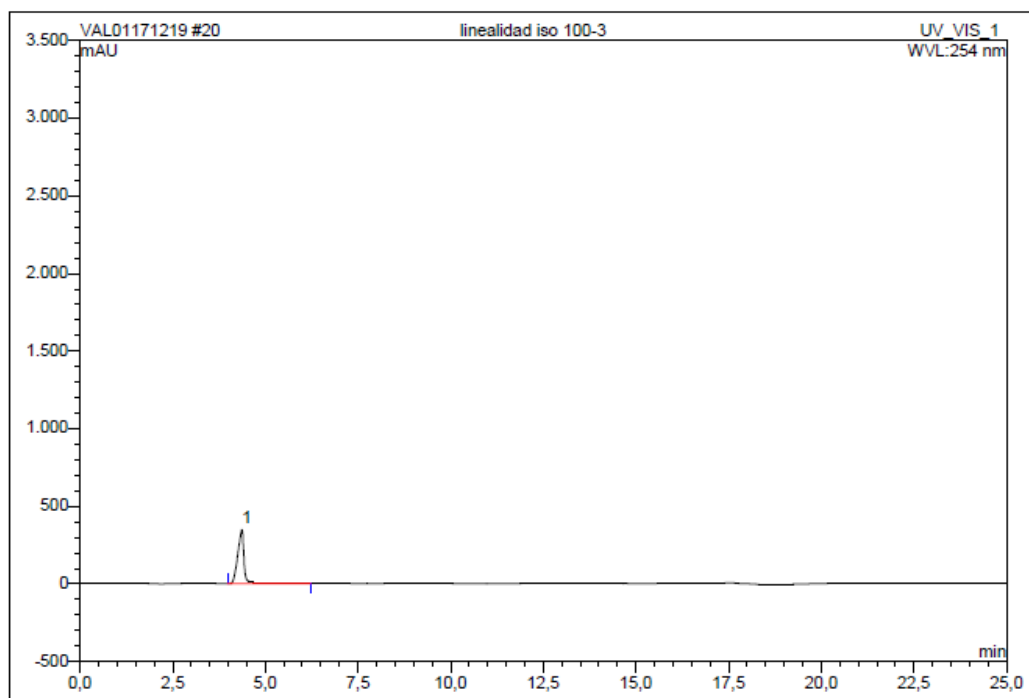


Figura 101. Linealitat isoniazida 100%

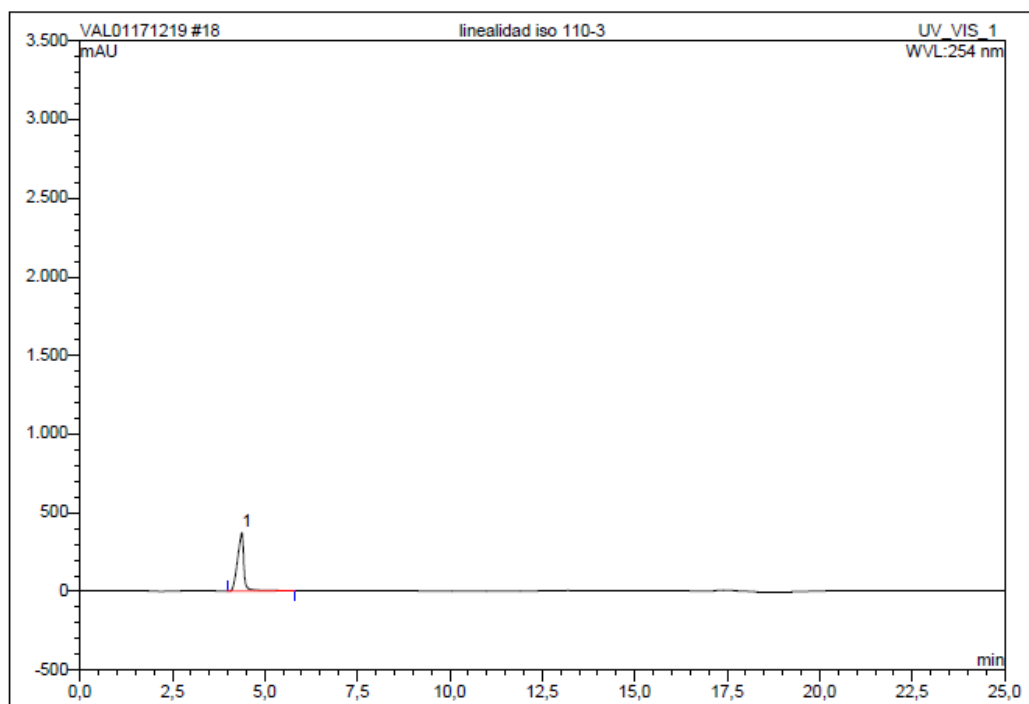


Figura 102. Linealitat isoniazida 110%



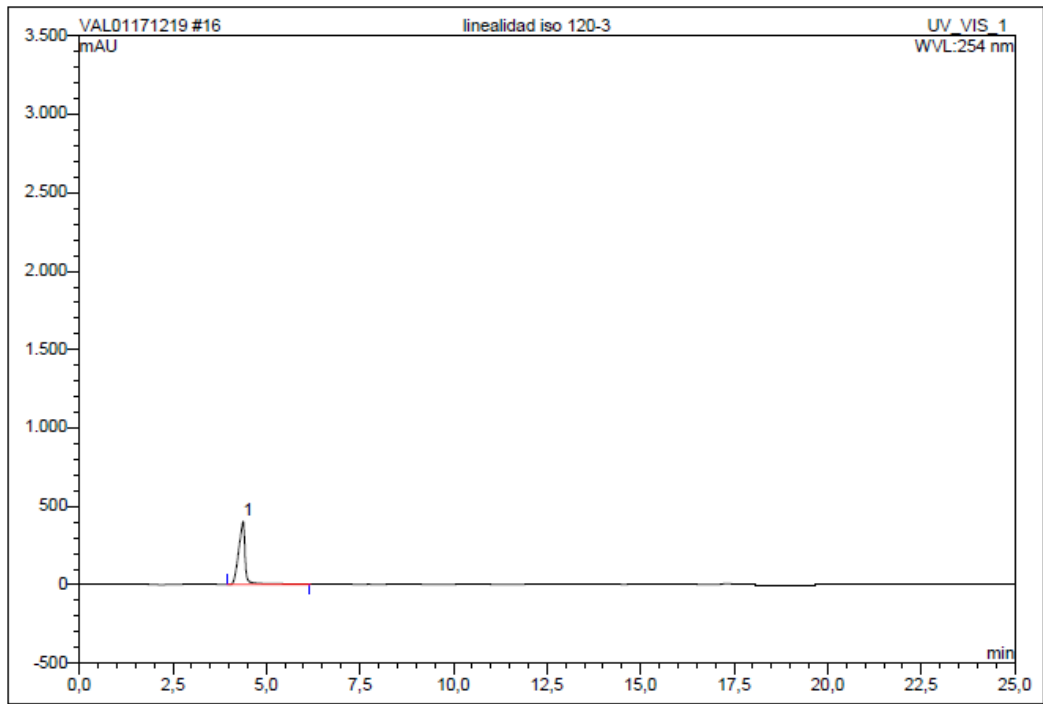


Figura 103. Linealitat isoniazida 120%

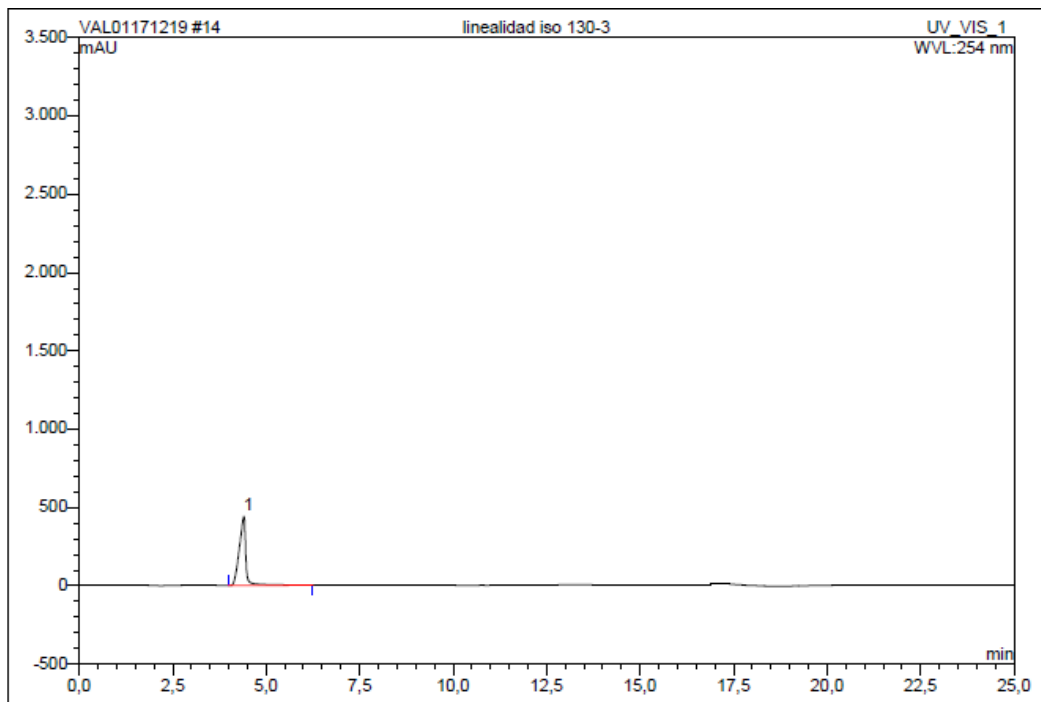


Figura 104. Linealitat isoniazida 130%

### Linealitat 1

El quadre 48 mostra els resultats estadístics dels valors de la linealitat 1 per isoniazida.

<b>ISONIAZIDA linealitat 1</b>		
<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (Y/X)</b>
171,700	93,82	0,55
160,900	86,05	0,53
145,600	77,58	0,53
132,500	70,18	0,53
119,500	63,94	0,54
107,100	57,47	0,54
92,700	48,19	0,52
<b>Coef. De correlació R</b>	0,9989	
<b>Coef. De determinació R<sup>2</sup></b>	0,9978	<b>Mitjana: 0,53</b>
<b>Pendent</b>	0,5601	<b>S.D: 0,01</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-3,3825	<b>RSD: 1,50 %</b>

*Quadre 48. Resultats estadístics linealitat 1 isoniazida*

L'equació de la recta obtinguda és la següent:

$$Y = 0,5601 X - 3,3825$$

Prenent com a criteris d'acceptació: *RSD factor resposta < 2 %*

$$R > 0,995$$

Els resultats obtinguts compleixen.

La figura 105 mostra la recta de regressió ajustada per l'equació obtinguda.

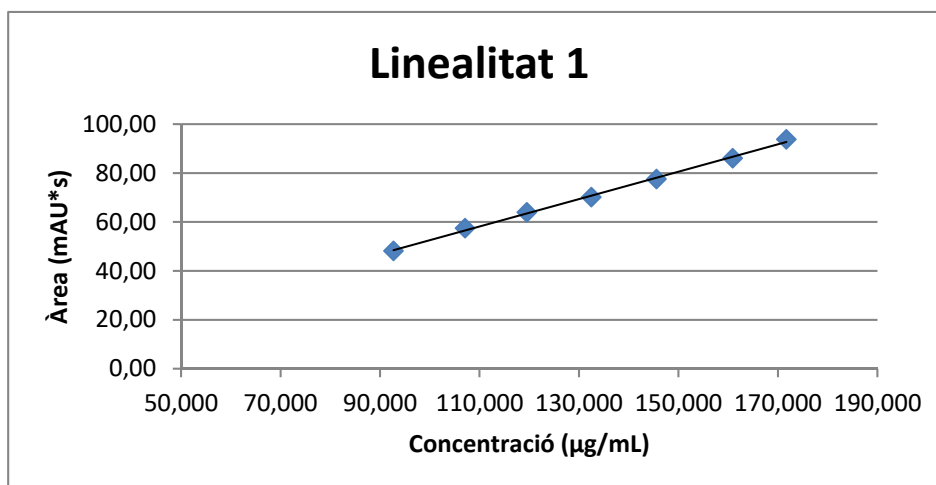


Figura 105. Corba de regressió ajustada

La figura 106 mostra el tractament estadístic aplicat per a la linealitat 1.

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99891827
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99783771
R <sup>2</sup> ajustado	0,99740525
Error típico	0,81725671
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1541,107072	1541,107072	2307,362471	7,3875E-08
Residuos	5	3,339542642	0,667908528		
Total	6	1544,446615			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-3,382466	1,5797004	-2,141207304	0,085187119	-7,44321519	0,67828312	-7,443215189	0,678283119
Variable X 1	0,56012125	0,011660687	48,03501297	7,38754E-08	0,5301465	0,590096	0,5301465	0,590096

Figura 106. Tractament estadístic de les dades

Linealitat 2

El quadre 49 mostra els resultats estadístics dels valors de la linealitat 2 per isoniazida.

<b>ISONIAZIDA linealitat 2</b>		
<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (Y/X)</b>
176,400	94,67	0,54
161,700	87,07	0,54
145,000	78,41	0,54
132,400	70,28	0,53
117,800	63,96	0,54
107,500	58,20	0,54
93,100	49,33	0,53
<b>Coef. De correlació R</b>	0,9993	
<b>Coef. De determinació R<sup>2</sup></b>	0,9986	<b>Mitjana: 0,54</b>
<b>Pendent</b>	0,5398	<b>S.D: 0,01</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-0,3138	<b>RSD: 0,96 %</b>

*Quadre 49. Resultats estadístics linealitat 2 isoniazida*

L'equació de la recta obtinguda és la següent:

$$Y = 0,5398 X - 0,3138$$

Prenent com a criteris d'acceptació: *RSD factor resposta < 2 %*

$$R > 0,995$$

Els resultats obtinguts compleixen.

La figura 107 mostra la recta de regressió ajustada per l'equació obtinguda.

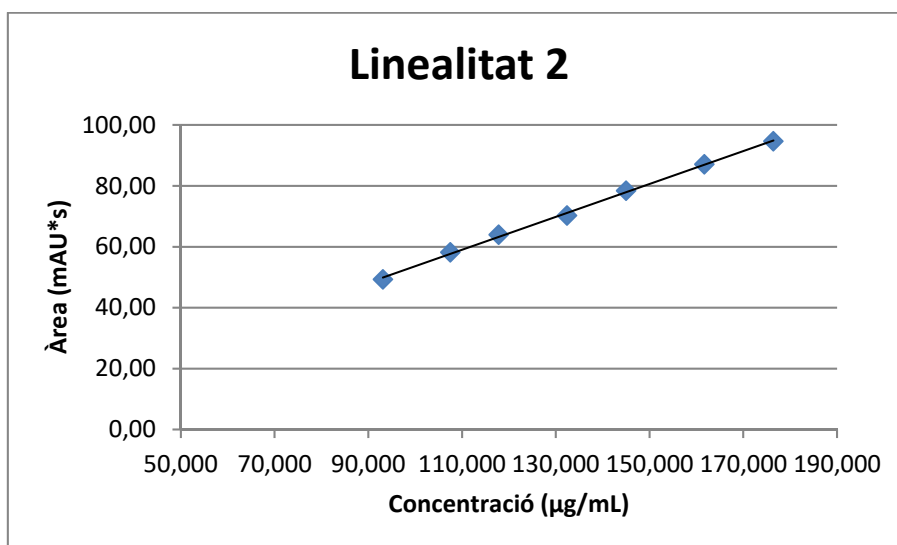


Figura 107. Corba de regressió ajustada

La figura 108 mostra el tractament estadístic aplicat per a la linealitat 2.

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999318779
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,998638023
R <sup>2</sup> ajustado	0,998365627
Error típico	0,65046961
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1551,180161	1551,180161	3666,133025	2,3255E-08
Residuos	5	2,11553569	0,423110714		
Total	6	1553,295714			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-0,313770523	1,214528491	-0,258347602	0,806435987	-3,4358154	2,808274355	-3,435815401	2,808274355
Variable X.1	0,539788943	0,00891497	60,54860052	2,32549E-08	0,51687228	0,562705602	0,516872283	0,562705602

Figura 108. Tractament estadístic de les dades

Linealitat 3

El quadre 50 mostra els resultats estadístics dels valors de la linealitat 3 per isoniazida.

<b>ISONIAZIDA linealitat 3</b>		
<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (Y/X)</b>
173,600	92,11	0,53
160,000	84,05	0,53
144,900	76,59	0,53
132,800	71,66	0,54
118,900	62,73	0,53
106,000	55,05	0,52
93,700	49,60	0,53
<b>Coef. De correlació R</b>	0,9988	
<b>Coef. De determinació R<sup>2</sup></b>	0,9976	<b>Mitjana: 0,53</b>
<b>Pendent</b>	0,5336	<b>S.D: 0,01</b>
<b>Ordenada en origen</b>	-0,6324	<b>RSD: 1,15 %</b>

*Quadre 50. Resultats estadístics linealitat 3 isoniazida*

L'equació de la recta obtinguda és la següent:

$$Y = 0,5336 X - 0,6324$$

Prenent com a criteris d'acceptació: *RSD factor resposta < 2 %*

$$R > 0,995$$

Els resultats obtinguts compleixen.

La figura 109 mostra la recta de regressió ajustada per l'equació obtinguda.

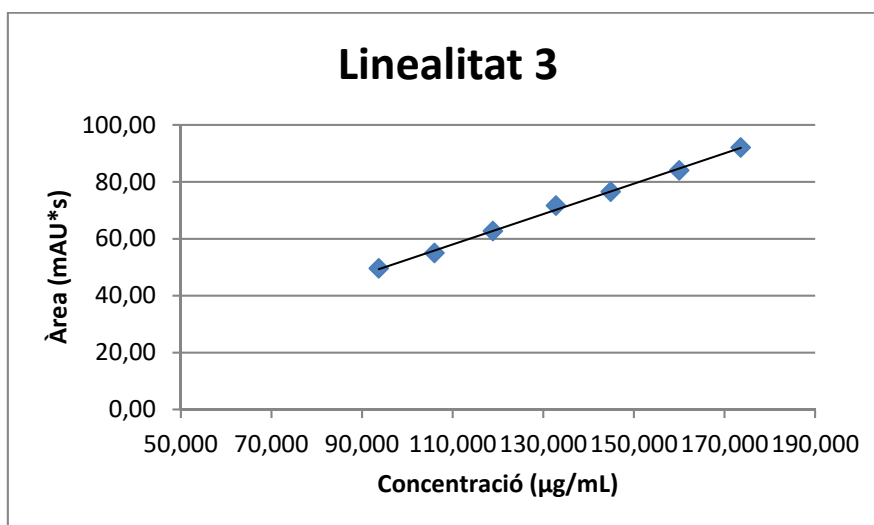


Figura 109. Corba de regressió ajustada

La figura 110 mostra el tractament estadístic aplicat per a la linealitat 3.

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99881343
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99762826
R <sup>2</sup> ajustado	0,99715391
Error típico	0,82203765
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1421,2009	1421,2009	2103,158754	9,3092E-08
Residuos	5	3,37872949	0,6757459		
Total	6	1424,57963			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	-0,63236265	1,57663508	-0,40108372	0,704924721	-4,68523215	3,42050684	-4,68523215	3,42050684
Variable X 1	0,53361495	0,01163569	45,8602088	9,30923E-08	0,50370447	0,56352543	0,50370447	0,56352543

Figura 110. Tractament estadístic de les dades

### Pirazinamida

El quadre 51 mostra els resultats estadístics dels valors de la linealitat total per pirazinamida (linealitat mitjana de 3 linealitats individuals).

<b>PIRAZINAMIDA Linealitat total</b>		
<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (Y/X)</b>
433,600	274,44	0,63
401,300	248,71	0,62
368,100	235,37	0,64
335,000	215,59	0,64
301,700	196,01	0,65
266,600	173,36	0,65
235,400	152,39	0,65
433,000	277,34	0,64
401,600	255,21	0,64
366,900	235,50	0,64
332,100	214,43	0,65
301,900	195,54	0,65
267,900	174,53	0,65
233,200	153,21	0,66
433,300	274,78	0,63
401,700	256,71	0,64
367,600	237,54	0,65
336,800	217,54	0,65
303,900	197,95	0,65
266,500	174,41	0,65
232,700	152,63	0,66
<b>Coef. De correlació R</b>	0,9989	
<b>Coef. De determinació R<sup>2</sup></b>	0,9978	<b>Mitjana: 0,64</b>
<b>Pendent</b>	0,6077	<b>S.D: 0,01</b>
<b>Ordenada en origen</b>	11,729	<b>RSD: 1,38 %</b>

Quadre 51. Resultats estadístics linealitat total pirazinamida



L'equació de la recta obtinguda és la següent:

$$Y = 0,6077 X + 11,729$$

Prenent com a criteris d'acceptació: *RSD factor resposta* < 2 %

$$R > 0,995$$

Els resultats obtinguts compleixen.

La figura 111 mostra la recta de regressió ajustada per l'equació obtinguda.

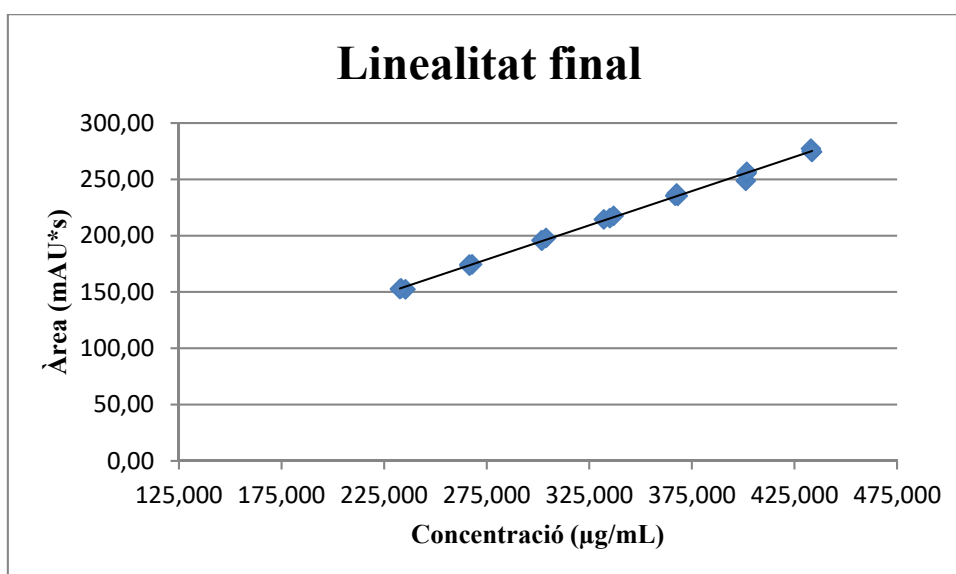


Figura 111. Corba de regressió ajustada

La figura 112 mostra el tractament estadístic aplicat per a la linealitat total.

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99892512
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99785139
R <sup>2</sup> ajustado	0,99773831
Error típico	1,97558757
Observaciones	21

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	34439,3348	34439,3348	8823,932616	8,1803E-27
Residuos	19	74,155979	3,90294626		
Total	20	34513,4908			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	11,72935	2,20556559	5,31806901	3,92642E-05	7,11304817	16,3456518	7,11304817	16,3456518
Variable X 1	0,60774971	0,00646984	93,9357899	8,18028E-27	0,59420817	0,62129124	0,59420817	0,62129124

Figura 112. Tractament estadístic de les dades

El coeficient de correlació obtingut ( $R= 0,9989$ ) indica que existeix una elevada correlació entre la concentració assajada i la resposta obtinguda, fet que permet concloure que la relació lineal és bona. De l'anàlisi de variància també es pot deduir que hi ha una bona proporcionalitat entre els resultats obtinguts, ja que el valor de  $f$  és molt superior al valor obtingut per a  $f$  teòrica i per tant es compleix la hipòtesi de que els resultats presenten diferències entre ells. En aquest cas, els valors de confiança de la intercepció no inclouen el valor 0, i per tant s'ha de realitzar una recta de calibratge en la rutina analítica. Aquestes conclusions apliquen tant a l'anàlisi de la linealitat total com a l'anàlisi individual de cada linealitat. Amb tot això es pot concloure que la metòdica analítica proposada per l'anàlisi de pirazinamida és lineal.

A tall d'exemple a les figures 113 a 119 mostren els cromatogrames obtinguts en l'estudi de la linealitat 1 per pirazinamida, on s'observa l'augment d'àrea i intensitat dels pics a mesura que la concentració de l'analit va augmentant.

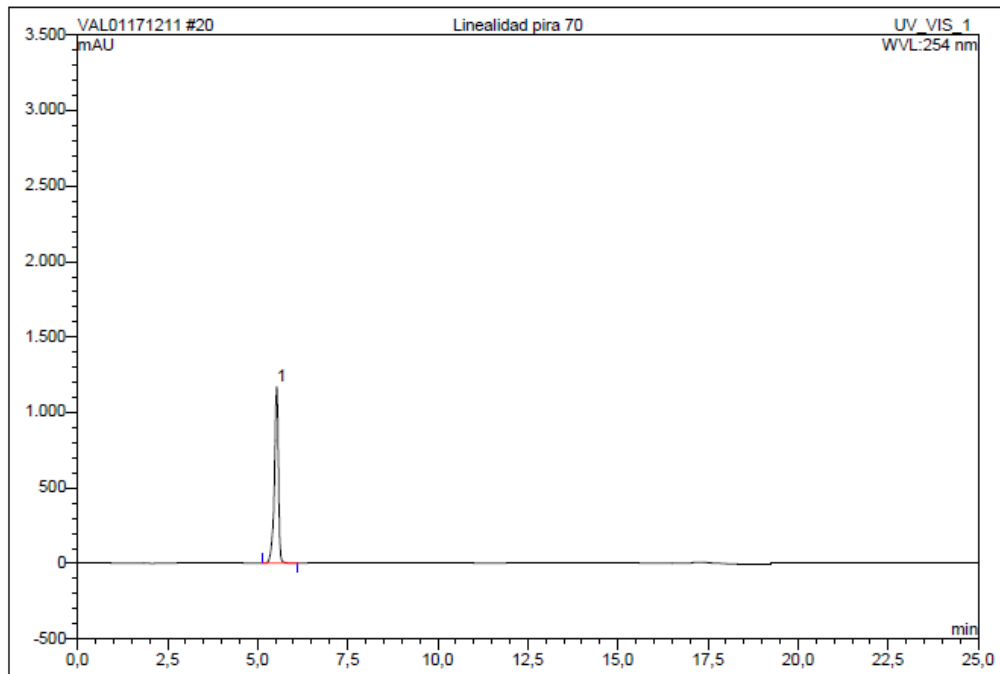


Figura 113. Linealitat pirazinamida 70%

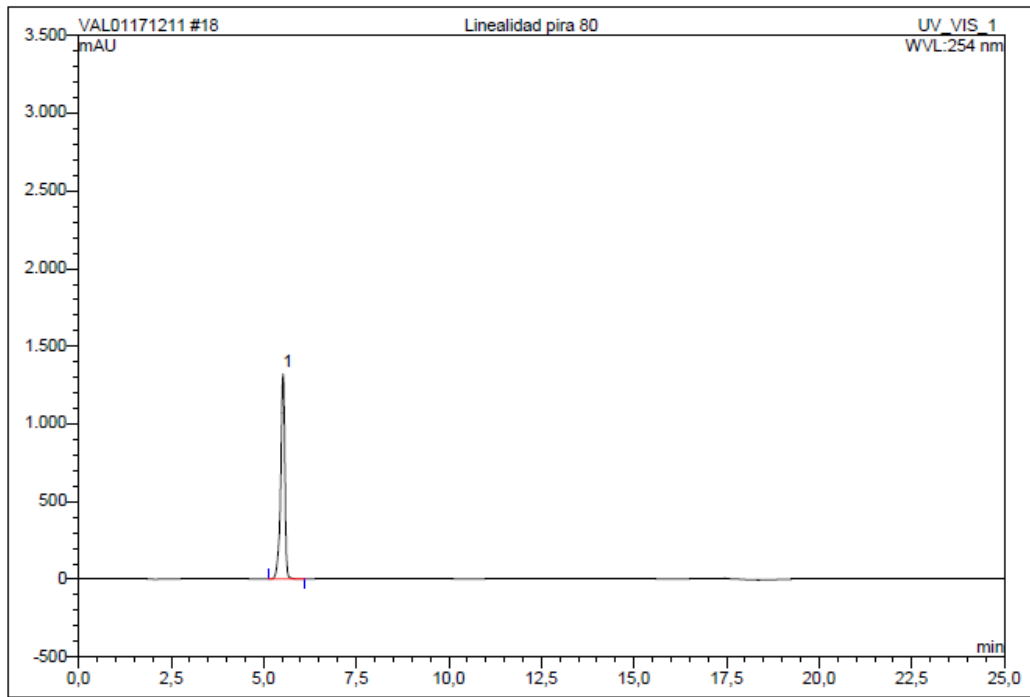


Figura 114. Linealitat pirazinamida 80%

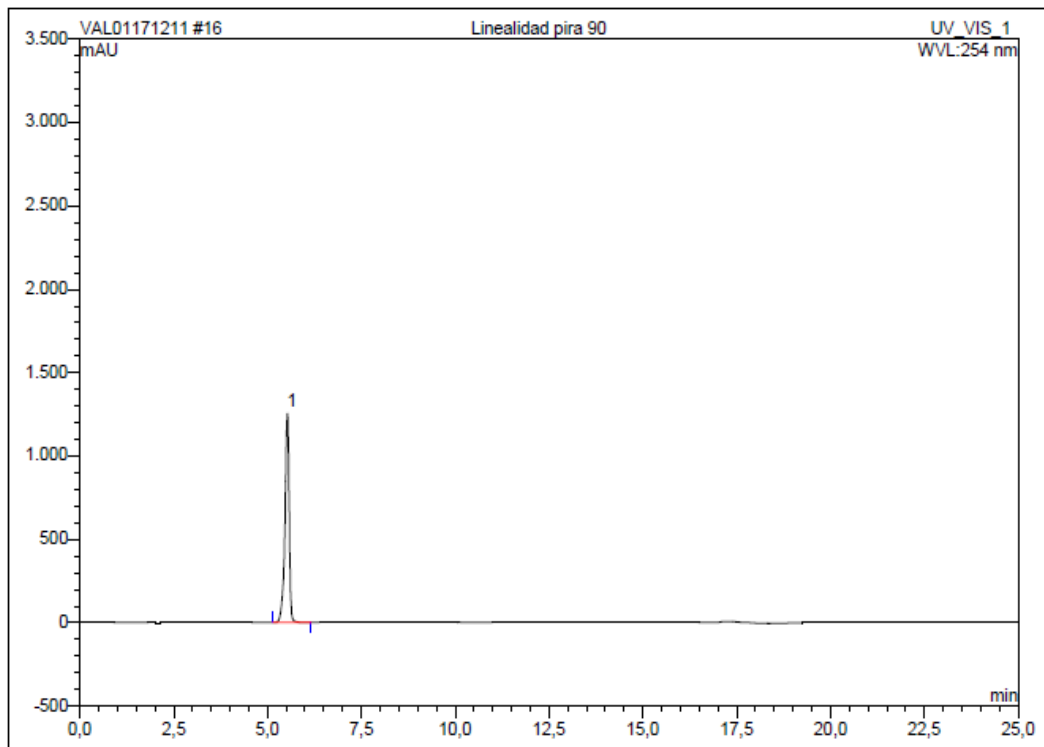


Figura 115. Linealitat pirazinamida 90%

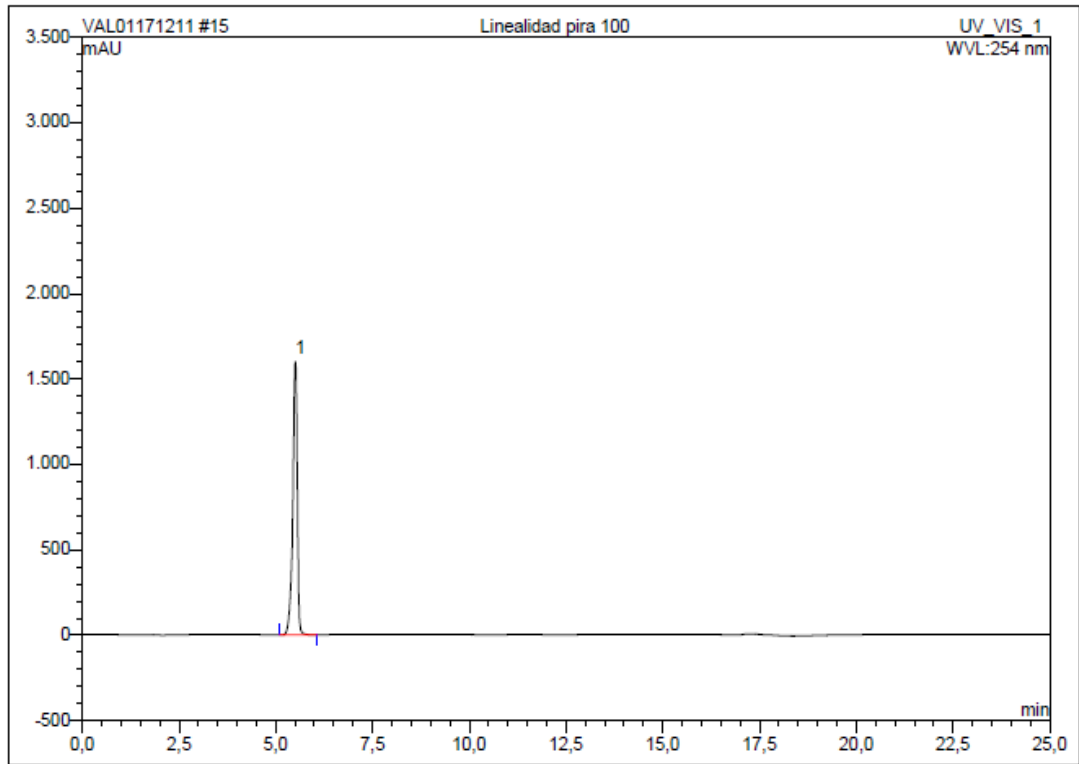


Figura 116. Linealitat pirazinamida 100%

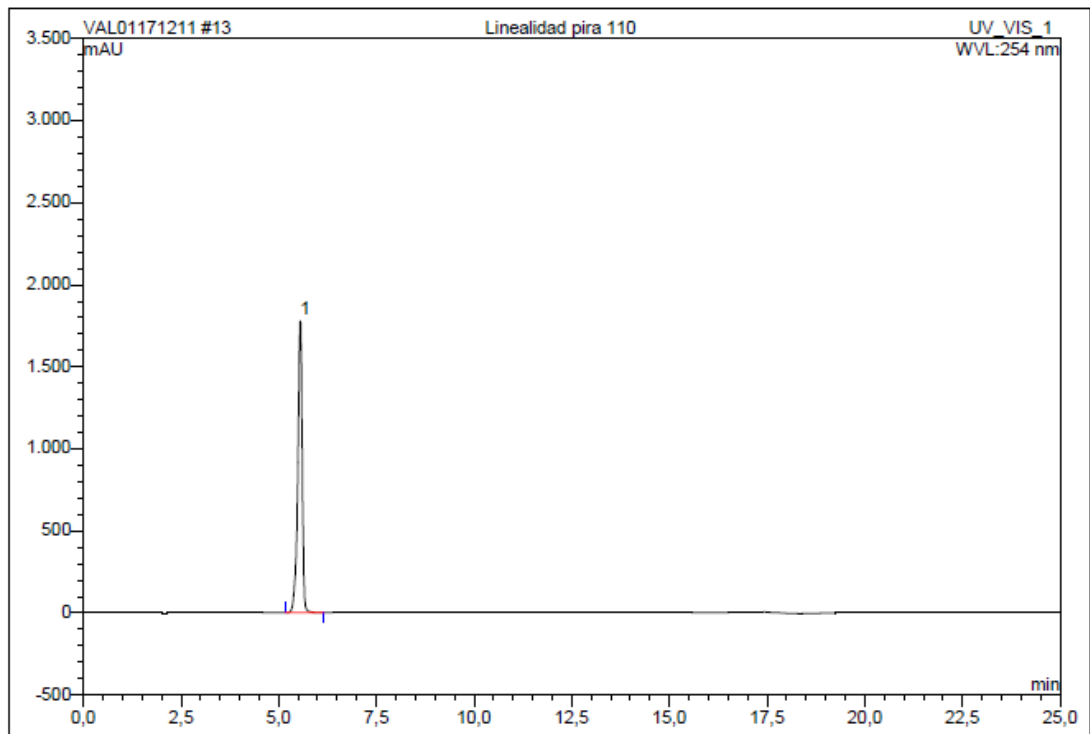


Figura 117. Linealitat pirazinamida 110%

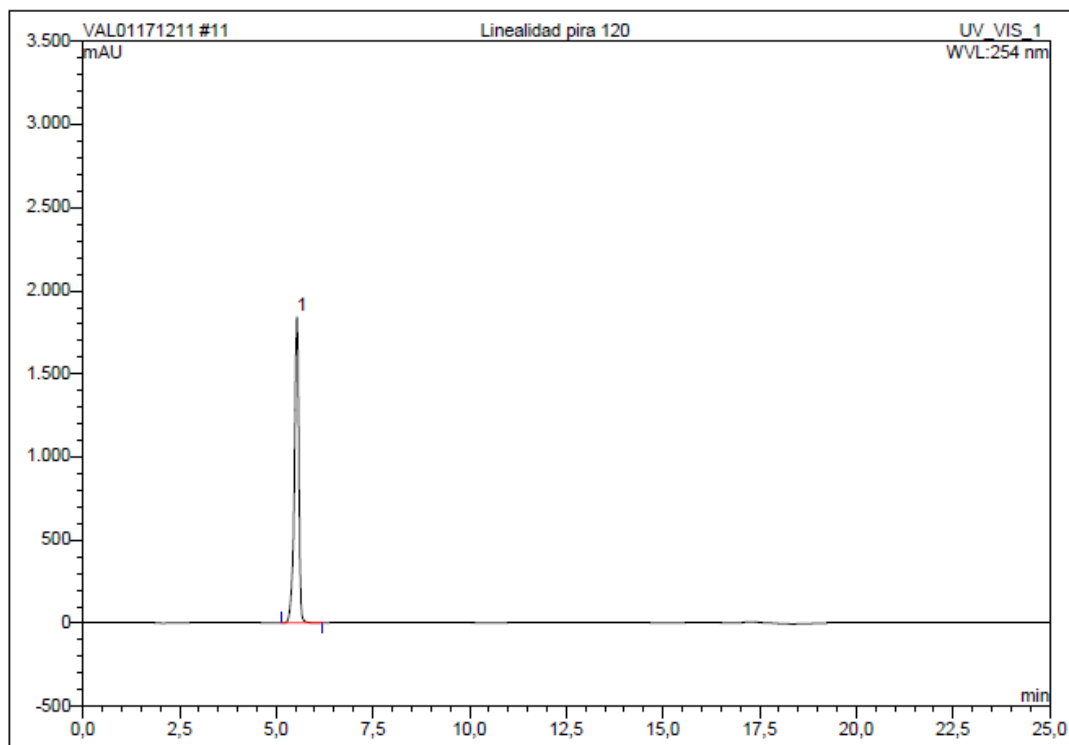


Figura 118. Linealitat pirazinamida 120%

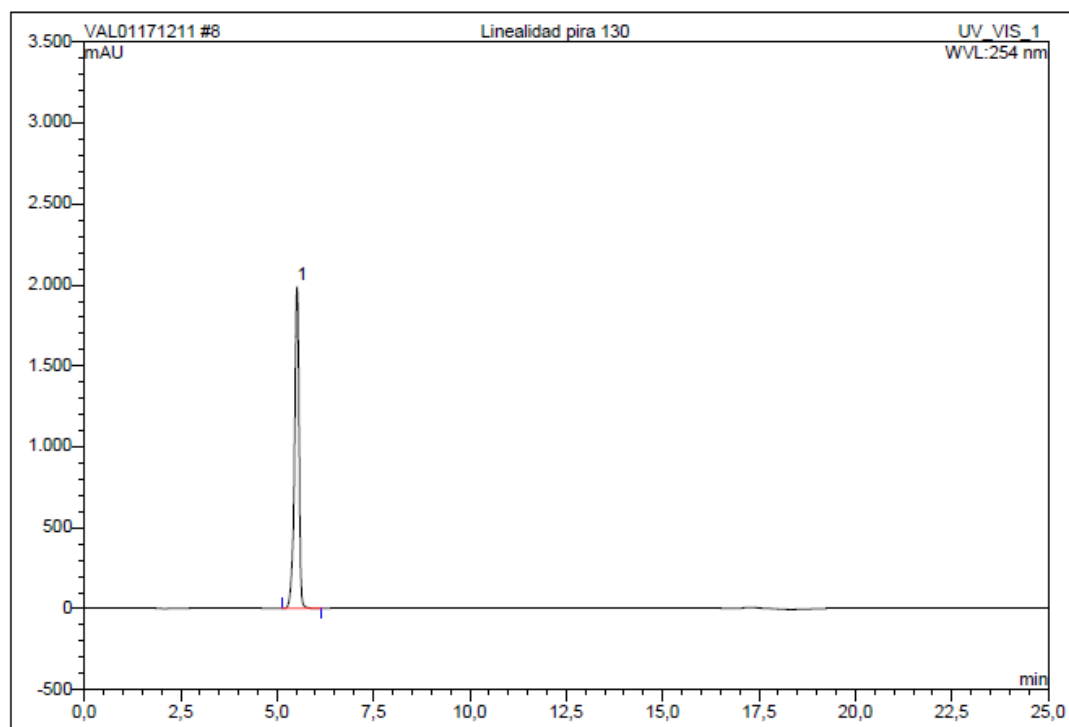


Figura 119. Linealitat pirazinamida 130%

### Linealitat 1

El quadre 52 mostra els resultats estadístics dels valors de la linealitat 1 per pirazinamida.

<b>PIRAZINAMIDA linealitat 1</b>		
<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (Y/X)</b>
433,600	274,44	0,63
401,300	248,71	0,62
368,100	235,37	0,64
335,000	215,59	0,64
301,700	196,01	0,65
266,600	173,36	0,65
235,400	152,39	0,65
<b>Coef. De correlació R</b>	0,9982	
<b>Coef. De determinació R<sup>2</sup></b>	0,9964	<b>Mitjana: 0,64</b>
<b>Pendent</b>	0,5978	<b>S.D: 0,01</b>
<b>Ordenada en origen</b>	13,726	<b>RSD: 1,72 %</b>

Quadre 52. Resultats estadístics linealitat 1 pirazinamida

L'equació de la recta obtinguda és la següent:

$$Y = 0,5978 X + 13,726$$

Prenent com a criteris d'acceptació: *RSD factor resposta* < 2 %

$$R > 0,995$$

Els resultats obtinguts compleixen.

La figura 120 mostra la recta de regressió ajustada per l'equació obtinguda.

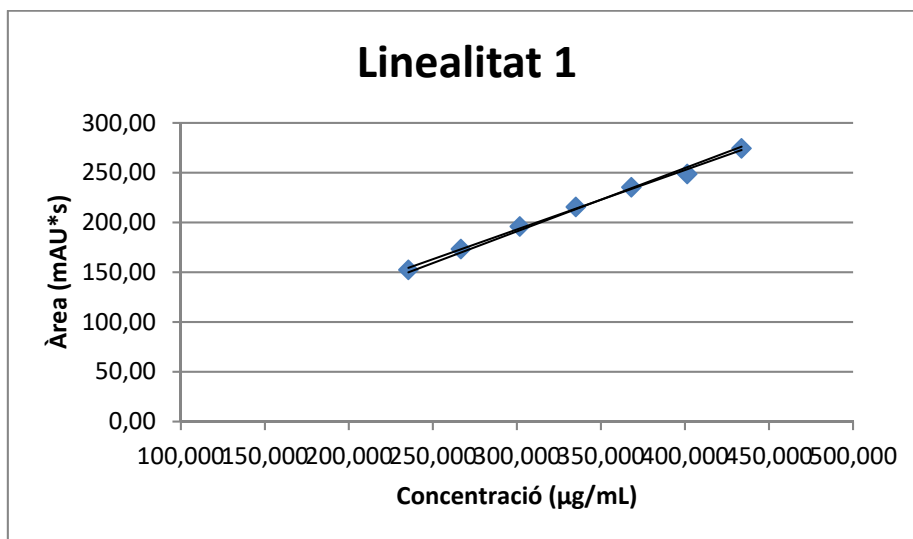


Figura 120. Corba de regressió ajustada

La figura 121 mostra el tractament estadístic aplicat per a la linealitat 1.

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,998214
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99643119
R <sup>2</sup> ajustado	0,99571742
Error típico	2,81321031
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	11048,3572	11048,3572	1396,025352	2,5867E-07
Residuos	5	39,5707613	7,91415225		
Total	6	11087,9279			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	13,7257288	5,45665425	2,51541112	0,053473389	-0,30104754	27,752505	-0,30104754	27,752505
Variable X 1	0,59776974	0,01599879	37,3634226	2,58668E-07	0,55664353	0,63889595	0,55664353	0,63889595

Figura 121. Tractament estadístic de les dades

## Linealitat 2

El quadre 53 mostra els resultats estadístics dels valors de la linealitat 2 per pirazinamida.

<b>PIRAZINAMIDA linealitat 2</b>		
<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (Y/X)</b>
433,000	277,34	0,64
401,600	255,21	0,64
366,900	235,50	0,64
332,100	214,43	0,65
301,900	195,54	0,65
267,900	174,53	0,65
233,200	153,21	0,66
<b>Coef. De correlació R</b>	0,9998	
<b>Coef. De determinació R<sup>2</sup></b>	0,9997	<b>Mitjana: 0,65</b>
<b>Pendent</b>	0,6156	<b>S.D: 0,01</b>
<b>Ordenada en origen</b>	9,6243	<b>RSD: 1,12 %</b>

Quadre 53. Resultats estadístics linealitat 2 de pirazinamida

L'equació de la recta obtinguda és la següent:

$$Y = 0,6156 X + 9,6243$$

Prenent com a criteris d'acceptació: *RSD factor resposta* < 2 %

$$R > 0,995$$

Els resultats obtinguts compleixen.



La figura 122 mostra la recta de regressió ajustada per l'equació obtinguda.

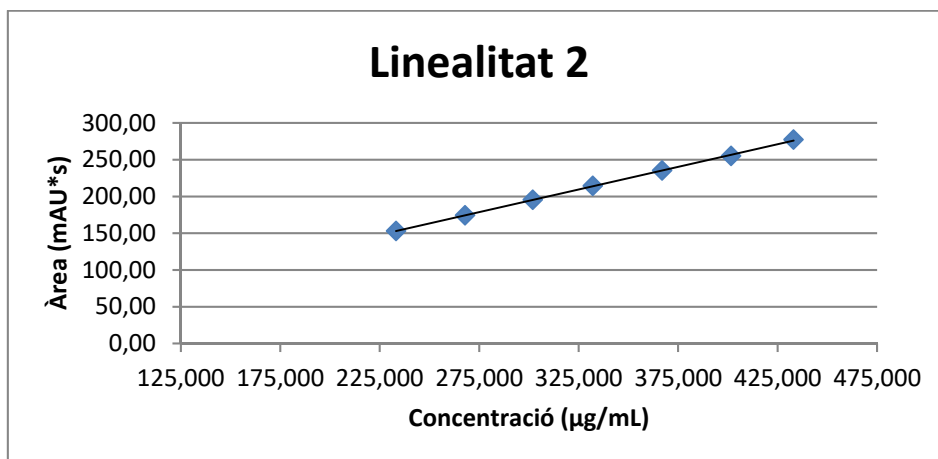


Figura 122. Corba de regressió ajustada

La figura 123 mostra el tractament estadístic aplicat per a la linealitat 2.

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99982196
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99964395
R <sup>2</sup> ajustado	0,99957274
Error típico	0,91503801
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados		Valor crítico de F
			F		
Regresión	1	11753,8551	11753,8551	14037,89741	8,123E-10
Residuos	5	4,18647278	0,83729456		
Total	6	11758,0416			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	9,62429973	1,76846033	5,44219148	0,002843798	5,07832773	14,1702717	5,07832773	14,1702717
Variable X 1	0,61559056	0,00519566	118,481633	8,12302E-10	0,60223468	0,62894643	0,60223468	0,62894643

Figura 123. Tractament estadístic de les dades

Linealitat 3

El quadre 54 mostra els resultats estadístics dels valors de la linealitat 3 per pirazinamida.

<b>PIRAZINAMIDA linealitat 3</b>		
<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (Y/X)</b>
433,300	274,78	0,63
401,700	256,71	0,64
367,600	237,54	0,65
336,800	217,54	0,65
303,900	197,95	0,65
266,500	174,41	0,65
232,700	152,88	0,66
<b>Coef. De correlació R</b>	0,9998	
<b>Coef. De determinació R<sup>2</sup></b>	0,9995	<b>Mitjana: 0,65</b>
<b>Pendent</b>	0,6091	<b>S.D: 0,01</b>
<b>Ordenada en origen</b>	12,144	<b>RSD: 1,27 %</b>

Quadre 54. Resultats estadístics linealitat 3 pirazinamida

L'equació de la recta obtinguda és la següent:

$$Y = 0,6091 X + 12,144$$

Prenent com a criteris d'acceptació: *RSD factor resposta* < 2 %

$$R > 0,995$$

Els resultats obtinguts compleixen.

La figura 124 mostra la recta de regressió ajustada per l'equació obtinguda.

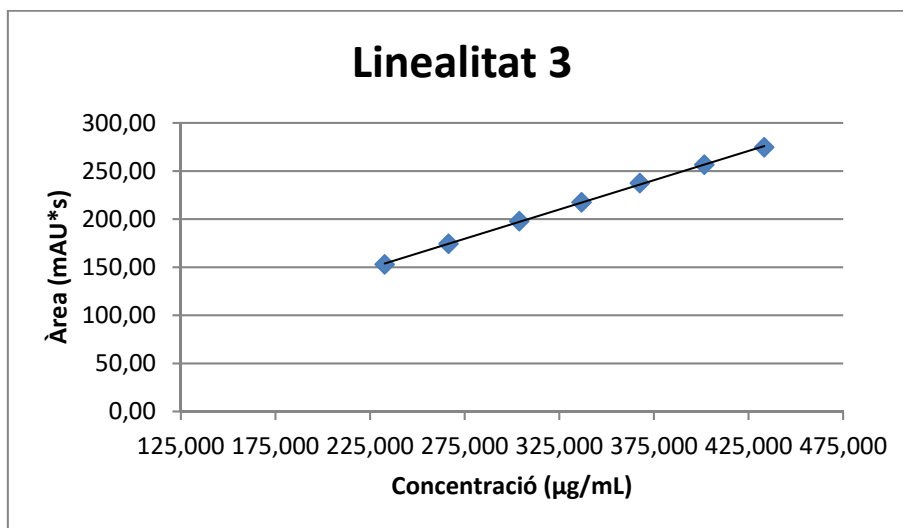


Figura 124. Corba de regressió ajustada

La figura 125 mostra el tractament estadístic aplicat per a la linealitat 3.

Resumen

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99976454
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99952914
R <sup>2</sup> ajustado	0,99943497
Error típico	1,04599895
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	11612,8468	11612,8468	10613,9296	1,6337E-09
Residuos	5	5,470569	1,0941138		
Total	6	11618,3174			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	12,1440532	2,01758324	6,01910889	0,001820045	6,95769038	17,330416	6,95769038	17,330416
Variable X 1	0,60909611	0,00591218	103,023927	1,63371E-09	0,59389836	0,62429385	0,59389836	0,62429385

Figura 125. Tractament estadístic de les dades

## 4.2.4 Precisió

### 4.2.4.1. Repetibilitat del Sistema Instrumental

La precisió del sistema instrumental s'estudia amb les dades obtingudes un dia i amb les dades obtingudes al dia següent. La repetibilitat dels sistema instrumental obtinguda per rifampicina, isoniazida i pirazinamida al 70, 100 i 130% es mostra en els quadres 55 a 63 respectivament. En el cas de rifampicina es realitzen únicament 5 injeccions degut a la inestabilitat de la mostra i es realitza l'anàlisi estadístic amb el factor resposta (FR) ja que es preparen vials nous cada dia.

En tots els casos, els resultats obtinguts estan per sota de l'1%, percentatge màxim que marca l'Associació de Farmacèutics de la Indústria (AEFI) per resultats obtinguts el mateix dia i per sota del 2% per resultats obtinguts en dies diferents (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001), i també per sota del 3,7%, percentatge màxim que marca l'AOAC pels principis actius (Association of Official Analytical Chemists, 2018), mostrant que l'equip utilitzat per l'estudi funciona correctament pel mètode desenvolupat, essent altament repetitiu.

<b>Rifampicina 70%</b>	<b>Dia 1</b>		<b>Dia 2</b>	
<b>Injecció</b>	<b>FR</b>	<b>Temps de retenció</b>	<b>FR</b>	<b>Temps de retenció</b>
1	0,72	13,52	0,74	13,44
2	0,72	13,51	0,74	13,44
3	0,71	13,50	0,74	13,42
4	0,71	13,49	0,74	13,43
5	0,71	13,49	0,74	13,45
<b>Mitjana</b>	0,71	13,50	0,74	13,44
<b>SD</b>	0,005	0,01	0,003	0,01
<b>RSD</b>	0,63 %	0,10 %	0,37 %	0,08 %

	<b>FR</b>	<b>Temps de retenció</b>
<b>Mitjana entre dies</b>	0,73	13,47
<b>SD entre dies</b>	0,01	0,037
<b>RSD entre dies</b>	1,83 %	0,27 %

*Quadre 55. Resultats obtinguts per la precisió del sistema instrumental rifampicina 70%*

<b>Rifampicina 100%</b>	<b>Dia 1</b>		<b>Dia 2</b>	
Injecció	FR	Temps de retenció	FR	Temps de retenció
1	0,75	13,52	0,74	13,43
2	0,75	13,51	0,74	13,44
3	0,74	13,52	0,74	13,45
4	0,74	13,52	0,74	13,44
5	0,74	13,52	0,74	13,42
<b>Mitjana</b>	0,74	13,52	0,74	13,44
<b>SD</b>	0,004	0,004	0,003	0,01
<b>RSD</b>	0,54 %	0,03 %	0,44 %	0,08 %

	FR	Temps de retenció
<b>Mitjana entre dies</b>	0,74	13,48
<b>SD entre dies</b>	0,004	0,04
<b>RSD entre dies</b>	0,51 %	0,33 %

*Quadre 56. Resultats obtinguts per la precisió del sistema instrumental rifampicina 100%*

<b>Rifampicina 130%</b>	<b>Dia 1</b>		<b>Dia 2</b>	
Injecció	FR	Temps de retenció	FR	Temps de retenció
1	0,75	13,49	0,75	13,52
2	0,75	13,49	0,75	13,45
3	0,75	13,50	0,75	13,45
4	0,74	13,51	0,75	13,45
5	0,74	13,53	0,75	13,44
<b>Mitjana</b>	0,75	13,50	0,75	13,46
<b>SD</b>	0,004	0,02	0,003	0,03
<b>RSD</b>	0,58 %	0,12 %	0,36 %	0,24 %

	FR	Temps de retenció
<b>Mitjana entre dies</b>	0,75	0,75
<b>SD entre dies</b>	0,004	0,004
<b>RSD entre dies</b>	0,47 %	0,47%

*Quadre 57. Resultats obtinguts per la precisió del sistema instrumental rifampicina 130%*

<b>Isoniazida 70%</b>	<b>Dia 1</b>		<b>Dia 2</b>	
<b>Injecció</b>	<b>Àrea</b>	<b>Temps de retenció</b>	<b>Àrea</b>	<b>Temps de retenció</b>
1	48,02	4,45	49,24	4,41
2	49,22	4,46	49,20	4,42
3	49,40	4,48	48,52	4,44
4	49,40	4,46	49,09	4,40
5	49,33	4,48	47,84	4,36
6	49,27	4,48	49,26	4,36
7	49,24	4,45	49,25	4,38
8	49,41	4,46	48,65	4,38
9	49,34	4,47	49,28	4,39
10	49,33	4,47	48,71	4,41
<b>Mitjana</b>	49,19	4,47	48,90	4,40
<b>SD</b>	0,42	0,01	0,47	0,03
<b>RSD</b>	0,85 %	0,26 %	0,96 %	0,59%

	<b>Àrea</b>	<b>Temps de retenció</b>
<b>Mitjana entre dies</b>	49,05	4,43
<b>SD entre dies</b>	0,46	0,041
<b>RSD entre dies</b>	0,93 %	0,93%

*Quadre 58. Resultats obtinguts per la precisió del sistema instrumental isoniazida 70%*



<b>Isoniazida 100%</b>	<b>Dia 1</b>		<b>Dia 2</b>	
Injecció	Àrea	Temps de retenció	Àrea	Temps de retenció
1	70,81	4,49	70,27	4,48
2	70,86	4,46	69,97	4,49
3	70,63	4,46	69,85	4,43
4	70,06	4,47	70,40	4,42
5	70,44	4,47	69,45	4,40
6	70,20	4,49	70,24	4,40
7	70,54	4,49	69,95	4,48
8	70,33	4,48	70,16	4,44
9	70,43	4,49	70,09	4,45
10	70,37	4,49	70,32	4,46
<b>Mitjana</b>	70,45	4,48	70,07	4,45
<b>SD</b>	0,3	0,01	0,28	0,03
<b>RSD</b>	0,36 %	0,29 %	0,40 %	0,74 %

	Àrea	Temps de retenció
<b>Mitjana entre dies</b>	70,27	4,46
<b>SD entre dies</b>	0,33	0,03
<b>RSD entre dies</b>	0,47 %	0,67 %

*Quadre 59. Resultats obtinguts per la precisió del sistema instrumental isoniazida 100%*

<b>Isoniazida 130%</b>	<b>Dia 1</b>		<b>Dia 2</b>	
Injecció	Àrea	Temps de retenció	Àrea	Temps de retenció
1	91,74	4,55	91,27	4,50
2	92,80	4,48	91,90	4,50
3	92,57	4,49	91,82	4,51
4	92,46	4,55	91,92	4,53
5	92,41	4,58	92,12	4,56
6	92,63	4,58	92,23	4,57
7	92,99	4,54	91,76	4,59
8	92,88	4,52	91,89	4,63
9	92,76	4,52	92,36	4,56
10	93,11	4,52	92,26	4,56
<b>Mitjana</b>	92,63	4,53	91,95	4,55
<b>SD</b>	0,39	0,03	0,31	0,04
<b>RSD</b>	0,42 %	0,74 %	0,34 %	0,92 %

	Àrea	Temps de retenció
<b>Mitjana entre dies</b>	92,29	4,54
<b>SD entre dies</b>	0,49	0,04
<b>RSD entre dies</b>	0,53 %	0,84 %

*Quadre 60. Resultats obtinguts per la precisió del sistema instrumental isoniazida 130%*

<b>Pirazinamida 70%</b>	<b>Dia 1</b>		<b>Dia 2</b>	
Injecció	Àrea	Temps de retenció	Àrea	Temps de retenció
1	149,94	6,21	150,23	6,21
2	149,79	6,22	150,10	6,22
3	149,95	6,22	149,89	6,22
4	149,92	6,21	150,12	6,21
5	149,95	6,21	150,07	6,21
6	149,69	6,21	149,76	6,20
7	149,69	6,23	149,91	6,20
8	149,77	6,21	150,06	6,21
9	149,99	6,20	149,80	6,20
10	149,57	6,20	149,82	6,21
<b>Mitjana</b>	149,83	6,21	149,98	6,21
<b>SD</b>	0,14	0,01	0,16	0,01
<b>RSD</b>	0,10 %	0,15 %	0,11 %	0,12 %

	Àrea	Temps de retenció
<b>Mitjana entre dies</b>	149,90	6,21
<b>SD entre dies</b>	0,17	0,008
<b>RSD entre dies</b>	0,11 %	0,13 %

*Quadre 61. Resultats obtinguts per la precisió del sistema instrumental pirazinamida 70%*

<b>Pirazinamida 100%</b>	<b>Dia 1</b>		<b>Dia 2</b>	
Injecció	Àrea	Temps de retenció	Àrea	Temps de retenció
1	210,86	6,19	211,67	6,20
2	211,14	6,21	213,19	6,21
3	211,04	6,22	211,13	6,20
4	211,96	6,22	212,88	6,24
5	212,13	6,22	211,54	6,23
6	211,77	6,24	210,81	6,23
7	210,89	6,24	211,06	6,23
8	211,90	6,25	210,80	6,21
9	211,86	6,23	211,19	6,21
10	211,87	6,23	211,17	6,21
<b>Mitjana</b>	211,54	6,23	211,54	6,22
<b>SD</b>	0,50	0,02	0,83	0,01
<b>RSD</b>	0,23 %	0,28 %	0,39 %	0,23 %

	Àrea	Temps de retenció
<b>Mitjana entre dies</b>	211,54	6,22
<b>SD entre dies</b>	0,67	0,02
<b>RSD entre dies</b>	0,32 %	0,25 %

*Quadre 62. Resultats obtinguts per la precisió del sistema instrumental pirazinamida 100%*

<b>Pirazinamida 130%</b>	<b>Dia 1</b>		<b>Dia 2</b>	
Injecció	Àrea	Temps de retenció	Àrea	Temps de retenció
1	262,11	6,23	258,62	6,22
2	262,45	6,21	258,44	6,22
3	262,36	6,21	258,96	6,21
4	262,22	6,22	258,88	6,21
5	262,35	6,20	259,00	6,21
6	262,53	6,21	258,68	6,20
7	262,40	6,21	259,48	6,20
8	262,82	6,22	259,10	6,20
9	259,55	6,22	259,22	6,20
10	262,75	6,22	259,26	6,20
<b>Mitjana</b>	262,15	6,22	258,96	6,21
<b>SD</b>	0,94	0,01	0,32	0,01
<b>RSD</b>	0,36 %	0,14 %	0,12 %	0,13 %

	Àrea	Temps de retenció
<b>Mitjana entre dies</b>	260,56	6,21
<b>SD entre dies</b>	1,77	0,01
<b>RSD entre dies</b>	0,68 %	0,15 %

*Quadre 63. Resultats obtinguts per la precisió del sistema instrumental pirazinamida 130%*

4.2.4.2. Repetibilitat del mètode

4.2.4.2.1 Repetibilitat de la solució patró

Els resultats obtinguts dels estudis de precisió per la solució patró per rifampicina, isoniazida i pirazinamida es mostren en els quadres 64, 65 i 66 respectivament. S'obtenen resultats de coeficient de variació (RSD) per sota del 3,7%, límit establert per la AOAC, fet que demostra que el mètode desenvolupat presenta una bona repetibilitat i precisió per la solució patró.

<b>RIFAMPICINA</b>			
<b>%</b>	<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (FR) (Y/X)</b>
70	141,90	105,26	0,74
70	140,40	104,75	0,75
70	140,10	104,44	0,75
100	201,90	153,13	0,76
100	200,80	150,91	0,75
100	200,00	151,20	0,76
130	263,80	197,34	0,75
130	261,60	196,22	0,75
130	260,40	194,87	0,75
<b>Mitjana</b>			0,75
<b>SD</b>			0,01
<b>RSD</b>			0,70 %

*Quadre 64. Resultats obtinguts per la precisió de la solució patró per rifampicina*

<b>ISONIAZIDA</b>			
<b>%</b>	<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (FR) (Y/X)</b>
70	92,70	48,19	0,52
70	93,10	49,33	0,53
70	93,70	49,60	0,53
100	132,50	70,18	0,53
100	132,40	70,28	0,53
100	132,80	70,68	0,53
130	171,70	93,82	0,55
130	176,40	94,67	0,54
130	173,60	92,11	0,53
<b>Mitjana</b>			0,53
<b>SD</b>			0,01
<b>RSD</b>			1,33 %

*Quadre 65. Resultats obtinguts per la precisió de la solució patró per isoniazida*

<b>PIRAZINAMIDA</b>			
<b>%</b>	<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (FR) (Y/X)</b>
70	235,40	152,39	0,65
70	233,20	153,21	0,66
70	232,70	152,88	0,66
100	335,00	215,59	0,64
100	332,10	214,43	0,65
100	336,80	217,73	0,65
130	433,60	274,44	0,63
130	433,00	277,34	0,64
130	433,30	274,78	0,63
<b>Mitjana</b>			0,64
<b>SD</b>			0,01
<b>RSD</b>			1,32 %

*Quadre 66. Resultats obtinguts per la precisió de la solució patró per pirazinamida*

#### 4.2.4.2.2 Repetibilitat de la solució problema

Els resultats obtinguts dels estudis de precisió per la solució problema (n=7) per rifampicina, isoniazida i pirazinamida es mostren en els quadres 67, 68 i 69 respectivament. S'obtenen resultats de coeficient de variació (RSD) per sota del 3,7% establert per la AOAC, fet que demostra que el mètode desenvolupat presenta una bona repetibilitat i precisió per la solució problema. Les dades obtingudes en aquest estudi han corresponen a segon cromatògraf inclòs en l'estudi de validació.



<b>RIFAMPICINA</b>			
<b>%</b>	<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (FR) (Y/X)</b>
1	215,81	6159,50	28,54
2	232,66	6430,00	27,64
3	213,27	5996,50	28,12
4	216,00	6267,50	29,02
5	249,73	6856,00	27,45
6	212,14	6081,50	28,67
7	220,87	6272,00	28,40
<b>Mitjana</b>			28,26
<b>SD</b>			0,56
<b>RSD</b>			1,99 %

Quadre 67. Resultats obtinguts per la precisió de la solució problema per rifampicina

<b>ISONIAZIDA</b>			
<b>%</b>	<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (FR) (Y/X)</b>
1	139,45	3219,00	23,08
2	150,34	3508,00	23,33
3	137,81	3146,00	22,83
4	139,58	3078,50	22,06
5	161,37	3717,00	23,03
6	137,09	3085,50	22,51
7	142,73	3399,50	23,82
<b>Mitjana</b>			22,95
<b>SD</b>			0,57
<b>RSD</b>			2,47 %

Quadre 68. Resultats obtinguts per la precisió de la solució problema per isoniazida

<b>PIRAZINAMIDA</b>			
<b>%</b>	<b>Conc. µg/ml (X)</b>	<b>Resposta (Y)</b>	<b>Factor resposta (FR) (Y/X)</b>
1	346,05	11543,00	33,36
2	373,06	12064,00	32,34
3	341,97	10837,00	31,69
4	346,36	10497,50	30,31
5	400,45	12620,50	31,52
6	340,17	10583,50	31,11
7	354,17	11408,50	32,21
<b>Mitjana</b>			31,79
<b>SD</b>			0,97
<b>RSD</b>			3,06 %

*Quadre 69. Resultats obtinguts per la precisió de la solució problema per pirazinamida*

#### 4.2.4.2.3 Precisió intermitja del mètode

Per determinar la precisió intermitja del mètode, s'analitzen les mostres de rifampicina, isoniazida i pirazinamida en diferents dies i per dos analistes diferents. Es preparen 7 mostres de solució problema segons metòdica analítica descrita a l'apartat 3.2.2 *Mètodes*. Els resultats obtinguts expressats en forma de factor resposta i el tractament posterior de les dades demostren la precisió intermitja del mètode. Els quadres 70, 71, 72, 73, 74 i 75 mostren els resultats obtinguts de la precisió intermitja del mètode per rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament.

#### Diferents dies, mateix analista

RIFAMPICINA						
%	DIA 1			DIA 2		
	Conc (X) (µg/ml)	Àrea (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) (µg/ml)	Àrea (Y)	FR (Y/X)
100	215,81	6159,50	28,54	212,74	5762,50	27,09
100	232,66	6430,00	27,64	213,46	5660,00	26,52
100	213,27	5996,50	28,12	222,80	6210,50	27,87
100	216,00	6267,50	29,02	212,00	5881,50	27,74
100	249,73	6856,00	27,45	214,26	5983,00	27,92
100	212,14	6081,50	28,67	228,67	5926,50	25,92
100	220,87	6272,00	28,40	212,27	5536,50	26,08
<b>Mitjana</b>	28,26			27,02		
<b>SD</b>	0,56			0,85		
<b>RSD</b>	1,99 %			3,18 %		

<b>Mitjana interdia</b>	27,64
<b>SD interdia</b>	0,95
<b>RSD interdia</b>	3,43%

Quadre 70. Resultats obtinguts per la precisió intermitja del mètode per rifampicina

ISONIAZIDA						
%	DIA 1			DIA 2		
	Conc (X) (µg/ml)	Àrea (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) (µg/ml)	Àrea (Y)	FR (Y/X)
100	139,45	3219,00	23,08	137,47	3113,50	22,65
100	150,34	3508,00	23,33	137,93	3198,50	23,19
100	137,81	3146,00	22,83	143,97	3461,00	24,04
100	139,58	3078,50	22,06	136,99	3171,50	23,15
100	161,37	3717,00	23,03	138,45	3010,00	21,74
100	137,09	3085,50	22,51	147,76	3586,00	24,27
100	142,73	3399,50	23,82	137,17	3217,00	23,45
<b>Mitjana</b>	22,95			23,21		
<b>SD</b>	0,568			0,851		
<b>RSD</b>	2,47 %			3,67 %		

<b>Mitjana interdia</b>	23,08
<b>SD interdia</b>	0,71
<b>RSD interdia</b>	3,07 %

Quadre 71. Resultats obtinguts per la precisió intermitja del mètode per isoniazida

PIRAZINAMIDA						
%	DIA 1			DIA 2		
	Conc (X) (µg/ml)	Àrea (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) (µg/ml)	Àrea (Y)	FR (Y/X)
100	346,05	11543,00	33,36	341,13	11482,50	33,66
100	373,06	12064,00	32,34	342,28	11524,00	33,67
100	341,97	10837,00	31,69	357,26	11780,50	32,97
100	346,36	10497,50	30,31	339,94	11215,00	32,99
100	400,45	12620,50	31,52	343,57	10765,00	31,33
100	340,17	10583,50	31,11	366,68	12599,00	34,36
100	354,17	11408,50	32,21	340,38	11189,50	32,87
<b>Mitjana</b>			31,79			33,12
<b>SD</b>			0,972			0,951
<b>RSD</b>			3,06 %			2,87%

<b>Mitjana interdia</b>	32,46
<b>SD interdia</b>	1,15
<b>RSD interdia</b>	3,56 %

Quadre 72. Resultats obtinguts per la precisió intermitja del mètode per pirazinamida

Analistes diferents

RIFAMPICINA						
%	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	Conc (X) (µg/ml)	Àrea (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) (µg/ml)	Àrea (Y)	FR (Y/X)
100	215,81	6159,50	28,54	214,94	5954,00	27,70
100	232,66	6430,00	27,64	213,65	5832,50	27,30
100	213,27	5996,50	28,12	213,29	5792,50	27,16
100	216,00	6267,50	29,02	213,67	5971,50	27,95
100	249,73	6856,00	27,45	211,98	5801,00	27,37
100	212,14	6081,50	28,67	212,97	5706,00	26,79
100	220,87	6272,00	28,40	213,75	5768,00	26,98
<b>Mitjana</b>	28,26			27,32		
<b>SD</b>	0,56			0,400		
<b>RSD</b>	1,99 %			1,46 %		

<b>Mitjana interanalista</b>	27,79
<b>SD interdia</b>	0,68
<b>RSD interdia</b>	2,43 %

Quadre 73. Resultats obtinguts per la precisió intermitja del mètode per rifampicina

ISONIAZIDA						
%	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	Conc (X) (µg/ml)	Àrea (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) (µg/ml)	Àrea (Y)	FR (Y/X)
100	139,45	3219,00	23,08	138,89	3297,50	23,74
100	150,34	3508,00	23,33	138,06	3282,50	23,78
100	137,81	3146,00	22,83	137,82	3347,00	24,28
100	139,58	3078,50	22,06	138,07	3230,00	23,39
100	161,37	3717,00	23,03	136,98	3155,50	23,04
100	137,09	3085,50	22,51	137,62	3102,00	22,54
100	142,73	3399,50	23,82	138,13	3291,00	23,83
<b>Mitjana</b>			22,95			23,51
<b>SD</b>			0,568			0,578
<b>RSD</b>			2,47 %			2,46 %

<b>Mitjana interanalista</b>	23,23
<b>SD interdia</b>	0,62
<b>RSD interdia</b>	2,68%

Quadre 74. Resultats obtinguts per la precisió intermitja del mètode per isoniazida

PIRAZINAMIDA						
%	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	Conc (X) (µg/ml)	Àrea (Y)	FR (Y/X)	Conc (X) (µg/ml)	Àrea (Y)	FR (Y/X)
100	346,05	11543,00	33,36	344,66	11589,00	33,62
100	373,06	12064,00	32,34	342,59	11970,50	34,94
100	341,97	10837,00	31,69	342,01	12155,50	35,54
100	346,36	10497,50	30,31	342,62	11342,50	33,11
100	400,45	12620,50	31,52	339,90	11025,00	32,44
100	340,17	10583,50	31,11	341,50	10990,00	32,18
100	354,17	11408,50	32,21	342,76	11586,50	33,80
<b>Mitjana</b>			31,79			33,66
<b>SD</b>			0,972			1,238
<b>RSD</b>			3,06 %			3,68 %

<b>Mitjana interanalista</b>	33,39
<b>SD interdia</b>	1,10
<b>RSD interdia</b>	3,28 %

Quadre 75. Resultats obtinguts per la precisió intermitja del mètode per pirazinamida

Els resultats de RSD obtinguts estan per sota dels límits establerts per la AOAC (3,7%) mostrant que el mètode d'anàlisi proposat té una bona precisió intermitja.

#### 4.2.5 Exactitud

En els quadres 76, 77 i 78 es mostren els resultats obtinguts per rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament per l'estudi d'exactitud, adjuntant alhora la mitjana, desviació estàndard (SD) i el coeficient de variació (RSD) per la recuperació calculada.



<b>RIFAMPICINA</b>			
<b>Concentració (µg/ml) afegida</b>	<b>Concentració (µg/ml) trobada</b>	<b>Error relatiu en %</b>	<b>% recuperació</b>
138,50	137,48	-0,74	99,26
139,50	138,50	-0,72	99,28
140,50	139,37	-0,80	99,20
201,50	203,52	1,00	101,00
200,00	203,97	1,99	101,99
204,00	208,93	2,41	102,41
260,3	258,93	-0,53	99,47
261,1	265,39	1,64	101,64
262,2	241,07	-0,84	99,16
<b>N</b>		<b>9</b>	
<b>Recuperació (mitjana)</b>		<b>100,38</b>	
<b>SD</b>		<b>1,36</b>	
<b>RSD</b>		<b>1,36 %</b>	

*Quadre 76. Resultats obtinguts per l'estudi d'exactitud del mètode per rifampicina*

<b>ISONIAZIDA</b>			
<b>Concentració (µg/ml) afegida</b>	<b>Concentració (µg/ml) trobada</b>	<b>Error relatiu en %</b>	<b>% recuperació</b>
93,90	90,94	-3,16	96,84
92,90	89,02	-4,17	95,83
93,70	90,73	-3,17	96,83
132,40	131,27	-0,85	99,15
134,30	133,51	-0,59	99,41
132,10	128,23	-2,93	97,07
173,8	170,27	-2,03	97,97
172,1	176,01	2,27	102,27
173,8	170,64	-1,82	98,18
<b>N</b>		<b>9</b>	
<b>Recuperació (mitjana)</b>		<b>98,17</b>	
<b>SD</b>		<b>1,92</b>	
<b>RSD</b>		<b>1,96 %</b>	

*Quadre 77. Resultats obtinguts per l'estudi d'exactitud del mètode per isoniazida*

<b>PIRAZINAMIDA</b>			
<b>Concentració (µg/ml) afegida</b>	<b>Concentració (µg/ml) trobada</b>	<b>Error relatiu en %</b>	<b>% recuperació</b>
231,80	237,20	2,33	102,33
234,00	242,56	3,66	103,66
234,30	240,45	2,63	102,63
333,40	335,65	0,67	100,67
333,30	332,67	-0,19	99,81
333,00	333,38	0,12	100,12
432,4	417,11	-3,54	96,46
434,5	414,14	-4,69	95,31
432,5	415,44	-3,95	96,05
<b>N</b>		<b>9</b>	
<b>Recuperació (mitjana)</b>		<b>99,67</b>	
<b>SD</b>		<b>3,07</b>	
<b>RSD</b>		<b>3,08 %</b>	

Quadre 78. Resultats obtinguts per l'estudi d'exactitud del mètode per pirazinamida

La recuperació obtinguda individualment i la mitjana per cada principi actiu es troba dins dels límits establerts segons l'AOAC (95-105%). Es conclou doncs que l'estudi de recuperació dels principis actius per l'avaluació d'aquests en el producte acabat és correcte i, per tant, el mètode d'anàlisi proposat es suficientment exacte.

#### 4.2.6 Robustesa

Els resultats obtinguts per rifampicina, isoniazida i pirazinamida, per cadascun dels experiments realitzats segons el que s'indica a l'apartat 3.2.2 *Mètodes*, es troben resumits en els quadres 79 a 90 respectivament.

De les dades obtingudes es fa un tractament estadístic mitjançant la realització d'una anàlisi de variància (ANOVA) d'una via per determinar si hi ha diferències estadísticament significatives o no.

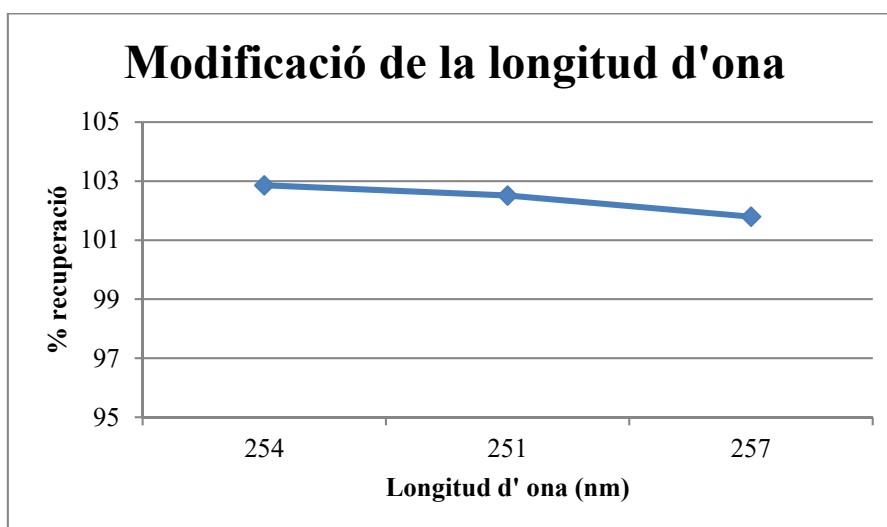
- Modificació de la longitud d'ona del detector

*% recuperació rifampicina*

<i>Mostra</i>	<i>251 nm</i>	<i>254 nm</i>	<i>257 nm</i>
1	102,23	104,60	101,72
2	105,14	104,11	102,43
3	100,16	99,86	101,24
<i>Mitjana</i>	102,51	102,86	101,79
<i>SD</i>	2,50	2,61	0,60
<i>RSD</i>	2,4 %	2,5 %	0,6 %

*Quadre 79. Resultats obtinguts per l'estudi de variació de longitud d'ona per rifampicina*

La figura 126 mostra la representació gràfica del % de recuperació de rifampicina en funció de la longitud d'ona establerta.



*Figura 126. Representació del % recuperació de rifampicina en l'estudi de variació de longitud d'ona*

El tractament estadístic ANOVA es representa a la figura 127.

## RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
254	3	308,57	102,8566667	6,79503333
251	3	307,53	102,51	6,2589
257	3	305,39	101,7966667	0,35843333

## ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,752622222	2	0,876311111	0,19600816	0,827065919	5,14325285
Dentro de los grupos	26,82473333	6	4,470788889			
Total	28,57735556	8				

Figura 127. Anàlisi estadístic de l'estudi de variació de longitud d'ona

De l'anàlisi estadística realitzada, s'obté una F experimental de 0,1960, valor molt inferior a l'establert pel valor crític especificat de F ( $p < 0,05$ ) que és de 5,1432, per la qual cosa existeix una probabilitat del 82,7 % de que els valors experimentals comparats formin part de la mateixa població estadística. Això vol dir que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts de rifampicina a les diferents longituds d'ona assajades, la qual cosa permet afirmar que el mètode analític posat a punt és robust pel que fa a les variacions del paràmetre longitud d'ona entre els valors de 251 nm i 257 nm per analitzar rifampicina.

## % recuperació isoniazida

Mostra	251 nm	254 nm	257 nm
1	102,10	101,47	101,33
2	98,40	97,72	97,82
3	99,61	98,98	98,91
Mitjana	100,04	99,39	99,35
SD	1,89	1,91	1,79
RSD	1,9 %	1,9 %	1,8 %

Quadre 80. Resultats obtinguts per l'estudi de variació de longitud d'ona per isoniazida

La figura 128 mostra la representació gràfica del % de recuperació d'isoniazida en funció de la longitud d'ona establerta.

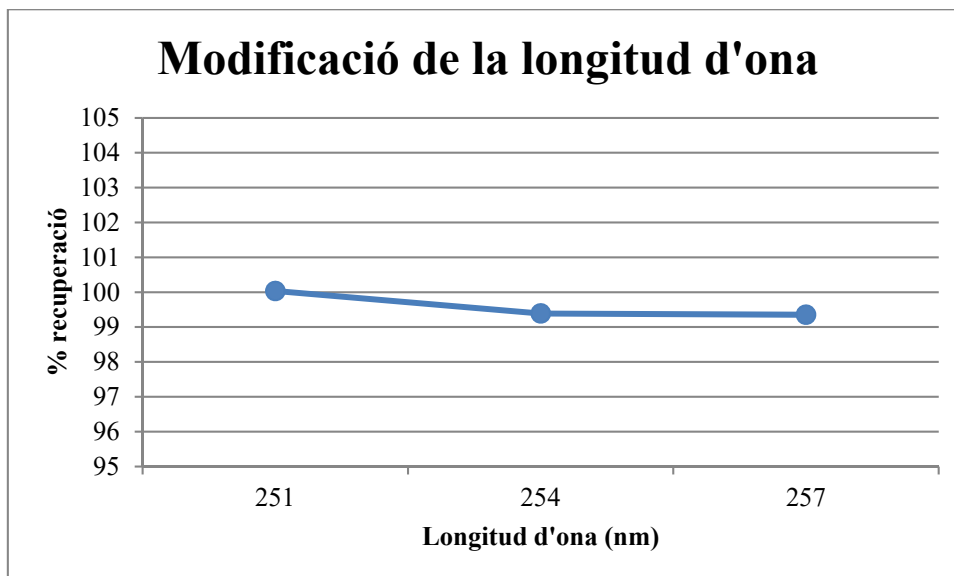


Figura 128. Representació del % recuperació de isoniazida en l'estudi de variació de longitud d'ona

El tractament estadístic ANOVA es representa a la figura 129.

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
251	3	300,11	100,0366667	3,55903333
254	3	298,17	99,39	3,6417
257	3	298,06	99,35333333	3,22743333

#### 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	0,886466667	2	0,443233333	0,12751043	0,882607197	5,14325285
Dentro de los grupos	20,85633333	6	3,476055556			
Total	21,7428	8				

Figura 129. Anàlisi estadístic de l'estudi de variació de longitud d'ona

De l'anàlisi estadística realitzada, s'obté una F experimental de 0,1275, valor molt inferior a l'establert pel valor crític especificat de F ( $p < 0,05$ ) que és de 5,1432, per la qual cosa existeix una probabilitat del 88,2 % de què els valors experimentals comparats formin part de la mateixa població estadística. Això vol dir que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts d'isoniazida a les diferents longituds d'ona assajades, la qual cosa permet afirmar que el mètode analític posat a punt és robust pel que fa a les variacions del paràmetre

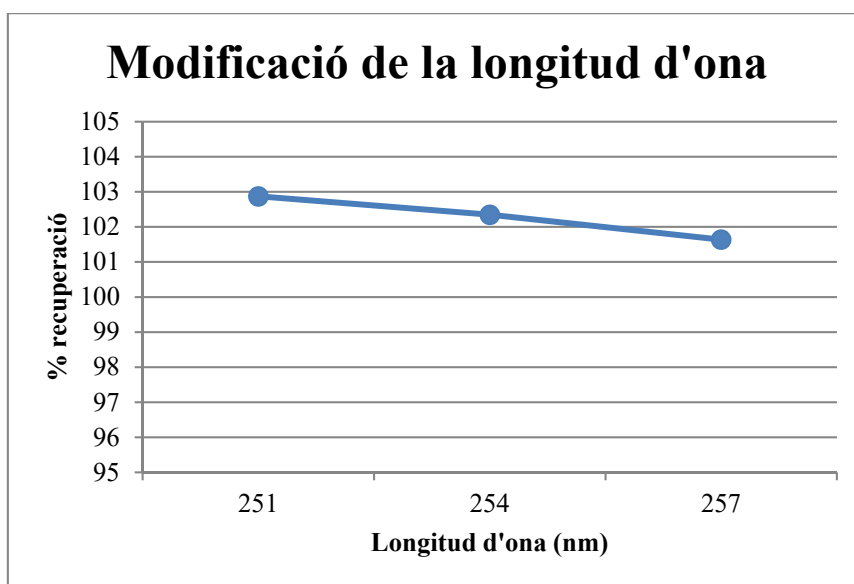
longitud d'ona entre els valors de 251 nm i 257 nm per analitzar isoniazida.

*% recuperació pirazinamida*

<i>Mostra</i>	<i>251 nm</i>	<i>254 nm</i>	<i>257 nm</i>
1	103,04	102,32	101,29
2	102,71	102,38	101,99
3	101,99	101,36	102,25
<i>Mitjana</i>	102,58	102,02	101,87
<i>SD</i>	0,53	0,57	0,54
<i>RSD</i>	0,52 %	0,56 %	0,53 %

*Quadre 81. Resultats obtinguts per l'estudi de variació de longitud d'ona per pirazinamida*

La figura 130 mostra la representació gràfica del % de recuperació de pirazinamida en funció de la longitud d'ona establerta.



*Figura 130. Representació del % recuperació de pirazinamida en l'estudi de variació de longitud d'ona*

El tractament estadístic ANOVA es representa a la figura 131.

## RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
251	3	307,74	102,58	0,2883
254	3	306,06	102,02	0,3276
257	3	305,53	101,8433333	0,246533333

## 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	0,887488889	2	0,443744444	1,543578248	0,287852317	5,14325285
Dentro de los grupos	1,724866667	6	0,287477778			
Total	2,612355556	8				

Figura 131. Anàlisi estadístic de l'estudi de variació de longitud d'ona

De l'anàlisi estadística realitzada, s'obté una F experimental de 1,5435, valor molt inferior a l'establert pel valor crític especificat de F ( $p < 0,05$ ) que és de 5,1432, per la qual cosa existeix una probabilitat del 28,8 % de què els valors experimentals comparats formin part de la mateixa població estadística. Això vol dir que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts de pirazinamida a les diferents longituds d'ona assajades, la qual cosa permet afirmar que el mètode analític posat a punt és robust pel que fa a les variacions del paràmetre longitud d'ona entre els valors de 251 nm i 257 nm per analitzar pirazinamida.

Considerant els resultats obtinguts segons l'anàlisi de variància realitzada, es conclou que no existeixen diferències estadísticament significatives per cap dels principis actius objecte d'estudi al realitzar petites variacions en la longitud d'ona del detector. Per tant, el mètode és robust per aquest paràmetre entre els intervals 251 nm a 257 nm.

- Modificació de la temperatura de la columna

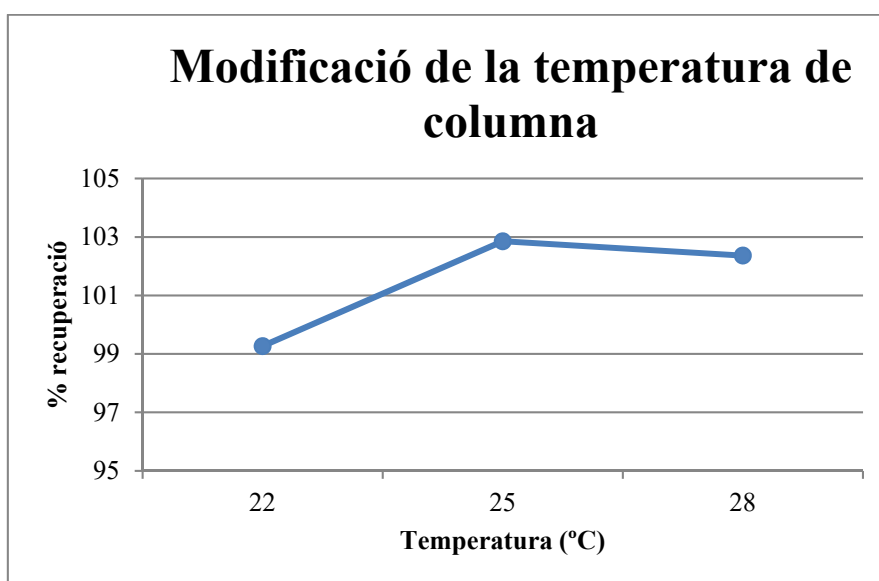


*% recuperació rifampicina*

<i>Mostra</i>	22 °C	25 °C	28 °C
1	98,45	104,60	102,91
2	102,40	104,11	105,07
3	96,96	99,86	99,12
<i>Mitjana</i>	99,27	102,86	102,37
<i>SD</i>	2,81	2,61	3,01
<i>RSD</i>	2,8 %	2,5 %	2,9 %

*Quadre 82. Resultats obtinguts per l'estudi de variació de temperatura de columna per rifampicina*

La figura 132 mostra la representació gràfica del % de recuperació de rifampicina en funció de la temperatura de columna establerta.



*Figura 132. Representació del % recuperació de rifampicina en l'estudi de variació de la temperatura de columna*

El tractament estadístic ANOVA es representa a la figura 133.

RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
22	3	297,81	99,27	7,9027	
25	3	308,57	102,8566667	6,79503333	
28	3	307,1	102,3666667	9,07203333	

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	22,69362222	2	11,34681111	1,4320895	0,310126014	5,14325285
Dentro de los grupos	47,53953333	6	7,923255556			
Total	70,23315556	8				

Figura 133. Anàlisi estadístic de la variació de la temperatura de columna

De l'anàlisi estadística realitzada, s'obté una F experimental de 1,4321, valor molt inferior a l'establert pel valor crític especificat de F ( $p < 0,05$ ) que és de 5,1432, per la qual cosa existeix una probabilitat del 31,0 % de què els valors experimentals comparats formin part de la mateixa població estadística. Això vol dir que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts de rifampicina a les diferents temperatures de columna assajades, la qual cosa permet afirmar que el mètode analític posat a punt és robust pel que fa a les variacions del paràmetre temperatura de columna entre els valors de 22 i 25 °C per analitzar rifampicina.

#### % recuperació isoniazida

Mostra	22 °C	25 °C	28 °C
1	99,13	101,47	101,41
2	98,51	97,72	98,05
3	101,08	98,98	99,47
Mitjana	99,58	99,39	99,64
SD	1,34	1,91	1,69
RSD	1,3 %	1,9 %	1,7 %

Quadre 83. Resultats obtinguts per l'estudi de variació de la temperatura de columna per isoniazida

La figura 134 mostra la representació gràfica del % de recuperació d'isoniazida en funció de la temperatura de columna establerta.

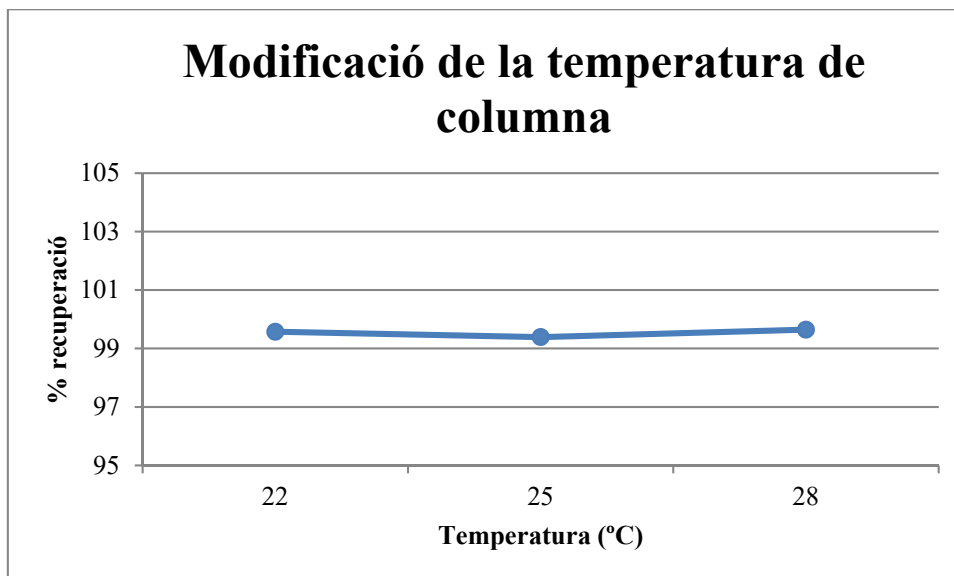


Figura 134. Representació del % recuperació de isoniazida en l'estudi de variació de la temperatura de columna

El tractament estadístic ANOVA es representa a la figura 135.

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
22	3	298,72	99,57333333	1,79863333
25	3	298,17	99,39	3,6417
28	3	298,93	99,64333333	2,84493333

#### 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	0,102688889	2	0,051344444	0,01859123	0,98163683	5,14325285
Dentro de los grupos	16,57053333	6	2,761755556			
Total	16,67322222	8				

Figura 135. Anàlisi estadístic de la variació de la temperatura de columna

De l'anàlisi estadística realitzada, s'obté una F experimental de 0,9816, valor molt inferior a l'establert pel valor crític especificat de F ( $p < 0,05$ ) que és de 5,1432, per la qual cosa existeix una probabilitat del 98,2 % de que els valors experimentals comparats formin part de la mateixa població estadística. Això vol dir que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts d'isoniazida a les diferents temperatures de columna assajades, la qual cosa permet afirmar que el mètode analític posat a punt és robust pel que fa a les variacions del

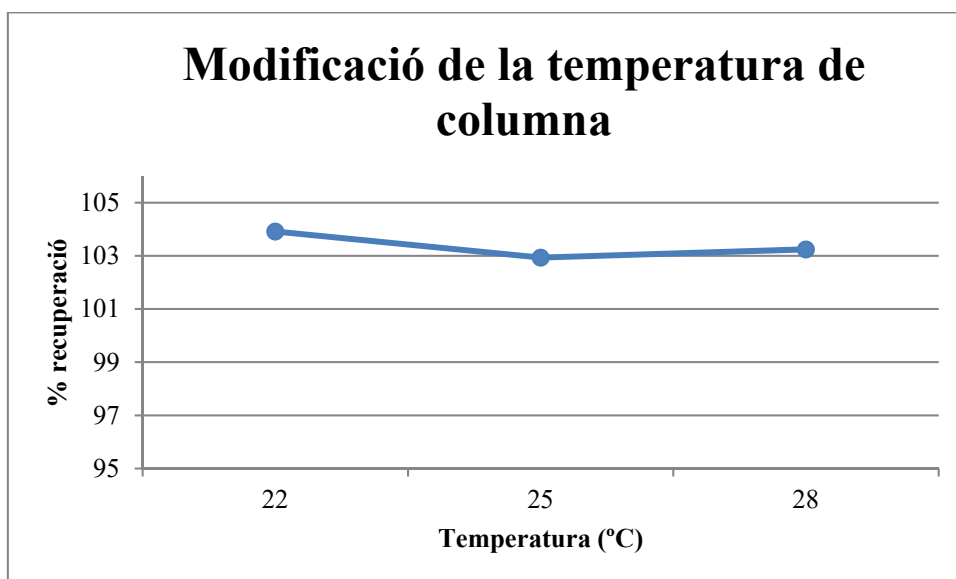
paràmetre temperatura de columna entre els valors de 22 i 25 °C per analitzar isoniazida.

*% recuperació pirazinamida*

<i>Mostra</i>	22 °C	25 °C	28 °C
1	103,70	102,32	102,54
2	103,72	102,38	102,98
3	104,33	104,11	104,20
<i>Mitjana</i>	103,92	102,94	103,24
<i>SD</i>	0,36	1,02	0,86
<i>RSD</i>	0,3 %	0,9 %	0,8 %

*Quadre 84. Resultats obtinguts per l'estudi de variació de la temperatura de columna per pirazinamida*

La figura 136 mostra la representació gràfica del % de recuperació de pirazinamida en funció de la temperatura de columna establerta.



*Figura 136. Representació del % recuperació de pirazinamida en l'estudi de variació de la temperatura de columna*

El tractament estadístic ANOVA es representa a la figura 137.

RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
22	3	311,7584874	103,9194958	0,12895465	
25	3	308,8104022	102,9368007	1,03777018	
28	3	309,7290734	103,2430245	0,73712129	

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,517076035	2	0,758538018	1,19527205	0,365664988	5,14325285
Dentro de los grupos	3,80769225	6	0,634615375			
Total	5,324768285	8				

Figura 137. Anàlisi estadístic de la variació de la temperatura de columna

De l'anàlisi estadística realitzada, s'obté una F experimental de 1,195, valor molt inferior a l'establert pel valor crític especificat de F ( $p < 0,05$ ) que és de 5,1432, per la qual cosa existeix una probabilitat del 36,6 % de què els valors experimentals comparats formin part de la mateixa població estadística. Això vol dir que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts de pirazinamida a les diferents temperatures de columna assajades, la qual cosa permet afirmar que el mètode analític posat a punt és robust pel que fa a les variacions del paràmetre temperatura de columna entre els valors de 22 i 25 °C per analitzar pirazinamida.

Considerant els resultats obtinguts segons l'anàlisi de variància realitzada, es conclou que no existeixen diferències estadísticament significatives per cap dels principis actius objecte d'estudi al realitzar petites variacions en la temperatura de columna. Per tant, el mètode és robust per aquest paràmetre en el interval comprès entre 22 °C i 28 °C.

- Modificació del volum d'injecció

*% recuperació rifampicina*

<i>Mostra</i>	<i>15 µl</i>	<i>20 µl</i>	<i>25 µl</i>
1	100,87	104,60	102,97
2	100,61	104,11	100,56
3	100,76	99,86	100,68
<i>Mitjana</i>	100,75	102,86	101,40
<i>SD</i>	0,13	2,61	1,36
<i>RSD</i>	0,1 %	2,5 %	1,3 %

Quadre 85. Resultats obtinguts per l'estudi de variació de volum d'injecció per rifampicina

La figura 138 mostra la representació gràfica del % de recuperació de rifampicina en funció del volum d'injecció establert.

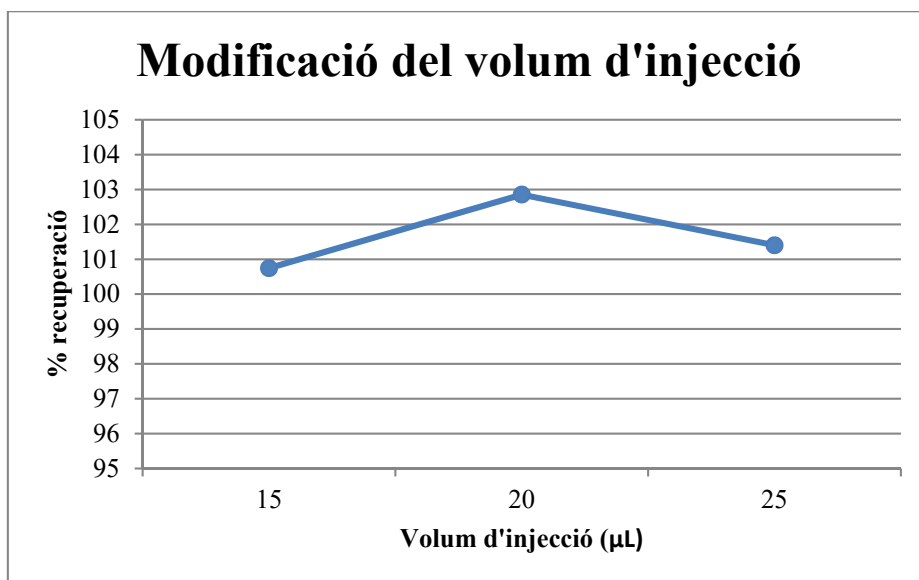


Figura 138. Representació del % recuperació de rifampicina en l'estudi de variació del volum d'injecció

El tractament estadístic ANOVA es representa a la figura 139.

RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
15	3	302,24	100,7466667	0,01703333	
20	3	308,57	102,8566667	6,79503333	
25	3	304,21	101,4033333	1,84443333	

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	6,995488889	2	3,497744444	1,21217967	0,361279318	5,14325285
Dentro de los grupos	17,313	6	2,8855			
Total	24,30848889	8				

Figura 139. Anàlisi estadístic de variació del volum d'injecció

De l'anàlisi estadística realitzada, s'obté una F experimental de 1,2121, valor molt inferior a l'establert pel valor crític especificat de F ( $p < 0,05$ ) que és de 5,1432, per la qual cosa existeix una probabilitat del 36,1 % de què els valors experimentals comparats formin part de la mateixa població estadística. Això vol dir que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts de rifampicina als diferents volums d'injecció assajats, la qual cosa permet afirmar que el mètode analític posat a punt és robust pel que fa a les variacions del paràmetre volum d'injecció entre els valors de 15 i 25  $\mu\text{l}$  per analitzar rifampicina.

#### % recuperació isoniazida

Mostra	15 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$
1	98,06	101,47	98,50
2	96,48	97,72	97,11
3	95,53	98,98	96,31
Mitjana	96,69	99,39	97,31
SD	1,28	1,91	1,11
RSD	1,3 %	1,9 %	1,1 %

Quadre 86. Resultats obtinguts per l'estudi de variació del volum d'injecció per isoniazida

La figura 140 mostra la representació gràfica del % de recuperació d'isoniazida en funció del volum d'injecció establert.

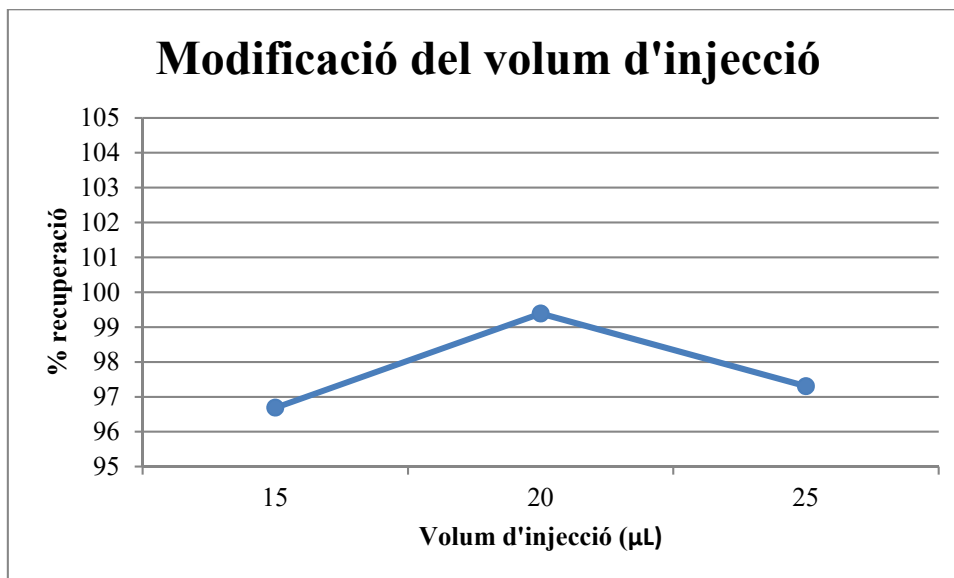


Figura 140. Representació del % recuperació de isoniazida en l'estudi de variació del volum d'injecció

El tractament estadístic ANOVA es representa a la figura 141.

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
15	3	290,07	96,69	1,6333
20	3	298,17	99,39	3,6417
25	3	291,92	97,30666667	1,22803333

#### 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	12,01055556	2	6,005277778	2,77037383	0,140524457	5,14325285
Dentro de los grupos	13,00606667	6	2,167677778			
Total	25,01662222	8				

Figura 141. Anàlisi estadístic de variació del volum d'injecció

De l'anàlisi estadística realitzada, s'obté una F experimental de 2,7703, valor molt inferior a l'establert pel valor crític especificat de F ( $p < 0,05$ ) que és de 5,1432, per la qual cosa existeix una probabilitat del 14,1 % de què els valors experimentals comparats formin part de la mateixa població estadística. Això vol dir que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts d'isoniazida als diferents volums d'injecció assajats, la qual cosa permet afirmar que el mètode analític posat a punt és robust pel que fa a les variacions del paràmetre volum d'injecció entre els valors de 15 i 25 µl per analitzar isoniazida.



### % recuperació pirazinamida

Mostra	15 $\mu$ l	20 $\mu$ l	25 $\mu$ l
1	105,26	102,32	104,43
2	103,03	102,38	102,41
3	102,40	104,10	101,98
Mitjana	103,56	102,93	102,94
SD	1,50	1,01	1,30
RSD	1,5 %	1,0 %	1,3 %

Quadre 87. Resultats obtinguts per l'estudi de variació del volum d'injecció per pirazinamida

La figura 142 mostra la representació gràfica del % de recuperació de pirazinamida en funció del volum d'injecció establert.

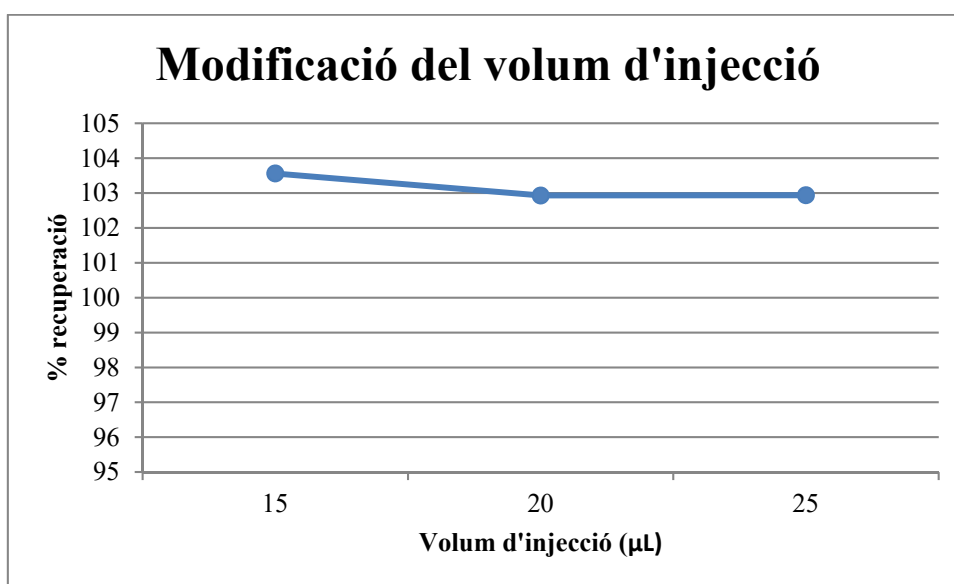


Figura 142. Representació del % recuperació de pirazinamida en l'estudi de variació del volum d'injecció

El tractament estadístic ANOVA es representa a la figura 143.

## RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
15	3	310,69	103,5633333	2,25823333
20	3	308,8	102,9333333	1,02173333
25	3	308,82	102,94	1,7113

## 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	0,785488889	2	0,392744444	0,23605898	0,796736067	5,14325285
Dentro de los grupos	9,982533333	6	1,663755556			
Total	10,76802222	8				

Figura 143. Anàlisi estadístic de variació del volum d'injecció

De l'anàlisi estadística realitzada, s'obté una F experimental de 0,2360, valor molt inferior a l'establert pel valor crític especificat de F ( $p < 0,05$ ) que és de 5,1432, per la qual cosa existeix una probabilitat del 79,7 % de què els valors experimentals comparats formin part de la mateixa població estadística. Això vol dir que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts de pirazinamida als diferents volums d'injecció assajats, la qual cosa permet afirmar que el mètode analític posat a punt és robust pel que fa a les variacions del paràmetre volum d'injecció entre els valors de 15 i 25  $\mu\text{l}$  per analitzar pirazinamida.

Considerant els resultats obtinguts segons l'anàlisi de variància realitzada, es conclou que no existeixen diferències estadísticament significatives per cap dels principis actius objecte d'estudi al realitzar petites variacions en el volum d'injecció. Per tant, el mètode és robust per aquest paràmetre en l'interval comprès entre 15  $\mu\text{l}$  i 25  $\mu\text{l}$ .

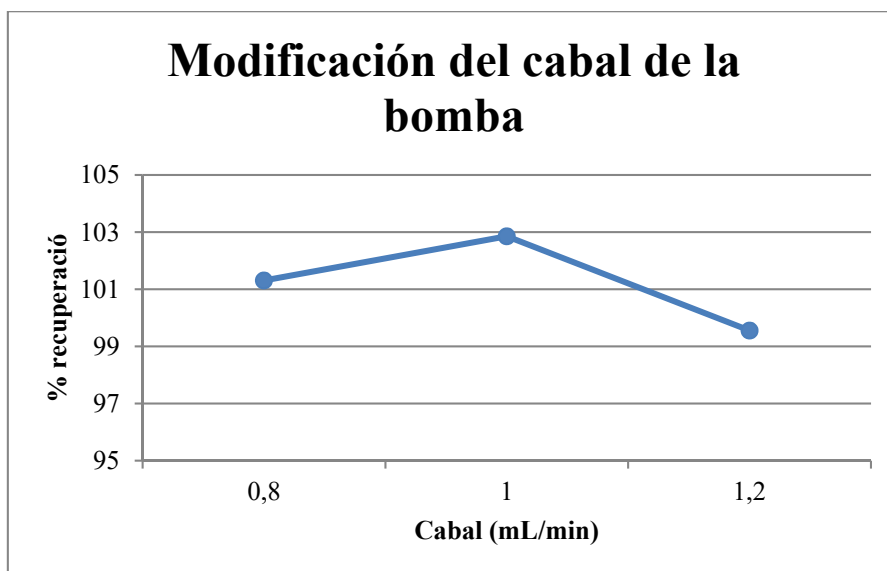
- Modificació del cabal de la bomba

*% recuperació rifampicina*

<i>Mostra</i>	<i>0,8 ml/min</i>	<i>1 ml/min</i>	<i>1,2 ml/min</i>
1	102,61	104,60	98,37
2	105,40	104,11	103,02
3	95,92	99,86	97,28
<i>Mitjana</i>	101,31	102,86	99,56
<i>SD</i>	4,87	2,61	3,05
<i>RSD</i>	4,8 %	2,5 %	3,1 %

*Quadre 88. Resultats obtinguts per l'estudi de variació de cabal per rifampicina*

La figura 144 mostra la representació gràfica del % de recuperació de rifampicina en funció del cabal establert.



*Figura 144. Representació del % recuperació de rifampicina en l'estudi de variació del cabal*

El tractament estadístic ANOVA es representa a la figura 145.

## RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
0,8	3	303,93	101,31	23,7351
1	3	308,57	102,8566667	6,79503333
1,2	3	298,67	99,55666667	9,29303333

## 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	16,35635556	2	8,178177778	0,61608695	0,571014544	5,14325285
Dentro de los grupos	79,64633333	6	13,27438889			
Total	96,00268889	8				

Figura 145. Anàlisi estadístic en l'estudi de variació del cabal

De l'anàlisi estadística realitzada, s'obté una F experimental de 0,6160, valor molt inferior a l'establert pel valor crític especificat de F ( $p < 0,05$ ) que és de 5,1432, per la qual cosa existeix una probabilitat del 57,1 % de què els valors experimentals comparats formin part de la mateixa població estadística. Això vol dir que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts de rifampicina als diferents cabals assajats, la qual cosa permet afirmar que el mètode analític posat a punt és robust pel que fa a les variacions del paràmetre cabal de la bomba entre els valors de 0,8 i 1,2 ml/minut per analitzar rifampicina.

*% recuperació isoniazida*

Mostra	0,8 ml/min	1 ml/min	1,2 ml/min
1	99,11	101,47	98,89
2	97,67	97,72	98,46
3	100,80	98,98	100,71
Mitjana	99,19	99,39	99,35
SD	1,57	1,91	1,20
RSD	1,6 %	1,9 %	1,2 %

Quadre 89. Resultats obtinguts per l'estudi de variació del cabal per isoniazida

La figura 146 mostra la representació gràfica del % de recuperació d'isoniazida en funció del cabal establert.

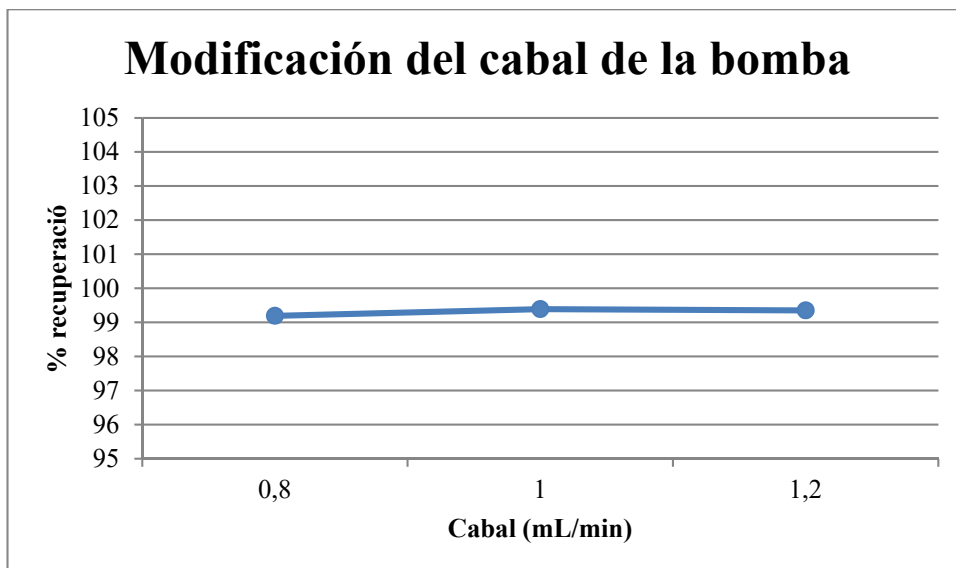


Figura 146. Representació del % recuperació de isoniazida en l'estudi de variació del cabal

El tractament estadístic ANOVA es representa a la figura 147.

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
0,8	3	297,58	99,19333333	2,45443333
1	3	298,17	99,39	3,6417
1,2	3	298,06	99,35333333	1,42663333

#### 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	0,065622222	2	0,032811111	0,01308473	0,987028591	5,14325285
Dentro de los grupos	15,04553333	6	2,507588889			
Total	15,11115556	8				

Figura 147. Anàlisi estadístic en l'estudi de variació del cabal

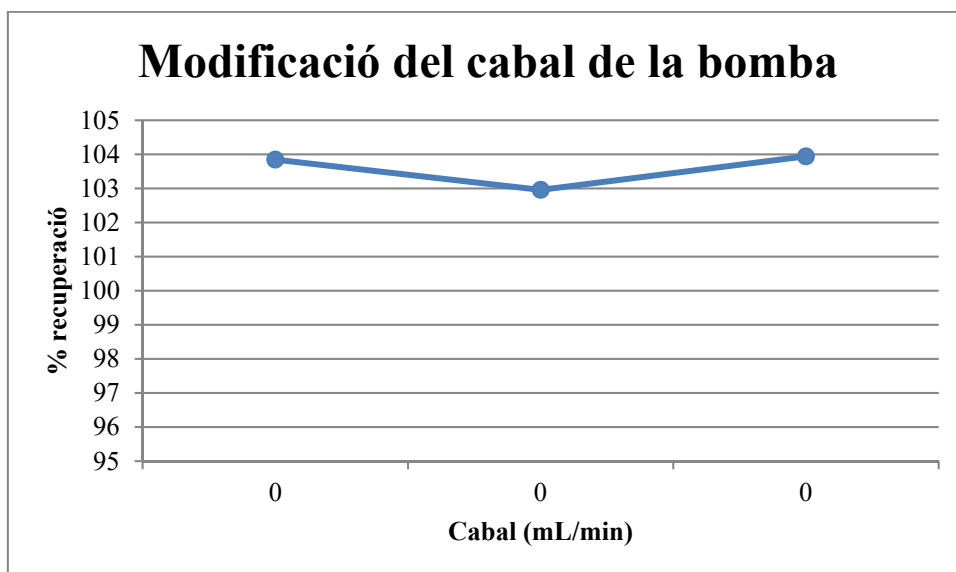
De l'anàlisi estadística realitzada, s'obté una F experimental de 0,0130, valor molt inferior a l'establert pel valor crític especificat de F ( $p < 0,05$ ) que és de 5,1432, per la qual cosa existeix una probabilitat del 98,7 % de què els valors experimentals comparats formin part de la mateixa població estadística. Això vol dir que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts d'isoniazida als diferents cabals assajats, la qual cosa permet afirmar que el mètode analític posat a punt és robust pel que fa a les variacions del paràmetre cabal de la bomba entre els valors de 0,8 i 1,2 ml/minut per analitzar isoniazida.

*% recuperació pirazinamida*

<i>Mostra</i>	<i>0,8 ml/min</i>	<i>1 ml/min</i>	<i>1,2 ml/min</i>
1	103,98	102,32	103,85
2	104,02	102,38	103,83
3	103,55	104,19	104,16
<i>Mitjana</i>	103,85	102,96	103,95
<i>SD</i>	0,26	1,07	0,18
<i>RSD</i>	0,3 %	1,0 %	0,2 %

*Quadre 90. Resultats obtinguts per l'estudi de variació del cabal per pirazinamida*

La figura 148 mostra la representació gràfica del % de recuperació de pirazinamida en funció del cabal establert.



*Figura 148. Representació del % recuperació de pirazinamida en l'estudi de variació del cabal*

El tractament estadístic ANOVA es representa a la figura 149.

## RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
0,8	3	311,55	103,85	0,0679
1	3	308,89	102,9633333	1,12943333
1,2	3	311,84	103,9466667	0,03423333

## ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,762466667	2	0,881233333	2,14661542	0,198060838	5,14325285
Dentro de los grupos	2,463133333	6	0,410522222			
Total	4,2256	8				

Figura 149. Anàlisi estadístic en l'estudi de variació del cabal

De l'anàlisi estadística realitzada, s'obté una F experimental de 2,146, valor molt inferior a l'establert pel valor crític especificat de F ( $p < 0,05$ ) que és de 5,1432, per la qual cosa existeix una probabilitat del 19,8 % de què els valors experimentals comparats formin part de la mateixa població estadística. Això vol dir que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts de pirazinamida als diferents cabals assajats, la qual cosa permet afirmar que el mètode analític posat a punt és robust pel que fa a les variacions del paràmetre cabal de la bomba entre els valors de 0,8 i 1,2 ml/minut per analitzar pirazinamida.

Considerant els resultats obtinguts segons l'anàlisi de variança realitzat, es conclou que no existeixen diferències estadísticament significatives per cap dels principis actius objecte d'estudi al realitzar petites variacions en el cabal de la bomba. Per tant, el mètode és robust per aquest paràmetre en l'interval comprès entre 0,8 ml/min i 1,2 ml/min.

#### 4.2.7 Estabilitat de la solució

El quadre 91 reflecteix el % de recuperació de rifampicina tant de la solució patró com de la solució problema, considerant el 100% el valor obtingut a temps 0 per a les dues solucions.

<i>Rifampicina</i>		
<i>Temps</i>	<i>Recuperació %</i>	
	Solució patró	Solució problema
0 hores	100,00	100,00
1 hora	100,37	-
2 hores	99,77	97,87
3 hores	99,26	-
4 hores	98,77	97,14
5 hores	98,41	-
6 hores	98,02	95,44
12 hores	99,18	92,47
24 hores	96,08	82,56
48 hores	89,42	69,10
72 hores	85,91	55,19

*Quadre 91. Estabilitat solució patró i solució problema rifampicina*

La figura 150 mostra la tendència de l'estabilitat a 25 °C de rifampicina en la solució patró i en la solució problema al llarg de 72 hores. Primerament es va fer la solució patró i posteriorment la solució problema. L'experimental es va fer en dies diferents agrupant rifampicina, isoniazida i pirazinamida, i no va ser possible, degut a la capacitat del HPLC, poder valorar els temps 1, 3 i 5 hores.



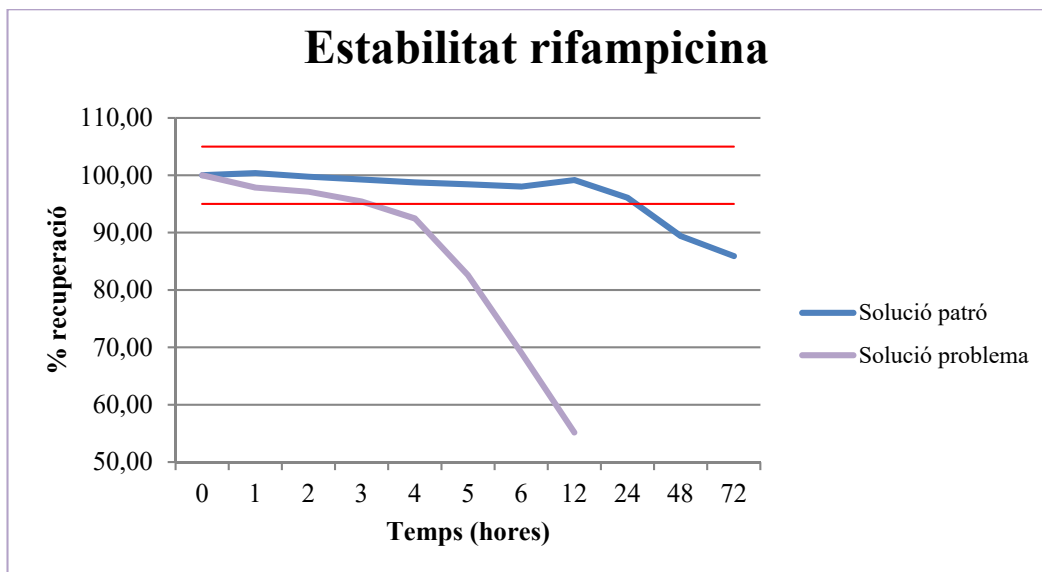


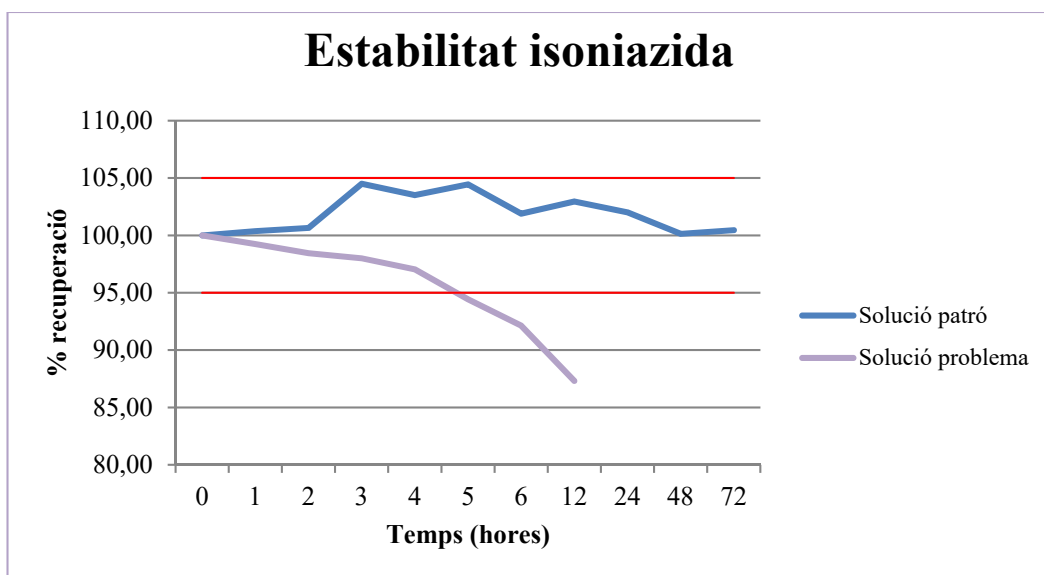
Figura 150. Tendència estabilitat solució patró i solució problema rifampicina

El quadre 92 indica el % de recuperació de isoniazida tant de la solució patró com de la solució problema, considerant el 100% el valor obtingut a temps 0 de les dues solucions.

<i>Isoniazida</i>		
<i>Temps</i>	<i>Recuperació %</i>	
	Solució patró	Solució problema
0 hores	100,00	100,00
1 hora	100,38	-
2 hores	100,66	99,25
3 hores	104,50	-
4 hores	103,51	98,45
5 hores	104,46	-
6 hores	101,90	98,01
12 hores	102,95	97,05
24 hores	102,02	94,44
48 hores	100,14	92,14
72 hores	100,47	87,33

Quadre 92. Estabilitat solució patró i solució problema isoniazida

La figura 151 mostra la tendència de l'estabilitat a 25 °C d'isoniazida en la solució patró i en la solució problema al llarg de 72 hores.



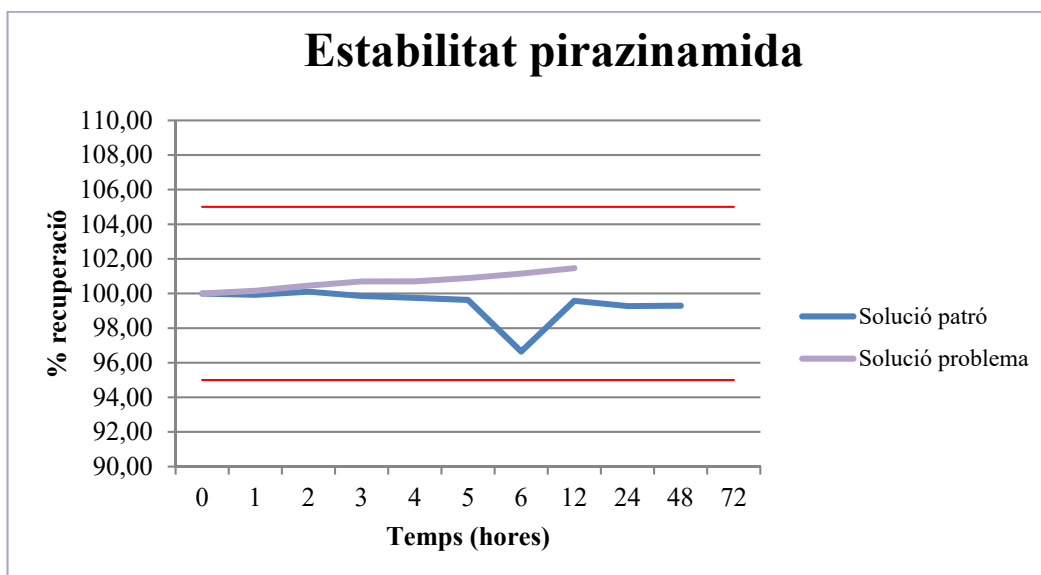
*Figura 151. Tendència estabilitat solució patró i solució problema isoniazida*

El quadre 93 indica el % de recuperació de pirazinamida tant de la solució patró com de la solució problema, considerant el 100% el valor obtingut a temps 0 de les dues solucions.

<i>Pirazinamida</i>		
<i>Temps</i>	<i>Recuperació %</i>	
	Solució patró	Solució problema
0 hores	100,00	100,00
1 hora	99,93	-
2 hores	100,11	100,16
3 hores	99,86	-
4 hores	99,75	100,46
5 hores	99,63	-
6 hores	96,65	100,70
12 hores	99,58	100,70
24 hores	99,28	100,89
48 hores	99,29	101,15
72 hores	100,00	101,46

*Quadre 93. Estabilitat solució patró i solució problema pirazinamida*

La figura 152 mostra la tendència de l'estabilitat a 25 °C de pirazinamida en la solució patró i en la solució problema al llarg de 72 hores.



*Figura 152. Tendència estabilitat solució patró i solució problema pirazinamida*

Considerant els resultats obtinguts es pot concloure que la solució patró és estable durant un màxim de 24 hores a  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , ja que tot i que la isoniazida i la pirazinamida encara mantenen els nivells dintre dels límits establerts (95-105 %), la rifampicina a les 48 hores s'ha degradat fins a valors inferiors (89,42 %) al dels límits establerts. En el cas de la solució problema es considera que és estable durant un màxim de 6 hores a  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , ja que tot i que la pirazinamida es manté estable durant tot el temps d'anàlisi, la rifampicina i la isoniazida es degraden passades les 6 hores i 12 hores respectivament fins a valors inferiors (92,47 % a les 12 hores per rifampicina i 94,44 % a les 24 hores per isoniazida) als dels límits establerts.

### **4.3 ESTUDIS DE PREFORMULACIÓ PER LA COMBINACIÓ RIFAMPICINA, ISONIAZIDA I PIRAZINAMIDA**

#### **4.3.1 Introducció**

Es pretén desenvolupar una forma farmacèutica líquida d'administració oral destinat a la població pediàtrica que contingui rifampicina, isoniazida i pirazinamida. Atenent la manca d'estabilitat quan es formulen els tres principis actius en medi aquós, deguda a la seva incompatibilitat, tal com demostra Chen.Y a la seva tesi doctoral on va arribar a la conclusió de la impossibilitat d'obtenir formulacions líquides aquoses amb els tres fàrmacs (Chen, 2000), es decideix utilitzar un medi oliós com a vehicle. El fet que el medi sigui anhidre hauria d'impossibilitar la reacció d'hidròlisi que es dona entre rifampicina i isoniazida i que produeix, en conseqüència, la degradació de la primera.

Com a base oliosa es trien els triglicèrids de cadena mitjana (TCM) degut a la seva baixa aportació calòrica i a la poca susceptibilitat que presenten a patir fenòmens d'oxidació. Altrament, els triglicèrids de cadena mitja, a diferència de la majoria dels olis vegetals, no presenten efecte laxant i són compatibles i ben tolerats per la població pediàtrica. Per això, són la base vehicular que s'utilitza a la preparació de la nutrició enteral hospitalària.

Degut a les característiques físico-químiques dels principis actius i a les concentracions en les que es troben, l'ús de triglicèrids de cadena mitjana com a medi fa que es formi una suspensió. Així mateix, perquè la fórmula sigui adequada a la població a la qual va destinada, es realitzen proves amb diferents excipients amb la finalitat de millorar les propietats galèniques i organolèptiques del preparat i poder garantir d'aquesta forma una millora en l'adherència terapèutica.

#### **4.3.2 Estudis de preformulació amb excipients**

La mescla dels tres principis actius amb el vehicle oliós (TCM) permet l'obtenció d'una suspensió amb moltes mancances com a tal, ja que el principal

problema que presenta, és que les partícules sedimenten molt ràpidament, i amb el temps formen un aglomerat al fons difícilment redispersable (fenomen de *caking*). Per millorar les propietats d'aquesta suspensió, s'utilitza com a base teòrica la Llei d'Stokes:

$$V = \frac{2 (d_1 - d_2) g \cdot r^2}{9\eta}$$

On:

V= Velocitat de sedimentació.

$d_1 - d_2$ = Diferència de densitats entre la fase dispersa i la fase dispersant.

g= Acceleració de la gravetat.

r= Radi de la fase dispersa.

$\eta$ = Viscositat.

Tenint en compte la Llei d'Stokes, per poder disminuir la velocitat de sedimentació i millorar així les propietats de la suspensió, es decideix augmentar la viscositat, ja que aquesta és inversament proporcional a la velocitat de sedimentació, i per altra banda, disminuir la mida de partícula (radi de la fase dispersa), ja que aquesta és directament proporcional a la velocitat de sedimentació.

#### 1) Augment de la viscositat

Es realitza una cerca bibliogràfica dels agents suspensors més adients per a la formulació tenint en compte incompatibilitats i possibles aplicacions en suspensions olioses. Alhora, es fa una cerca de possibles dispersants ja que l'addició d'aquests permet garantir una distribució més homogènia de les partícules. Els excipients seleccionats són els següents:

- **Glicerol Behenat**

Sinònims: Compritol-ATO888®

Funció: Utilitzat com a agent suspensor en suspensions olioses (Cano et al. 2012), (European Pharmacopoeia, 2016a), (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016a).

Concentració en suspensions orals: 2-10 % (Cano et al. 2012).

Incompatibilitats: És incompatible amb agents oxidants (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016a).

- **Triglicèrids d'àcids grassos (C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>)**

Sinònims: Gelucire®50/13

Funció: Utilitzat per les seves propietats com a agent suspensor i com a solubilitzant (Bandari et al. 2014), (European Pharmacopoeia, 2016b), (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016b).

Concentració en suspensions orals: 1-10 % (Bandari et al. 2014).

Incompatibilitats: És incompatible amb agents oxidants (Handbook of Pharmaceutical excipients, 2016b).

- **Monoestearat de gliceril**

Sinònims: Estearat de gliceril, monoestearina

Funció: Utilitzat per la gran varietat de propietats que té, en aquest cas com a solubilitzant, emulsificant i agent suspensor. Amb valors del Balanç Hidròfil-Lipòfil (HLB) al voltant de 4, idoni com a emulsionant en mescles aigua/oli. (European Pharmacopoeia, 2016c), (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016c).

Concentració en suspensions orals: 0,5-2% (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016c).

Incompatibilitats: És incompatible amb substàncies àcides, sals ionitzables, metalls pesants, aigua dura i òxids (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016c).

- **Lecitina de Soja líquida**

Sinònims: Topcithin® 300

Funció: Utilitzat per les seves propietats com a dispersant. (United States Pharmacopeia, 2016), (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016e).

Concentració en suspensions orals: 0,25-10% (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016e).

Incompatibilitats: És incompatible amb esterases, degut a que l' hidrolitzen. També és incompatible amb el clor, fluor i altres agents oxidants (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016e).

- **Monolaurat de sorbità**

Sinònims: Span® 20

Funció: Utilitzat per les seves propietats com a dispersant, agent antiestàtic i agent suspensor. (European Pharmacopoeia, 2016e), (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016f).

Concentració en suspensions orals: 1-15% (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016f).

Incompatibilitats: No s'han descrit incompatibilitats.

Amb les dades obtingudes, es realitzen tot un seguit d'assajos combinant els diferents agents suspensors amb els diferents dispersants sobre una base oliosa de triglicèrids de cadena mitjana (TCM). Es preparen mostres de 100 ml. Per



poder realitzar una comparativa de les fórmules obtingudes, es decideix utilitzar la mateixa concentració per als agents suspensors (10%), així com per als dispersants (5%). Les combinacions i les proporcions de cadascun d'ells es mostren en el quadre 94.

Referència	Agent suspensor (10%)	Dispersant (5%)
001	Compritol ATO 888 <sup>®</sup>	Topcithin <sup>®</sup> 300
002	Monoestearat de gliceril	Topcithin <sup>®</sup> 300
003	Compritol ATO 888 <sup>®</sup>	Span 20 <sup>®</sup>
004	Monoestearat de gliceril	Span 20 <sup>®</sup>
005	Gelucire 50/13 <sup>®</sup>	Topcithin <sup>®</sup> 300
006	Gelucire 50/13 <sup>®</sup>	Span 20 <sup>®</sup>

*Quadre 94. Proporcions i combinacions dels agents suspensors i dels dispersants*

S'estableix un procediment d'elaboració de la suspensió:

- Pesar dels components
- Escalfar els TCM fins 70 °C sota agitació amb hèlix
- Un cop calents, afegir l'agent suspensor mantenint l'agitació
- Deixar refredar la mescla
- Afegir el dispersant a la mescla freda, mantenint l'agitació

De les diferents formulacions es valora l'aspecte inicial, l'aspecte a les 24 h i la viscositat. Les condicions idònies per mesurar la viscositat de les fórmules, utilitzant el Viscosímetre de Brookfield Cap 2000+, són:

spindle (tipus de con) = 4

Hold (temps d'espera abans de començar a rotar el con) = 20 s

Run (temps de rotació del con) = 12 s

Velocitat de rotació del con = 800 rpm

Es considera com a valor de referència de viscositat per a suspensions 50 mPa.s. segons experiència pràctica de l'equip del Servei de Desenvolupament del

Medicament (SDM) de la Facultat de Farmàcia del Universitat de Barcelona, considerant aquest valor com l'ídoni per mantenir l'equilibri entre l'estabilitat de la suspensió i la correcta dosificació. Per poder establir un valor numèric de l'1 al 10 que serveixi com a eina comparativa entre les diferents formulacions, s'apliquen les següents fórmules:

$$\text{Per valors de viscositat } (\eta) > 50 \text{ mPa.s: } \quad \text{Valor numèric} = \frac{50}{\eta} \times 10$$

$$\text{Per valors de viscositat } (\eta) < 50 \text{ mPa.s: } \quad \text{Valor numèric} = \frac{\eta}{50} \times 10$$

El quadre 95 mostra els resultats obtinguts dels paràmetres avaluats de les diferents formulacions.

Referència	Viscositat mPa x s <sup>-1</sup> (resultats experimentals)	Viscositat (valor) codificat	Aspecte inicial	Aspecte 24 h
001	47,90	9,58	Suspensió groguenca, s'observa que en repòs deixa residu a l'envàs	S'observa separació de fases que s'uniformitza al agitar
002	No mesurable	No mesurable	Suspensió molt viscosa, groguenca, no s'observa residu a l'envàs	Té aspecte com de crema
003	51,89	9,63	Suspensió blanquinosa, s'observa que en repòs deixa residu a l'envàs	S'observa separació de fases que s'uniformitza al agitar
004	No mesurable	No mesurable	Suspensió molt viscosa, blanquinosa, en repòs no s'observa residu a l'envàs	Té aspecte com de crema
005	53,21	9,40	Suspensió groguenca, en repòs no deixa residu a l'envàs	Sense variacions
006	52,97	9,44	Suspensió blanquinosa, en repòs no deixa residu a l'envàs	Sense variacions

Quadre 95. Resultats obtinguts per les diferents formulacions

Tenint en compte els resultats obtinguts, es decideixen descartar les referències 002 i 004. En el cas de totes dues fórmules s'obtenen suspensions massa viscoses i impossibles de mesurar en les condicions establertes. Destacar que ambdues tenen el monoestearat de gliceril com a agent suspensor. S'exclou

doncs aquest excipient per a futurs assajos, deixant-ho com a alternativa si els altres agents suspensors no funcionessin, tenint com a premissa la disminució en la concentració del monoestearat de gliceril per evitar problemes d'excessiva viscositat.

Es decideixen fer més proves amb les formulacions que contenen Compritol ATO 888<sup>®</sup> i Gelucire 50/13<sup>®</sup>. Per evitar la separació de fases es disminueix la quantitat de dispersant a la meitat (2,5%), de forma que es generen 4 fórmules més. El quadre 96 mostra el número de referència i la composició de cadascuna d'elles.

<b>Referència</b>	<b>Agent suspensor (10%)</b>	<b>Dispersant (2,5%)</b>
007	Compritol ATO 888 <sup>®</sup>	Span 20 <sup>®</sup>
008	Compritol ATO 888 <sup>®</sup>	Topcithin <sup>®</sup> 300
009	Gelucire 50/13 <sup>®</sup>	Span 20 <sup>®</sup>
010	Gelucire 50/13 <sup>®</sup>	Topcithin <sup>®</sup> 300

*Quadre 96. Proporcions i combinacions dels agents suspensors i dels dispersants*

Les 4 fórmules es preparen seguint el procediment descrit per les primeres. Els resultats obtinguts per les referències 007, 008, 009 i 010 es mostren en el quadre 97.

Referència	Viscositat (resultats experimentals)	Viscositat (valor codificat)	Aspecte inicial	Aspecte 24 h
007	62,37	8,02	Suspensió blanquinosa, s'observa que en repòs deixa residu a l'envàs	Sense variacions
008	50,41	9,92	Suspensió groguenca, en repòs deixa residu a l'envàs	Sense variacions
009	47,52	9,50	Suspensió blanquinosa, en repòs no deixa residu a l'envàs	Sense variacions
010	45,13	9,03	Suspensió groguenca, en repòs no deixa residu a l'envàs	Sense variacions

*Quadre 97. Resultats obtinguts per les diferents formulacions*

El fet de disminuir la quantitat de dispersant a la meitat ha permès solucionar el problema de separació de fases que es donava després de 24 h de la fabricació. Es treballarà doncs amb els tres principis actius sobre aquestes 8 fórmules placebo per cercar la que sigui més adient en termes d'estabilitat, i característiques organolèptiques.

Previ a les proves a realitzar amb els principis actius, i tenint en compte els resultats obtinguts en els assajos de mida de partícula, es decideix disminuir i uniformitzar la mida de partícula dels mateixos per reduir la velocitat de sedimentació alhora que per facilitar el procediment d'elaboració de la fórmula.

## 2) Disminució de la mida de partícula

Per disminuir la mida de partícula dels tres principis actius i homogeneïtzar la posterior mescla es decideix tamisar cadascun d'ells per un tamís de 100 µm de llum. Es fan proves amb tamisos de llums superiors, però com s'observa que els compostos passen bé a través d'aquests, es va disminuint la llum del tamís fins arribar a la de 100 µm. El pas de rifampicina, isoniazida i pirazinamida per aquest tamís es costós, però permet obtenir una mida de partícula idònia per l'elaboració de suspensions (100 % < 100 µm).

## 4.4 ESTUDIS DE FORMULACIÓ PER LA COMBINACIÓ RIFAMPICINA, ISONIAZIDA I PIRAZINAMIDA

### 4.4.1 Preparació de la mescla de rifampicina, isoniazida i pirazinamida

Abans de fer els assajos pertinents amb els tres principis actius, es decideix preparar una mescla tamisada d'aquests tenint en compte les pautes de dosificació de l'OMS (Organización Mundial de la Salud, 2014b).

En el quadre 98 es mostren les pautes de dosificació de l'OMS, les concentracions de cadascun dels principis actius calculades a partir d'aquestes pautes de dosificació i les concentracions per a una suspensió de 100 ml.

Principi Actiu	Pautes de dosificació de l'OMS	Concentració (mg/ml)	Concentració en 100 ml
Rifampicina	15 mg/ kg/dia	20 mg/ml	2 g/100 ml
Isoniazida	10 mg/ kg/dia	13,3 mg/ml	1,33 g/100 ml
Pirazinamida	25 mg/ kg/dia	33,3 mg/ml	3,33 g/100 ml

*Quadre 98. Dosis de rifampicina, isoniazida i pirazinamida*

S'estableix el següent procediment per l'obtenció de la mescla dels tres principis actius:

Es pesen els tres components i es passen per un tamís de 100 µm de llum. Un cop tamisats, es col·loquen en un recipient que permeti la mescla manual dels tres principis actius. Per garantir la correcta uniformitat de la mescla, s'utilitzen recipients amb capacitat superior a la quantitat de mescla, de forma que 2/3 de l'envàs sempre estan lliures, fet que permet el moviment lliure de la mescla.

El mesclat es realitza de forma manual amb moviments oscil·lants en forma d'infinít durant 15 minuts.

Per a suspensions de 100 ml és necessiten 6,66 g de mescla.

### 4.4.2 Estudis de formulació amb rifampicina, isoniazida i pirazinamida

Es parteix de les 8 fórmules placebo obtingudes en l'etapa de preformulació. S'estableix un procediment d'elaboració de la suspensió:

- Pesar dels components
- Escalfar 80 ml de TCM fins 70 °C sota agitació en hèlix
- Un cop calents, afegir l'agent suspensor mantenint l'agitació
- Deixar refredar la mescla
- Afegir el dispersant a la mescla freda, mantenint l'agitació
- Afegir la mescla de principis actius mantenint l'agitació
- Afegir la quantitat necessària de TCM per obtenir una suspensió de 100 ml
- Condicionar en un envàs de vidre transparent

Es manté la mateixa numeració assignada a les 8 referències obtingudes en la fase de preformulació afegint el sufix – API per indicar que es treballa amb els principis actius.

Per valorar i comparar les diferents formulacions es defineixen uns paràmetres a estudiar i s'assigna un valor numèric a cadascun d'ells, evitant així resultats subjectius. En conseqüència, es desenvolupa una eina original i innovadora per l'avaluació de les característiques galèniques de les suspensions. Els paràmetres són els següents:

### 1. Viscositat

La mesura de la viscositat es realitza en les mateixes condicions de mesura que en les fórmules placebo (hold = 20, run=12, velocitat=800 rpm i spindle=4 ). Per assignar un valor numèric comprès entre 1 i 10 s'utilitzen les fórmules descrites en l'apartat de preformulació (apartat 4.3.2).

### 2. Mida de partícula

Es decideix fer una comparativa de la mida de partícula de les substàncies en suspensió, però davant de la impossibilitat de determinar aquest paràmetre degut a la impossibilitat de conèixer la mida de cada substància quan es troben barrejades, es decideix establir un valor fix referent al % de partícules globals que es troben per sota de 50 µm en la mescla en sec dels tres principis actius. S'aplica la següent fórmula:

Valor numèric = % partícules < 50 µm / 10

### 3. Característiques organolèptiques

Es consideren 4 paràmetres:

#### 3.1 Aspecte a temperatura ambient

S'aplica la següent fórmula:

$$\text{Valor numèric} = 10 - L - E - P$$

On:

- L= Líquid quartejat= 4
- E= Escuma =3
- P= Parets brutes (molt= 3, mig=2, poc=1)

#### 3.2 Coloració a temperatura ambient

Es segueix la guia INSTACOAT tal i com es mostra a la figura 153, considerant la referència E-4111 com la patró (valor numèric de 10) i disminuint en 2 unitats successivament per a referències inferiors.

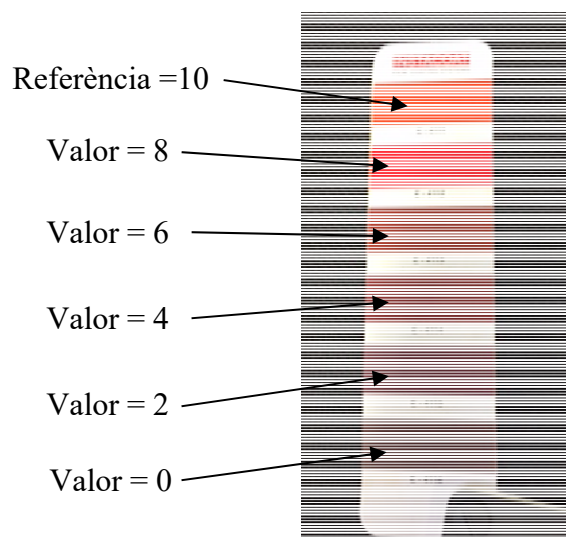


Figura 153. Referències guia INSTACOAT



### 3.3 Aspecte a 40 °C durant 24 h

Per a suspensions sòlides s'assigna un valor numèric = 0

Per a suspensions líquides s'assigna un valor numèric = 10

### 3.4 Coloració a 40 °C durant 24 h

S'utilitza la guia INSTACOAT. Només es valora en el cas de que l'aspecte a 40 °C durant 24 h sigui líquid.

Si hi ha variació respecte a la coloració inicial s'assigna un valor numèric = 0

Si no hi ha variació respecte a la coloració inicial s'assigna un valor numèric = 10

En aquest cas, a diferència de la baremació assignada en el paràmetre *coloració a temperatura ambient* on s'estableix un color determinat com a referència (E-4111) i a mesura que s'allunya d'aquest color patró s'assigna menys puntuació, s'estableix com a criteri que qualsevol variació del color obtingut inicialment, es considera quelcom molt negatiu per l'estabilitat de la fórmula i directament s'assigna el valor de zero.

Es calcula la mitjana dels 4 paràmetres.

## 4. Propietats de la suspensió

Es consideren 2 paràmetres:

### 4.1 Sedimentació

S'omple una proveta de 10 ml amb la formulació objecte d'estudi, es deixa en repòs 24 h i tot seguit es valora la separació en ml. S'aplica la següent fórmula:

$$\text{Valor numèric} = 10 - s$$

On:

s = ml de separació.

## 4.2 Redispersió

Es centrifuga la fórmula objecte d'estudi durant 10 minuts a 1000 revolucions per minut (rpm) amb la finalitat d'obtenir un precipitat. Posteriorment s'agita mitjançant un agitador electrònic durant 20 minuts. Cada 5 minuts es valora si el precipitat ha redispersat. S'aplica la següent fórmula:

$$\text{Valor numèric} = 10 - (t/2)$$

On:

t= temps que triga en redispersar-se el precipitat.

Es calcula la mitjana dels 2 paràmetres.

Es calcula la mitjana dels 4 valors numèrics obtinguts a partir dels 4 paràmetres estudiats. Aquest valor servirà per comparar formulacions, de manera que la formulació que obtingui el valor més elevat es considerarà com la suspensió amb millors propietats com a tal. Els quadres 99 i 100 mostren els valors individuals obtinguts per a cada formulació.

Paràmetres	001-API	003-API	005-API	006-API
<b>Viscositat</b>	<b>60,97</b>	<b>0</b>	<b>72,76</b>	<b>71,78</b>
<b>Mida de partícula</b>	<b>5,48</b>	<b>5,48</b>	<b>5,48</b>	<b>5,48</b>
Característiques organolèptiques				
Aspecte a T <sup>a</sup> ambient	9	0	7	8
Coloració a T <sup>a</sup> ambient	10	6	4	4
Aspecte i coloració a 40°C/24 h	0	0	10	0
<b>Total característiques organolèptiques</b>	<b>6,33</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>4</b>
Propietats de la suspensió				
Sedimentació	9,60	0	9,80	9,80
Redispersió	9,50	0	7,50	7,50
<b>Total propietats de la suspensió</b>	<b>9,55</b>	<b>0</b>	<b>8,65</b>	<b>8,65</b>

*Quadre 99. Valors individuals obtinguts per les diferents fórmules*

Paràmetres	007-API	008-API	009-API	010-API
<b>Viscositat</b>	<b>0</b>	<b>61,13</b>	<b>60,88</b>	<b>64,41</b>
<b>Mida de partícula</b>	<b>5,48</b>	<b>5,48</b>	<b>5,48</b>	<b>5,48</b>
Característiques organolèptiques				
Aspecte a T <sup>a</sup> ambient	7	8	9	8
Coloració a T <sup>a</sup> ambient	6	10	4	4
Aspecte i coloració a 40 °C/24 h	0	0	0	0
<b>Total característiques organolèptiques</b>	<b>4,33</b>	<b>6</b>	<b>4,33</b>	<b>4</b>
Propietats de la suspensió				
Sedimentació	10	9,70	9,60	9,80
Redispersió	0	9,50	0	7,50
<b>Total propietats de la suspensió</b>	<b>5</b>	<b>9,60</b>	<b>4,80</b>	<b>8,65</b>

Quadre 100. Valors individuals obtinguts per les diferents fórmules

El quadres 101 i 102 mostren els resultats obtinguts de l'anàlisi dels paràmetres descrits per les fórmules fabricades amb els principis actius.

Paràmetres	001-API	003-API	005-API	006-API
Viscositat	8,20	0	6,87	6,97
Mida de partícula	5,48	5,48	5,48	5,48
Característiques organolèptiques	6,33	2	7	4
Propietats de la suspensió	9,55	0	8,65	8,65
<b>TOTAL</b>	<b>7,39</b>	<b>1,87</b>	<b>7</b>	<b>6,28</b>

Quadre 101. Resultats obtinguts per les diferents fórmules

Paràmetres	007-API	008-API	009-API	010-API
Viscositat	0	8,18	8,21	7,76
Mida de partícula	5,48	5,48	5,48	5,48
Característiques organolèptiques	4,33	6	4,33	4
Propietats de la suspensió	5	9,60	4,80	8,65
<b>TOTAL</b>	<b>3,70</b>	<b>7,32</b>	<b>5,71</b>	<b>6,47</b>

Quadre 102. Resultats obtinguts per les diferents fórmules

Segons els resultats obtinguts, es poden considerar com a millors formulacions les referències 001-API i 008-API (totes dues contenen Compritol ATO 888®). A més a més, destacar que:

1. En totes les referències s'aprecia un residu considerable en les parets de l'envàs.
2. Les referències que contenen Compritol ATO 888® solidifiquen després d'estar 24 h a 40 °C, i les que contenen Gelucire 50/13® formen un precipitat que no redispersa.

Per resoldre aquestes deficiències es decideixen fer proves únicament amb les referències amb les quals s'han obtingut valors més elevats (001-API i 008-API) disminuint la quantitat de Compritol ATO 888® a la meitat (5%). Alhora, per evitar la formació de residu en les parets de l'envàs, es decideix afegir un antiadherent a la formulació. Es cerca un antiadherent que sigui compatible amb les suspensions olioses. Es troba que l'excipient més indicat és la simeticona. A continuació es descriu la informació referent a aquest:

- **Simeticona**

Sinònims: Dow-Corning®Q7-2243

Funció: Utilitzat per les seves propietats com agent antiadherent (antiestàtic). (European Pharmacopoeia, 2016g), (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016h).

Concentració en suspensions orals: Dosis màxima diària en nounats 126 mg de simeticona (British National Formulary for Children, 2016). En aquest cas, per a un nounat de 5 Kg de pes, la pauta terapèutica de la suspensió fora de 3,75 ml al dia. Si a la suspensió s'incorpora fins a 20 mg de simeticona/ml (concentració del 2 % de simeticona), el nounat rebria una quantitat total diària de 75 mg de simeticona, molt per sota de la dosi màxima diària.

Incompatibilitats: Incompatible amb sistemes aquosos, agents oxidants, medis molt àcids (pH< 3) o molt bàsics (pH>10) (Handbook of Pharmaceutical excipients, 2016h).

El quadre 103 mostra les composicions de les noves referències 011-API i 012-API.

<b>Components</b>	<b>Referència 011-API</b>	<b>Referència 012-API</b>
Mescla APIS tamisada	6,66 g	6,66 g
Compritol ATO 888 <sup>®</sup>	5 g	5 g
Topcithin <sup>®</sup> 300	5 g	2,5 g
Dow-Corning <sup>®</sup> Q7-2243	2 g	2 g
TCM	csp 100 ml	csp 100 ml

*Quadre 103. Composició referència 011-API i 012-API*

S'estableix el següent procediment d'elaboració de la fórmula:

- Pesar dels components
- Escalfar 80 ml de TCM fins 70 °C sota agitació en hèlix
- Un cop calents, afegir l'agent suspensor mantenint l'agitació
- Deixar refredar la mescla
- Un cop freda, afegir els principis actius mantenint l'agitació
- Afegir l'agent antiadherent mantenint l'agitació
- Afegir la quantitat necessària de TCM per obtenir una suspensió de 100 ml
- Condicionar en un envàs de vidre transparent

S'analitzen els paràmetres descrits anteriorment per les referència 011-API i 012-API. El quadre 104 mostra els valors individuals obtinguts per les referències 011-API i 012-API.

<b>Paràmetres</b>	<b>011-API</b>	<b>012-API</b>
<b>Viscositat</b>	<b>28,38</b>	<b>29,45</b>
<b>Mida de partícula</b>	<b>5,48</b>	<b>5,48</b>
<b>Característiques organolèptiques</b>		
Aspecte a T <sup>a</sup> ambient	9	8
Coloració a T <sup>a</sup> ambient	8	8
Aspecte i coloració a 40 °C/24 h	0	1
<b>Total característiques organolèptiques</b>	<b>5,67</b>	<b>5,67</b>
<b>Propietats de la suspensió</b>		
Sedimentació	5,5	8,5
Redispersió	7,5	7,5
<b>Total propietats de la suspensió</b>	<b>6,5</b>	<b>8</b>

*Quadre 104. Valors obtinguts per a les referències 011-API i 012-API*

Els resultats de l'anàlisi de les referències 011-API i 012-API es mostren en el quadre 105.

<b>Paràmetres</b>	<b>011-API</b>	<b>012-API</b>
Viscositat	5,68	5,89
Mida de partícula	5,48	5,48
Característiques organolèptiques	5,67	5,67
Propietats de la suspensió	6,5	8
<b>TOTAL</b>	<b>5,83</b>	<b>6,26</b>

*Quadre 105. Resultats obtinguts per a les referències 011-API i 012-API*

Degut als baixos resultats obtinguts i sobretot a l'aspecte de les referències 011-API i 012-API després d'haver estat 24 h a 40 °C (pràcticament sòlid), es decideix disminuir les quantitats de Compritol ATO 888<sup>®</sup> i de Topcithin<sup>®</sup> 300 a un 2%, mantenint les quantitats dels altres components iguals. S'obté així la referència 013-API. La composició d'aquesta referència es mostra en el quadre 106.

<b>Components</b>	<b>Referència 013-API</b>
Mescla APIS tamisada	6,66 g
Compritol ATO 888®	2 g
Topcithin® 300	2 g
Dow-Corning® Q7-2243	2 g
TCM	csp 100 ml

*Quadre 106. Composició referència 013-API*

Es segueix el mateix procediment d'elaboració descrit per les referències 011-API i 012-API. El quadre 107 mostra els valors individuals obtinguts per la referència 013-API.

<b>Paràmetres</b>	<b>013-API</b>
<b>Viscositat</b>	<b>36,46</b>
<b>Mida de partícula</b>	<b>5,48</b>
<b>Característiques organolèptiques</b>	
Aspecte a T <sup>a</sup> ambient	9
Coloració a T <sup>a</sup> ambient	6
Aspecte i coloració a 40°C/24 h	10
<b>Total característiques organolèptiques</b>	<b>8,33</b>
<b>Propietats de la suspensió</b>	
Sedimentació	4,5
Redispersió	9,5
<b>Total propietats de la suspensió</b>	<b>7</b>

*Quadre 107. Valors obtinguts per a la referència 013-API*

Els resultats de l'anàlisi de la referència 013-API es mostren en el quadre 108.

<b>Paràmetres</b>	<b>013-API</b>
Viscositat	7,29
Mida de partícula	5,48
Característiques organolèptiques	8,33
Propietats de la suspensió	7
<b>TOTAL</b>	<b>7,03</b>

*Quadre 108. Resultats obtinguts per a la referència 013-API*

Els resultats obtinguts de l'anàlisi de la referència 013-API indiquen que aquesta formulació és la més adequada, tot i obtenir un valor lleugerament inferior al de les referències 001-API i 008-API. Malgrat el valor per a la sedimentació i en conseqüència per a les propietats de la suspensió i el valor de viscositat són lleugerament més baixos, aquesta suspensió redispersa perfectament, té viscositat adequada i és molt més estable als canvis de temperatura.

Per tant, tenint en compte els resultats obtinguts a partir dels estudis de formulació, a falta de millorar les propietats organolèptiques (gust i olor) i a falta dels estudis d'estabilitat, es considera la fórmula de la referència 013-API com la més idònia per poder ser administrada a la població pediàtrica.

Degut a les dificultats alhora de trobar lecitina de soja líquida apte per a ús farmacèutic, es decideix canviar aquest excipient per un altre que tingui propietats similars i que no presenti problemes de proveïment amb qualitat farmacèutica. De la cerca realitzada es troba el següent compost:

- **Oli de ricí hidrogenat polioxietilenat**

Sinònims: Cremophor<sup>®</sup>RH-40

Funció: Utilitzat per les seves propietats com a dispersant i emulgent. Aquestes propietats permeten la solubilització dels principis actius més hidròfobs. A més a més, l'oli de ricí hidrogenat es caracteritza per tenir propietats autoemulgentes, és a dir, actua facilitant la formació d'emulsions entre els líquids corporals i els principis actius millorant així la biodisponibilitat d'aquests. (European Pharmacopoeia, 2016f), (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016g), (Sharma et al. 2011).

- Concentració en suspensions orals: Estudis de toxicitat oral conclouen que l'oli de ricí hidrogenat polioxietilenat és un compost considerat com a no-tòxic amb una LD<sub>50</sub> (rat, oral): >10 g/ kg. (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016g).



Incompatibilitats: És compatible amb la majoria de ceres naturals d'origen vegetal i animal (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016g).

La composició d'aquesta nova referència (014-API) es mostra en el quadre 109.

<b>Components</b>	<b>Referència 014-API</b>
Mescla APIS tamisada	6,66 g
Compritol ATO 888 <sup>®</sup>	2 g
Cremophor <sup>®</sup> RH-40	5 g
Dow-Corning <sup>®</sup> Q7-2243	2 g
TCM	csp 100 ml

*Quadre 109. Composició referència 014-API*

S'estableix els següent procediment d'elaboració de la fórmula:

- Pesar dels components
- Escalfar 80 ml de TCM fins 70 °C sota agitació en hèlix
- Un cop calents, afegir el dispersant i autoemulgent (Cremophor<sup>®</sup>RH-40) mantenint l'agitació fins homogeneïtzar
- Un cop homogeneïtzada la mescla, afegir l'agent suspensor (Compritol ATO 888<sup>®</sup>) encara sota agitació d'hèlix i calor (70 °C)
- Deixar refredar
- Un cop freda, afegir els principis actius mantenint l'agitació
- Afegir l'agent antiadherent (Dow-Corning<sup>®</sup>Q7-2243) mantenint l'agitació
- Afegir la quantitat necessària de TCM per obtenir una suspensió de 100 ml
- Condicionar en un envàs de vidre transparent

El quadre 110 mostra els valors individuals obtinguts per la referència 014-API.

<b>Paràmetres</b>	<b>014-API</b>
<b>Viscositat</b>	<b>60,06</b>
<b>Mida de partícula</b>	<b>5,48</b>
<b>Característiques organolèptiques</b>	
Aspecte a T <sup>a</sup> ambient	7
Coloració a T <sup>a</sup> ambient	6
Aspecte i coloració a 40 °C/24 h	10
<b>Total característiques organolèptiques</b>	<b>7,67</b>
<b>Propietats de la suspensió</b>	
Sedimentació	7
Redispersió	9
<b>Total propietats de la suspensió</b>	<b>8</b>

*Quadre 110. Valors obtinguts per a la referència 014-API*

Els resultats de l'anàlisi per a la referència 014-API es mostren en el quadre 111.

<b>Paràmetres</b>	<b>014-API</b>
Viscositat	8,33
Mida de partícula	5,48
Característiques organolèptiques	7,67
Propietats de la suspensió	8
<b>TOTAL</b>	<b>7,37</b>

*Quadre 111. Resultats obtinguts per a la referència 014-API*

Tot i que el valor que s'obté de l'anàlisi de les propietats de la suspensió per a la referència 014-API és el més elevat assolit fins ara, el residu que s'observa a les parets és considerable, i en conseqüència l'aspecte final obtingut per a aquesta formulació és bastant deficient. Després de realitzar una cerca bibliogràfica, es proposa un nou agent suspensor com a alternativa al Compritol ATO 888<sup>®</sup> per les seves propietats com a espessant i anticaking:

- **Sílice col·loïdal anhidre**

Sinònims: Aerosil<sup>®</sup>R-792

Funció: Utilitzat per les seves propietats com a agent suspensor i estabilitzant. (European Pharmacopoeia, 2016d), (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016d).

Concentració en suspensions orals: 1-10 % (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016d).

Incompatibilitats: Incompatible amb preparats de dietilestilbestrol (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016d).

La composició d'aquesta nova referència (015-API) es mostra en el quadre 112.

<b>Components</b>	<b>Referència 015-API</b>
Mescla APIS tamisada	6,66 g
Aerosil®R-792	1 g
Cremophor®RH-40	5 g
Dow-Corning®Q7-2243	2 g
TCM	csp 100 ml

*Quadre 112. Composició referència 015-API*

S'estableix els següent procediment d'elaboració de la fórmula:

- Pesar dels components
- Escalfar 80 ml de TCM fins 70 °C sota agitació d'hèlix
- Un cop calents, afegir l'agent suspensor (Aerosil®R-792) mantenint l'agitació fins homogeneïtzar
- Un cop homogeneïtzada la mescla, afegir el dispersant i autoemulgent (Cremophor®RH-40) sota agitació d'hèlix i calor (70 °C)
- Deixar refredar
- Un cop freda, afegir els principis actius mantenint l'agitació
- Afegir l'agent antiadherent (Dow-Corning®Q7-2243) mantenint l'agitació

- Afegir la quantitat necessària de TCM per obtenir una suspensió de 100 ml
- Condicionar en un envàs de vidre transparent

El quadre 113 mostra els valors individuals obtinguts per la referència 015-API.

<b>Paràmetres</b>	<b>015-API</b>
<b>Viscositat</b>	<b>49,66</b>
<b>Mida de partícula</b>	<b>5,48</b>
<b>Característiques organolèptiques</b>	
Aspecte a T <sup>a</sup> ambient	9
Coloració a T <sup>a</sup> ambient	6
Aspecte i coloració a 40 °C/24 h	10
<b>Total característiques organolèptiques</b>	<b>8,33</b>
<b>Propietats de la suspensió</b>	
Sedimentació	7
Redispersió	7,5
<b>Total propietats de la suspensió</b>	<b>7,25</b>

*Quadre 113. Valors obtinguts per a la referència 015-API*

Els resultats de l'anàlisi per a la referència 015-API es mostren en el quadre 114.

<b>Paràmetres</b>	<b>015-API</b>
Viscositat	9,93
Mida de partícula	5,48
Característiques organolèptiques	8,33
Propietats de la suspensió	7,25
<b>TOTAL</b>	<b>7,74</b>

*Quadre 114. Resultats obtinguts per a la referència 015-API*

De totes les formulacions realitzades, la referència 015-API és la que obté un valor més elevat (7,74). A més a més, l'aspecte final de la suspensió és molt bo, gairebé no s'aprecia residu a les parets. Per tant, es considera aquesta referència

com la idònia per realitzar els estudis de millora de les propietats organolèptiques.

#### 4.4.3 Estudis de millora de les propietats organolèptiques

L'objectiu principal d'aquesta darrera etapa de formulació, és la millora del gust i l'olor de la referència 015-API amb la finalitat de fer-la més atractiva i acceptable per a la població pediàtrica.

Aquesta fórmula es caracteritza per presentar un gust molt amarg, per la qual cosa es realitza una recerca dels edulcorants i correctors més utilitzats per emmascarar aquesta característica. A continuació es descriuen les propietats dels excipients trobats:

- **Sucralosa**

Sinònims: Splenda®, Unisweet®

Funció: Utilitzat per les seves propietats com a edulcorant no nutritiu, ja que no aporta calories, i com a emmascarant de sabors amargants. A més a més, a diferència d'altres edulcorants, no promou la formació de càries ja que no fomenta el creixement de les bacteries de la cavitat bucal. (Ash et al. 2007), (European Pharmacopoeia, 2016h), (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016i), (Rubio, 1993).

Concentració en suspensions orals: 0,03 - 0,24 % (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016i)

Incompatibilitats: No s'han descrit incompatibilitats per aquest producte.

- **Mentol**

Sinònims: Hexahidrotimol, 2-isopropil-5-metilciclohexanol; 4-isopropil-1-metilciclohexà-3-ol, 3-*p*-mentanol.

Funció: Utilitzat per les seves propietats com a aromatitzant i corrector potent del sabor, molt útil per emmascarar sabors amargants. (European Pharmacopoeia, 2016i), (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016j), (Rubio, 1993).

Concentració en suspensions orals: 0,001-0,05% (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016j)

Incompatibilitats: hidrat de butilcloral, alcanfor,  $\beta$ -naftol, fenol, permanganat de potassi, resorcinol i timol.

Tenint en compte les propietats descrites, s'utilitzen la sucralosa i el mentol com a base edulcorant. Les quantitats proposades de cada excipient per fer les proves inicials es mostren en el quadre 115.

Components	Quantitats (per 100 ml)
Sucralosa	0,2 g
Mentol	0,05 g

*Quadre 115. Quantitats sucralosa i mentol*

S'estableix el següent procediment d'incorporació dels excipients a la fórmula:

- Pesar dels components
- En un morter, afegir la sucralosa i el mentol i triturar els cristalls amb l'ajuda d'una mà de morter
- Mesclar el triturat fins homogeneïtzar (= mescla edulcorant)
- Afegir la mescla edulcorant a la fórmula 015-API sota agitació d'hèlix
- Condicionar en un envàs de vidre transparent

S'assigna la referència 015-API-edulcorada a la fórmula obtinguda.

Tot i l'addició de sucralosa i mentol a la fórmula, encara s'aprecia força gust amarg. Es decideix augmentar la quantitat de sucralosa, de manera que s'incorpora finalment a la fórmula 0,35 g de sucralosa per 100 ml. Aquesta

modificació emmascara prou bé el sabor amargant. No s'augmenta la quantitat de mentol perquè això suposaria sobrepassar la dosis màxima diària establerta per l'OMS (0,4mg/kg/dia) (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016j).

Amb aquest canvi, la quantitat de sucralosa que hi ha a la fórmula sobrepassa les recomanacions galèniques establertes en el Handbook of Pharmaceutical Excipients (0,03 - 0,24 %) (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016i). Cal tenir present que aquests valors són orientatius, considerats com a eina de gran utilitat en etapes primerenques de formulació, i que es poden ajustar en funció de les propietats de la fórmula. Tot i estar per sobre dels valors recomanats, segueix estant per sota de la dosis màxima establerta per l'OMS de 15 mg/kg/dia (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2016i), així per un infant que pesés 10 Kg al que s'administraria 7,5 ml de suspensió al dia, estaria rebent un total de 26,25 mg de sucralosa/dia, molt per sota dels 150 mg/dia que fora la dosi màxima permesa per aquest pes.

Es decideix afegir essència a la fórmula per fer-la més gustosa i acabar de millorar les propietats organolèptiques d'aquesta. Es fan proves amb diferents essències. Es trien bàsicament aquelles que lliguin amb l'aspecte (color vermell) i la textura (oliosa, densa, opaca) de la suspensió. A continuació es descriuen les propietats de les essències que compleixen aquestes característiques:

- **Essència de maduixa**

Funció: Utilitzat per les seves propietats com a emmascarant de gustos amargants (Faulí, 1993)

Quantitat en suspensions orals: 0.1-0.5% Segons experiència pràctica de l'equip del Servei de Desenvolupament del Medicament (SDM) de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Incompatibilitats: No s'han descrit incompatibilitats.

- **Essència de xocolata**

Funció: Utilitzat per les seves propietats per emmascarar sabors amargants (Faulí, 1993)

- Quantitat en suspensions orals: 0.1-0.5% Segons experiència pràctica de l'equip del Servei de Desenvolupament del Medicament (SDM) de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.
- Incompatibilitats: No s'han descrit incompatibilitats.

- **Essència de coco**

Funció: Utilitzat per les seves propietats per emmascarar sabors amargants (Faulí, 1993)

Quantitat en suspensions orals: 0.1-0.5% Segons experiència pràctica de l'equip del Servei de Desenvolupament del Medicament (SDM) de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Incompatibilitats: No s'han descrit incompatibilitats.

S'elabora el següent procediment per la incorporació de l'essència a la fórmula:

- Pesar l'essència
- Incorporar-la a la fórmula 015-API-edulcorada sota agitació en hèlix
- Condicionar en un envàs de vidre transparent

El quadre 116 mostra les formulacions obtingudes a partir de la incorporació de les tres essències objecte d'estudi:



<b>Components</b>	<b>Referència 015-API-01</b>	<b>Referència 015-API-02</b>	<b>Referència 015-API-03</b>
015-API	100 ml	100 ml	100 ml
Sucralosa	0,35 g	0,35 g	0,35 g
Mentol	0,05 g	0,05 g	0,05 g
Essència de xocolata	0,3 g	-	-
Essència de maduixa	-	0,3 g	-
Essència de coco	-	-	0,2 g

*Quadre 116. Formulacions obtingudes arrel de l'administració de les essències*

S'incorpora menys quantitat d'essència de coco respecte a les altres dues, degut a que aquesta essència és molt potent i amb poques quantitats emmascara gustos desagradables. A més a més, de les tres, es considera que pot ser la que té més dificultats alhora de rebre acceptació per part de la població pediàtrica.

Es realitza un test d'avaluació sensorial amb 4 panelistes voluntaris mascles d'edats compreses entre els 55-79 anys, seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.3.2.2 (mètode de selecció de la fórmula amb millors característiques organolèptiques).

Els resultats del test es mostren en el quadre 117.

<b>Panelistes</b>	<b>Referències</b>		
	<b>Referència 015-API-01</b>	<b>Referència 015-API-02</b>	<b>Referència 015-API-03</b>
FGU	6,4	5,4	6,3
JSU	6,3	5,1	3,9
LDO	6,3	7,3	6,1
MRO	6,5	3,9	6,5
<b>TOTAL</b>	<b>6,4</b>	<b>5,4</b>	<b>5,7</b>

*Quadre 117. Resultats del test d'avaluació sensorial*

Segons els resultats obtinguts, la referència guanyadora és la 015-API-01, la qual porta essència de xocolata. Com a possible proposta de millora es planteja un augment de la quantitat d'essència de xocolata.

Es decideix augmentar en 0,15 g l'essència de xocolata. El quadre 118 mostra les composicions de les fórmules anteriors així com la de la nova referència. Per indicar aquest canvi s'anomena igual que la 015-API-01 amb l'addició de la lletra -A.

Components	Referència 015-API-01	Referència 015-API-02	Referència 015-API-03	Referència 015-API-01A
015-API	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Sucralosa	0,35 g	0,35 g	0,35 g	0,35 g
Mentol	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g
Essència de xocolata	0,3 g	-	-	<b>0,45 g</b>
Essència de maduixa	-	0,3 g	-	-
Essència de coco	-	-	0,2 g	-

*Quadre 118. Formulacions obtingudes arrel dels resultats obtinguts en el tast d'avaluació sensorial*

Es sotmet de nou als 4 panelistes a la realització del test d'avaluació sensorial per determinar si la modificació ha estat significativa. Els resultats obtinguts es mostren en el quadre 119.

Panelistes	Referències			
	Referència 015-API-01	Referència 015-API-02	Referència 015-API-03	Referència 015-API-01A
FGU	5,9	3,3	4,1	6,4
JSU	4,7	8,4	3,4	8,6
LDO	5,6	7,9	4,6	6,9
MRO	7,6	7,6	5,6	7,1
<b>TOTAL</b>	<b>5,9</b>	<b>6,8</b>	<b>4,4</b>	<b>7,2</b>

*Quadre 119. Resultats del test d'avaluació sensorial després de realitzar modificacions quantitatives*

Tenint en compte els resultats obtinguts, s'observa que la nova referència és la que obté una puntuació major. Es pot considerar doncs, que els canvis proposats en la formulació han millorat les característiques organolèptiques d'aquesta, i per tant, la fan la més adient per assolir l'objectiu de ser la més gustosa i

atractiva a la població pediàtrica. S'estableix doncs com a fórmula definitiva la 015-API-01A.

El quadre 120 mostra la composició qualitativa i quantitativa de la referència 015-API-01A.

<b>Components</b>	<b>Referència 015-API-01A</b>
Mescla APIS tamisada	6,66 g
Aerosil®R-792	1 g
Cremophor®RH-40	5 g
Dow-Corning®Q7-2243	2 g
Sucralosa	0,35 g
Mentol	0,05 g
Essència de xocolata	0,45 g
TCM	csp 100 ml

*Quadre 120. Composició referència definitiva*

Amb la fórmula definitiva es realitzen estudis d'estabilitat preliminar i estudis d'estabilitat microbiològica i fisicoquímica per determinar el període d'eficàcia del producte, el qual permet assegurar la potència, identitat, qualitat i puresa d'aquest, des de la seva preparació fins al final del període de caducitat.

Degut als resultats obtinguts en els estudis d'estabilitat preliminar (apartat 4.5) els quals indiquen que la suspensió de reposició no és pas estable al llarg del temps, es proposa que la fórmula final sigui una suspensió extemporània emmagatzemada en condicions de refrigeració (4-6 °C). Aquesta modificació en la formulació i en les condicions d'emmagatzematge permet garantir l'estabilitat del medicament durant un temps mínim d'11 dies, a manca de realització d'estudis d'estabilitat a més llarg termini els quals s'inclouen en l'apartat 4.6.

Es realitzen proves per comprovar si la fórmula existent permet l'obtenció d'una suspensió extemporània de qualitat. A continuació es descriu el procediment seguit:

- Pesar dels components
- Tamisar els principis actius per un tamís de 100 µm i guardar en un envàs de vidre transparent
- Escalfar 91 ml de TCM fins 70 °C sota agitació d'hèlix
- Un cop calents, afegir l'agent suspensor (Aerosil®R-792) mantenint l'agitació fins homogeneïtzar
- Un cop homogeneïtzada la mescla, afegir el dispersant i autoemulgent (Cremophor®RH-40) sota agitació d'hèlix i calor (70 °C)
- Deixar refredar
- Un cop freda, afegir l'agent antiadherent (Dow-Corning®Q7-2243) mantenint l'agitació
- Afegir la sucralosa i el mentol mantenint l'agitació
- Afegir l'essència de xocolata mantenint l'agitació
- Vessar la mescla líquida d'excipients sobre la mescla solida de principis actius i agitar enèrgicament de forma manual fins obtenir una mescla homogènia

Es conclou doncs que la suspensió obtinguda simulant les condicions reals de preparació, és una suspensió homogènia, que es forma ràpidament i sense aglomerats sota agitació manual. Amb aquesta nova preparació, es realitzen de nou els estudis d'estabilitat preliminar i els estudis d'estabilitat microbiològica i fisicoquímica per determinar el període d'eficàcia del producte.

#### **4.4.4 Estudis d'eficàcia de conservació antimicrobiana (Challenge Test) per a la combinació de rifampicina, isoniazida i pirazinamida**

Es realitza un challenge test a la suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida seguint la metodologia descrita en l'apartat 3.3.2.3 *Mètode de realització dels estudis d'eficàcia de conservació antimicrobiana (Challenge test) de la fórmula definitiva* amb la finalitat d'avaluar les propietats conservants de la preparació. Els resultats obtinguts es mostren en la figura 154.



## INFORME DEL ENSAYO

### Eficacia de conservación antimicrobiana (Challenge Test)

**Solicitado por:** Servei de Desenvolupament del Medicament.

**Dirección:** Facultad de Farmacia. Avenida Joan XXIII s/n. 08028. Barcelona.

**Telf.:** 93.402.45.46; **Fax:** 93.402.45.46; **e-mail:**

**Fecha:** septiembre de 2016.

**Recepción de muestras:** 7 de septiembre de 2016.

**Inicio del ensayo:** 7 de setiembre de 2016.

**Final del ensayo:** 11 de octubre de 2016.

**Muestra/s:** 1 preparación de suspensión Oral Rifampicina-Isoniazida-Pirazinamida;

**Referencia:** 05A12.

**Características:** envase final en cristal topacio.

**Procedencia:** Proporcionadas por el SDM (Servei de Desenvolupament del Medicament) de la Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona (UB).

**Método:** Farmacopea Europea.

Se toman como referencia las normas microbiológicas recomendadas en la Farmacopea Europea 8.8 y se aplica el procedimiento descrito en el PNT interno del laboratorio de la Unidad de Microbiología.

**Objetivo:** 'El ensayo consiste en la contaminación deliberada de la preparación, con un inóculo preestablecido de microorganismos adecuados, el mantenimiento a una temperatura determinada, la toma de muestras a intervalos de tiempo especificados, y el recuento de los microorganismos presentes en las muestras tomadas. Se considera que las propiedades conservantes de la preparación son las adecuadas si, en las condiciones de ensayo, se produce un descenso significativo o, según el caso, no tiene lugar un incremento del número de microorganismos presentes en la preparación inoculada en los períodos de tiempo prescritos y a las temperaturas establecidas'.

**Condiciones de ensayo:** La muestra proporcionada se fracciona, depositando 10 g de producto en envases estériles, y a éstos se les inocula 100 µl de la suspensión microbiana a ensayar. A tiempos establecidos, se determina el nº de microorganismos viables por recuento en placa, previa inactivación específica para eliminar la actividad antimicrobiana residual del producto.

**Medios de cultivo y diluyentes utilizados:** Agar TSA (Oxoid, lote: 1175859); Agar Sabouraud dextrosa (Oxoid, lote 1179175); Solución de NaCl-peptona tamponada (Oxoid, lote: 335007). Diluyente de Beerens (Scharlab, lote: 102825); Polisorbato 80 (Scharlau, lote: 11671).

**Resultados:** Expresados como unidades formadoras de colonias por gramo de preparación (ufc/g)

Muestras:	Recuentos a tiempo:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
<b>Inóculo</b>	<b>0 horas</b>	<b>1.2 x 10<sup>8</sup></b>	<b>1.0 x 10<sup>8</sup></b>	<b>1.5 x 10<sup>8</sup></b>	<b>1.4 x 10<sup>8</sup></b>	<b>1.2 x 10<sup>7</sup></b>
Ref. 05A12	<b>0 horas</b>	< 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>4</sup>	< 10 <sup>4</sup>
	<b>14 días</b>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>
	<b>28 días</b>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>

Criterios de aceptación: 'Los criterios de evaluación de la actividad antimicrobiana se presentan en términos de reducción logarítmica del número de microorganismos viables, en relación con los valores correspondientes al inóculo sembrado'. Los criterios indicados expresan la eficacia que se recomienda alcanzar para preparaciones orales:

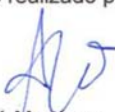
	14 días	28 días
Bacterias	3	No Incrementa
Hongos	1	No Incrementa

**Conclusiones:**

- Las preparaciones Ref. 05A12 cumplen los criterios de aceptación especificados en la Farmacopea Europea.

A Barcelona, 14 de octubre de 2016

Ensayo realizado por:



M<sup>a</sup> José Martínez  
Responsable del ensayo



M<sup>a</sup> Carmen Fusté  
Jefa de unidad  
Laboratorio de Microbiología

Figura 154. Resultats obtinguts dels estudis d'eficàcia de conservació antimicrobiana per a la combinació de rifampicina, isoniazida i pirazinamida

Segons els resultats obtinguts en els estudis d'eficàcia de conservació antimicrobiana es dedueix que la suspensió de rifampicina, isoniazida i pirazinamida compleix els criteris d'acceptació especificats en la Farmacopea Europea i que per tant la composició de la fórmula és adequada i garanteix la no contaminació de la mateixa per part de bacteries i fongs.

## 4.5 ESTUDIS D'ESTABILITAT PRELIMINAR

### 4.5.1 Introducció

En el transcurs del desenvolupament d'un medicament es realitzen estudis d'estabilitat d'una o varies formulacions per avaluar els paràmetres o característiques de les mateixes amb la finalitat de triar la formulació més estable. Aquests estudis s'anomenen estudis d'estabilitat preliminar, i no tenen perquè complir els requisits recomanats per les guies ICH.

En el cas de la suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida, de la informació obtinguda mitjançant la recerca bibliogràfica, i tot i que el vehicle no és aquós, es planteja la hipòtesi d'una possible interacció i la conseqüent degradació dels principis actius degut a que es troben en medi líquid.

Es realitzen estudis d'estabilitat preliminar galènics amb la finalitat d'obtenir resultats que proporcionin la informació necessària per valorar la integritat dels tres principis actius i descartar la formulació proposada com a definitiva, o pel contrari, continuar amb aquesta i realitzar els estudis d'estabilitat per determinar el període d'eficàcia del producte.

### 4.5.2 Estudis d'estabilitat preliminar per la combinació de rifampicina, isoniazida i pirazinamida

Es realitzen els estudis d'estabilitat preliminar fisicoquímics a la suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida. Per fer-ho, s'analitza una suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida preparada i emmagatzemada durant 10 mesos i una altra preparada i emmagatzemada durant 10 dies mitjançant la mètrica descrita en l'apartat 3.4.2.1 *Mètodes d'anàlisi per les fórmules realitzades durant els estudis d'estabilitat preliminar*. Totes dues s'han fabricat seguint el procediment d'elaboració descrit en l'apartat 4.4 *Estudis de formulació*, i s'han conservat en un flascó de vidre transparent emmagatzemades en un armari, a temperatura ambient ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). La composició de totes dues referències és la de la fórmula definitiva obtinguda en



els estudis de formulació (015-API-01A). Els resultats obtinguts es mostren en el quadre 121.

Referència	% rifampicina	% isoniazida	% pirazinamida
FOR-API-10mesos	72,3	77,6	61,1
FOR-API-10dies	84,6	92,7	77,37

*Quadre 121. Resultats estabilitat suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida*

Els resultats indiquen que possiblement s'ha produït una reacció entre rifampicina, isoniazida i pirazinamida i tots tres principis actius han patit degradació, no tan sols als 10 mesos d'estudi sinó també als 10 dies d'haver estat fabricada, fet indicatiu que la suspensió oliosa podria considerar-se com a no estable a temperatura ambient ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Per corroborar que la degradació no ve donada per cap excipient i que la reacció es produeix entre rifampicina i isoniazida i rifampicina i pirazinamida principalment, es preparen tres suspensions olioses diferents. La referència 001 només amb rifampicina com a principi actiu, la referència 002 amb rifampicina i isoniazida com a principis actius i la referència 003 amb rifampicina i pirazinamida com a principis actius. Totes es fabriquen seguint el procediment d'elaboració descrit en l'apartat 4.4 *Estudis de formulació*. El quadre 122 mostra la composició de cadascuna de les referències.

	<b>Referència 001</b>	<b>Referència 002</b>	<b>Referència 003</b>
Rifampicina	2 g	2 g	2 g
Isoniazida	---	1,33 g	---
Pirazinamida	---	---	3,33 g
Aerosil®R-792	1 g	1 g	1 g
Cremophor®RH-40	5 g	5 g	5 g
Dow-Corning®Q7-2243	2 g	2 g	2 g
Sucralosa	0,35 g	0,35 g	0,35 g
Mentol	0,05 g	0,05 g	0,05 g
Essència de xocolata	0,45 g	0,45 g	0,45 g
TCM	csp 100 ml	csp 100 ml	csp 100 ml

*Quadre 122. Composició referències 001, 002 i 003*

El quadre 123 mostra els resultats obtinguts de l'anàlisi de les tres referències a temps inicial i després de 7 dies emmagatzemades en un armari a temperatura ambient.

<b>Referència</b>	<b>% rifampicina</b>	<b>% isoniazida</b>	<b>% pirazinamida</b>
Referència 001 (temps inicial)	106	---	---
Referència 001 (7 dies)	107	---	---
Referència 002 (temps inicial)	97,6	101	---
Referència 002 (7 dies)	93	98	---
Referència 003 (temps inicial)	99	---	102,4
Referència 003 (7 dies)	100,4	---	100

*Quadre 123. Resultats de l'anàlisi de les referències 001, 002 i 003*

En relació als resultats obtinguts de l'anàlisi de les tres referències es pot deduir que els excipients no són els responsables de la degradació dels principis actius. En el cas de la referència 001, la rifampicina es manté estable, el petit increment en el percentatge pot ser degut a les variacions implícites del sistema instrumental.

La referència 002 és la que presenta més degradació, la rifampicina es degrada un 5% i la isoniazida un 3%. Aquest fet corrobora la informació obtinguda a través de la recerca bibliogràfica realitzada on es mostra que la

presència d'isoniazida augmenta la descomposició de la rifampicina en medi líquid. (Shisho et al. 2001), (Sosa et al. 2005).

En la referència 003 no s'observa pràcticament variació dels principis actius, es pot considerar que la rifampicina està igual i que la pirazinamida ha disminuït un 2%, però tenint en compte que la rifampicina no s'ha degradat, es podria considerar aquesta variació en la concentració de pirazinamida com una variació associada al sistema instrumental.

Per tant, els resultats obtinguts experimentalment s'ajusten als obtinguts bibliogràficament on s'afirma que la degradació de rifampicina és gairebé insignificant quan està sola o en combinació amb pirazinamida, però quan es troba en combinació amb isoniazida es dona en un grau molt elevat aquest fenomen de degradació (Saranjit et al. 2001). Alhora aquest resultats confirmen la hipòtesi de que tot i no estar en medi aquós, la mescla dels tres principis actius en un medi líquid oliós produeix igualment la degradació d'aquests.

Considerant que la degradació ve accelerada per condicions àcides (Shisho et al. 2001), (Sosa et al. 2005), i tenint en compte que es millora l'estabilitat dels patrons alcalinitzant el medi, es decideix fer una última prova abans de descartar definitivament la suspensió oliosa. S'elaboren dues referències, la 004 i la 005, on s'afegeix a cadascuna una substància alcalinitzant diferent amb la finalitat de millorar l'estabilitat de la fórmula. Es fabriquen seguint el procediment d'elaboració descrit en l'apartat 4.4 *Estudis de formulació*, afegint la substància reguladora del pH al final del procés. El quadre 124 mostra la composició de cadascuna de les referències.

	<b>Referència 004</b>	<b>Referència 005</b>
Rifampicina	2 g	2 g
Isoniazida	1,33 g	1,33 g
Pirazinamida	3,33 g	3,33 g
Citrat sòdic	csp pH 7,5	---
Trometamol	---	csp pH 7,5
Aerosil®R-792	1 g	1 g
Cremophor®RH-40	5 g	5 g
Dow-Corning®Q7-2243	2 g	2 g
Sucralosa	0,35 g	0,35 g
Mentol	0,05 g	0,05 g
Essència de xocolata	0,45 g	0,45 g
TCM	csp 100 ml	csp 100 ml

*Quadre 124. Composició referències 004 i 005*

El quadre 125 mostra els resultats obtinguts de l'anàlisi de les dues referències a temps inicial i després de 7 dies emmagatzemats en un armari a temperatura ambient ( $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ).

<b>Referència</b>	<b>% rifampicina</b>	<b>% isoniazida</b>	<b>% pirazinamida</b>
Referència 004 (temps inicial)	91,4	93,6	97
Referència 004 (7 dies)	77,9	88,9	96
Referència 005 (temps inicial)	96,6	97,9	100,3
Referència 005 (7 dies)	79,3	89,9	96,3

*Quadre 125. Resultats de l'anàlisi de les referències 004 i 005*

Tot i que els valors inicials de principi actiu de la referència 004 surten baixos, (fet atribuïble a un enràs poc exacte o a la preparativa magistral de la formulació) s'utilitzen igualment com valors a temps inicial que serviran per fer un estudi comparatiu de degradació dels principis actius en medi oliós alcalí.

Els resultats mostren que tot i incloure una substància alcalinitzant en la formulació i evitar així una de les condicions que acceleren la degradació dels principis actius, les referències 004 i 005 no es poden considerar estables a temperatura ambient ( $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ). La rifampicina pateix una degradació de

gairebé el 17% en les dues suspensions i la isoniazida i la pirazinamida tot i ser en menor grau, també es degraden degut a la reacció que donen amb la rifampicina.

Es conclou que la suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida és inestable a temperatura ambient ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Es planteja com a possible solució l'elaboració d'una suspensió oliosa extemporània emmagatzemada en condicions de refrigeració ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Es realitza la fabricació d'aquesta referència (referència 006) tal i com es descriu en l'apartat 4.4 *Estudis de formulació*, mantenint la composició de la fórmula definitiva obtinguda prèviament (015-API-01A). Es realitzen els anàlisi a temps inicial, 4 dies, 7 dies i 11 dies per corroborar la viabilitat de la fórmula. El quadre 126 mostra els resultats obtinguts de l'anàlisi de la referència 006.

---

<b>Referència</b>	<b>% rifampicina</b>	<b>% isoniazida</b>	<b>% pirazinamida</b>
Referència 006 (temps inicial)	104,3	99,8	108,4
Referència 006 (4 dies)	102,8	104,2	104,9
Referència 006 (7 dies)	102,8	106	108,8
Referència 006 (11 dies)	98,4	102,9	107,2

---

*Quadre 126. Resultats de l'anàlisi de la referència 006*

Dels resultats obtinguts es pot deduir que la suspensió oliosa extemporània emmagatzemada en condicions de refrigeració ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) és estable durant un mínim d'11 dies. Es considera doncs la suspensió oliosa extemporània emmagatzemada en condicions de refrigeració ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) com a fórmula final definitiva. A partir d'ara, es realitzen proves d'estabilitat microbiològica i fisicoquímica per determinar el període d'eficàcia del producte, el qual permet assegurar la potència, identitat, qualitat i puresa d'aquest, des de la seva preparació fins al final del període de validesa un cop reconstituïda.

## 4.6 ESTUDIS D'ESTABILITAT

### 4.6.1 Introducció

Les normes de correcta fabricació defineixen estabilitat com la propietat del medicament, contingut en un envàs d'un material determinat, per mantenir les característiques fisicoquímiques i microbiològiques dins dels límits especificats durant el temps d'emmagatzematge i ús (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2018).

L'1 de gener de 1998 entra en vigor, a la Unió Europea, Japó i Estats Units, la directriu principal ICH Q1A, elaborada pel Comitè Internacional d'Harmonització o *International Council on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*, relativa als «Procediments dels Estudis d'Estabilitat de Nous Principis Actius i Medicaments». Aquest document unifica els requisits mínims de dades sobre estabilitat exigits pel registre de comercialització de nous principis actius i medicaments, per les autoritats de la Unió Europea, Estats Units i Japó (International Council on Harmonization, 2018a).

A aquesta primera directriu han seguit altres quinze, també relacionades amb els requisits dels estudis d'estabilitat de medicaments d'ús humà. Tots aquests documents elaborats per l'ICH van ser concebuts per a la seva aplicació en aquestes tres àrees de comercialització (Unió Europea, Japó i Estats Units), però en la pràctica han estat adoptades per les Autoritats Reguladores de tercers països, per a les quals aquests documents suposen una reglamentació contrastada i revisada per experts de nombrosos països que garanteix la qualitat del producte per la seva autorització (Torres y Gil, 2005).

Segons les recomanacions ICH, es parla de qualitat d'un medicament quan el conjunt de propietats organolèptiques, químiques, físiques i microbiològiques garanteixen l'eficàcia, seguretat i acceptació d'aquest per part del pacient. Els estudis d'estabilitat es realitzen doncs amb la finalitat de garantir la màxima qualitat del medicament durant el seu període de validesa, alhora que permeten establir quina és la data d'expiració del medicament, obtenint un producte que es manté, durant un període determinat, dintre de les especificacions establertes si

s'emmagatzema sota unes condicions definides, i que per tant un cop passat el període de validesa mai s'ha d'utilitzar (*International Council on Harmonisation 2018a*) (*International Council on Harmonisation 2018b*) (Salazar i Suñé Negre, 1998) (Salazar y Suñé Negre, 2001).

Segons la guia ICH Q1A, es troben tres tipus diferents d'estudis d'estabilitat de medicaments: els estudis a llarg termini, els estudis intermitjos i els estudis d'estabilitat accelerada.

Es defineix com un estudi a llarg termini aquell que permet establir l'estabilitat final del producte acabat, per a productes els quals s'espera una vida mitja d' almenys 12 mesos o més. En aquest cas, l'ICH recomana realitzar assajos cada 3 mesos, durant el primer any, cada 6 mesos, durant el segon any i anualment fins assolir el temps de vida proposat per al medicament (*International Council on Harmonisation 2018a*).

En els estudis intermitjos es recomana com a mínim l'anàlisi dels lots en estudi cada 3 mesos fins al sisè mes d'estudi, incloent el temps inicial i final. S'aconsella però en aquests tipus d'estudis un augment en el número d'anàlisis durant els primers 3 mesos amb la finalitat d'obtenir la major quantitat d'informació possible sobre el producte (*International Council on Harmonisation 2018a*).

Per últim, es defineixen els estudis d'estabilitat accelerada, els quals són estudis on el producte està sotmès a condicions extremes de temperatura i humitat segons la zona climàtica de comercialització que es consideri. Les dades recollides durant aquest tipus d'estudi permeten obtenir molta informació sobre el producte en un temps relativament curt. L'anàlisi es fa fins als 6 mesos i es fa l'anàlisi dels lots com a mínim a temps 0, 3 i 6 mesos (*International Council on Harmonisation 2018a*).

Aquests tres estudis també es defineixen no només en funció del temps d'anàlisi, sinó també en funció de les condicions d'emmagatzematge relatives a la temperatura i la humitat (*International Council on Harmonisation 2018a*).

El quadre 127 mostra un resum de les condicions i temps de mostreig més freqüents a realitzar en cadascun dels estudis considerant la zona climàtica II (clima subtropical i mediterrani).

<b>Estudi</b>	<b>Condicions d'emmagatzematge</b>	<b>Temps mínim d'estudi</b>
Llarg termini	25 °C ± 2 °C / 60 % HR ± 5 %	12 mesos
Termini intermig	30 °C ± 2 °C / 65 % HR ± 5 %	6 mesos
Accelerat	40 °C ± 2 °C / 75 % HR ± 5 %	6 mesos

*Quadre 127. Condicions d'estabilitat a llarg termini, termini intermig i d'estabilitat accelerada*

En el cas de la suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida, els estudis d'estabilitat preliminar han permès determinar que el medicament en qüestió requereix de condicions especials d'emmagatzematge, concretament condicions de refrigeració (4-6 °C). Les recomanacions de la ICH per aquest tipus de medicaments proposen estudis d'estabilitat a llarg termini i estudis d'estabilitat accelerada amb unes condicions d'emmagatzematge particulars degut a les característiques intrínseques del propi producte a analitzar. En el quadre 128 es mostren les condicions d'estabilitat a llarg termini i d'estabilitat accelerada per productes que han d'estar emmagatzemats sota condicions de refrigeració (4-6 °C) (International Council on Harmonisation 2018a).

<b>Estudi</b>	<b>Condicions d'emmagatzematge</b>	<b>Temps mínim d'estudi</b>
Llarg termini	5 °C ± 3 °C	12 mesos
Accelerat	25 °C ± 2 °C / 60 % HR ± 5 %	6 mesos

*Quadre 128. Condicions d'estabilitat a llarg termini i d'estabilitat accelerada per productes que han d'estar emmagatzemats sota refrigeració (4-6 °C)*

#### **4.6.2 Disseny de l'estudi**

Per realitzar els estudis d'estabilitat de la suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida es dissenya un estudi d'estabilitat a llarg termini i un d'estabilitat accelerada sota les condicions descrites anteriorment per a medicaments que han d'estar emmagatzemats sota refrigeració, però modificant els temps d'anàlisi donada la gran inestabilitat del producte en forma líquida.



Es fabriquen 2 lots de 500 ml cadascun de la fórmula 015-API-01A seguint el procediment de fabricació descrit en l'apartat 4.4 *Estudis de formulació per la combinació rifampicina, isoniazida i pirazinamida*. La composició de totes les fórmules és la descrita en l'apartat 4.4 *Estudis de formulació per la combinació rifampicina, isoniazida i pirazinamida*, considerada com la fórmula definitiva, és a dir, la fórmula 015-API-01A (veure quadre 120). Els lots s'anomenen EE001 i EE002.

De cada lot fabricat es creen dos sub-lots, de forma que cada lot estarà sotmès a les condicions establertes pels estudis d'estabilitat a llarg termini i a les condicions establertes pels estudis d'estabilitat accelerada. Els sub-lots s'identifiquen amb el prefix –A (condicions 5 °C ± 3 °C) i –B (condicions 25 °C ± 2 °C).

El quadre 129 mostra les referències de les fórmules fabricades i les condicions d'emmagatzematge sota les quals estaran sotmeses durant els estudis d'estabilitat.

Referència	Condicions d'emmagatzematge
EE001A	Frigorífic 5 °C ± 3 °C
EE002A	Frigorífic 5 °C ± 3 °C
EE001B	Cambra d'estabilitat A 25 °C ± 2 °C / 60 % HR ± 5 %
EE002B	Cambra d'estabilitat A 25 °C ± 2 °C / 60 % HR ± 5 %

*Quadre 129. Condicions d'estabilitat a llarg termini i d'estabilitat accelerada per les referències fabricades*

La data de fabricació de les referències EE-001 és: 20/02/2018

La data de fabricació de les referències EE-002 és: 27/02/2018

Totes les fórmules s'acondiionen en envasos de vidre transparent amb tap de plàstic. La descripció completa del material emprat per realitzar els estudis d'estabilitat està descrita en l'apartat 3.5 *Estudis d'estabilitat* dins del *capítol 3 material i mètodes*.

Tenint en compte els resultats obtinguts durant les proves d'estabilitat preliminar, es mostregen les referències diàriament durant 15 dies, exceptuant

els dos dies inclosos en el cap de setmana. Per a les fórmules sotmeses a condicions accelerades, es deixaran de mostrejar en el moment que es demostrï que són inestables. En el cas de que arribat l'últim punt de mostreig els resultats mostrin que les fórmules emmagatzemades sota condicions a llarg termini segueixen sent estables, es seguirà l'anàlisi de les mateixes de forma diària fins que els resultats mostrin que la fórmula deixa de ser estable o fins que es consideri que el temps analitzat és suficient per garantir les necessitats posològiques dels pacients. Es considera que la fórmula ja no és estable quan no compleixi alguna de les especificacions establertes pels paràmetres determinats en el següent apartat (4.6.3 *Paràmetres d'estudi i especificacions*).

Es fabriquen 2 referències per a cada condició per poder obtenir dades estadísticament significatives. Els paràmetres d'humitat i temperatura de la cambra i el de temperatura del frigorífic es controlen durant tot el temps d'estudi, obtenint un registre d'aquests paràmetres.

#### **4.6.3 Paràmetres d'estudi i especificacions**

Segons les recomanacions de la ICH, els estudis d'estabilitat han d'incloure la prova de que les propietats dels principis actius són susceptibles de canvi durant l'emmagatzematge i que és provable que això afecti en la qualitat, seguretat i/o eficàcia del medicament. Les proves a realitzar durant els estudis d'estabilitat, han de cobrir les propietats físiques, químiques, biològiques i microbiològiques i els procediments analítics emprats han d'estar validats (International Council on Harmonisation 2018a).

Tenint present això, els estudis d'estabilitat es realitzen en base a la determinació dels següents paràmetres, seguint com a referència els assajos proposats per la Farmacopea Europea per a formes farmacèutiques líquides d'ús oral (European Pharmacopoeia, 2018) i de la bibliografia general sobre Farmàcia Galènica i Tecnologia Farmacèutica (Alonso, 2001) (Attwood, 2004) (Billany, 2004) (Bustamante, 1993) (Elorza y Civera, 2012) (Miñarro y Ticó, 2005) (Pugh, 2004) (Salazar y Suñé, 1998) (Salazar y Suñé, 2001a) (Salazar y Suñé, 2001b) (Sánchez y Barata, 2012) (Sellés, 1993) adaptats però, a les

particularitats de la suspensió oliosa. Els assajos es realitzen a totes les referències esmentades en l'apartat anterior (4.6.2 *Disseny de l'estudi*).

A continuació es descriuen els paràmetres d'estudi i el mètode d'anàlisi de cadascun d'ells:

#### 1. Característiques organolèptiques

Prèvia lleugera agitació, es comprova que es tracta d'una suspensió homogènia de color vermell-grana amb una lleugera olor a xocolata.

#### 2. Capacitat de redispersió

Es comprova la capacitat de la suspensió per homogeneïtzar-se prèvia lleugera agitació i el temps necessari per assolir aquesta resuspensió. També es comprova que no es produeixin sediments a la part inferior de l'envàs (fenomen del *caking*) així com l'absència d'agregats en la suspensió.

#### 3. Densitat

Es determinen les densitats de totes les referències fabricades. Per fer-ho es pesen 25 ml de suspensió. De la relació entre el pes i el volum s'obté la densitat de la suspensió. L'estudi d'aquest paràmetre es realitza a temps inicial i final.

#### 4. Identificació dels principis actius

Es realitza una anàlisi qualitativa dels tres principis actius objecte d'estudi. La identificació dels principis actius es realitza mitjançant la tècnica de cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC). La metodologia analítica i la preparativa de les mostres es descriuen de forma detallada a l'apartat 3.2 *Mètode d'anàlisi*.

#### 5. Valoració del contingut dels principis actius

Es realitza una anàlisi quantitativa dels tres principis actius objecte d'estudi. La valoració dels principis actius es realitza mitjançant la tècnica de cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC). La metodologia analítica i la preparativa de les mostres es descriuen de forma detallada a l'apartat 3.2 *Mètode d'anàlisi*.

## 6. Valoració del contingut dels productes de degradació

Es realitza una anàlisi quantitativa dels productes de degradació.

La valoració es realitza mitjançant la tècnica de cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC). La metodologia analítica i la preparativa de les mostres es descriuen de forma detallada a l'apartat 3.2 *Mètode d'anàlisi*.

## 7. Control microbiològic

Es realitza un control microbiològic de les fórmules en els períodes inicial i final dels estudis d'estabilitat.

Per a cadascun dels assajos a realitzar s'assigna una especificació. El compliment de l'especificació serà el que determinarà l'estabilitat i per tant la qualitat del producte final. Per establir els límits quantitius assignats als paràmetres d'estudi, s'han pres com a referència els valors proposats per l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (Association of Official Analytical Chemists, 2018).

El quadre 130 mostra les especificacions establertes als diferents paràmetres d'estudi.

Assaig	Mètode d'anàlisi	Especificació	
Característiques organolèptiques	Mètode organolèptic	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata	
Capacitat de redispersió	Procediment intern	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats	
Temps de resuspensió		Inferior a 1 minut	
Densitat	Procediment intern	0,98 g/ml ± 5%	
Identificació dels principis actius	HPLC	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph (13,50', 3,75' i 6,17' per rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament)	
Valoració del contingut dels principis actius	HPLC	95 %-105 %	
Valoració del contingut de productes de degradació individuals	HPLC	≤ 0,1 %	
Control microbiològic	Eur.Ph. 9.4	<i>Escherichia coli</i>	Absència/g
		TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g
		TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g

Quadre 130. Especificacions establertes als paràmetres d'estudi

#### 4.6.4 Avaluació dels mètodes d'estudi

##### 1. Característiques organolèptiques

Els resultats obtinguts permeten observar possibles variacions produïdes en el transcurs de l'emmagatzematge, reflex de l'existència de possibles alteracions físiques, químiques o biològiques.

##### 2. Capacitat de redispersió

Els resultats obtinguts permeten conèixer les propietats reològiques del producte i garantir que no variïn durant el transcurs de l'emmagatzematge en les condicions específiques d'aquest.

### 3. Densitat

Els resultats obtinguts permeten conèixer les propietats reològiques del producte i garantir que no variïn durant el transcurs de l'emmagatzematge en les condicions específiques d'aquest.

### 4. Identificació dels principis actius

Els resultats obtinguts permeten avaluar la identitat dels principis actius en la formulació.

### 5. Valoració del contingut dels principis actius

Els resultats obtinguts permeten avaluar la riquesa dels principis actius en la formulació i la possible aparició de productes de degradació durant el temps d'emmagatzematge.

### 6. Valoració del contingut dels productes de degradació

Els resultats obtinguts permeten avaluar l'aparició de possibles productes de degradació durant el temps d'emmagatzematge.

### 7. Control microbiològic

Els resultats obtinguts demostren la qualitat microbiològica del producte i del procés de fabricació.

#### **4.6.5 Resultats experimentals dels estudis d'estabilitat**

A continuació es presenten els resultats obtinguts per cada referència fabricada als diferents temps i temperatures establertes. Tot i que els resultats estan inclosos en els quadres corresponents (quadres 131 a 134) , també s'adjunta l'informe de l'anàlisi de la contaminació microbiològica (veure Annex V).

Estudis d'estabilitat accelerada (25 °C ± 2 °C / 60 % HR ± 5 %)

Referència EE001B

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			0			1		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		0,9734			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			101,7± 0,91	96,7± 1,59	97,8± 2,32	94,6± 1,37	95,4± 0,39	98,8± 3,33
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	Absència/g			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	0 ufc/g			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	0 ufc/g			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)		
			2 (final)		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix		
Capacitat de redispersió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats		Compleix		
Temps de resuspensió	Inferior a 1 minut				
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		0,9711		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P
			90,5±0,09	97,1±1,85	101,7±2,81
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	Absència/g		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	0 ufc/g		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	0 ufc/g		

Quadre 131. Resultats obtinguts pel lot EE001B emmagatzemat sota condicions 25 °C ± 2 °C / 60 % HR ± 5 %  
<sup>1</sup>Veure certificat d'anàlisi en Annex V.



Referència EE002B

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			0			1		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		0,9758			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			97,2± 0,84	99,5± 0,39	103,9± 1,56	89,0± 1,44	97,0± 2,75	102,7 ±2,30
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	Absència/g			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	0 ufc/g			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	0 ufc/g			-		

Assaig	Especificació	Temps (dies)		
		2 (final)		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata	Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut	Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml $\pm$ 5%	0,9778		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph	Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% $\pm$ SD	R	I	P
		92,3 $\pm$ 0,97	100,4 $\pm$ 0,75	104,9 $\pm$ 0,74
Valoració del contingut dels productes de degradació	$\leq$ 0,1 %	< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g		Absència/g
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g		0 ufc/g
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g		0 ufc/g

Quadre 132. Resultats obtinguts pel lot EE002B emmagatzemat sota condicions 25 °C  $\pm$  2 °C / 60 % HR  $\pm$  5 %  
<sup>1</sup>Veure certificat d'anàlisi en Annex V

### Estudis d'estabilitat a llarg termini (5 °C $\pm$ 3 °C)

Referència EE001A

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			0			1		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		0,9734			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			102,8± 0,91	98,5± 1,56	100,5± 2,32	103,3± 1,82	100,5± 1,98	99,8± 3,39
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	Absència/g			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	0 ufc/g			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	0 ufc/g			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			2			3		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			104,7± 0,26	97,1± 0,20	99,3± 2,01	100,2± 1,62	98,9± 0,03	101,1 ± 0,33
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			6			7		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			99,0± 1,31	99,5± 2,13	101,9± 3,03	100,8± 2,38	96,9± 1,54	99,6± 3,17
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			8			9		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			101,2± 1,31	98,8± 1,15	101,6± 2,64	102,6± 0,18	95,5± 1,87	98,4± 3,01
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			10			13		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positivo			Positivo		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			103,5± 2,79	96,5± 2,59	98,1± 0,01	98,2± 1,43	95,9± 1,05	98,4± 1,53
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			14			15		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			102,5± 0,53	98,7± 2,90	100,2± 0,74	101,5± 1,05	98,0± 3,40	96,8± 0,76
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		



Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			16			17		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			97,4± 0,83	95,3± 2,28	102,7± 2,69	99,8± 3,38	97,6± 2,91	101,6 ± 2,75
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			20			21		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			101,9± 1,37	97,7± 1,88	100,3± 1,38	102,3± 1,50	100,6± 0,88	102,9 ±1,64
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			22			23		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			102,1± 1,57	97,2± 3,21	100,3± 3,10	99,8± 2,10	98,9± 0,42	101,8 ± 0,63
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			24			27		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			0,9911		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			99,1± 2,95	98,6± 2,58	101,8± 2,53	98,2± 3,40	96,1± 2,17	99,8± 3,11
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			Absència/g		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			0 ufc/g		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			0 ufc/g		

Quadre 133. Resultats obtinguts pel lot EE001A emmagatzemat sota condicions 5 °C ± 3°C

<sup>1</sup>Veure certificat d'anàlisi en Annex V

Referència EE002A

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			0			1		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		0,9758			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			98,8± 2,58	96,9± 1,09	98,5± 1,19	100,9± 2,34	97,3± 1,12	99,7± 0,51
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	Absència/g			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	0 ufc/g			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	0 ufc/g			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			2			3		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			99,5± 3,58	99,9± 3,57	100,7± 0,97	100,8± 1,32	99,9± 3,27	98,0± 0,89
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			6			7		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			99,8± 2,83	95,5± 3,15	99,2± 0,96	98,5± 1,72	97,0± 0,62	100,5 ± 1,17
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			8			9		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			97,4± 3,23	96,6± 0,65	100,8± 0,57	97,0± 1,79	95,5± 0,73	99,2± 2,26
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		



Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			10			13		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			96,1± 1,47	97,8± 1,25	102,7± 1,14	99,2± 2,58	97,9± 2,74	101,0 ± 3,15
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			14			15		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			99,6± 2,42	98,2± 1,69	101,9± 2,26	98,9± 0,47	97,5± 2,83	103,5 ± 1,58
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			16			17		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			97,1± 2,19	97,9± 1,14	102,7± 1,44	97,3± 0,39	98,1± 2,29	102,0 ± 2,06
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			20			21		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			97,2± 1,53	95,1± 0,52	101,9± 0,88	97,0± 0,98	96,8± 1,35	101,9 ±1,98
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			22			23		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			-		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			96,9± 0,86	96,7± 1,22	102,0± 2,06	96,8± 0,73	96,7± 1,07	102,1 ±2,15
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			-		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			-		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			-		

Assaig	Especificació		Temps (dies)					
			24			27		
Característiques organolèptiques	Suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata		Compleix			Compleix		
Capacitat de redispersió  Temps de resuspensió	Suspensió fàcilment redispersable. Absència de sediments i d'agregats  Inferior a 1 minut		Compleix			Compleix		
Densitat (inici i final)	0,98 g/ml ± 5%		-			0,9858		
Identificació dels principis actius	Al voltant del temps de retenció específic del patró de Eur. Ph		Positiva			Positiva		
Valoració del contingut dels principis actius	95%-105% ±SD		R	I	P	R	I	P
			96,7± 0,61	96,6± 0,88	102,2± 2,23	96,3± 0,19	96,5± 0,08	102,6 ±2,52
Valoració del contingut dels productes de degradació	≤ 0,1 %		< LQ			< LQ		
Control microbiològic <sup>1</sup>	<i>E. coli</i>	Absència/g	-			Absència/g		
	TAMC totals	10 <sup>3</sup> ufc/g	-			0 ufc/g		
	TYMC fongs	10 <sup>2</sup> ufc/g	-			0 ufc/g		

Quadre 134. Resultats obtinguts pel lot EE002A emmagatzemat sota condicions 5 °C ± 3°C

<sup>1</sup>Veure certificat d'anàlisi en Annex V

#### 4.6.6 Discussió dels resultats obtinguts

##### 1. Característiques organolèptiques

Les característiques organolèptiques de la suspensió es mantenen en totes les referències fabricades, durant tots els temps establerts i sota les dues condicions estudiades d'acord amb les especificacions establertes pel producte acabat (suspensió homogènia de color vermell-grana amb lleugera olor a xocolata). Per tant, es conclou que el producte manté les característiques relatives a les propietats organolèptiques intactes amb el pas del temps, segons condicions ICH, en el seu envàs primari de vidre transparent i tap de plàstic.

##### 2. Capacitat de redispersió

Es manté la capacitat de redispersió de la suspensió en les referències fabricades, durant tots els punts d'estudi establerts i sota les condicions estudiades d'acord amb les especificacions establertes pel producte acabat (suspensió fàcilment redispersable, absència de sediments i d'agregats i temps de redispersió inferior a 1 minut). Es conclou, per tant, que el producte manté la capacitat de redispersió intacte amb el pas del temps segons condicions ICH.

##### 3. Densitat

La figura 155 permet observar l'evolució de la densitat de la suspensió al llarg del temps.

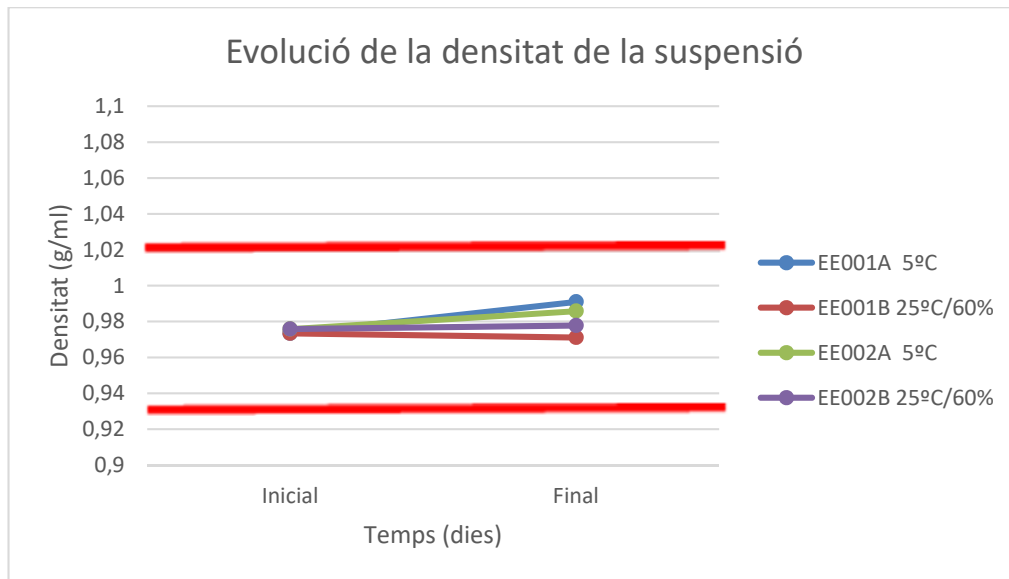


Figura 155. Evolució de la densitat de la suspensió en les diferents referències

Com s'observa a la figura 155, la densitat de la suspensió no varia de forma crítica en cap de les referències fabricades, durant tots els punts d'estudi establerts i sota les condicions estudiades. Els valors de densitat obtinguts per tots dos lots es troben dintre dels límits establerts en les especificacions de producte acabat ( $0,98 \text{ g/ml} \pm 5\%$ ). Es conclou, per tant, que el producte manté les propietats reològiques intactes amb el pas del temps segons condicions ICH.

#### 4. Identificació dels principis actius

Les figures 156, 157, 158 i 159 mostren els cromatogrames obtinguts dels tres principis actius per les referències EE001A, EE001B, EE002A i EE002B respectivament.



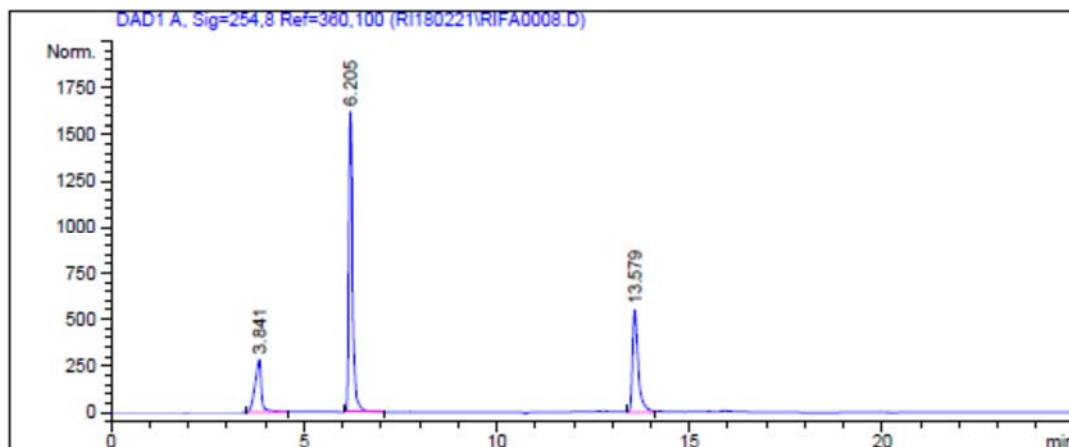


Figura 156. Cromatograma obtingut de l'anàlisi de la referència EE001A

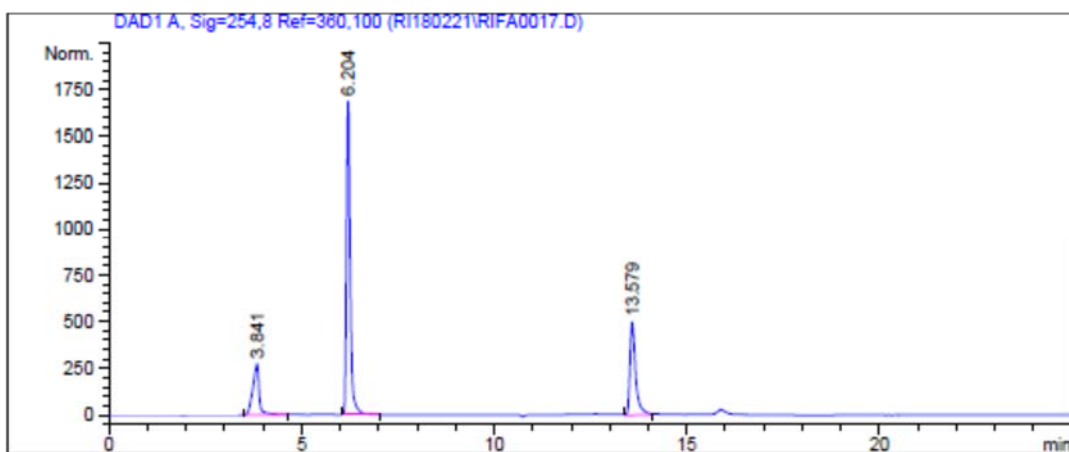


Figura 157. Cromatograma obtingut de l'anàlisi de la referència EE001B

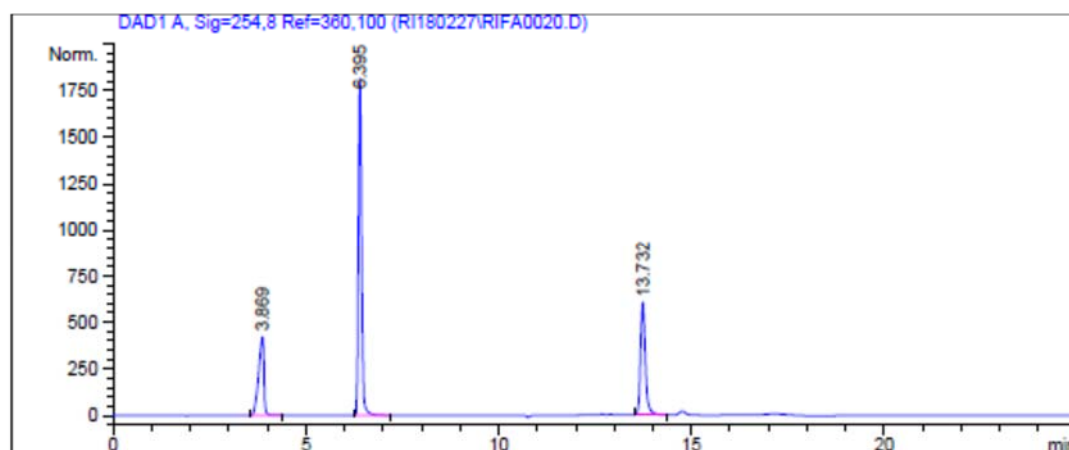


Figura 158. Cromatograma obtingut de l'anàlisi de la referència EE002A

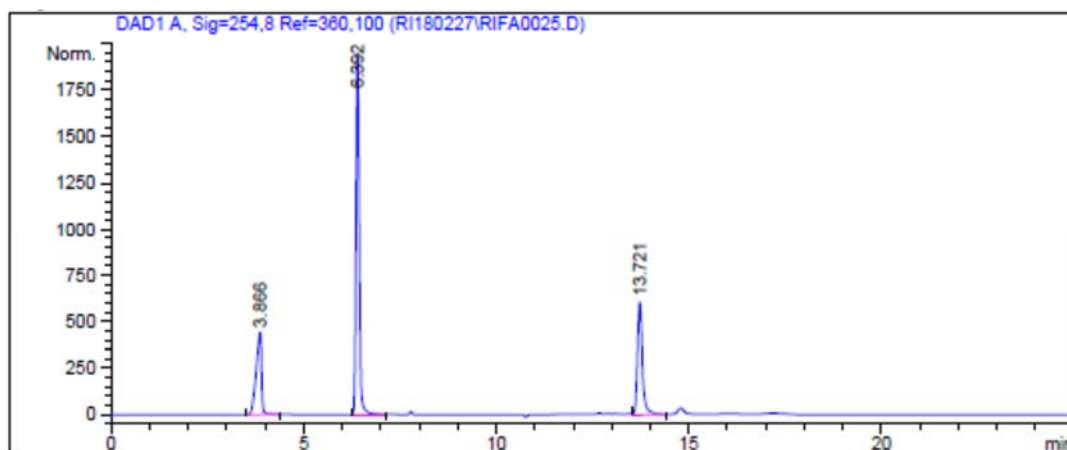


Figura 159. Cromatograma obtingut de l'anàlisi de la referència EE002B

Els temps de retenció obtinguts per cadascun dels principis actius inclosos en les formulacions de totes les referències estudiades coincideixen amb les especificacions establertes (al voltant de 13,50', 3,75' i 6,17' per rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament). Es conclou doncs que la identificació de rifampicina, isoniazida i pirazinamida per a cada lot i en les diferents condicions d'estudi és positiva.

##### 5. Valoració del contingut dels principis actius

La figura 160 mostra l'evolució de la riquesa dels principis actius en la suspensió sota condicions accelerades. S'observa una disminució en el contingut de rifampicina per sota dels límits d'acceptació establerts (95%-105%) a partir del primer dia de fabricació. Les dues referències mostren el mateix comportament tant en la degradació de rifampicina com en l'evolució dels altres dos principis actius, els quals, als dos dies de fabricació, mantenen encara els valors de riquesa dintre dels límits d'acceptació establerts. Per tant, segons els resultats obtinguts, es considera que la suspensió és inestable en condicions de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C} / 60\% \text{ HR} \pm 5\%$ .

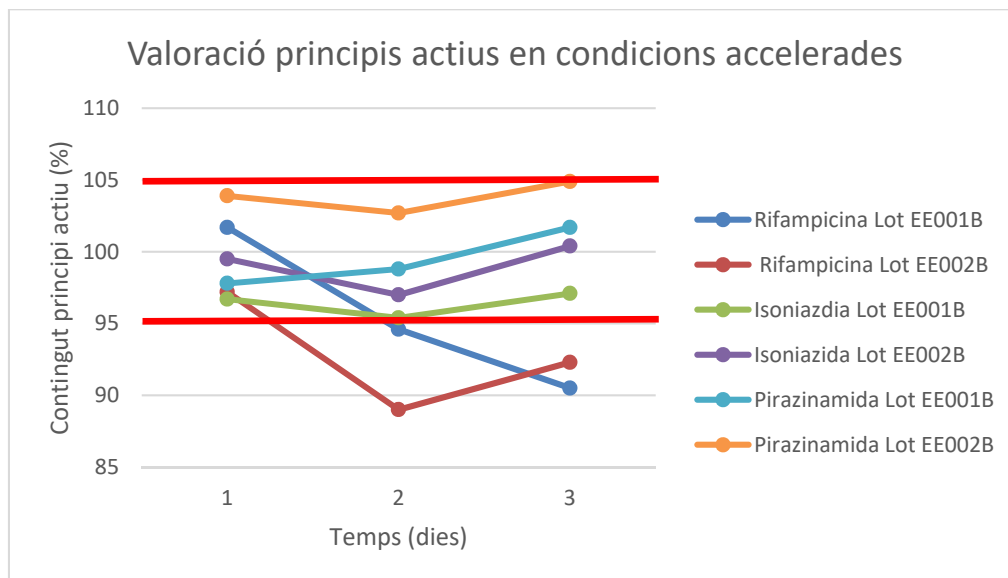


Figura 160. Valoració del contingut dels tres principis actius de les referències sotmeses a condicions accelerades (25 °C /60 %HR)

La figura 161 mostra l'evolució de la riquesa dels principis actius en la suspensió sota condicions a llarg termini. En aquest cas s'observa que els tres principis actius es mantenen dintre dels límits d'acceptació establerts durant tot el període d'estudi. Les dues referències fabricades mostren el mateix comportament en l'evolució del contingut de rifampicina, isoniazida i pirazinamida. Per tant, segons els resultats obtinguts, es considera que la suspensió és estable durant 27 dies sota condicions de 5 °C ± 3 °C (condicions de refrigeració).

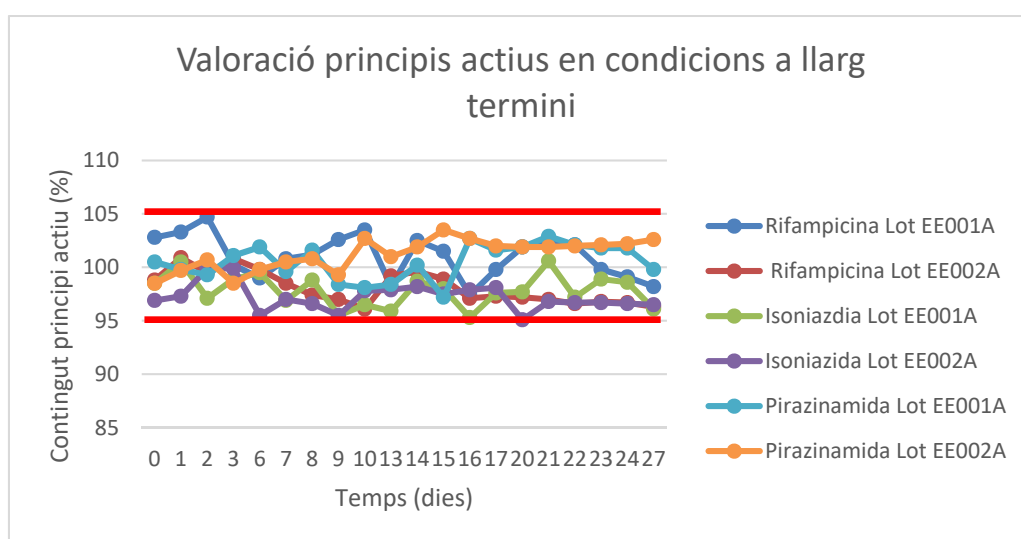


Figura 161. Valoració del contingut dels tres principis actius de les referències sotmeses a condicions a llarg termini (5 °C)

Per aprofundir en els resultats i valorar si hi ha diferències significatives entre els valors de riquesa obtinguts durant cada punt d'estudi per a cada principi actiu, es decideix fer un tractament estadístic de les dades mitjançant la realització d'un test ANOVA. Aquest anàlisi només es realitza amb les dades obtingudes en condicions a llarg termini, ja que és on es mantenen estables els tres principis actius. Els resultats obtinguts per rifampicina, isoniazida i pirazinamida de la referència EE001A es mostren a les figures 162 a 168 respectivament.

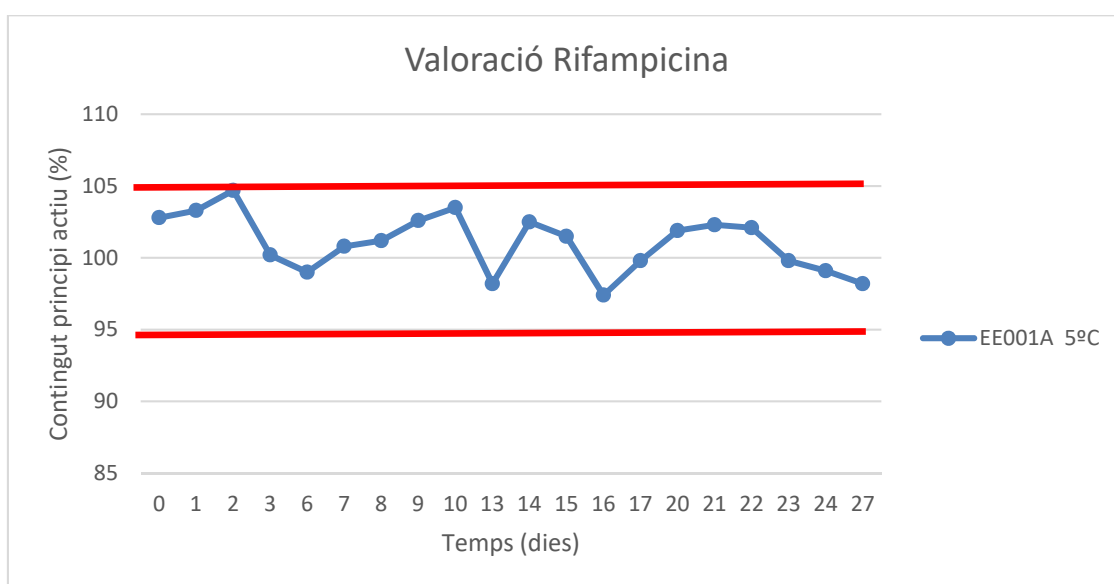


Figura 162. Valoració rifampicina de la referència EE001A sotmesa a condicions a llarg termini (5 °C)

## RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0	3	305,310332	101,770111	0,82484344
1	3	305,310332	101,770111	0,82484344
2	2	209,297456	104,648728	0,06629859
3	2	200,43083	100,215415	2,61981439
6	2	199,415296	99,7076478	0,55121002
7	3	302,48012	100,826707	5,64784659
8	3	303,523065	101,174355	1,71964021
9	3	307,976825	102,658942	0,03148053
10	3	310,634807	103,544936	7,77544501
14	2	205,010404	102,505202	0,28002543
15	3	304,586345	101,528782	1,09650478
17	3	299,262542	99,7541807	11,4408305
20	3	305,675393	101,891798	1,86939661
21	3	306,836532	102,278844	2,25895011
22	2	204,204292	102,102146	2,47258516
23	3	299,413465	99,8044884	4,41794798
24	3	297,419503	99,1398344	8,71138172
27	3	298,191149	99,3970498	1,15714818
13	3	294,713739	98,2379129	2,04327045
16	3	292,060776	97,3535919	0,6809429

## ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	167,333298	19	8,80701568	2,88104512	0,00326149	1,8922059
Dentro de los grupos	106,990879	35	3,05688225			
Total	274,324177	54				

Figura 163. Anàlisi estadístic per rifampicina de la referència EE001A sotmesa 5 °C

De les dades obtingudes de l'anàlisi estadística per la rifampicina de la referència EE001A es dedueix que si que hi ha diferències estadísticament significatives. Això es degut a que hi ha dos dies que presenten un comportament que es surt de la tendència: dia 13 (98,2 %) i dia 16 (97,4 %); malgrat que són valors correctes segons les especificacions establertes (95,0

% - 105,0 %), es troben fora de la tendència general dels resultats obtinguts. Es per això que es decideixen eliminar aquest dos dies i tornar a fer el tractament estadístic de dades per valorar si entre els resultats obtinguts en els altres dies hi ha diferències estadísticament significatives. La figura 164 mostra el tractament estadístic de les dades actualitzades.

#### RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0	3	305,310332	101,7701106	0,824843
1	3	305,310332	101,7701106	0,824843
2	2	209,297456	104,6487279	0,066299
3	2	200,43083	100,2154149	2,619814
6	2	199,415296	99,70764783	0,55121
7	3	302,48012	100,8267068	5,647847
8	3	303,523065	101,1743549	1,71964
9	3	307,976825	102,6589417	0,031481
10	3	310,634807	103,5449358	7,775445
14	2	205,010404	102,505202	0,280025
15	3	304,586345	101,5287816	1,096505
17	3	299,262542	99,75418068	11,44083
20	3	305,675393	101,8917975	1,869397
21	3	306,836532	102,2788439	2,25895
22	2	204,204292	102,1021458	2,472585
23	3	299,413465	99,80448835	4,417948
24	3	297,419503	99,13983436	8,711382
27	3	298,191149	99,39704978	1,157148

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	99,5381347	17	5,855184394	1,787535	0,078160743	1,964574615
Dentro de los grupos	101,5424519	31	3,275562964			
Total	201,0805866	48				

Figura 164. Anàlisi estadístic per rifampicina de la referència EE001A sotmesa 5 °C

En aquest cas s'observa que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts els diferents dies d'anàlisi per rifampicina de la referència EE001A.

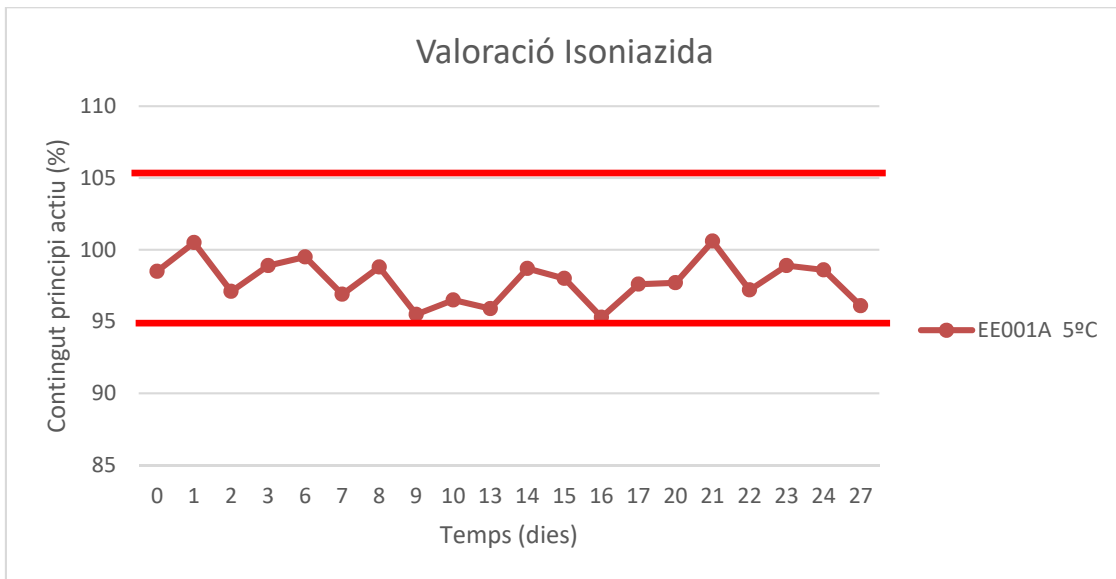


Figura 165. Valoració isoniazida de la referència EE001A sotmesa a condicions a llarg termini (5 °C)

## RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0	3	290,072979	96,69099313	2,447759
1	3	301,561455	100,5204851	3,902686
2	2	194,278158	97,13907902	0,04071
3	2	197,670619	98,83530946	0,001086
6	3	298,597581	99,53252712	4,554441
7	3	290,787938	96,92931281	2,368143
8	3	296,524854	98,84161787	1,323736
9	2	191,054196	95,52709775	3,50234
10	2	192,972096	96,4860478	6,728548
13	2	191,790634	95,89531687	1,097713
14	3	296,185556	98,72851855	8,418816
15	2	196,005019	98,00250945	11,55184
16	2	190,604185	95,30209232	5,204138
17	3	292,677918	97,55930613	8,474394
20	3	293,146386	97,71546196	3,547601
21	3	301,923696	100,6412319	0,781431
22	3	291,514971	97,17165687	10,29319
23	3	296,621057	98,87368554	0,176794
24	3	295,648067	98,5493556	6,654177
27	2	192,26875	96,13437521	4,719883

## ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	115,1569514	19	6,060892179	1,398003	0,196388375	1,92194641
Dentro de los grupos	138,7325993	32	4,335393729			
Total	253,8895507	51				

Figura 166. Anàlisi estadístic per isoniazida de la referència EE001A sotmesa 5 °C

L'anàlisi de dades mostra que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts els diferents dies d'estudi per isoniazida de la referència EE001A.



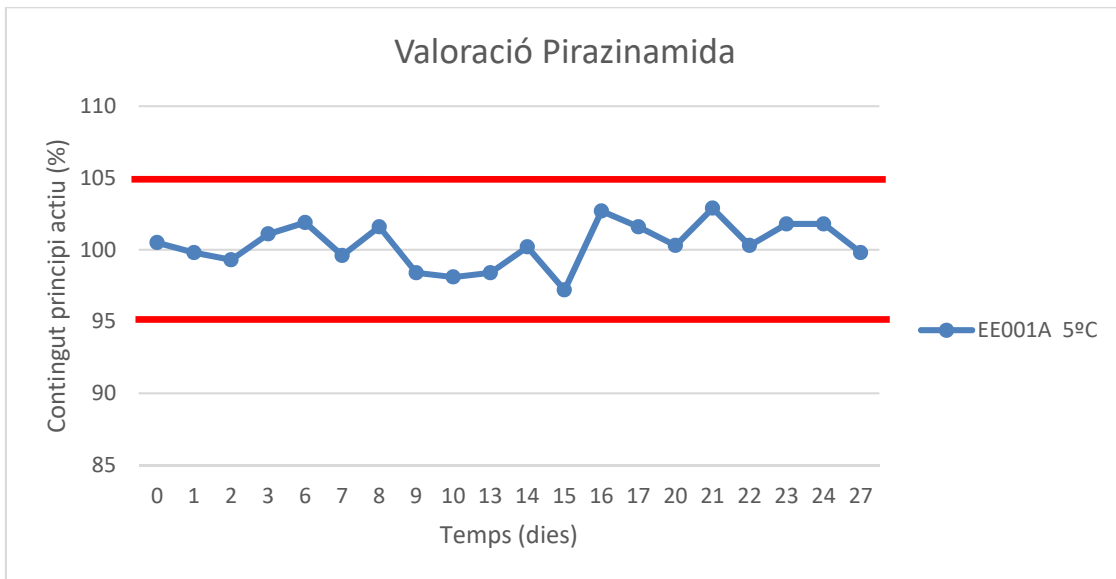


Figura 167. Valoració pirazinamida de la referència EE001A sotmesa a condicions a llarg termini (5 °C)

## RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0	3	293,459275	97,8197585	5,375197
1	2	199,576726	99,78836299	11,46509
2	2	198,721502	99,36075104	4,035641
3	2	202,177201	101,0886003	0,108028
6	3	305,96327	101,9877568	9,195673
7	2	199,177721	99,58886057	10,07595
8	3	304,661723	101,5539077	6,985666
9	2	196,869882	98,43494085	9,073275
10	2	196,239636	98,11981777	0,00021
13	2	196,743534	98,37176698	2,354608
14	2	200,317087	100,1585433	0,55003
15	2	193,552395	96,77619744	0,411834
16	3	308,054671	102,6848904	7,212746
17	3	304,883832	101,627944	7,548982
20	3	300,869475	100,289825	1,914541
21	3	308,560139	102,8533798	2,676162
22	3	300,844578	100,2815259	9,599428
23	3	305,411447	101,8038158	0,398962
24	3	305,424197	101,8080658	6,384068
27	3	299,488968	99,82965603	9,670044

## ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	140,5825807	19	7,399083197	1,333574	0,232233584	1,933197826
Dentro de los grupos	171,9975991	31	5,54830965			
Total	312,5801799	50				

Figura 168. Anàlisi estadístic per pirazinamida de la referència EE001A sotmesa 5 °C

L'anàlisi de dades mostra que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts els diferents dies d'estudi per pirazinamida de la referència EE001A.

Els resultats obtinguts per rifampicina, isoniazida i pirazinamida de la referència EE002A es mostren a les figures 169 a 174 respectivament.

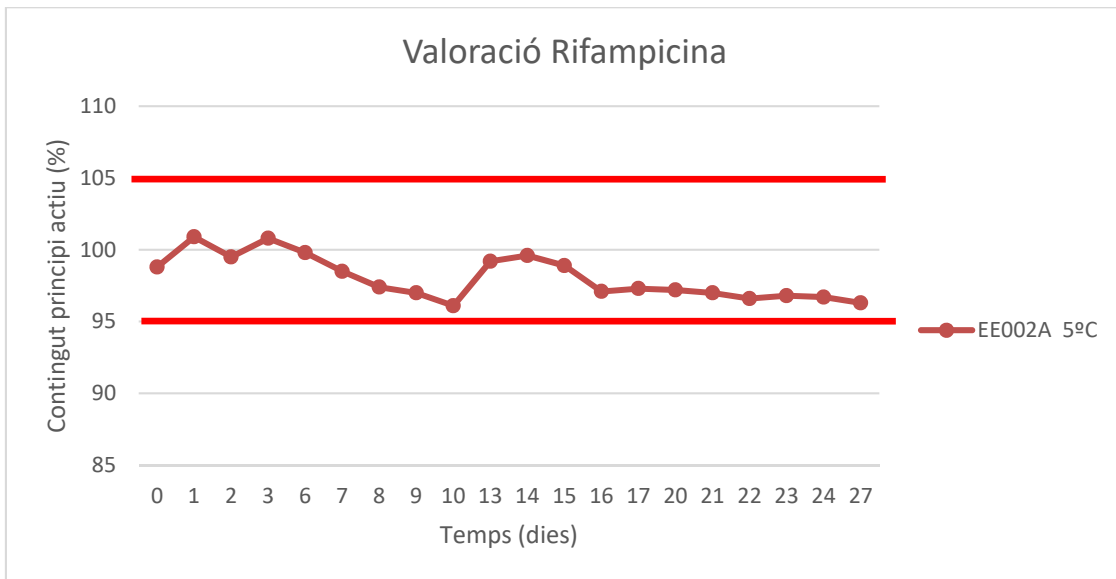


Figura 169. Valoració rifampicina de la referència EE002A sotmesa a condicions a llarg termini (5 °C)

## RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0	3	291,557429	97,1858098	2,34852915
1	3	302,937345	100,979115	5,45579936
2	3	298,514167	99,5047223	12,8253458
3	3	302,481797	100,827266	1,74107566
6	2	199,754488	99,8772442	7,98387142
7	3	295,448982	98,482994	2,96068783
8	3	292,193185	97,3977282	10,4101372
9	3	291,122284	97,0407614	3,22199593
10	3	288,225648	96,0752162	2,1468215
13	2	198,422293	99,2111465	24,9028188
14	3	298,910222	99,6367408	5,85586778
15	3	296,700529	98,9001764	0,21733862
16	3	291,147367	97,0491222	4,78765859
17	2	194,533527	97,2667636	0,14948424
20	3	291,557429	97,1858098	2,34852915
21	2	194,8675	97,4333875	0,30396605
22	2	195,2748	97,6374894	1,04951072
23	2	194,4367	97,2183548	0,38097721
24	2	193,3506	96,675305	0,00122018
27	2	193,6518	96,825986	0,55314162

## ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	108,080379	19	5,68844098	1,26440915	0,27189475	1,92194641
Dentro de los grupos	143,964563	32	4,4988926			
Total	252,044942	51				

Figura 170. Anàlisi estadístic per rifampicina de la referència EE002A sotmesa 5 °C

L'anàlisi de dades mostra que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts els diferents dies d'estudi per rifampicina de la referència EE002A.

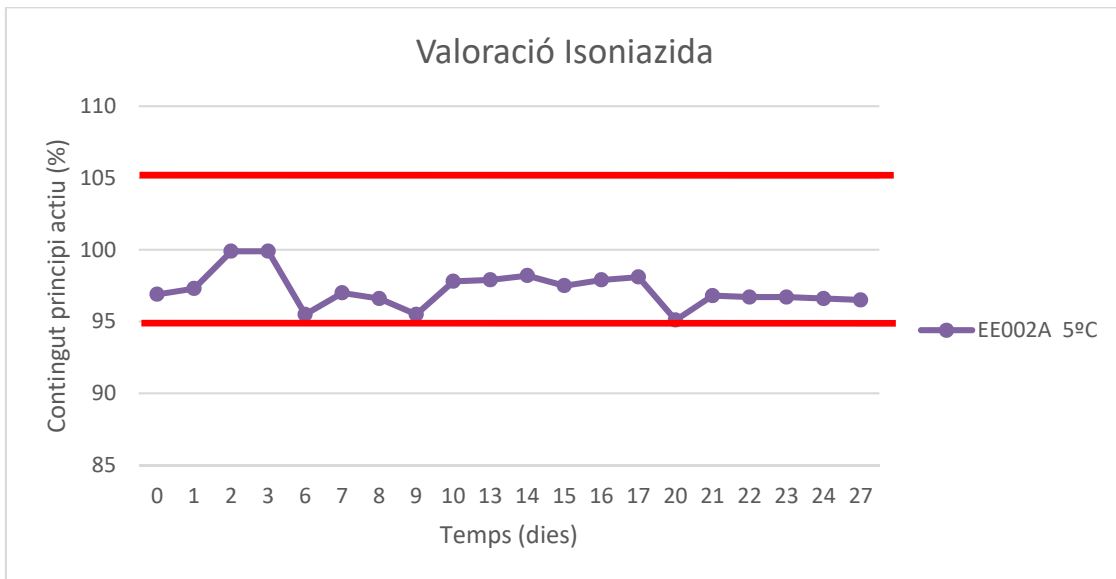


Figura 171. Valoració isoniazida de la referència EE002A sotmesa a condicions a llarg termini (5 °C)

## RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
0	3	290,789497	96,9298324	1,19787315
1	3	291,784207	97,2614025	1,26275879
2	3	299,783679	99,9278929	12,7238019
3	3	299,979331	99,9931104	10,6785637
6	2	190,956501	95,4782504	9,89434075
7	3	291,079869	97,026623	0,38497576
8	3	289,781994	96,593998	0,4204532
9	2	190,899217	95,4496086	0,53776344
10	3	293,485474	97,8284914	1,56701307
13	3	293,743239	97,9144131	7,4922565
14	3	294,486745	98,1622484	2,8675951
15	3	292,5927	97,5309001	8,01187728
16	3	293,963052	97,987684	1,28941205
17	3	294,208007	98,0693356	5,23700563
20	3	285,139857	95,046619	0,26536848
21	2	194,6601	97,33005	0,56275441
22	2	195,3796	97,6898	1,7803845
23	2	194,0961	97,04805	0,25226305
24	2	194,2944	97,1472	0,51531552
27	2	193,3214	96,6607	0,0658845

## ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	81,113172	19	4,26911431	1,17004179	0,33685932	1,91140642
Dentro de los grupos	120,406616	33	3,64868532			
Total	201,519787	52				

Figura 172. Anàlisi estadístic per isoniazida de la referència EE002A sotmesa 5 °C

L'anàlisi de dades mostra que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts els diferents dies d'estudi per isoniazida de la referència EE002A.

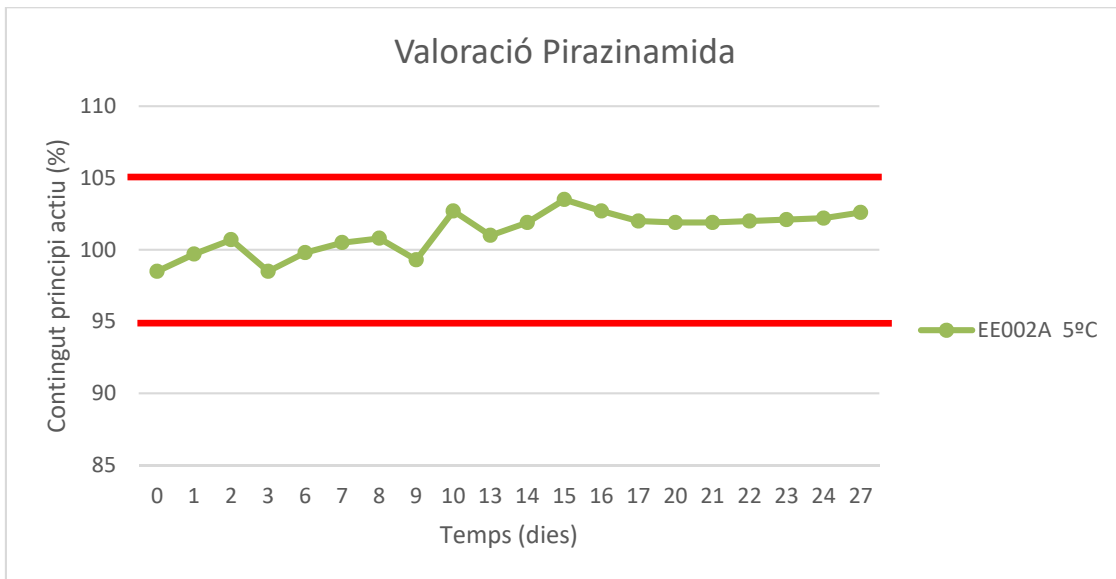


Figura 173. Valoració pirazinamida de la referència EE002A sotmesa a condicions a llarg termini (5 °C)

## RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
0	3	295,471593	98,49053094	1,410969
1	3	299,195931	99,73197697	0,256076
2	2	201,399392	100,6996961	0,932089
3	2	98,5287133	98,52871333	0,847369
6	2	99,5515201	99,5515201	0,74638
7	3	301,335387	100,4451289	1,378577
8	3	302,520622	100,8402073	0,324236
9	2	99,2864969	99,28649695	1,57460
10	3	307,94981	102,6499366	1,29361
13	3	303,069739	101,0232464	9,952817
14	3	305,790752	101,9302507	5,10145
15	3	310,515032	103,5050106	2,490654
16	3	308,038618	102,6795393	2,073924
17	3	306,049031	102,0163437	4,226156
20	3	305,735855	101,9119515	0,778682
21	2	204,739869	102,3695989	0,6441125
22	2	203,325958	101,6625098	0,2642645
23	2	203,644768	101,8224560	0,197192
24	2	203,713590	101,8565067	0,3003125
27	2	204,295495	102,1475656	0,3502845

## 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	83,22095106	19	4,380050056	1,692947	0,114353896	2,060753936
Dentro de los grupos	59,50639053	23	2,587234371			
Total	142,7273416	42				

Figura 174. Anàlisi estadístic per pirazinamida de la referència EE002A sotmesa 5 °C

L'anàlisi de dades mostra que no existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts els diferents dies d'estudi per pirazinamida de la referència EE002A. Es conclou doncs que no hi ha diferències estadísticament significatives entre els valors de riquesa obtinguts durant els diferents dies d'estudi en cap de les dues referències.

Considerant aquests resultats es realitza un altre anàlisi per determinar si hi ha diferències estadísticament significatives entre els resultats obtinguts de les dues referències fabricades per a la realització dels estudis d'estabilitat.



Per fer aquesta comparativa es realitza un anàlisi de t d'Student. Les figures 175, 176 i 177 mostren els resultats obtinguts per l'anàlisi de dades entre referències per rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament.

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	101,4055556	98,0666667
Varianza	3,137026144	2,41176471
Observaciones	18	18
Varianza agrupada	2,774395425	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	34	
Estadístico t	6,013662374	
P(T<=t) una cola	0,0000004	
Valor crítico de t (una cola)	1,6909	
P(T<=t) dos colas	0,0000008	
Valor crítico de t (dos colas)	2,0322	

*Figura 175. Anàlisi estadístic per rifampicina entre les referències EE001A i EE002A*

L'anàlisi estadística de la t d'Student, indica que existeixen diferències estadísticament significatives entre els dos lots elaborats pel que fa a la valoració quantitativa de rifampicina. Això es degut a la variabilitat existent en la preparació magistral del preparat medicamentós, que ha fet que en el lot EE001A es tingués un valor inicial del 102,8 % i en el lot EE002A es tingués un valor inicial del 98,8 %, és a dir, un 4% menys. Malgrat que tots dos lots aconsegueixen amb escreix les especificacions de qualitat establertes per aquest paràmetre (95 %- 105 %), la diferència fa que existeixin diferències estadísticament significatives entre els dos lots a causa de la poca variabilitat existent en els resultats individuals obtinguts al llarg del temps. Això fa que no existeixi superposició de valors experimentals, donant lloc a dues poblacions diferenciades entre sí. Aquest fet reflecteix i confirma la major variabilitat que existeix en la preparació magistral de medicaments, la qual cosa és habitual en la pràctica galènica.

	Variable 1	Variable 2
Media	97,84	97,36875
Varianza	2,359368421	1,88095833
Observaciones	20	16
Varianza agrupada	2,148305147	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	34	
Estadístico t	0,95857725	
P(T<=t) una cola	0,172269519	
Valor crítico de t (una cola)	1,690924255	
P(T<=t) dos colas	0,344539038	
Valor crítico de t (dos colas)	2,032244509	

Figura 176. Anàlisi estadístic per isoniazida entre les referències EE001A i EE002A

Tenint en compte les dades obtingudes es conclou que no existeixen diferències significatives entre % de isoniazida existent en les dues referències fabricades i emmagatzemades sota les mateixes condicions.

	Variable 1	Variable 2
Media	100,365	101,215
Varianza	2,485552632	2,08660526
Observaciones	20	20
Varianza agrupada	2,286078947	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	38	
Estadístico t	-1,77776075	
P(T<=t) una cola	0,041723463	
Valor crítico de t (una cola)	1,68595446	
P(T<=t) dos colas	0,083446925	
Valor crítico de t (dos colas)	2,024394164	

Figura 177. Anàlisi estadístic per pirazinamida entre les referències EE001A i EE002A

Tenint en compte les dades obtingudes es conclou que no existeixen diferències significatives entre el percentatge de pirazinamida existent en les dues referències fabricades i emmagatzemades sota les mateixes condicions.

Els resultats obtinguts permeten concloure doncs que de forma majoritària no hi ha diferències estadísticament significatives entre els valors de riquesa obtinguts en les referències fabricades per la realització dels estudis d'estabilitat, per tant les dades obtingudes es poden considerar fiables i els mètodes tant de fabricació com el d'anàlisi robustos. Fins i tot, de forma

sorprenent, el mètode de formulació magistral resulta ser majoritàriament robust i reproducible.

#### 6. Valoració del contingut dels productes de degradació

Com s'observa als quadres 131, 132, 133 i 134, en cap cas es poden quantificar els pics atribuïbles als productes de degradació per cada referència i per cada condició estudiada. Es conclou doncs que la suspensió manté unes condicions adequades de qualitat durant el temps d'estudi.

#### 7. Control microbiològic

Com s'observa als quadres 131, 132, 133 i 134, les diferents suspensions fabricades pels estudis d'estabilitat compleixen amb les especificacions microbiològiques establertes per Farmacopea Europea. Es demostra doncs la qualitat microbiològica del producte acabat i del procés de fabricació.

#### **4.6.7 Conclusions dels estudis d'estabilitat**

De l'anàlisi dels resultats obtinguts dels diferents paràmetres establerts en els estudis d'estabilitat es conclou que la suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida és altament inestable a temperatura ambient (25 °C) però estable durant 27 dies sota condicions de 5 °C ± 3 °C (condicions de refrigeració).

## DISCUSSIÓ GENERAL



La tuberculosi es caracteritza per ser una malaltia crònica que pot persistir durant anys si no es tracta adequadament. Degut als avenços en matèria de prevenció i de les noves combinacions de fàrmacs antimicrobians que han aparegut, el nombre de persones que emmalalteixen de tuberculosi cada any va disminuint. Tot i que les dades són esperançadores i que les perspectives d'erradicació de la malaltia són elevades, encara avui en dia el tractament de la malaltia representa un repte, sobretot en poblacions vulnerables com la geriàtrica o la pediàtrica, fent especial menció en aquesta última, la qual, és vulnerable, no només per les característiques intrínseques d'aquesta població, sinó també per la falta de tractaments antituberculosos específics per a ella (Naciones Unidas, 2014b), (Organització Mundial de la Salut, 2014a).

Actualment, l'ús de la teràpia de combinació en formulacions de dosi fixa és l'estratègia fonamental que es plantegen la OMS i la UICTER, la qual consisteix en administrar dos o més substàncies actives amb la finalitat de guanyar efectivitat en el tractament de la malaltia i de disminuir el nombre de resistències. Dintre dels tractaments considerats com de primera línia es troba la combinació de rifampicina, isoniazida i pirazinamida com a principal combinació que es pauta en la majoria d'organitzacions de salut que hi ha arreu del món (Organització Mundial de la Salut, 2014b).

Tant en el mercat nacional com internacional existeixen medicaments que inclouen la combinació dels tres antituberculosos considerats de primera línia, però cap d'ells està adreçat a la població pediàtrica, de fet, la majoria són formes farmacèutiques sòlides orals (càpsules o comprimits) difícils de fraccionar (Centro de información de medicamentos On-line, 2014), (*Medecines and Healthcare Products Regulatory Agency*, 2014). Aquest fet juntament amb l'elevada durada dels tractaments, condiciona molt l'adherència terapèutica en pediatria i això es tradueix en la no curació de la malaltia (Organización Mundial de la Salud, 2014b). Així, institucions com la Xarxa Espanyola d'estudi de la tuberculosi pediàtrica, han evidenciat una falta de consens nacional en l'administració d'antituberculosos en nens propiciada per la manca de presentacions pediàtriques específiques i han creat, juntament amb 5 institucions més, un grup de treball amb la finalitat d'estandarditzar la preparació, conservació i administració de fórmules magistrals pediàtriques dels antituberculosos més utilitzats. (Piñeiro et al. 2016).

Així doncs, l'objectiu de la tesi es desenvolupar un nou medicament que permeti dosificar de manera conjunta, senzilla i individualitzada la combinació de rifampicina, isoniazida i pirazinamida per al tractament de la tuberculosi en població pediàtrica.

La primera etapa s'inicia amb la fase d'investigació de les característiques físiques, químiques i tecnològiques dels tres principis actius objecte d'estudi amb la finalitat de recopilar la màxima informació sobre ells. Es defineixen l'estructura, les característiques físiques i químiques, els espectres d'absorció i les estabilitats de cadascun d'ells de forma individual i/o en combinació.

D'aquesta primera fase de recerca s'extreuen dades indispensables que condicionaran el camí a seguir alhora de realitzar la formulació conjunta dels tres principis actius. Destacar que la combinació de rifampicina i isoniazida en medi àcid aquós es tradueix en l'aparició d'un fenomen de degradació en un grau molt elevat de rifampicina. Sota aquestes condicions es genera la 3-formil rifampicina, la qual interacciona amb la isoniazida donant, a través d'una reacció de segon ordre, una hidrazona. Aixó es tradueix en una degradació de la rifampicina i la seva conseqüent disminució en l'estabilitat i la biodisponibilitat (Shisho et al. 2001), (Sosa et al. 2005).

A més a més cal considerar que l'addició de pirazinamida a la mescla catalitza la reacció que es dona per formar la hidrazona intervenint directament a nivell de protons intramoleculars (Bhutani et al. 2005), (Saranjit et al. 2001) i (Seifart et al. 1991). Aquestes dades permeten dirigir la formulació cap a una elaboració líquida de caràcter oliós, que contingui bàsicament olis vegetals i/o triglicèrids de cadena mitja els quals aportin poques calories i presentin poca susceptibilitat a l'enranciment (Cano Corral, 2012), (Roig, 2004).

La següent etapa consisteix en l'estudi i la caracterització dels principis actius de forma experimental amb la finalitat d'obtenir informació sobre la puresa, l'estructura química i les possibles incompatibilitats que pugin presentar.

S'estudien les característiques de solubilitat dels tres principis actius, considerant les quantitats proposades segons les pautes de dosificació de la OMS (Organització Mundial de la Salut, 2014b) en medi oliós i a diferents pHs. De l'estudi realitzat s'observa que tots tres principis actius són insolubles en medi oliós, fet que permet

afirmar que en el desenvolupament d'una preparació líquida dels tres principis actius en medi oliós es forma una suspensió.

Per altra banda, en medi aquós la isoniazida es demostra soluble a la concentració estudiada (dosi terapèutica) independentment del pH de la dissolució, ben al contrari que la pirazinamida, que demostra ser insoluble en medi aquós independentment del pH. Per altra banda la rifampicina és soluble a la concentració de treball en medi aquós a  $\text{pH} = 1$ , però insoluble als pHs de 3, 5, 7 i 9, la qual cosa fa concloure que el seu comportament de solubilitat en medi aquós és pH dependent, essent necessari un pH molt àcid per la seva correcta solubilització.

Alhora, es realitza un anàlisi de la distribució de la mida de partícula de cada principi actiu, obtenint una mida de partícula d 0,5 (corresponent al 50 % del volum de partícula) per sota de 0,193  $\mu\text{m}$ , 180,715  $\mu\text{m}$  i 72,747  $\mu\text{m}$  per rifampicina, isoniazida i pirazinamida respectivament. Destacar la presència de dues poblacions de partícules en el cas de rifampicina, on la gran majoria es troba de forma micronitzada. Tant isoniazida com pirazinamida es troben en forma polvoritzada amb mides de partícula altament superiors a les que presenta rifampicina. Segons les dades obtingudes es conclou que es convenient la realització d'una tamisació prèvia de les pólvores per uniformitzar la mida de partícula i elaborar d'aquesta manera una suspensió estable i homogènia. Després del procés de desenvolupament de la formulació, s'arriba a la conclusió de fer una tamisació forçada per un tamís de 0,100 mm de llum, obtenint-se llavors unes correctes característiques de la suspensió. En referència a la morfologia dels cristalls, en tots tres casos es preveuen unes característiques reològiques deficientes degut als cristalls de tipus prismàtic que presenten rifampicina i isoniazida i als cristalls de forma variable que presenta pirazinamida.

De l'estudi de les propietats reològiques s'extreuen dades que s'han de considerar a l'hora de realitzar el disseny de la formulació. Dels valors obtinguts dels paràmetres de dimensions destacar els elevats valors de densitat que s'obtenen per rifampicina i isoniazida, fet que facilita per una banda la manipulació de les pólvores i per l'altre l'estabilitat de la suspensió. En el cas de la pirazinamida, no s'obtenen valors tan elevats de densitats, la qual cosa dificultarà la manipulació de les pólvores i l'estabilitat de la suspensió. Els paràmetres corresponents a lliscament i fluïdesa són deficientes pels tres principis actius objectes d'estudi, fet que dificultarà l'elaboració a escala industrial,



fonamentalment en tot el relatiu als processos de barreja i dosificació. Els paràmetres relatius a la humitat i a la higroscopicitat són excel·lents en tots tres casos, condició favorable en el cas que la suspensió sigui extemporània, ja que la mescla de pólvores no es veurà afectada per la humitat ambiental.

Dels espectres UV-Vis obtinguts per rifampicina, isoniazida i pirazinamida s'obtenen els màxims d'absorció descrits a Farmacopea Europea per a cadascun d'ells. Dels espectres IR i RMN obtinguts per rifampicina, isoniazida i pirazinamida es poden identificar els grups funcionals característics de cadascun d'ells. Dels difractogrames obtinguts per rifampicina, isoniazida i pirazinamida s'observen nombroses línies d'alta intensitat, fet que indica que els tres principis actius estan en estat cristal·lí. Tot això permet assegurar que les primeres matèries utilitzades són de qualitat, tenen la puresa adient i les característiques establertes per Farmacopea Europea.

En aquesta etapa també es realitza un estudi de compatibilitat dels tres principis actius per calorimetria diferencial d'escombratge. Dels termogrames obtinguts de les mescles binàries es conclou que no hi ha cap incompatibilitat entre els tres principis actius en estat sòlid.

Tenint present les dades obtingudes, la següent etapa que s'inicia és la dels estudis de preformulació i formulació amb la finalitat d'obtenir una fórmula robusta i adequada mitjançant una tècnica d'elaboració adient.

En l'etapa de preformulació es tria com a vehicle oliós els triglicèrids de cadena mitja degut a les particularitats esmentades. La mescla dels tres principis actius amb aquest medi permet obtenir una suspensió amb moltes mancances com a tal, produint una ràpida sedimentació de partícules i la formació d'un aglomerats difícilment redispersables. Aquests fets fan plantejar dues possibles vies d'actuació, per una banda l'addició d'excipients que millorin les propietats de la suspensió, i per altra la tamització prèvia dels principis actius per homogeneïtzar la mescla.

S'afegeixen agents suspensors, agents antiadherents i agents dispersants amb la finalitat de resoldre els problemes d'estabilitat. S'avaluen característiques com viscositat i aspecte inicial i final per determinar quins excipients són els més adequats per la fórmula. Així, s'estudien mescles a diferents concentracions dels excipients esmentats,

on finalment s'obtenen 8 fórmules placebo les quals s'utilitzen per als estudis de formulació amb els tres principis actius.

La següent fase dins d'aquesta etapa són els estudis de formulació. Per fer les proves conjuntes d'excipients amb principis actius, es parteix dels resultats obtinguts en els estudis de preformulació. Per establir les quantitats de cada principi actiu es consideren les pautes de dosificació de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 2014b). Per valorar i comparar les diferents formulacions es defineixen uns paràmetres d'estudi i s'assigna un valor numèric a cadascun d'ells. Els paràmetres són: viscositat, mida de partícula, característiques organolèptiques i propietats de la suspensió. A partir d'aquests paràmetres s'ha desenvolupat una forma de tractament de dades que ha donat lloc a la proposta d'una eina original i innovadora per l'avaluació de les característiques galèniques d'una suspensió que determina amb un valor numèric objectiu la qualitat galènica de la mateixa. Aquesta eina, fonamentada en els plantejaments del diagrama SeDeM (Aguilar et al, 2014) (Pérez et al, 2006) (Suñé Negre et al, 2011), tracta de donar un valor numèric de l'1 al 10 als resultats experimentals de cada assaig desenvolupat. Sobre tots els valors numèrics s'apliquen un seguit de fórmules que donen lloc a un valor únic indicador de la millor o pitjor qualitat de la suspensió. Com més alt sigui aquest valor en l'escala de l'1 al 10, millor és la suspensió obtinguda. D'aquesta manera, s'ha pogut definir la millor formulació per a l'obtenció d'una suspensió d'administració oral per vehicular en forma líquida els tres fàrmacs motiu d'estudi. Alhora que es valoren els excipients idonis per la formulació, s'estableix la tècnica d'elaboració més adient. Els resultats obtinguts mostren que la mescla conjunta de sílice col·loidal anhidre a l'1%, oli de ricí polioxietilenat al 5% i simeticona al 2% ofereix les millors propietats fisicoquímiques i galèniques a la formulació.

Un cop s'obté la millor fórmula es fan estudis de millora de les propietats organolèptiques amb la finalitat de millorar el gust i l'olor de la suspensió i fer-la d'aquesta manera més atractiva per a la població pediàtrica. Després de fer una exhaustiva recerca amb la finalitat d'emascarar el sabor amargant de la formulació, es fan proves amb diferents edulcorants i correctors. La tria d'aquests excipients es realitza en funció de les característiques físiques de la fórmula (color i textura), així com de la potència emascarant de sabor amarg. De forma que s'escullen edulcorants i correctors que amaguin el sabor amargant i aportin un sabor dolç a la suspensió alhora que

integren les propietats organolèptiques de la mateixa amb el color i la textura d'aquesta. Per avaluar les diferents propostes es realitza un test d'avaluació sensorial amb 4 panelistes. Els resultats obtinguts del tast mostren que la millor combinació per corregir i emmascarar el sabor amargant, i que més lliga amb l'aspecte final de la suspensió és la de xocolata i mentol.

<b>Components</b>	<b>Quantitats</b>
Rifampicina	2 g
Isoniazida	1,33 g
Pirazinamida	3,33 g
Aerosil®R-792	1 g
Cremophor®RH-40	5 g
Dow-Corning®Q7-2243	2 g
Sucralosa	0,35 g
Mentol	0,05 g
Essència de xocolata	0,45 g
TCM	csp 100 ml

*Quadre 135. Composició referència definitiva*

El resultat final de l'etapa de formulació és l'obtenció d'una fórmula físicament estable, d'aspecte i gust agradable, i el desenvolupament d'un procés d'elaboració simple i fàcil que permet fer un escalat a nivell industrial sense l'aparició de complicacions crítiques. Amb la fórmula definitiva es realitzen estudis d'eficàcia de conservació antimicrobiana per garantir que la composició de la suspensió de rifampicina, isoniazida i pirazinamida no patirà contaminació per part de bacteris i fongs. Es demostra que això és així, arribant-se a la conclusió de que la formulació proposada no cal que porti conservants antimicrobians ni antifúngics.

Per poder realitzar la investigació i el desenvolupament d'un nou medicament, molts cops es necessari fer una posta a punt de nous mètodes d'anàlisi en funció dels principis actius considerats, de la formulació desenvolupada (excipients) i de la forma farmacèutica finalment establerta. Es per això, que prèvia a l'etapa d'investigació de l'estabilitat de la fórmula definitiva, es realitza una etapa d'investigació i desenvolupament d'una nova metodologia analítica que permet analitzar la suspensió oliosa

amb els tres principis actius objecte d'estudi de forma ràpida i conjunta. Així, es desenvolupa un mètode d'anàlisi per la quantificació i identificació conjunta de rifampicina, isoniazida i pirazinamida. Posteriorment es realitza la validació del mètode analític per la valoració de rifampicina, isoniazida i pirazinamida mitjançant la qual s'arriba a la conclusió que el mètode utilitzat és adequat. Prèviament a la validació es comprova, a través d'un estudi d'idoneïtat del sistema, que el mètode i el sistema HPLC poden generar resultats de precisió i exactitud acceptables. Dels resultats obtinguts es conclou que l'estudi d'idoneïtat del sistema és correcte.

Es comprova que el mètode és selectiu per rifampicina, isoniazida i pirazinamida, és lineal en l'interval establert (70%-130%), repetitiu, reproduïble i exacte. Es comprova que el sistema instrumental és adequat per la valoració dels tres principis actius objecte d'estudi.

Es comprova la capacitat del mètode per donar resultats directament proporcionals a la concentració d'analits en la mostra. Alhora s'estableix un interval de concentracions en les quals el mètode és exacte i precís (70%-130%).

Es comprova la robustesa del sistema pels analits en estudi respecte a la longitud d'ona del detector, la temperatura de la columna, el cabal de la bomba cromatogràfica i el volum d'injecció. Es conclou que la recuperació no es veu afectada per petites variacions de ninguna de les variables estudiades.

La solució problema preparada per cromatografia pot conservar-se durant un màxim de 6 hores després de la seva preparació, ja que s'estudia la seva estabilitat a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  i es manté al 100 % fins les 6 hores.

La solució patró preparada per cromatografia pot conservar-se durant un màxim de 24 hores després de la seva preparació, ja que s'estudia la seva estabilitat a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  i es manté al 100 % fins les 24 hores.

De l'estudi dels productes de degradació es defineix l'existència de 8 productes de degradació.

Es conclou doncs que el mètode utilitzat és adequat.

Es realitzen estudis d'estabilitat preliminar amb la finalitat d'avaluar diferents paràmetres o característiques de la fórmula proposada per determinar si és estable o per comprovar si modificant algun factor es podrien pal·liar dèficits en matèria d'estabilitats.

Considerant la recerca bibliogràfica es planteja la hipòtesi d'una possible degradació de la rifampicina degut a la presència conjunta dels tres principis actius en medi líquid (Saranjit et al. 2001). En conseqüència, es realitzen estudis d'estabilitat preliminar galènics amb la finalitat d'obtenir resultats que proporcionin la informació necessària per valorar la integritat dels tres principis actius i descartar la formulació proposada com a definitiva, o pel contrari, continuar amb aquesta i realitzar els estudis d'estabilitat per determinar el període d'eficàcia del producte.

S'analitzen 2 referències de productes acabats preparats des de fa 10 dies i 10 mesos respectivament mitjançant el mètode d'anàlisi desenvolupat i validat dels tres principis actius. Dels resultats obtinguts dels estudis d'estabilitat preliminar es conclou que la suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida és inestable a temperatura ambient ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ja que als 10 dies la rifampicina ja s'ha degradat més d'un 15 %.

Es corrobora que la degradació no ve donada per cap excipient i que la reacció es produeix principalment entre rifampicina i isoniazida i rifampicina i pirazinamida. S'analitzen 3 referències. La referència 001 només amb rifampicina com a principi actiu, la referència 002 amb rifampicina i isoniazida com a principis actius i la referència 003 amb rifampicina i pirazinamida com a principis actius. Els resultats mostren que la degradació de rifampicina és gairebé insignificant quan està sola o en combinació amb pirazinamida, però quan es troba en combinació amb isoniazida es dona en un grau molt elevat. Es corroboren les dades obtingudes bibliogràficament sobre la reactivitat dels tres principis actius en medi líquid (Saranjit et al. 2001) i es descarta la hipòtesi d'incompatibilitat amb els excipients.

Es planteja l'elaboració d'una suspensió oliosa extemporània emmagatzemada en condicions de refrigeració ( $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). S'analitza a temps inicial, 4 dies, 7 dies i 11 dies per corroborar la viabilitat de la fórmula. Dels resultats obtinguts es conclou que la suspensió oliosa extemporània emmagatzemada en condicions de refrigeració ( $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) és

estable durant un mínim d'11 dies. Es considera la suspensió oliosa extemporània emmagatzemada en condicions de refrigeració (5 °C) com a fórmula final definitiva.

Finalment, en la última etapa es realitzen els estudis d'estabilitat sota condicions ICH a la fórmula definitiva per determinar el període d'eficàcia del producte. Les recomanacions de les ICH per realitzar estudis d'estabilitat a medicaments que han d'estar emmagatzemats sota condicions de refrigeració (4-6 °C) són estudis en condicions a llarg termini (5 °C ± 3 °C) i estudis en condicions accelerades (25 °C ± 2 °C / 60 % HR ± 5) (International Council on Harmonisation 2018a). Es fabriquen 2 referències per a cada condició per poder obtenir dades estadísticament significatives, les mostres es preparen per triplicat per garantir la fiabilitat de les dades obtingudes.

Es consideren els següents paràmetres d'estudi: característiques organolèptiques, capacitat de redispersió, densitat, identificació dels principis actius, valoració del contingut dels principis actius, valoració dels contingut dels productes de degradació i control microbiològic.

Amb els resultats obtinguts dels estudis d'estabilitat es comprova que la suspensió oliosa manté les propietats organolèptiques i la capacitat de redispersió durant tot el període d'estudi i en les dues condicions. També es comprova que el temps de resuspensió i la densitat es mantenen dintre dels límits establerts i que la identificació dels tres principis actius és positiva durant tot els temps d'estudi i en les dues condicions d'emmagatzematge.

En referència a la valoració del contingut dels principis actius, es comprova que les referències sotmeses a condicions accelerades mantenen la quantitat de principis actius dintre dels límits establerts durant les primeres 24 h, en canvi les referències sotmeses a condicions a llarg termini, les mantenen durant 27 dies. No es detecten productes de degradació per sobre dels límits establerts en cap de les dues referències durant tots el període d'estudi.

No s'observa creixement microbiològic en cap de les dues referències fabricades per a cada condició d'emmagatzematge de cap població de microorganismes establerts en les especificacions de Eur.Ph. 9.4 durant tot el període d'estudi.

Dels resultats obtinguts en els estudis d'estabilitat es conclou que la suspensió oliosa de rifampicina, isoniazida i pirazinamida és inestable a temperatura ambient (25 °C) però estable durant 27 dies sota condicions de 5 °C ± 3 °C (condicions de refrigeració).

D'aquesta forma, s'arriba a assolir el principal objectiu d'aquesta tesi, que és el d'obtenir un nou medicament que permeti dosificar de forma conjunta, senzilla i individualitzada la combinació dels tres principis actius (rifampicina, isoniazida i pirazinamida) més utilitzats per al tractament de la tuberculosi en població pediàtrica. Això ha estat possible després de fer la recerca galènica adient, que ha permès proposar com a nou medicament una suspensió anhidra de preparació extemporània d'administració oral d'ús en pediatria, amb els avantatges que això suposa en matèria d'adherència terapèutica, de compliment terapèutic i en conseqüència de curació de la malaltia, així com de dosificació individualitzada en funció de les característiques de cada pacient, garantint tant l'eficàcia del tractament com la disminució de possibles efectes nocius derivats d'una incorrecta dosi de fàrmacs.

La formulació i la tècnica d'elaboració que es proposen per aquest nou medicament són les següents:

<b>Components</b>	<b>Quantitats</b>
Rifampicina	2 g
Isoniazida	1,33 g
Pirazinamida	3,33 g
Aerosil®R-792	1 g
Cremophor®RH-40	5 g
Dow-Corning®Q7-2243	2 g
Sucralosa	0,35 g
Mentol	0,05 g
Essència de xocolata	0,45 g
TCM	csp 100 ml

*Quadre 136. Formulació definitiva*

Pesar dels components.
Tamisar els principis actius per un tamís de 100 µm i emmagatzemar en un envàs de vidre transparent.
Escalfar 91 ml de TCM fins 70 °C sota agitació mecànica de tipus pales.
Un cop calents, afegir l'agent suspensor (Aerosil®R-792) mantenint l'agitació fins homogeneïtzar.
Un cop homogeneïtzada la mescla, afegir el dispersant i autoemulgent (Cremophor®RH-40) mantenint l'agitació i la calor (70 °C).
Deixar refredar fins a temperatura ambient.
Un cop freda, afegir l'agent antiadherent (Dow-Corning®Q7-2243) mantenint l'agitació.
Afegir la sucralosa i el mentol mantenint l'agitació.
Afegir l'essència de xocolata mantenint l'agitació.
Emmagatzemar la mescla líquida d'excipients en un envàs de vidre transparent.

*Quadre 137. Tècnica d'elaboració.*

D'aquesta manera, la recerca plantejada ha assolit quelcom que va ser desestimat i considerat inviable per part de Chen Y (Chen, 2000) el qual va estudiar la possibilitat d'obtenir una formulació líquida d'administració oral de rifamicina, isoniazida i pirazinamida sense èxit. Aquesta fita assolida ha estat considerada de prou vàlua i que compleix les característiques de novetat i activitat inventiva necessàries com per ser patentada per part de la Universitat de Barcelona (EP 18382385).





## CONCLUSIONS



1. S'ha obtingut un nou medicament que permet dosificar de forma conjunta, senzilla i individualitzada rifampicina, isoniazida i pirazinamida pel tractament de la tuberculosi en població pediàtrica.
2. Es proposa com a nou medicament una suspensió d'administració oral i preparació extemporània, que permet adaptar la dosificació adient en funció del pes del pacient a tractar.
3. Es proposa com a formulació òptima la corresponent a una suspensió oliosa extemporània on la composició és la següent:

Rifampicina.....	2%
Isoniazida.....	1,33%
Pirazinamida.....	3,33%
Aerosil®R-792.....	1%
Cremophor®RH-40.....	5%
Dow-Corning®Q7-2243.....	2%
Sucralosa.....	0,35%
Mentol.....	0,05%
Essència de xocolata.....	0,45%
Triglicèrids de cadena mitja.....	cs

4. Es proposa un procés de fabricació que inclou les etapes de pesada, tamització i mescla dels principis actius, mesclat i homogeneïtzació dels excipients i acondicionament per separat en flascons de vidre transparent amb tap de plàstic dels principis actius sòlids i de la mescla líquida d'excipients.
5. Es proposa una nova mètrica analítica per RP-HPLC per l'anàlisi quantitatiu simultani dels tres principis actius objecte d'estudi en el producte acabat.
6. El mètode d'anàlisi proposat es valida conclouent que és selectiu, lineal, precís, exacte i robust segons ICH.
7. S'estableixen uns assaigs de qualitat pel medicament proposat en funció de les característiques galèniques, fisicoquímiques i microbiològiques dels estudis preliminars. Concretament es proposen els següents assajos: característiques organolèptiques, capacitat de redispersió, temps de redispersió, densitat, identificació dels principis actius, valoració dels principis actius, valoració dels productes de degradació i controls microbiològics.

8. De l'anàlisi dels resultats obtinguts dels estudis d'estabilitat a llarg termini ( $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) es conclou que la suspensió oliosa és estable durant 27 dies en envàs de vidre transparent amb tap de plàstic sota condicions de refrigeració ( $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

## BIBLIOGRAFIA



## A

Advance Chromatography Technologies (2016). A guide to HPLC and LC-MS buffer selection. Disponible en [https://www.hplc.eu/Downloads/ACE\\_Guide\\_BufferSelection.pdf](https://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_BufferSelection.pdf) [consultat el 01/12/2016].

Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (2001). Validación de métodos analíticos, monografías de la AEFI. Girona. Marzo 2001.

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (2018). Guia de Normas de Correcta Fabricación para medicamentos de uso humano y veterinario. Disponible en <https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/home.htm> [consultat el 26/01/2018].

Aguilar Díaz JE, García Montoya E, Pérez Lozano P, Suñé Negre JM, Miñarro M, Ticó JR. SeDeM expert system a new innovator tool to develop pharmaceutical forms. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014; 40 (2): 222-236.

Alifano P, Palumbo C, Pasani D, Adelfia T. Rifampicin-resistance, rpoB polymorphism and RNA polymerase genetic engineering. *Journal of Biotechnology*, 2015; 202: 60-77.

Alonso Gonzalo AC. Formas líquidas orales. En Vila Jato JL. Tecnología Farmacéutica. 2ª edición. Ed. Síntesis. Madrid, 2001; 2: 25-54.

Ash M, Ash I, Mayers J. Handbook of Pharmaceutical Additives. 3<sup>rd</sup> edition. Synapse Information Resources Inc. New York, 2007.

Association of Analytical Chemists (2018). Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures. Disponible en [http://www.aoac.org/AOAC\\_Prod\\_Imis/AOAC/PS/PSOMP/AOAC\\_Member/SDCF/SDOMPFC/SDOMPM.aspx?hkey=216d4ba2-68ec-41db-bd32-abb12569cb00](http://www.aoac.org/AOAC_Prod_Imis/AOAC/PS/PSOMP/AOAC_Member/SDCF/SDOMPFC/SDOMPM.aspx?hkey=216d4ba2-68ec-41db-bd32-abb12569cb00) [consultat el 30/01/2018].



Attwood D. Sistemas dispersos. En Aulton ME. Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Elsevier España SA. Madrid, 2004: 70-100.

## **B**

Balasubramanian A, Pampalia G.M. Drug adjuvant interaction study using DSC supported by isothermal method. *Drug Dev Ind Pharm*, 2001; 26: 925-930.

Bandari S, Jadav S, Babu B, Dhurke R, Jukanti R. Enhancement of Solubility and Dissolution Rate of Loratadine with Gelucire 50/13. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 2014; 9(2):141–149.

Bavdekar S.B. Pediatric clinical trials. *Perspectives in Clinical Research*, 2013; 4 (1): 89–99.

Benfang L, Chih-Jen W, Shiao-Chun T. Action Mechanism of Antitubercular Isoniazid. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275(4): 2520-2526.

Bhutani H, Singh S, Jindal KC, Chackrabuti AK. Mechanistic explanation to the catalysis by pyrazinamide and ethambutol of reaction between rifampicin and isoniazid in anti-TB FDCs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005; 39: 892-899.

Billany M. Suspensiones y emulsiones. En Aulton ME. Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Elsevier España SA. Madrid, 2004: 334-358.

Boletín Oficial del Estado. Definición del término de validación. OM. de 19\_IV-1985. BOE nº 103 de 30-IV-1985.

British National Formulary for Children (2016). Disponible en <https://www-medicinescomplete-com.sire.ub.edu/mc/bnfc/current/PHP11104-simeticone.htm#PHP98196-indicationsAndDose-topic> [consultat el 27/05/2016].

Brunton L.L, Lazo J.S, Parker K.L. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapèutica. 12ª edición. Mc Graw Hill International. México, 2012:1203-1216.

Bustamante Martínez P. Suspensiones. En Faulí trillo C. Tratado de Farmacia Galénica. Ed Luzan 5 SA. Madrid, 1993: 405-422.

## C

Cano Corral C, González Rodríguez ML, Pérez Martínez JI, Alarcón-Payer C, Martínez López I, Rabasco Álvarez A. Elaboración y caracterización de una suspensión oleosa de omeprazol para su administración en pediatría. *Ars Pharmaceutica*, 2012; 53(2): 29-35.

Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS-CIMA (2014). Disponible en <http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm> [consultat el 17/11/2014].

Chen Y. The solubility enhancement and the stability assessment of Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide in aqueous media. Thesis for the degree of master of science of Rhodes University, 2000.

## D

Dalmau Roch R, Suñé Negra JM, Cemeli Pons J. Control de calidad en la Industria Farmacéutica: Concepto de validación. *Industria Farmacéutica. Investigación y Tecnología*. 1989; IV (3): 85-91.

Diana A, Riet-Nales V, Wang S, Saint-Raymond A, Robert J.L. The EMA quality guideline on the pharmaceutical development of medicines for paediatric use. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012; 435 (2): 132-134.

Dolan J.W. Gradient Elution Part V: Baseline Drift Problems. *LCGC North America*, 2013; 31 (7): 538:543.

## E

Elorza Barroeta MA, Civera Tejuca MC. Sistemas dispersos heteronéneos: suspensiones. En Lozano MC, Córdoba D, Córdoba M. Manual de Tecnología Farmaceutica. Elsevier Española SL. Barcelona, 2012: 143-153.

European Comission (2014). Disponible en [https://ec.europa.eu/health/human-use/paediatric-medicines\\_en](https://ec.europa.eu/health/human-use/paediatric-medicines_en) [consultat el 20/04/2014].

European Medicines Agency (2014). Disponible en [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general\\_content\\_000023.jsp](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000023.jsp) [consultat el 20/04/2014].

European Medicines Agency (2015). Disponible en [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2013/07/WC500147002.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/07/WC500147002.pdf) [consultat el 20/01/2015].

European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> edition (2014a). (01/2008:0052). Disponible en <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-8th-edition-1563.html> [consultat el 27/05/2014].

European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> edition (2014b). (01/2008:0146). Disponible en <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-8th-edition-1563.html> [consultat el 27/05/2014].

European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> edition (2014c). (01/2008:0859). Disponible en <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-8th-edition-1563.html> [consultat el 27/05/2014].

European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> edition (2015a). (4.1.3). Disponible en <http://online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep808/> [consultat el 27/10/2015].

European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> edition (2015b). (2.9.34). Disponible en <http://online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep808/> [consultat el 16/11/2015].

European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> edition (2015c). (2.9.16). Disponible en <http://online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep808/> [consultat el 16/11/2015].

European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> edition (2015d). (2.9.36). Disponible en <http://online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep808/> [consultat el 16/11/2015].

European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> edition (2015e). (2.9.12). Disponible en <http://online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep808/> [consultat el 16/11/2015].

European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> edition (2015f). (2.2.32). Disponible en <http://online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep808/> [consultat el 16/11/2015].

European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition (2016a). (04/2012:1427). Disponible en <https://www.online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep900/> [consultat el 09/09/2016].

European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition (2016b). (01/2017:1268). Disponible en <https://www.online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep900/> [consultat el 09/09/2016].

European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition (2016c). (01/2017:0495). Disponible en <https://www.online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep900/> [consultat el 09/09/2016].

European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition (2016d). (01/2017:0434). Disponible en <https://www.online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep900/> [consultat el 09/09/2016].

European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition (2016e). (01/2017:1040). Disponible en <https://www.online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep900/> [consultat el 09/09/2016].

European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition (2016f). (01/2008:1497). Disponible en <https://www.online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep900/> [consultat el 09/09/2016].

European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition (2016g). (01/2017:1470). Disponible en <https://www.online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep900/> [consultat el 09/09/2016].

European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition (2016h). (01/2017:2368). Disponible en <https://www.online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep900/> [consultat el 09/09/2016].

European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition (2016i). (01/2008:0623). Disponible en <https://www.online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep900/> [consultat el 09/09/2016].

European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition (2017). (07/2014:10000). Disponible en <http://online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep905/#> [consultat el 09/10/2017].

European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition (2018). (01/2018:0672). Disponible en <http://online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep905/> [consultat el 10/01/2018].

## F

Faulí C. Tratado de farmacia galénica. Editorial Luzán 5. Madrid, 1993.

Florez J, Armijo J.A, Mediavilla A. Farmacología Humana, 6<sup>a</sup> edición. Editorial Elsevier España S.L. Barcelona, 2014: 715-738.

Food and Drug Administration (2015). Analytical Procedures and Methods Validations for Drugs and Biologics. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf> [consultat el 10/01/2017].

Ford J.L, Timmins P. Application of thermal analysis to Compatibility studies for sòlid dosatge forms. *Pharmaceutical Thermal Analysis*, 1989: 238:247.

## G

Girling D, Fox W. Side Effects of Rifampicin. *British Medical Journal*, 1971; 5781 (4): 231.

Goldstein B. Resistance to rifampicin: a review. *The Journal of Antibiotics*, 2014; 67: 625-630.

González-Martín J, García-García J.M, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, Moreno S, Manzano J.R. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 2010; 28(5):297.e1-297.e20.

Gorocica P, Jiménez-Martínez M, Garfías Y, Sada I, Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 2005; 18(2):142-153.

Guía para la evaluación sensorial de alimentos (2016). Disponible en <http://lac.harvestplus.org/wp-content/uploads/2008/02/Guia-para-la-evaluacion-sensorial-de-alimentos.pdf> [consultat el 09/04/2016].

## **H**

Handbook of Pharmaceutical Excipients 7<sup>th</sup> edition (2016a). Disponible en <http://www.medicinescomplete.com.sire.ub.edu/mc/excipients/current/1001938956>. [consultat el 09/09/2016].

Handbook of Pharmaceutical Excipients 7<sup>th</sup> edition (2016b). Disponible en <http://www.medicinescomplete.com.sire.ub.edu/mc/excipients/current/1001964739>. [consultat el 09/09/2016].

Handbook of Pharmaceutical Excipients 7<sup>th</sup> edition (2016c). Disponible en <http://www.medicinescomplete.com.sire.ub.edu/mc/excipients/current/1001984637>. [consultat el 09/09/2016].

Handbook of Pharmaceutical Excipients 7<sup>th</sup> edition (2016d). Disponible en <http://www.medicinescomplete.com.sire.ub.edu/mc/excipients/current/1000946372>. [consultat el 09/09/2016].

Handbook of Pharmaceutical Excipients 7<sup>th</sup> edition (2016e). Disponible en <http://www.medicinescomplete.com.sire.ub.edu/mc/excipients/current/1000940954>. [consultat el 09/09/2016].

Handbook of Pharmaceutical Excipients 7<sup>th</sup> edition (2016f). Disponible en <http://www.medicinescomplete.com.sire.ub.edu/mc/excipients/current/1008573920>. [consultat el 09/09/2016].

Handbook of Pharmaceutical Excipients 7<sup>th</sup> edition (2016g). Disponible en <http://www.medicinescomplete.com.sire.ub.edu/mc/excipients/current/1084923738>. [consultat el 09/09/2016].

Handbook of Pharmaceutical Excipients 7<sup>th</sup> edition (2016h). Disponible en <http://www.medicinescomplete.com.sire.ub.edu/mc/excipients/current/1084929458>. [consultat el 09/09/2016].

Handbook of Pharmaceutical Excipients 7<sup>th</sup> edition (2016i). Disponible en <http://www.medicinescomplete.com.sire.ub.edu/mc/excipients/current/1084996358>.  
[consultat el 09/09/2016].

Handbook of Pharmaceutical Excipients 7<sup>th</sup> edition (2016j). Disponible en <http://www.medicinescomplete.com.sire.ub.edu/mc/excipients/current/1084905985>.  
[consultat el 09/09/2016].

## I

IESMAT (2016). Fundamentos sobre el tamaño de partícula. Disponible en <http://www.iesmat.com/iesmat/upload/file/Malvern/Productos-MAL/DIF-Fundamentos%20tam.%20de%20particula.pdf> [consultat el 04/02/2016].

Instituto Químico de Sarrià. Análisis instrumental: cualificación de equipos, validación de métodos de análisis. Febrero, 2000.

International Council on Harmonisation (2018a). Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). Disponible en [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf) [consultat el 26/01/2018].

International Council on Harmonisation (2018b). Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances Q6A. Disponible en [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf) [consultat el 26/01/2018].

International Council on Harmonisation (2018c). Validation of analytical methods: definition and terminology. ICH topic Q2A. Disponible en <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html> [consultat el 18/04/2018].

International Council on Harmonisation (2018d). Note for guidance on validation of analytical procedures: methodology. ICH topic Q2B. Disponible en

<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073384.pdf> [consultat el 18/04/2018].

## **K**

Kishore N, Unnikrishnan D, Govindaraj R, Devendiran R, Celladurai K, Pully Neelakanta R, Asit Baran M. Effect of Formulation Variables on Rifampicin Loaded Alginate Beads. *Iran Journal Pharmaceutical Research*, 2012; 11(3): 715–721.

Koch A, Cox H, Mizrahi V. Drug resistant tuberculosis: challenges and opportunities for diagnosis and treatment. *Current Opinion in Pharmacology*, 2018; 42:7-15.

## **L**

Lorenzo P, Moreno A, Lizascain I, Leza J.C, Moro M.A, Portoles A. *Farmacología básica y clínica*. 18ª edición. Médica Panamericana. Madrid, 2008.

## **M**

Martindale, guía completa de consulta farmacoterapéutica, 1ª edición. Editorial Pharma editores. Barcelona, 2003.

Mariappan T, Singh B, Singh S. Validated reverse-phase (C<sub>18</sub>) HPLC method for simultaneous determination of rifampicina, isoniazid and pyrazinamide in USP dissolution medium and simulated gastric fluid. *Pharmaceutical Pharmacology Community*, 2000; 6: 345-349.

Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (2014). Medicines: information about specific products. Disponible en <http://www.mhra.gov.uk/Safetyinformation/%20Medicinesinformation/SPCandPILs/index.htm> [consultat el 19/11/2014].

Mellado Peña MJ, Santiago García B, Baquero Artigao F, Moreno Pérez D, Piñeiro Pérez R, Méndez Echevarría A, Tomás Ramos J, Gómez Duran D, Antoni Noguera



J. Actualización del tratamiento de la tuberculosis en niños. *Anales de pediatría*, 2018; 88(1):52.e1-52.e12.

Miñarro M, Tico JR. Análisis y control de formas farmacéuticas de dosificación líquidas orales.. En Salazar Macián R. Análisis y control de medicamentos. Ed. Romargraf, S.A. Barcelona, 2005: 591-634.

Miotto P, Cabibbe A, Feuerriegel S, Casali N, Drobnieswski F, Rodionova Y, Bakonyte D, Stakenas P, Pimkina E. *Mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamide Resistance determinants: a Multicenter Study. *American society for micorbiology* 2014; 5 (5): 819-829.

Moffat A, Osselton D, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3<sup>rd</sup> Edition. Pharmaceutical Press. London, 2004.

Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica, 7<sup>a</sup> edición. Editorial Elsevier España S.L. Barcelona, 2014.

## N

Naciones Unidas (2014a). Sesión especial a favor de la infancia. Disponible en <http://www.unicef.org/spanish/specialsession/press/globalchild>. [consultat el 22/10/2014].

Naciones Unidas (2014b). Informe de los objetivos de desarrollo del milenio de 2015. Disponible en <http://www.un.org/es/millenniumgoals/bkgd.shtml>. [consultat el 03/11/2014].

Nagarajan S, Whitaker P. Management of adverse reactions to first-line tuberculosis antibiotics. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2018; 4: 333-341.

Niemi M, Backman J, Fromm M, Neuvonen P, Kivisto K. Pharmacokinetic Interactions with Rifampicin, clinical relevance. *Clin Pharmacokinet*, 2003; 42 (9): 819-850.

## O

Organización Mundial de la Salud (2014a). Tuberculosis: datos y cifras. Centro de prensa de l'OMS. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/> [consultat el 03/11/2014].

Organización Mundial de la Salud (2014b). Fixed-dose combinations for tuberculosis: lessons learned from a clinical, formulation and regulatory perspective. Background documents compiled by WHO. Disponible en [http://www.who.int/publications/2003/a86263\\_part1.pdf](http://www.who.int/publications/2003/a86263_part1.pdf) [consultat el 17/11/2014].

Osterberg L, Terrence Blaschke M.D. Adherence to Medication. *The New England Journal of Medicine*, 2005; 353: 487-497.

## P

Pavia D, Lampman G, Kriz G, Vyvyan J. Introduction to spectroscopy. 4<sup>th</sup> edition. Cengage learning. Washington, 2008.

Pérez Cuadrado JA, Pujol Forn M. Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Marzo 2001.

Pérez Lozano P, Suñé Negre JM, Miñarro M, Roig M, Fuster R, García Montoya E, Hernández C, Ruhí R, Ticó JR. A new expert system (SeDeM Diagram) for control batch powder formulation and preformulation drug products. *Eur J Pharm & Biopharm*, 2006; 64: 351-359.

Pinheiro M, Silva A.S, Pisco S, Reis S. Interactions of isoniazid with the membrane models: implications for drug mechanism of action. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2014; 163:184-190.

Piñeiro Pérez R, Ruiz Antorán M.B, Avendano Solá C, Román Riechmann E, Cabrera García L, Cilleruelo Ortega MJ y Mellado Pena MJ. Conocimiento sobre el uso de fármacos off-label en Pediatría. Resultados de una encuesta pediátrica nacional 2012-2013. *Anales de pediatría*, 2013; 81(1): 16-21.

Piñeiro Pérez R, Santiago García B, Rodríguez Marrodán B, Baquero Artigao F, Fernández Llamazares C, López Ramos MG, Vinent Genestant J, Gómez Pastrana D, Mellado Peña MJ. Recomendaciones para la elaboración y administración de fármacos antituberculosos en niños. Segunda fase del Proyecto Magistral de la Red Española de Estudio de la Tuberculosis Pediátrica (pTBred). *Anales de Pediatría*, 2016; 85(6): 281-330.

Prats G. Microbiología y parasitología médicas. Editorial médica panamericana. Madrid, 2012.

Pugh J. Cinética y estabilidad del producto. En Aulton ME. Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Elsevier España SA. Madrid, 2004: 101-113.

## **R**

Rabi I, Zacharias J.R, Millman S, Kusch P. A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment. *Physical Review*, 1998; 53(4): 318–327.

Rang H.P, Dale M.M, Ritter J.M, Flower R.J. Farmacología, 8ª edición. Elsevier España S.L. Barcelona, 2016: 675-676.

Roig Carreras M, Tubau Arino P, Julve Rubio J. 16 Octubre 2004. Laboratorios Salvat S.A. *Composición farmacéutica líquida para administración oral de sustancias activas amargas susceptibles de hidrólisis*. Patent ES 2 215 665 T3, A61K 47/44, 2 215 665.

Rubio Fernández M.A. Los aditivos edulcorantes. *Revista Química e Industria*, 1993: 451-458.

## **S**

Salazar Macián R, Suñé Negre JM<sup>a</sup>. Exigencias de las autoridades sanitarias en el control de la estabilidad de medicamentos: Normas internacionales (ICH: International Conference Harmonisation). Bibliografía. En Salazar Macián R. Estabilidad de medicamentos. Edita A.E.F.I. (sección catalana). Barcelona, 1998: 211-229.

Salazar Macián R, Suñé Negre JM<sup>a</sup>. Exigencias de las autoridades sanitarias en el control de la estabilidad de medicamentos: normas internacionales. En Salazar Macián R. Gestión de la calidad en el desarrollo y fabricación industrial de medicamentos. Ed. Romargraf, S.A. Barcelona, 2001a: 463-523.

Salazar Macián R, Suñé Negre JM<sup>a</sup>. Inestabilidad física de medicamentos. En Salazar Macián R. Gestión de la calidad en el desarrollo y fabricación industrial de medicamentos. Ed. Romargraf, S.A. Barcelona, 2001b: 371-381.

Sanchez oliveira R, Barata Coelho P. Estudios de estabilidad. En Lozano MC, Córdoba D, Córdoba M. Manual de Tecnología Farmaceutica. Elsevier Española SL. Barcelona, 2012: 235-245.

Saranjit S, Mariappan R, Sankar R, Sarda N, Singh B. A critical review of the probable reasons for the poor/variable bioavailability of rifampicin from anti-tubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001; 238: 5-17.

Seifart HL, Parkin DP, Donald PR. Stability of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in suspensions used for treatment of tuberculosis in children. *The pediatric infections disease Journal*, 1991; 10 (11): 795-880.

Sellés Flores E. Estabilidad del medicamento. En Faulí trillo C. Tratado de Farmacia Galénica. Ed Luzan 5 SA. Madrid, 1993: 59-76.

Sharma S, Sharma AD, Arif Naseer MD, Singh R. Formulation and evaluation of selfemulsifying drug delivery system of ibuprofen using castor oil. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2011; 3 (4): 299-302.

Shisho C.J, Shah S.A, Rathod I.S, Savale S.S. Impaired bioavailability of rifampicin in presence of isoniazid from fixed dose combination (FDC) formulation. *M.J. International Journal of Pharmaceutics*, 2001; 228 (1-2): 53-67.

Sosa M, Széliga ME, Fernández A, Bregni C. Rifampicin and bioavailability in combination formulation. *Ars Pharmaceutica*, 2005; 46 (4): 353-364.

Suñe Negre JM<sup>a</sup>, Roig Carreras M, Fuster García R, Hernández Pérez C, Ruhí Roura R, García Montoya E, Miñarro Carmona M, Pérez Lozano P, Tico Grau JR. Nueva metodología de preformulación galénica para la caracterización de sustancias en relación para su viabilidad para la compresión. Diagrama SeDeM. *Cienc Tecnol Pharm*, 2005; 15 (3): 125-136.

Suñe Negre JM<sup>a</sup>, Pérez Lozano P, Roig Carreras M, Fuster García R, Hernández Pérez C, Ruhí Roura R, García Montoya E, Miñarro Carmona M, Tico Grau JR. Optimization of parameters of SeDeM Diagram Expert System: Hausner index (HI) and relative humidity (%RH). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011; 79: 464-472.

## T

Torres Suárez A.I, Gil Alegre M.E. Globalización de los requisitos para la comercialización de medicamentos: importancia de la humedad ambiental en el diseño de los estudios de estabilidad. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 2005, 71: 111-126.

Tung-Yuan S, Chien-Yi P, Ping Y, Wen-Liang C, Ning-Chi W, Yoa-Pu O. A Novel Mechanism Underlies the Hepatotoxicity of Pyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 2013; 57 (4): 1685-1690.

## U

United States Pharmacopeia 39-National Formulary 34 (2015). (Reagents, indications and solutions). Disponible en <https://www.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=39&nf=34&s=0&officialOn=May1,2016>. [consultat el 27/10/2015].

United States Pharmacopeia 39-National Formulary 34 (2016). (8002-43-5). Disponible en <https://www.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=39&nf=34&s=0&officialOn=August1,2016>. [consultat el 09/09/2016].

United States Pharmacopeia 40-National Formulary 35 (2018). First suplement. General information. <1225> Validation of compendial procedures. Disponible en

[https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCsPdfs/c1225\\_1SUSP40.pdf](https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCsPdfs/c1225_1SUSP40.pdf). [consultat el 09/02/2018].

## **V**

Valls O, Del Castillo B. Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. 4ª edición. Editorial Piros. Barcelona, 1998.

## **W**

Wissing S, Craig D.Q, Baker S.A, Moore W.D. An investigation into the use of stepwise isothermal high sensitivity DSC as a means of detecting drug-excipient. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000; 199: 141-150.

Woods D. John. Formulation in Pharmacy Practice, 2<sup>nd</sup> edition. Editorial HealthCare. Otago, 1993.

## **Z**

Zuccotti G, Clementi E, Molteni M, Rocchi F, Tomasi P. The development of medicines for children. *Pharmacological Research*, 2011; 64:169-175.



## ANNEX I







MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, ENERGIA  
Y TURISMO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

### Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	300276892	
Application number	EP18382385.5	
File No. to be used for priority declarations	EP18382385	
Date of receipt	04 June 2018	
Your reference	UBTT0306	
Applicant	UNIVERSITAT DE BARCELONA	
Country	ES	
Title	SUSPENSION FORMULATION FOR THE TREATMENT OF TUBERCULOSIS	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml OLF-ARCHIVE.zip\UBTT0306 specification.zip SPECEPO-1.pdfUBTT0306 specification.pdf (9 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECTRANONEP.pdfUBTT0306 resumen.pdf (1 p.) f1002-1.pdf (1 p.)
Submitted by	CN=Pascual-Marcos Segura Camara 45901	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	04 June 2018, 09:48:04 (CEST)	
Official Digest of Submission	77:A2:40:4F:12:37:71:67:28:86:1A:60:12:1C:A1:F1:2E:D5:25:04	

/Madrid, Oficina Receptora/



## ANNEX II



# Application of SeDeM Diagram System for the characterization of isoniazid in relation to its direct compression viability.

Mercadé-Frutos D<sup>1</sup>, Suñé-Pou M<sup>1</sup>, Nardi-Ricart A<sup>1</sup>, Nofrerias-Rojg I<sup>1</sup>, Garcia-Montoya E<sup>1,2</sup>, Pérez-Lozano P<sup>1,2</sup>, Miñarro-Carmona M<sup>1,2</sup>, Tico-Grau JR<sup>1,2</sup>, Suñé-Negre JM<sup>1,2</sup>

1. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Físico-química, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. Avda. Joan XXIII 27-31. dmercafr@alumnes.ub.edu.telf: 934024546 (meu despatx)
2. Grupo de investigación "Farmacoterapia, Farmacogenética y Tecnología Farmacéutica" del IDIBELL de la Universidad de Barcelona.

## INTRODUCTION

Isoniazid is characterized through SeDeM Diagram System as a preformulation study in order to define the capacity of the molecule for obtaining direct compression tablets. This new method allows the characterization of solid substances, be it active ingredients or excipients, in relation to its direct compression viability (1-5).

Through the application of the different characterization parameters of the SeDeM Diagram System an isoniazid specific profile is obtained. This profile will offer an orientation to the capacity of the substance to be compressed by direct compression.

Additionally, this useful method also let us to correct the different characteristics that are unsuitable for the direct compression, facilitating the obtainment of the final product.

## MATERIAL AND METHODS

### Material

A sample of isoniazid crystalline powders manufactured by Acrôs Organics (USA) are used (batch number: A0351069) (6).

### Methods

The SeDeM Diagram system uses 12 parameters in order to define the direct compression viability of a substance.

The 12 parameters are represented in a diagram. This tool allows determining the properties of the sample in a quick and visual way, since the figure obtained in the diagram shows the characteristics of the powder and of every parameter studied. Moreover, this method let it define numerically the acceptability of the substance for direct compression through the calculation of the Parametric Index (IP), the Parametric Profile (PP) and the Good Compression Index (IGC).

## RESULTS AND DISCUSSION

The 12 parameters proposed by the SeDeM methodology were applied to isoniazid. The experimental values are shown in Table 1. This method allows transforming the values obtained to numeric values corresponding to the radii of the diagram (r).

INCIDENCE	PARAMETER	acronym	units	experimental values (v)	(r)	incidence mean
Dimension	Bulk density	Db	g/ml	0.501	5.01	5.88
	Tapped density	Dt	g/ml	0.774	7.74	
Compressibility	Inter-particle Porosity	ip	-	0.372	3.10	2.77
	Carr Index	IC	%	22.351	4.47	
	Cohesion Index	icn	N	14.600	0.73	
Flowability / Powder flow	Hausner Index	Hh	-	1.288	8.56	4.44
	Angle of repose	( $\alpha$ )	°	26.138	4.77	
	Powder flow	f	seg	NA	0.00	
Lubricity / Stability	Loss on drying	%RH	%	0.489	9.51	9.76
	Higroscopicity	%H	%	0.000	10.00	
Lubricity / Dosage	Particles (<50 $\mu$ )	% Pf	$\mu$	12.040	7.59	5.10
	Homogeneity Index	(H)		0.0052	2.60	

Table 1. Results obtained from the characterization of isoniazid by SeDeM Diagram System.

The radii values (r) are represented on the diagram showed in Figure 1. This system allows carrying out the analysis of the obtained results in a quick and visual way.

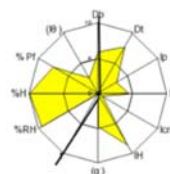


Figure 1. Isoniazid SeDeM Diagram.

The index acceptance results are shown in Table 2.

PARAMETRIC INDEX	0.50
PARAMETRIC PROFILE (mean of the radius)	5.42
GOOD COMPRESSION INDEX (GCI)	5.16

Table 2. Isoniazid index acceptance results.

Considering the results obtained, the PP and the IGC for isoniazid are above 5, which indicates that the substance has enough attributes for direct compression. However, it should be noted that the analysis of individual factors allows determining more precisely the degree of acceptability isoniazid has to direct compression. In the case of this substance, the parameters involved in the general factor of incidence called compressibility, show values below 5 (average =2,77), which means the powder presents inadequate compression properties, as seen in an elevated Carr Index and in low sponginess and cohesiveness indexes.

Besides, the parameter involved in the general factor of incidence called flowability/powder flow terms also present values below 5 (average= 4,44), which means it has poor rheological properties, specially reflected in the impossibility of performing the powder flow test (the sample does not flow).

These facts are graphically reflected through the SeDeM diagram, where the mentioned parameters can be observed with a very low shaded area. This profile shows the deficient characteristics of isoniazid in these specific parameters. In spite of this, the Parametric Profile (PP) and the Good Compression Index (IGC) have values above 5, which demonstrate the possibility of the substance to be compressed by direct compression. It will be necessary to add some DC diluents and lubricants in order to improve the flow and compression properties of isoniazid.

#### CONCLUSIONS

1. The SeDeM Diagram System shows that isoniazid is a powder suitable for direct compression.
2. The formulation to compress isoniazid by direct compression has to include diluent and lubricating excipients in order to improve the flow and the compression properties of the isoniazid.

#### REFERENCES

6. Acrôs Organics, Isonicotinic acid hydrazide. [http://www.acros.com/DesktopModules/Acros\\_Search\\_Results/Acros\\_Search\\_Results.aspx?search\\_type=CoA&Lotnr=A0351069&Prdnr](http://www.acros.com/DesktopModules/Acros_Search_Results/Acros_Search_Results.aspx?search_type=CoA&Lotnr=A0351069&Prdnr) [consultedl 11/04/2016].
1. Aguilar Díaz JE, García Montoya E, Pérez Lozano P, Sarrate R, Fábregas A, Carrillo C, Miñarro M, Ticó JR. SeDeM expert system a new innovator tool to develop pharmaceutical forms. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, 40 (2): 222-236.
2. Pérez Lozano P, Suñé Negre JM, Miñarro M, Roig M, Fuster R, García Montoya E, Hernández C, Ruhí R, Ticó JR. A new expert system (SeDeM Diagram) for control batch powder formulation and preformulation drug products. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2006, 64: 351-359.
3. Saurí J, Millán D, Suñé Negre JM, Pérez Lozano P, Sarrate R, Fábregas A, Carrillo C, Miñarro M, Ticó JR, García Montoya E. The use of the SeDeM diagram expert system for the formulation of Captopril SR matrix tablets by direct compression. *Int J Pharm*, 2014, 461 (1-2): 38-45.
4. Suñé Negre JM, Pérez Lozano P, Miñarro M, Roig M, Fuster R, Hernández C, Ruhí R, García Montoya E, Ticó JR. Application of the SeDeM diagram and a new mathematical equation in the design of direct compression tablet formulation. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2008, 69: 1029-1039.
5. Suñé Negre JM<sup>a</sup>, Pérez Lozano P, Roig Carreras M, Fuster García R, Hernández Pérez C, Ruhí Roura R, García Montoya E, Miñarro Carmona M, Tico Grau JR. Optimization of parameters of SeDeM Diagram Expert System: Hausner index (HI) and relative humidity (%RH). *Eur J Pharm and Biopharm*, 2011; 79:464-472.





# Certificate

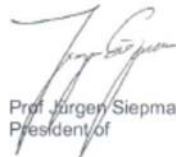
**Debora Mercade Frutos**  
08028 Barcelona  
Spain

participated in the


**2<sup>nd</sup> European Conference on Pharmaceutics**  
Novel dosage forms & innovative technologies

Krakow, Poland, 3 to 4 April 2017

**The Chairs of the Conference**



Prof Jürgen Siepmann  
President of  
APGI



Prof Jörg Breitzkreutz  
President of  
APV



Prof Anna Maria Fadda  
President of  
A.D.R.I.T.E.L.F.







## ANNEX III



## *Certificat de participació*

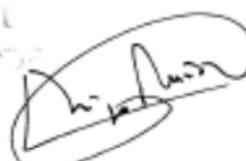
**Debora Mercadé**

Ha presentat la conferència: ***Nova preparació pediàtrica per al tractament de la tuberculosi.*** a la **IX Jornada de Recerca** a la Facultat de Farmàcia del dia 13 de juny de 2016.



Pepita Badia  
Vicedegana de Postgrau

Universitat  
de Barcelona



Diego Muñoz-Torrero  
Vicedegà de Recerca

Barcelona, 13 de juny de 2016

---

**IX Jornada de Recerca a la Facultat de Farmàcia**  
**Universitat de Barcelona**

Av. Joan XXIII, 27-31. 08028-Barcelona  
Telèfon: 93 402 18 81



## ANNEX IV



## INFORMACIÓ PREVIA

A continuació rebrà 3 mostres diferents d'una suspensió destinada a la població pediàtrica.

Esbandeixi la boca amb aigua abans de començar el tast i cada cop que canviï de mostra.

Per poder realitzar una correcta avaluació del gust, prengui tota la quantitat de mostra administrada.

Per evitar possibles alteracions en els resultats, no parli ni comenti durant l'avaluació.

Si necessita aclariment sobre el funcionament del tast, no dubti en preguntar.



REFERÈNCIA: **015-API-01**

## 1. Olor

Olori la mostra subministrada.

1.1 L'olor percebuda:

No m'agrada gens    No m'agrada gaire    M'agrada    M'agrada molt

1.2 Amb quina de les següents olors identifica la de la mostra:

Menta    Xocolata    Maduixa    Plàtan  
 Coco    Cirera    Neutre

1.3 Comentaris

## 2. Gust

Prengui tota la quantitat de mostra subministrada.

2.1 El gust percebut en el moment de tastar la mostra:

No m'agrada gens    No m'agrada gaire    M'agrada    M'agrada molt

2.2 Quin dels següents adjectius descriu millor el gust de la mostra? (Pot marcar més d'una opció)

Àcid    Amarg    Suau    Intens    Dolç    Insípid

2.3 Un cop empassada la mostra, nota algun gust residual?

Sí    No

2.4 En cas afirmatiu, el pot descriure com:

No m'agrada gens    No m'agrada gaire    M'agrada    M'agrada molt

2.5 Amb quin dels següents gustos identifica el de la mostra

Menta    Xocolata    Maduixa    Plàtan  
 Coco    Cirera    Neutre

2.6 Comentaris

3. Quina puntuació designaria a la fórmula objecte d'estudi?

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10

REFERÈNCIA: **015-API-02**

## 1. Olor

Olori la mostra subministrada.

1.1 L'olor percebuda:

No m'agrada gens     No m'agrada gaire     M'agrada     M'agrada molt

1.2 Amb quina de les següents olors identifica la de la mostra:

Menta                       Xocolata                       Maduixa                       Plàtan  
 Coco                               Cirera                               Neutre

1.3 Comentaris

## 2. Gust

Prengui tota la quantitat de mostra subministrada.

2.1 El gust percebut en el moment de tastar la mostra:

No m'agrada gens     No m'agrada gaire     M'agrada     M'agrada molt

2.2 Quin dels següents adjectius descriu millor el gust de la mostra? (Pot marcar més d'una opció)

Àcid                       Amarg                       Suau                       Intens                       Dolç                       Insípid

2.3 Un cop empassada la mostra, nota algun gust residual?

Sí                       No

2.4 En cas afirmatiu, el pot descriure com:

No m'agrada gens     No m'agrada gaire     M'agrada     M'agrada molt

2.5 Amb quin dels següents gustos identifica el de la mostra

Menta                       Xocolata                       Maduixa                       Plàtan  
 Coco                               Cirera                               Neutre

2.6 Comentaris

3. Quina puntuació designaria a la fórmula objecte d'estudi?

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10

REFERÈNCIA: **015-API-03**

## 1. Olor

Olori la mostra subministrada.

1.1 L'olor percebuda:

No m'agrada gens    No m'agrada gaire    M'agrada    M'agrada molt

1.2 Amb quina de les següents olors identifica la de la mostra:

Menta    Xocolata    Maduixa    Plàtan  
 Coco    Cirera    Neutre

1.3 Comentaris

## 2. Gust

Prengui tota la quantitat de mostra subministrada.

2.1 El gust percebut en el moment de tastar la mostra:

No m'agrada gens    No m'agrada gaire    M'agrada    M'agrada molt

2.2 Quin dels següents adjectius descriu millor el gust de la mostra? (Pot marcar més d'una opció)

Àcid    Amarg    Suau    Intens    Dolç    Insípid

2.3 Un cop empassada la mostra, nota algun gust residual?

Sí    No

2.4 En cas afirmatiu, el pot descriure com:

No m'agrada gens    No m'agrada gaire    M'agrada    M'agrada molt

2.5 Amb quin dels següents gustos identifica el de la mostra

Menta    Xocolata    Maduixa    Plàtan  
 Coco    Cirera    Neutre

2.6 Comentaris

3. Quina puntuació designaria a la fórmula objecte d'estudi?

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10

## INFORMACIÓ PREVIA

A continuació rebrà 3 mostres diferents d'una suspensió destinada a la població pediàtrica.

Esbandeixi la boca amb aigua abans de començar el tast i cada cop que canviï de mostra.

Per poder realitzar una correcta avaluació del gust, prengui tota la quantitat de mostra administrada.

Per evitar possibles alteracions en els resultats, no parli ni comenti durant l'avaluació.

Si necessita aclariment sobre el funcionament del tast, no dubti en preguntar.

REFERÈNCIA: **015-API-01****1. Olor**

Olori la mostra subministrada.

1.1 L'olor percebuda:

- No m'agrada gens     No m'agrada gaire     M'agrada     M'agrada molt  
**0**                                    **3**                                    **6**                                    **9**

1.2 Amb quina de les següents olors identifica la de la mostra: **(10 – valor)**

- Menta                                     Xocolata                                     Maduixa                                     Plàtan  
**1**                                    **0**                                    **3**                                    **3**
- Coco                                     Cirera                                     Neutre  
**3**                                    **3**                                    **3**

1.3 Comentaris

**2. Gust**

Prengui tota la quantitat de mostra subministrada.

2.1 El gust percebut en el moment de tastar la mostra:

- No m'agrada gens     No m'agrada gaire     M'agrada     M'agrada molt  
**0**                                    **3**                                    **6**                                    **9**

2.2 Quin dels següents adjectius descriu millor el gust de la mostra? (Pot marcar més d'una opció) **si marca més d'una opció: (valor 1+ valor 2)/2**

- Àcid                                     Amarg                                     Suau                                     Intens                                     Dolç                                     Insípid  
**0**                                    **0**                                    **9**                                    **0**                                    **9**                                    **5**

2.3 Un cop empassada la mostra, nota algun gust residual?

- Sí                                     No  
**9**

2.4 En cas afirmatiu, el pot descriure com:

- No m'agrada gens     No m'agrada gaire     M'agrada     M'agrada molt  
**0**                                    **3**                                    **6**                                    **9**



2.5 Amb quin dels següents gustos identifica el de la mostra (10 – valor)

<input type="checkbox"/> Menta	<input type="checkbox"/> Xocolata	<input type="checkbox"/> Maduixa	<input type="checkbox"/> Plàtan
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<input type="checkbox"/> Coco	<input type="checkbox"/> Cirera	<input type="checkbox"/> Neutre	
<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	

2.6 Comentaris

3. Quina puntuació designaria a la fórmula objecte d'estudi?

1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 9 – 10

REFERÈNCIA: 015-API-02

1. Olor

Olori la mostra subministrada.

1.1 L'olor percebuda:

No m'agrada gens     No m'agrada gaire     M'agrada     M'agrada molt  
**0**                            **3**                            **6**                            **9**

1.2 Amb quina de les següents olors identifica la de la mostra: **(10 – valor)**

Menta                     Xocolata                     Maduixa                     Plàtan  
**1**                            **3**                            **0**                            **3**

Coco                     Cirera                     Neutre  
**3**                            **3**                            **3**

1.3 Comentaris

2. Gust

Prengui tota la quantitat de mostra subministrada.

2.1 El gust percebut en el moment de tastar la mostra:

No m'agrada gens     No m'agrada gaire     M'agrada     M'agrada molt  
**0**                            **3**                            **6**                            **9**

2.2 Quin dels següents adjectius descriu millor el gust de la mostra? (Pot marcar més d'una opció) **si marca més d'una opció: (valor 1+ valor 2)/2**

Àcid                     Amarg                     Suau                     Intens                     Dolç                     Insípid  
**0**                            **0**                            **9**                            **0**                            **9**                            **5**

2.3 Un cop empassada la mostra, nota algun gust residual?

Sí                     No  
**9**

2.4 En cas afirmatiu, el pot descriure com:

No m'agrada gens     No m'agrada gaire     M'agrada     M'agrada molt  
**0**                            **3**                            **6**                            **9**

2.5 Amb quin dels següents gustos identifica el de la mostra (10 – valor)

<input type="checkbox"/> Menta	<input type="checkbox"/> Xocolata	<input type="checkbox"/> Maduixa	<input type="checkbox"/> Plàtan
<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
<input type="checkbox"/> Coco	<input type="checkbox"/> Cirera	<input type="checkbox"/> Neutre	
<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	

2.6 Comentaris

3. Quina puntuació designaria a la fórmula objecte d'estudi?

1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 9 – 10

REFERÈNCIA: **015-API-03****1. Olor**

Olori la mostra subministrada.

1.1 L'olor percebuda:

No m'agrada gens     No m'agrada gaire     M'agrada     M'agrada molt  
**0**                                    **3**                                    **6**                                    **9**

1.2 Amb quina de les següents olors identifica la de la mostra: **(10 – valor)**

Menta                                     Xocolata                                     Maduixa                                     Plàtan  
**1**                                    **3**                                    **3**                                    **3**

Coco                                     Cirera                                     Neutre  
**0**                                    **3**                                    **3**

1.3 Comentaris

**2. Gust**

Prengui tota la quantitat de mostra subministrada.

2.1 El gust percebut en el moment de tastar la mostra:

No m'agrada gens     No m'agrada gaire     M'agrada     M'agrada molt  
**0**                                    **3**                                    **6**                                    **9**

2.2 Quin dels següents adjectius descriu millor el gust de la mostra? (Pot marcar més d'una opció) **si marca més d'una opció: (valor 1+ valor 2)/2**

Àcid                                     Amarg                                     Suau                                     Intens                                     Dolç                                     Insípid  
**0**                                    **0**                                    **9**                                    **0**                                    **9**                                    **5**

2.3 Un cop empassada la mostra, nota algun gust residual?

Sí                                     No  
**9**

2.4 En cas afirmatiu, el pot descriure com:

No m'agrada gens     No m'agrada gaire     M'agrada     M'agrada molt  
**0**                                    **3**                                    **6**                                    **9**

2.5 Amb quin dels següents gustos identifica el de la mostra (10 – valor)

<input type="checkbox"/> Menta	<input type="checkbox"/> Xocolata	<input type="checkbox"/> Maduixa	<input type="checkbox"/> Plàtan
<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<input type="checkbox"/> Coco	<input type="checkbox"/> Cirera	<input type="checkbox"/> Neutre	
<b>0</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	

2.6 Comentarís

3. Quina puntuació designaria a la fórmula objecte d'estudi?

1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 9 – 10

## ANNEX V



**Análisis de la contaminación microbiológica.**

**Proyecto:** Tesis DME, 2 lotes de producto lipídico de administración oral no acuosa (jarabe de RIP) a dos temperaturas diferentes y en fases inicial/final, proporcionados por el Servicio de Desarrollo del Medicamento de la Facultad de Farmacia (UB).

Se toma como referencia: Normas Microbiológicas recomendadas en la Farmacopea Europea 9.4

Fechas de la recogida y procesado de las muestras:

- 21 de febrero de 2018. LOTES iniciales (i): EE001A (3 °-5 °C) + EE001B (25 °C)
- 23 de febrero de 2018. LOTE final (f): EE001B (25 °C)
- 28 de febrero de 2018. LOTES iniciales (i): EE002A (3 °-5 °C) + EE002B (25 °C)
- 2 de marzo de 2018. LOTE final (f): EE002B (25 °C)
- 19 de marzo de 2018. LOTES final (f): EE001A (3 °-5 °C) + EE002A (3 °-5 °C)

**RESULTADOS:**

Lote:	Temperatura	Recuento de microorganismos aerobios viables		Investigación de <i>Escherichia coli</i>
		TAMC totales	TYMC hongos	
Lote EE001A (i)	3-5 °C	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausencia/g
Lote EE001A (f)	3-5 °C	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausencia/g
Lote EE001B (i)	25 °C	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausencia/g
Lote EE001B (f)	25 °C	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausencia/g
Lote EE002A (i)	3-5 °C	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausencia/g
Lote EE002A (f)	3-5 °C	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausencia/g
Lote EE002B (i)	25 °C	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausencia/g
Lote EE002B (f)	25 °C	0 ufc/g	0 ufc/g	Ausencia/g
<b>CRITERIOS DE ACEPTACIÓN</b>		<b>10<sup>3</sup> ufc/g</b>	<b>10<sup>2</sup> ufc/g</b>	<b>Ausencia/g</b>

**CONCLUSIONES:**

Cumple los criterios de aceptación.

Estudio realizado por M. J. Martínez



3 de abril de 2018