

Artículo

# Validación de un método analítico por HPLC para la determinación del filtro UV Octocrileno presente en protectores solares.

Laura Raigoza<sup>2</sup>, Isabela Arteaga<sup>2</sup>, Lucía Ramírez<sup>2,\*</sup>, Juan Carlos Valencia<sup>2</sup> y Christian Alexis Gómez Suarez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de la Ciencia y la Investigación Farmacéutica (CECIF), Sabaneta, Antioquia, Colombia; laboratoriocif@ces.edu.co

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES, Medellín, Antioquia, Colombia; drojas@ces.edu.co

\* Correspondence: LR. raigoza.laura@uces.edu.co o IA. arteaga.isabela@uces.edu.co o LR. ramirez.lucia@uces.edu.co

**Resumen:** Un filtro Solar UV es un compuesto químico que refleja o dispersa la luz y la radiación solar; gracias sus componentes activos llamados filtros UV; para el propósito del presente estudio se enfocó en el filtro Octocrileno, donde el objetivo planteado es demostrar la validez de un método analítico para la cuantificación de Octocrileno mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), donde se busca responder la pregunta problema ¿Es validable un método para la cuantificación de Octocrileno en protectores solares?; el método utilizado para la validación incluye criterios como especificidad-selectividad, linealidad, repetibilidad del sistema instrumental, precisión intermedia, repetibilidad del método, límite de detección y cuantificación, se demuestra que cumple con los criterios de aceptación, y se encuentra que el límite de detección fue de 0,04 mg/ L y el de cuantificación fue 0,13 mg/ L, donde se concluye que el método validado a partir de una materia prima es apto y valido para la evaluación de la molécula objetivo.

**Citation:** Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Cosmetics* 2021, 8, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

**Palabras claves:** Octocrileno, Validación, HPLC

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date  
Accepted: date  
Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introducción

Hoy en día es bien conocido que la radiación solar sobre la piel provoca envejecimiento precoz y cáncer, debido a que la luz solar produce daño cutáneo, al ser la radiación ultravioleta (RUV) absorbida por el ADN, el ARN, las proteínas, los lípidos de membranas y las organelas celulares presentes en la epidermis y la dermis, incluyendo el sistema vascular. Los efectos provocados son además acumulativos y están en relación a la duración, frecuencia e intensidad de la radiación directamente (1). Por lo que el uso de protectores solares contra las radiaciones UVB (290-320 nm) y UVA (320-400 nm) son adecuados, necesarios y cada vez más usados, donde se ha visto un crecimiento anual positivo de 8,19% entre los periodos 2013 a 2018 y se esperan más ventas en los próximos años (2). Este creciente aumento ha llevado a la industria cosmética a desarrollar formulaciones con filtros solares los cuales protegen la piel del daño por los rayos UV y limiten su penetración en la piel (3). Los filtros solares usados en protectores solares comercializados en Colombia, se basan en los listados aprobados de la FDA y la de Cosmetics Europe, no obstante, hay evidencias en estudios previos de que algunos de estos ingredientes activos de protección solar pueden ser absorbidos a través de la piel y alcanzar un nivel sistémico en el cuerpo humano (4), entre estos está el Octocrileno, el cual puede absorber los rayos UVB y una parte de los rayos UVAIL, siendo este muy común en las formulaciones de protectores solares actualmente. Al ser evidenciando este potencial

riesgo se pretende demostrar la validez de un método analítico para la cuantificación de Octocrileno mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que sirva como herramienta analítica para la cuantificación en pruebas de perfusión transcutánea; el proceso inicia con la evaluación de la materia prima Octocrileno fabricada por Merck y estableciendo un protocolo de validación que sea satisfactorio con los criterios de aptitud del sistema, linealidad, repetibilidad instrumental, repetibilidad del método, precisión intermedia y especificidad. Por lo que puede servir para realizar la identificación de la molécula Octocrileno sobre los demás ingredientes de los protectores solares y futuros estudios que logren evidencias de que el Octocrileno puede incluso llegar a nivel sistémico.

## 2. Objetivo

Demostrar la validez de un método analítico para la cuantificación de Octocrileno mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

## 3. Pregunta problema

¿Es validable un método para la cuantificación de Octocrileno en protectores solares?

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Sustancias químicas y Reactivos

Todas las sustancias químicas son de grado analítico Metanol, Ácido Acético, Agua tipo I, Ácido Clorhídrico, Hidróxido de Sodio y Peróxido de Hidrogeno al 30%; todos los reactivos y disolventes fueron proporcionados por el Centro de la Ciencia y la Investigación Farmacéutica (CECIF), Sabaneta, Colombia.

### 4.2 Materia Prima y de Referencia

El material Eusolex® OCR tanto para materia prima (CAS 1053770000) con una pureza del 97,6%, como para la referencia (CAS 1053779201) con una pureza del 98% fueron comprados a Merck S.L.U. Mollet del Vallés (Barcelona).

### 4.3. Condiciones Cromatográficas

El equipo de cromatografía líquida acoplado a un detector UV 293nm y una columna C18 de 4,6 mm x 150 mm, tamaño de partícula 5µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,5 mL por minuto. La preparación de la aptitud del sistema fue un volumen de inyección de 15µL, una temperatura de 50°C y un tiempo de corrida de 12 minutos.

#### 4.3.1 Preparación soluciones

##### 4.3.1.1. Fase Móvil

Se prepara una solución buffer de Ácido Acético al 4,0 % V/V. Para ello, se toman 40 mL de Ácido Acético grado reactivo y se lleva a volumen en un balón volumétrico de 1 L con Agua tipo I. Se Filtra toda la solución buffer a través de un filtro de 0,45 micras. La fase móvil consta de una proporción de Metanol: Solución buffer (67:33).

##### 4.3.1.2. Solución Diluyente

Una proporción de Metanol: Agua tipo I (90:10)

#### 4.3.1.3. Aptitud del sistema

Se prepara una curva de calibración a partir de una solución madre con una concentración de 1000 ppm. Para esto se pesa alrededor de 101,7mg del estándar en un balón volumétrico de 100 mL y se completa a volumen con metanol. Consecutivamente se diluye cinco veces tomando 1 mL de la solución madre para llevarlo a un balón volumétrico de 10 mL, se completa a volumen con solución diluyente y con esto se obtienen concentraciones de 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm.

#### 4.3.1.4. Solución Muestra

Se pesa aproximadamente 100 mg de la muestra en un balón volumétrico de 50 mL, se lleva a volumen con solución diluyente Metanol:Agua (9:1). El procedimiento mencionado se repite 6 veces. Consecutivamente de cada balón volumétrico obtenido se toma una alícuota de 1 mL y se lleva a un balón volumétrico de 10 mL, para completar a volumen con solución diluyente Metanol:Agua (9:1). Se dispone en un vial y se inyecta en el HPLC.

#### 4.4. Validación del método

La validación del método se lleva a cabo mediante la especificidad, linealidad, precisión y reproducibilidad para Eusolex® OCR en tres días diferentes.

##### 4.4.1. Especificidad y Selectividad

En el estudio de la selectividad, como norma general, se comparan los resultados del análisis de muestras con y sin analito en presencia o ausencia de impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas y/o excipientes. Las muestras se prepararon a la concentración nominal de 300 ppm y como parte de dilución final, se le adiciona al 10% del volumen de dilución del interferente, entonces se prepara Ácido Clorhídrico (HCl) al 1N, donde se toman 0,8 mL de HCl grado reactivo y se lleva con agua a volumen de 10 mL. Para la preparación de Hidróxido de Sodio (NaOH) se tomaron 400 mg de NaOH grado reactivo y se lleva con agua a un volumen de 10 mL. Para la preparación de la solución madre véase el apartado 4.3.1.4. En este caso se implementa el método de degradación preparando las muestras por duplicado a partir de una misma madre.

##### 4.4.1.1. Muestra sin tratamiento

Se tomó 3 ml de la solución madre y se llevó a un balón volumétrico de 10 mL. Se completó a volumen con solución diluyente. Se filtró con un filtro de Nylon de 0,45 micras y se llevó al HPLC.

##### 4.4.1.2. Hidrólisis ácida

Se tomó 3 mL de la solución madre y se llevó a un balón volumétrico de 10 mL, se añadió 0,1 mL de una solución de HCl 1N, y se completó a volumen con solución diluyente. Se calentó a 50 °C por 15 minutos, se afora nuevamente una vez que esté atemperado. Se filtró con un filtro de nylon de 0,45 micras y se llevó al HPLC.

##### 4.4.1.3. Hidrolisis alcalina

Se tomó 3 mL de la solución madre y se llevó a un balón volumétrico de 10 mL, se añadió 0,1 mL de una solución de NaOH 1 N, y se completó a volumen con solución diluyente.

Se calentó a 50 °C por 15 minutos, se afora nuevamente una vez que esté atemperado. Se filtró con un filtro de Nylon de 0,45 micras y se llevó al HPLC.

#### 4.4.1.4. *Muestra Oxidativa*

Se tomó 3 mL de la solución madre y se llevó a un balón volumétrico de 10 mL, se añadió 0,1 mL de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% y se completó a volumen con solución diluyente. Se calentó a 50 °C por 15 minutos, se afora nuevamente una vez que esté atemperado. Se filtró con un filtro de Nylon de 0,45 micras y se llevó al HPLC.

#### 4.4.1.5. *Muestra Fotólisis*

Se tomó 3 mL de la solución madre y se llevó a un balón volumétrico de 10 mL y se completó a volumen con solución diluyente. Se expone a luz UV por 15 minutos. Se filtra con un filtro de Nylon de 0,45 micras y se llevó al HPLC.

#### 4.4.1.6. *Muestra termólisis*

Se tomó 3 mL de la solución madre y se llevó a un balón volumétrico de 10 mL y se completó a volumen con solución diluyente. Se calentó a 50 °C por 15 minutos, se afora nuevamente una vez que esté atemperado. Se Filtra con un filtro de Nylon de 0,45 micras y se llevó al HPLC.

#### 4.4.1.7. *Blancos de especificidad*

##### 4.4.1.7.1. *Blanco hidrólisis*

Se tomó 0,1 mL de una solución de HCl 0,1 N y se completó a volumen con solución diluyente. Se filtró con un filtro de Nylon de 0,45 micras y se llevó al HPLC.

##### 4.4.1.7.2. *Blanco hidrólisis alcalina*

Se tomó 0,1 mL de una solución de NaOH 0,1 N y se completó a volumen con solución diluyente. Se filtró con un filtro de Nylon de 0,45 micras y se llevó al HPLC.

##### 4.4.1.7.3. *Blanco oxidación*

Se tomó 0,1 mL de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %, y se completó a volumen con solución diluyente. Se filtró con un filtro de Nylon de 0,45 micras y se llevó al HPLC.

#### 4.4.2. *Linealidad del sistema*

Según la ICH la linealidad se evalúa en un intervalo de 50,0% a 150,0% con un rango mínimo de 5 niveles de concentración del analito del ensayo (100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm y 500 ppm) con estándar por triplicado (n=5, k=3) con un total de 15 determinaciones. Se disponen en un vial y se inyecta en el HPLC.

#### 4.4.3. *Precisión*

##### 4.4.3.1. *Repetibilidad del sistema instrumental*

Se realizó con el estándar a la concentración nominal de 300 ppm de la aptitud del sistema (véase apartado 4.3.1.3.), donde se inyecta 5 veces consecutivas en el HPLC.

#### 4.4.3.2. Precisión intermedia

La precisión del método se evaluó con la variación de los factores: día de analista y analista bajo las mismas condiciones experimentales. Se pesaron aproximadamente 100 mg de muestra en un balón volumétrico de 50 mL y se lleva a volumen con solución diluyente Metanol:Agua (9:1). El procedimiento mencionado se repite 6 veces. Posteriormente, de cada balón volumétrico obtenido se toma una alícuota de 1 mL y se lleva a un balón volumétrico de 10 mL, para completar a volumen con solución diluyente Metanol:Agua (9:1). Se dispone en un vial y se inyecta en el HPLC.

#### 4.4.3.3. Repetibilidad del método

El parámetro se evalúa tomando los datos de la precisión intermedia del analista 1, se calcula el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas y con los intervalos de confianza de cada nivel de concentración.

#### 4.4.4. Límite de detección y límite de cuantificación

La sensibilidad del método fue evaluado mediante el método de la relación señal/ruido. Para ello, se prepararon diluciones sucesivas hasta encontrar la concentración cuya relación señal/ruido fuese alrededor de 3 y 10 para el límite de detección y límite de cuantificación, respectivamente.

## 5. Resultados y Discusión

Para el desarrollo del método HPLC se identificó que utilizando como fase móvil Metanol: Solución buffer Ácido Acético 4,0% (67:33 v/v) no hubo una deformación del pico y se redujo el tiempo de retención, obteniendo la mejor forma de pico del Octocrileno. En la prueba de aptitud del sistema cromatográfico se inyectó el estándar cinco veces para determinar los platos teóricos, donde se evidencio un resultado superior a 2000. Se tiene en cuenta los criterios de validación descritos en la guía ICH Q2 (R1) para analizar cada uno de los parámetros evaluados en la validación del método analítico para el octocrileno (5).

### 5.1. Especificidad y selectividad

Es la capacidad del método para medir específicamente la sustancia de interés, sin ningún tipo de interferencia. Por lo que, al ser sometidas las muestras por duplicado al equipo de HPLC, se obtiene las áreas de cada muestra, las cuales son promediadas, como se muestra en la tabla 1, con el fin de calcular el porcentaje de degradación, según la formula (1), dando como resultado para la hidrólisis acida 4,59%, la hidrólisis básica 22,01%, la oxidación -0,84%, la fotólisis 1,26% y la termólisis 1,31%, lo que indica que el Octocrileno es más susceptible a hidrólisis básica. Además, no se observó ninguna presencia de interferencias para ninguna de las degradaciones mencionadas anteriormente.

**Tabla 1.** Especificidad mediante degradación de las diferentes muestras preparadas.

Réplica	Muestra	Área	Promedio
R1	Muestra sin tratamiento	93948	94149,5
R2		94351	
R1	Hidrolisis ácida	90880	89826

R2		88772	
R1	Hidrólisis básica	73764	73429
R2		73094	
R1	Oxidación	94465	94945
R2		95425	
R1	Fotólisis	93267	92960,5
R2		92654	
R1	Termólisis	93256	92912
R2		92568	

$$\% \text{Degradación} = (\text{PMST}/\text{PMD}) * 100 \quad (1)$$

Dónde:

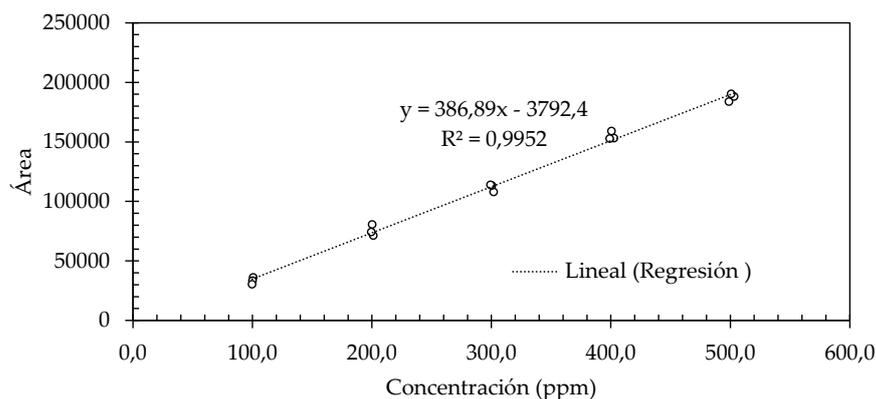
- PMST: promedio de las áreas de las dos réplicas de las muestras sin tratamiento.
- PMD: promedio de las áreas de las dos réplicas de las muestras con degradación.

### 5.2. Linealidad

Los resultados de la linealidad a cinco concentraciones: 100, 200, 300, 400 y 500 ppm (Tabla 2 y figura 1) permitieron estimar que el método es lineal en el rango de concentraciones evaluado obteniendo un coeficiente de correlación ( $R$ )  $\geq 0,99$  y coeficiente de determinación ( $R^2$ )  $\geq 0,99$ , los cuales expresan un alto grado de relación entre las variables presentes en la curva (relación de áreas vs. concentración).

**Tabla 2.** Valores experimentales obtenidos para realizar la curva de calibración

Muestra	Peso	Área
100 ppm replica 1	100,7	36162
100 ppm replica 2	100,2	33317
100 ppm replica 3	99,8	30365
200 ppm replica 1	201,3	71167
200 ppm replica 2	200,3	80526
200 ppm replica 3	199,5	74238
300 ppm replica 1	302,0	107864
300 ppm replica 2	300,5	113310
300 ppm replica 3	299,3	113930
400 ppm replica 1	402,6	153089
400 ppm replica 2	400,7	159014
400 ppm replica 3	399,1	152630
500 ppm replica 1	503,3	188037
500 ppm replica 2	500,8	190280
500 ppm replica 3	498,9	183659



**Figure 1. Curva de calibración y ecuación de la recta**

A demás se evaluó la prueba t de linealidad y la prueba t de proporcionalidad dentro del mismo rango de concentraciones (Tabla 3). Obteniendo que los interceptos no fueron significativamente diferentes. Para el cálculo de los Test se establece rangos de límite superior e inferior de analito, con la ecuación 2 y ecuación 3.

$$\text{Intervalos de confianza pendiente: } b \pm t \cdot S_b, \quad (2)$$

$$\text{Intervalos de confianza intercepto: } a \pm t \cdot S_a, \quad (3)$$

**Tabla 3.** Resultados de análisis de regresión lineal para obtener los datos del test de proporcionalidad y el test de linealidad

Magnitud	Curva
R	0,9976
R <sup>2</sup>	0,9952
t <sub>exp</sub> >> t (0,05; 3) <sup>1</sup>	52,14 >> 2,16
B	386,88
S <sub>b</sub>	7,42
t <sub>exp</sub> < t (0,05; 3) <sup>1</sup>	-1,54 < 2,16
A	-3792,39
S <sub>a</sub>	2465,94

R coeficiente de correlación. R<sup>2</sup> coeficiente de determinación. b pendiente. S<sub>b</sub> desviación estándar de la pendiente. <sup>1</sup> t Tablas tener en cuenta  $\alpha = 0,05$  y n-2 grados de libertad (n=15) es igual a 2,16.

Los resultados obtenidos para los límites superior e inferior para la prueba de linealidad fueron 402,91 y 370,86 respectivamente; y para los límites superior e inferior para la prueba de proporcionalidad fueron 1534,04 y -9118,83 respectivamente. Por tanto, los cálculos obtenidos cumplen con las especificaciones de la prueba de linealidad para Octocrileno.

### 5.3. Precisión

#### 5.3.1 Repetibilidad del sistema instrumental

Se obtuvieron 6 áreas resultantes de la prueba realizada como se muestra en la tabla 4, donde el coeficiente de variación obtenido fue de 1,54%, lo cual demuestra que el sistema instrumental (Cromatógrafo líquido acoplado a un detector UV) tiene la capacidad de proporcionar resultados próximos entre sí al inyectar la misma solución estándar a concentración nominal, teniendo un  $CV \leq 2,0 \%$ .

**Tabla 4.** Repetibilidad del sistema instrumental

Inyección	Área	Promedio	CV (%)
I1	118908		
I2	117678		
I3	115997		
I4	114711	116190	1.54
I5	114264		
I6	115580		

### 5.3.2. Precisión intermedia

Evalúa la variabilidad del método efectuando una serie de análisis, por este motivo se realiza en varios días, para determinar la precisión de los resultados del método sobre la misma muestra, en el mismo laboratorio, pero diferente analista. Por lo que el día 1 analista 1, se obtuvo un peso del estándar de 102,4 mg, con una pureza de 98,3%, para obtener los resultados de la tabla 5. Para el caso de las muestras preparadas se obtuvieron los resultados reportados en la tabla 6, teniendo en cuenta que el factor de dilución para todas las muestras fue de 10 mL, donde el porcentaje de activo fue calculado utilizando la fórmula 4.

**Tabla 5.** Seis repeticiones del estándar con varias diluciones, para el día 1 analista 1

Réplica	Factor de dilución (mL)	Concentración (ppm)	Área
R1	0,1	100,7	36162
R2	0,2	201,3	71167
R3	0,3	302,0	107864
R4	0,4	402,6	153089
R5	0,5	503,3	188037

**Tabla 6.** Muestras para la precisión día 1 analista 1.

Muestras	Peso (mg)	Área	Concentración (ppm)	Porcentaje de activo (%)
M1	109,6	81176	223,4	101,9
M2	113,1	80176	220,8	97,6
M3	107,6	78563	216,6	100,7
M4	110,5	79093	218,0	98,6
M5	97,9	71858	199,1	101,7

$$\% \text{activo} = (\text{concentración} * 10 \text{ mL} * 0,05\text{L}) * (100/\text{peso muestra}), \quad (4)$$

Para el caso del día 2 analista 2, se tienen las mismas consideraciones mencionadas, y se obtiene los resultados mostrados en la tabla 7 y 8, además se sigue utilizando para el porcentaje de activo la fórmula 4.

**Tabla 7.** Seis repeticiones del estándar con varias diluciones, para el día 2 analista 2.

Réplica	Factor de dilución (mL)	Concentración (ppm)	Área
R1	0,1	99,8	47796
R2	0,2	199,5	82792
R3	0,3	299,3	121681
R4	0,4	399,1	158235
R5	0,5	498,9	200302

**Tabla 8.** Muestras para la precisión día 2 analista 2.

Muestras	Peso (mg)	Área	Concentración (ppm)	Porcentaje de activo (%)
M1	110,2	92649	221,9	100,7
M2	108,0	91760	219,6	101,7
M3	105,4	88953	212,2	100,7
M4	102,2	85738	203,8	99,7
M5	117,4	95869	230,4	98,1

Con estos datos se procedió a realizar el promedio de los porcentajes de los activos que se obtuvieron en el día 1 analista 1 y día 2 analista 2, además de la desviación estándar de ambos, con el fin de encontrar el coeficiente de variación global (CV Global), el cual dio un resultado de 1,55, este indica que cumple el criterio de la precisión intermedia.

### 5.3.3 Repetibilidad del método

Utilizando los resultados de la Tabla 5 para el análisis donde se demuestra linealidad en los resultados, además a partir de las 5 réplicas realizadas se sacó el porcentaje de principio activo (Tabla 9), el cual tiene un promedio de 92,7 y una desviación estándar de 2, por lo que para el coeficiente de variación se obtuvo un 1,89%, esto indica que el método es repetible ya que cumple con la especificación  $CV \leq 2,0\%$ .

**Tabla 9.** Repetibilidad del método

Replica	Peso(mg)	Área	Concentración (%) Activo
M1	109.6	72176	200.0
M2	113.1	78176	215.6
M3	107.6	72563	201.0
M4	110.5	74093	205.0
M5	97.9	63858	178.2

### 5.4. Límite de detección y límite de cuantificación

El resultado de la concentración de Octocrileno equivale a 40,3 mg/mL, teniendo en cuenta que la concentración inicial de Octocrileno fue de 205,1 mg. Para el cálculo de límite de detección teórico dio como resultado 0,04 mg/ml y para el límite de cuantificación 0,13 mg/ml. Para calcular esta relación de señal ruido con concentración del Octocrileno se tiene en cuenta la ecuación 5 y la ecuación 6.

$$LD = (\text{peso de la muestra}) * (\text{área}=3) / (\text{señal ruido}), \quad (5)$$

$$LC = (\text{peso de la muestra}) * (\text{área}=10) / (\text{señal ruido}), \quad (6)$$

## 6. Conclusión

La validación realizada a la molécula Octocrileno a partir de una materia prima mediante el método analítico HPLC acoplado a un detector UV fue satisfactoria debido a que cumple con todos los criterios de aptitud del sistema, especificidad, linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación, por lo que se corrobora que es funcional y válido el procedimiento descrito anteriormente y se cumplió con el objetivo planteado.

## 7. Referencias

1. Salmentón, D. G. (n.d.). Riesgos de la exposición solar. V. <http://www.scielo.edu.uy/pdf/adp/v71n1-4/breves.pdf>
2. Market research. (n.d.-d). Sun Protection (Suncare) Market in Colombia - Outlook to 2023: Market Size, Growth and Forecast Analytics. Retrieved May 19, 2020, from <https://www.marketresearch.com/GlobalData-v3648/Sun-Protection-Suncare-Colombia-Outlook-13056812/>
3. L. Dencausse, A. Galland, J. L. Clamou and J. Basso. Validation of HPLC method for quantitative determination of TinosorbS and three other sunscreens in a high protection cosmetic product. *International Journal of Cosmetic Science*, 2008 (Received 22 April 2008, Accepted 2 June 2008).
4. Protector solar: cómo ayudar a proteger su piel del sol | FDA. (n.d.).
5. ICH harmonisation for better health. Available online: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (2021 – 08 – 10).