



17
27
24

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán

ESTUDIO ESTADISTICO COMPARATIVO DE DOS METODOS PARA DETERMINAR LA HUMEDAD RESIDUAL EN VACUNA ANTIRRABICA LIOFILIZADA.

Tesis presentada ante la División de Estudios
Profesionales de la Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de
México.

Para la obtención del Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

por

AGUSTIN HERNANDEZ ZUÑIGA

Asesores:

**Q. F. B. MARICELA NOE MARTINEZ
M.V.Z. LAURA P. NOE MARTINEZ**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

Página:

I.-	OBJETIVO.....	1
II.-	INTRODUCCION.....	2
	A).- Método de Karl Fischer.....	6
	B).- Método de pérdida por secado con aplicación de vacío.....	10
III.-	METODOLOGIA.....	12
	A).- Material y Equipo.....	12
	B).- Técnica de Karl Fischer.....	13
	1.- Titulación del disolvente.....	13
	2.- Obtención del factor de Karl Fischer.....	13
	3.- Determinación de la hu- medad de la muestra.....	14
	C).- Técnica pérdida por secado con aplicación de vacío.....	15
	1.- Lavado y secado del material..	15
	2.- Manejo del aparato.....	15

IV.-	RESULTADOS.....	18
	A).- Porcentajes de humedad obtenidos.....	18
	B).- Comparación estadística.....	23
	1.- Fórmulas empleadas.....	23
	2.- Resultado de la prueba de hipótesis.....	25
V.-	DISCUSION.....	31
VI.-	CONCLUSIONES.....	36
VII.-	RESUMEN.....	39
VIII.-	BIBLIOGRAFIA.....	41

I.- O B J E T I V O

Realizar un estudio estadístico comparativo entre los métodos para determinar la humedad residual, el de Karl Fischer y el de pérdida por secado con aplicación de vacío, en vacuna antirrábica liofilizada.

II.- I N T R O D U C C I O N

La rabia es una enfermedad infecciosa aguda y con un desenlace fatal a la cual son susceptibles todos los animales de sangre caliente incluyendo al hombre. Es causada por un virus RNA de la familia de los Rhabdovirus, género Lyssavirus y que generalmente se transmite por mordedura de animales enfermos, (21, 22, 23).

La rabia puede dividirse un tanto arbitrariamente en rabia de las zonas urbanas y rabia de los animales silvestres. En las zonas rurales donde el ganado vacuno y otros animales de granja son víctimas fáciles de los quirópteros, más de 100 000 bovinos sufren año tras año muerte a causa del derriengue (rabia paralítica); el país resiente por este concepto una pérdida económica anual de más de 200 millones de pesos.

La rabia de las zonas urbanas es principalmente transmitida por perros aún cuando otras especies domésticas, como el gato, pueden estar involucradas. Este tipo de rabia representa un serio problema de salud pública permanente que podríamos resolver con un control adecuado. Este control se realiza principalmente mediante la vacunación tanto en el caso de la rabia urbana como en la rural.

Actualmente en México se cuenta con la tecnología adecuada para resolver el problema que representa la rabia mediante la elaboración de vacunas; un ejemplo es la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios donde se elabora vacuna antirrábica cepa Acatlán, por el método de cultivo de tejidos.

En los productos biológicos es la presencia de cantidades importantes de agua lo que permite sus reacciones químicas, enzimáticas y eventualmente fermentaciones bacterianas y que entrañan, por lo mismo un riesgo de desnaturalización de las sustancias conservadas.

Sea cual fuere la duración del proceso (liofilización) y las condiciones utilizadas en la misma, el producto contiene cierta cantidad de agua no extraída. Se a costumbre denominarla: humedad residual y es de gran importancia.

En efecto su porcentaje condiciona directamente el tiempo de conservación de la vacuna. A una elevada humedad residual corresponde un estado de gran sensibilidad a las condiciones ambientales, dando períodos de conservación muy cortos (poca estabilidad del producto). Por el contrario la humedad residual más baja implica el riesgo de no ser compatible con el mantenimiento de la vida de los microorganismos que se liofilizan.

Por lo anterior observamos que para asegurar una conservación óptima es básico definir con precisión el porcentaje de humedad residual y en consecuencia disponer

de medios adecuados de control que garanticen esta medición.

Desde hace tiempo se ha tratado de encontrar técnicas que permitan la conservación de productos por tiempos prolongados. Se ha buscado sin cesar que un alimento después de mucho tiempo conserve su sabor, color, aspecto y características nutritivas; que los virus y bacterias conserven su actividad y viabilidad.

La desecación se ha asociado con la mejor estabilidad de los productos, (20). La liofilización es un proceso multioperacional que tiene como resultado un sistema estable partiendo de su estado líquido y a través de la pérdida lenta del solvente o fase dispersante por congelación del sistema y a presión reducida, se obtiene dicho sistema estable.

Los productos liofilizados se identifican por su alta ligereza y su elevada porosidad, friabilidad e higroscopicidad. Estos pueden ser almacenados adecuadamente por largos períodos aislados del oxígeno, humedad y luz. Además tienen la facilidad, por su estructura porosa de absorber el solvente y retornar a su estado líquido.

Cuando se procura la estandarización de productos biológicos liofilizados es difícil la correlación de las características biológicas y el contenido de humedad residual, debido a la gran variedad de procedimientos que han sido usados para estimarla. Sin embargo cuando la humedad es aquilatada de acuerdo a un mismo procedimiento

general de ensayo, existen frecuentemente diferencias que causan una gran variación en los resultados.

La determinación de humedad residual en los productos biológicos es con frecuencia considerada como una de las pruebas más sencillas de ejecutar y existe probablemente muchas más oportunidad para la variación de resultados que en cualquier otro ensayo. Varios tipos de prueba son comúnmente empleados para estimar el contenido de humedad de los productos biológicos pero sin una certeza en los resultados obtenidos.

Existe una gran variedad de técnicas que pueden tener gran influencia en los resultados, (3); la selección del método depende de varios factores:

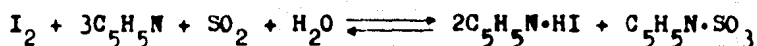
- 1.- Naturaleza del producto
- 2.- Forma en que se encuentra el agua
- 3.- Cantidad de humedad presente
- 4.- Rapidez de la determinación
- 5.- Exactitud
- 6.- Costo del equipo

Algunos de los métodos más usados son:

- a.- Método de Karl Fischer
- b.- Por calentamiento con aplicación de vacío
- c.- Por calentamiento directo
- d.- Balanza de humedad
- e.- Por destilación con un disolvente inmiscible
- f.- Métodos indirectos (por medio de la densidad, índice de refracción, conductividad, etc.)

A).- VALORACION POR EL METODO DE KARL FISCHER

En 1935 Karl Fischer describió un método volumétrico específico para la determinación del agua, (1, 4, 7). El reactivo utilizado que desde entonces se conoce como reactivo de Karl Fischer es una solución de yodo, dióxido de azufre y piridina en metanol. La reacción se desarrolla en dos pasos:



La piridina ejerce algunas funciones importantes que no se deducen inmediatamente de las ecuaciones. La primera reacción es reversible y la piridina fuerza la posición de equilibrio hacia la derecha combinándose con el HI producido. La piridina también incrementa la estabilidad del reactivo formando complejos de transferencia de carga con yodo y dióxido de azufre, reduciendo así la presión de vapor de estas sustancias volátiles.

El reactivo de Karl Fischer se estandariza por valoración con cantidades conocidas de agua. El agua líquida es un estándar satisfactorio. Se han propuesto como estándares primarios hidratos cristalinos, porque tienen altos pesos equivalentes y no son volátiles.

Se han ensayado muchas sustancias que han mostrado

ser satisfactorias. El compendio oficial establece al tartrato de sodio dihidratado como estándar primario. El contenido teórico de esta sustancia es 15.66 % de agua.

Se puede localizar por diferentes maneras el punto final de la valoración de Karl Fischer. El reactivo activo de Karl Fischer contiene yodo, el cual tiene un fuerte color marrón-rojizo. El reactivo consumido (es decir reactivo agotado por reacción con agua), es amarillo canario. Esto posibilita valorar agua en una muestra (que por lo general se disuelve en metanol, piridina o dioxano), con un punto final visual. Antes del punto final la solución es amarilla y después del punto final el primer exceso de reactivo activo confiere el característico color rojizo del yodo a la solución. Aunque el punto final no destaca mucho, es bastante reproducible cuando se emplea una solución de comparación.

Se efectúa una valoración fotométrica de Karl Fischer midiendo la absorbancia de la solución valorada, a 525 nm, longitud de onda a la que el reactivo activo absorbe luz, pero no el reactivo consumido, conforme se añade el reactivo valorante a la disolución. Se traza una representación de la absorbancia en función del volumen del valorante. Antes del punto final, la absorbancia permanece próxima a cero, pero rebasando aquél, se incrementa linealmente con el volumen. La intersección de las

dos líneas rectas señala el punto final. La valoración fotométrica suministra mayor sensibilidad y precisión que la lograda con la detección visual del punto final.

Cuando se han de analizar muchas muestras semejantes gran número de analistas químicos prefieren localizar el punto final electrónicamente antes que el método visual ya que la operación es susceptible de semiautomatización. Para ello se emplean dos electrodos de platino, a los cuales se aplica un potencial hasta que un galvanómetro registra cero con los electrodos inmersos en la disolución (aunque los dos electrodos pueden parecer idénticos uno de ellos adopta el papel de electrodo de referencia y el otro de electrodo indicador). Cuando se alcanza el punto final el primer pequeño exceso de yodo en la solución causa un relativamente largo flujo de corriente, con lo cual resulta una larga deflexión de la aguja del galvanómetro. Esta forma de valoración electrométrica se ha llamado método del punto final "dead-stop", porque se valora la solución hasta que cambia la aguja del galvanómetro. Esta técnica es tan solo una relativamente tosca valoración amperométrica.

La valoración electrométrica es aplicable en macro y microescala. Es realmente adaptable al uso habitual y se expenden aparatos comerciales que pueden terminar automáticamente la valoración.

La valoración de Karl Fischer es el método elegido para la determinación de agua en la mayoría de las muestras. Se disuelve la muestra en metanol, piridina o dioxano y se valora hasta el punto final, visual o electrónicamente, con el reactivo estandarizado. Hay que tomar precauciones especiales para excluir la humedad atmosférica del reactivo valorante y de la muestra. Es menester una valoración en blanco para corregir el agua en el solvente. Si se libera con dificultad el agua de la muestra cabe echar mano de una valoración por retroceso; se añade un exceso de reactivo de Karl Fischer y se valora el reactivo que no ha reaccionado por retroceso con agua estándar en solución de metanol. La valoración de Karl Fischer suele dar en una muestra el agua libre así como la enlazada, (1).

B).- METODO PERDIDA POR SECADO CON APLICACION DE VACIO

Quizas el método más sencillo para determinar el agua contenida en un sólido sea el secado en la estufa a presión atmosférica, a 100-150°C, hasta que se alcanza el peso constante. La pérdida de peso de la muestra se atribuye a la pérdida de agua. Se puede medir tanto el agua libre como la enlazada. Es necesario buscar por cada compuesto la temperatura apropiada y el período requerido de secado para desalojar toda el agua. Algunos hidratos compuestos son muy resistentes a la completa expulsión del agua por secado a la estufa.

Si la muestra es lábil al calor, también puede someterse al secado en la estufa, si se reduce la presión. Esto naturalmente tiene el efecto de disminuir el punto de ebullición del agua por lo que se utilizará una temperatura más baja en el proceso de secado. Se dispone de estufas de vacío para este propósito. Habitualmente también se emplean otros medios en el laboratorio para el secado a presión reducida. Una pistola de secado (llamada asimismo "pistola de AbderHalden"), es un aparato de vidrio diseñado para permitir a la muestra estar encerrada en una cámara de vacío, que se calienta por el vapor de un líquido a reflujo. Se establece la temperatura de la cámara medante la selección del líquido que hierve.

El vacío lo proporciona una bomba de vacío rotatoria de

aceite. Si el secado a la presión reducida y a temperatura ambiente es suficiente para la separación completa del agua, un desecador de vacío es el aparato más sencillo para este propósito. Se coloca un desecador y en su parte inferior un desecante para que absorba la humedad; entre los mejores desecantes se encuentran: perclorato de magnesio anhidro (Dehydrita), el sulfato de calcio anhidro (Drierita), el pentóxido de fósforo. Una bomba produce el vacío. Si la muestra contiene considerable cantidad de agua, resulta adecuada una acción bombeante sostenida para liberar al desecador de vapor de agua. Se ha de interponer acetona helada seca entre el desecador y la bomba para evitar el paso de agua dentro de la bomba o de los vapores químicos de la bomba de aceite dentro del desecador. Cuando la muestra únicamente contiene trazas de humedad, tal vez baste con desarrollar un vacío en el desecador y luego cerrarlo hasta que el desecante haya absorbido todo el agua, (1).

Es importante apreciar la naturaleza del proceso de secado según la influencia de la presión reducida. Este proceso cabe describirlo como una aproximación al equilibrio, el cual se alcanza cuando la presión parcial del agua es la misma en todas las partes del sistema. Así en las etapas iniciales de un secado por desecación la presión parcial del vapor de agua de la muestra es bastante mayor que sobre el desecante.

III.- M E T O D O L O G I A

A).- MATERIAL Y EQUIPO.

Se trabajaron 200 muestras de vacuna antirrábica liofilizada de 10 lotes distintos (PRONABIVE). A 100 muestras se les determinó la humedad residual por el método de Karl Fischer y a las 100 restantes por el método de pérdida por secado con aplicación de vacío.

En todos los casos las muestras se trabajaron el mismo día por ambos métodos (10 muestras cada vez por cada método), de esta forma se trató de estandarizar las condiciones de trabajo para evitar variaciones ambientales.

MATERIAL

- Espátulas
- Pesafiltros
- Desecador
- Cronómetro
- Jeringa de insulina
- Guantes de cirujano
- Cubreboca
- Cubrepelo

MATERIAL BIOLÓGICO

- Vacuna antirrábica liofilizada cepa Acatlán

REACTIVOS

- Alcohol metílico
- Reactivo de Karl Fischer

EQUIPO

- Balanza analítica
- Titulador semiautomático Karl Fischer, marca METRO OHM MOD. E-551
- Aparato para medir humedad por pérdida por secado con aplicación de vacío, marca EIKO MOD. MD-1
- Bomba de vacío (Handy-Vac), marca NAKAMURA SEISAKUSHO

B).- TECNICA P/DETERMINAR HUMEDAD POR KARL FISCHER

1.- Titulación del disolvente.

Se utilizó como disolvente alcohol metílico; se colocaron 20 ml. en la vasija de prueba a través de la bureta correspondiente y se tituló con el reactivo de Karl Fischer adicionando pequeños volúmenes hasta alcanzar el punto final de la titulación, el cual se obtiene cuando la aguja que indica el porcentaje de microamperes alcanza una lectura de 60 a 80 % y permanece estable por espacio de 25 a 30 segundos.

2.- Obtención del factor de Karl Fischer.

Se colocó agua destilada en la jeringa de insulina y se pesó en la balanza analítica. Agregamos una gota de agua en la vasija de prueba que contenía alcohol metílico neutralizado y titulamos el agua adicionando pequeños volúmenes del reactivo hasta alcanzar el punto final de la titulación como se indicó anteriormente. Por diferencia de peso obtuvimos la cantidad de agua agregada.

CALCULOS:

$$\text{FACTOR DE K.F.} = \frac{\text{Peso del agua (mg)}}{\text{Consumo de reactivo (ml)}}$$

3.- Determinación de la humedad de la muestra.

Por tratarse de un producto liofilizado y fácilmente higroscópico, el peso de la muestra por analizar se obtuvo por diferencia de peso según las siguientes indicaciones:

a) Desprendimos cuidadosamente la retapa de aluminio para evitar remover el tapón de hule del frasco que contenía la muestra. Se destapó ligera y rápidamente el frasco para eliminar el vacío y en estas condiciones se pesó el frasco.

b) Abrimos el frasco rápidamente y con una espátula se cortó en cuatro partes la "pastilla" (muestra), vaciando directamente dentro de la vasija, (100-150 mg). Pesamos nuevamente el frasco.

c) Titulación de la muestra. La muestra depositada dentro de la vasija (con metanol previamente neutralizada la humedad en él), se homogeneizó por medio del agitador magnético y a continuación añadimos pequeños volúmenes del reactivo hasta alcanzar el punto final de la titulación.

CALCULOS:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(\text{ml de R.K.F})(F)}{\text{peso muestra (mg)}} \times 100$$

donde:

F = Factor de Karl Fischer (mg de agua/ml)

R.K.F = Reactivo de Karl Fischer

peso de la muestra = (peso del frasco con muestra) - (peso del frasco después de agregar la muestra)

C).- TECNICA P/DETERMINAR HUMEDAD POR PERDIDA POR SECADO CON APLICACION DE VACIO.

1.- Lavado y secado del material.

Se lavaron perfectamente los pesafiltros con agua, jabón y después con alcohol y se metieron a la estufa a 105°C durante una hora, enseguida se pasaron al desecador y se dejaron enfriar (30 minutos).

Pesamos el pesafiltro vacío y agregamos la muestra previamente pulverizada (100 - 200 mg) dentro de éste. Se pesó nuevamente. Colocamos el pesafiltro con muestra dentro del desecador.

2.- Manejo del aparato.

a) Se verificó que estuvieran cerrados los siguientes botones:

- de vacío
- de la cámara

- b) Encendimos el botón de la temperatura y seleccionamos la temperatura de trabajo (60°C).
- c) Pasamos la llave de PODER a la posición pre-calentamiento. Cuando el aparato alcanza la temperatura de trabajo suena una alarma en ese momento apagamos el botón de la temperatura.
- d) Se pusieron los pesafiltros con muestra y destapados dentro de la cámara y la cerramos.
- e) Pasamos la llave de PODER a evacuación (EVAC).
- f) Abrimos la llave de vacío y cerramos el botón de seguridad del aparato.
- g) Encendimos la bomba de vacío.
- h) Esperamos que el vacío alcanzara 1 TORR y se controló por espacio de 1 a 2 minutos.
- i) Se programó el tiempo requerido para la prueba (3 horas).
- j) Pasamos la llave de PODER a AUTO y esperamos las 3 horas de la prueba hasta que suena la alarma. Durante este tiempo controlamos el vacío.
- k) Pasamos la llave de AUTO a evacuación.
- l) Cerramos la llave de vacío y abrimos el botón de seguridad del aparato para evitar que el aceite sea succionado hacia él. Apagamos la bomba de vacío.
- m) Apagamos la llave de PODER.
- n) Controlamos la entrada de aire a la cámara, poco a poco por espacio de 30 a 45 minutos.
- o) Abrimos la cámara y tapamos rápidamente los pesafiltros, los pasamos al desecador y los dejamos de 15-30 min

p) Se pesaron los pesafiltros para determinar el peso perdido.

CALCULOS:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{A}{B} \times 100$$

donde:

A = peso perdido en el secado = (peso del pesafiltro con muestra húmeda) - (peso del pesafiltro con muestra seca)

B = peso de la muestra = (peso del pesafiltro con muestra húmeda) - (peso del pesafiltro sin muestra).

IV.- R E S U L T A D O S

A).- Los resultados obtenidos en porcentaje de humedad residual por cada muestra, fueron los siguientes:

METODO PERDIDA POR SECADO

CON APLICACION DE VACIO

METODO DE KARL FISCHER

LOTE: 137-9-84

3.76 ‰	3.32 ‰
4.61 ‰	4.16 ‰
3.54 ‰	5.13 ‰
3.47 ‰	5.59 ‰
3.39 ‰	5.62 ‰
2.88 ‰	3.52 ‰
3.31 ‰	5.45 ‰
3.93 ‰	3.90 ‰
4.16 ‰	5.80 ‰
3.71 ‰	5.69 ‰

LOTE: 5-2-85

3.80 ‰	3.23 ‰
3.36 ‰	4.13 ‰
3.53 ‰	4.00 ‰
3.97 ‰	3.33 ‰
4.04 ‰	3.72 ‰
3.38 ‰	3.95 ‰
3.33 ‰	4.93 ‰
3.72 ‰	4.25 ‰
3.91 ‰	3.20 ‰
3.37 ‰	4.25 ‰

LOTE: 6-2-85

3.85 %	3.35 %
3.07 %	3.29 %
3.83 %	3.77 %
2.77 %	3.36 %
3.20 %	3.98 %
3.39 %	4.30 %
3.77 %	3.28 %
3.10 %	3.68 %
3.63 %	3.46 %
3.15 %	4.59 %

LOTE: 138-9-84

3.86 %	5.32 %
4.67 %	3.98 %
3.23 %	3.86 %
4.26 %	4.44 %
3.44 %	4.99 %
3.03 %	4.72 %
3.79 %	5.35 %
3.29 %	4.66 %
3.05 %	4.14 %
4.96 %	4.75 %

LOTE: 182-10-84

2.67 ✕	4.33 ✕
4.66 ✕	3.33 ✕
4.00 ✕	3.65 ✕
4.05 ✕	4.64 ✕
2.55 ✕	5.05 ✕
3.14 ✕	4.73 ✕
4.16 ✕	3.95 ✕
3.33 ✕	5.19 ✕
4.38 ✕	4.60 ✕
3.73 ✕	3.88 ✕

LOTE: 186-11-84

4.33 ✕	4.35 ✕
4.21 ✕	5.09 ✕
3.51 ✕	5.33 ✕
3.62 ✕	5.61 ✕
4.24 ✕	4.82 ✕
4.45 ✕	4.78 ✕
3.53 ✕	5.26 ✕
3.19 ✕	5.30 ✕
3.75 ✕	4.04 ✕
4.65 ✕	3.79 ✕

LOTE: 181-10-84

3.03 ✕	4.24 ✕
2.88 ✕	4.33 ✕
2.96 ✕	4.15 ✕
3.03 ✕	3.62 ✕
2.95 ✕	4.12 ✕
3.07 ✕	4.52 ✕
3.10 ✕	3.90 ✕
3.25 ✕	4.31 ✕
3.10 ✕	5.70 ✕
2.96 ✕	4.22 ✕

LOTE: 184-11-84

3.18 ✕	3.69 ✕
3.51 ✕	3.39 ✕
2.54 ✕	4.17 ✕
3.94 ✕	4.56 ✕
3.71 ✕	4.66 ✕
3.53 ✕	4.90 ✕
3.01 ✕	5.95 ✕
3.73 ✕	4.75 ✕
3.46 ✕	4.20 ✕
3.41 ✕	5.34 ✕

LOTE: 187-11-84

3.29 ✕	3.75 ✕
3.66 ✕	5.16 ✕
4.02 ✕	3.56 ✕
4.05 ✕	4.13 ✕
3.84 ✕	4.40 ✕
4.01 ✕	5.77 ✕
3.48 ✕	4.11 ✕
3.98 ✕	4.83 ✕
3.77 ✕	3.39 ✕
4.10 ✕	4.57 ✕

LOTE: 17-3-85

3.05 ✕	2.43 ✕
3.20 ✕	4.16 ✕
3.07 ✕	3.31 ✕
3.26 ✕	4.12 ✕
3.23 ✕	3.78 ✕
3.21 ✕	3.68 ✕
3.51 ✕	3.95 ✕
3.33 ✕	3.42 ✕
3.15 ✕	3.41 ✕
3.78 ✕	3.54 ✕

B).- COMPARACION ESTADISTICA

Con el fin de demostrar si los métodos son estadísticamente equivalentes para la determinación cuantitativa de la humedad residual, se compararon sus resultados utilizando prueba de hipótesis (prueba de muestras independientes caso balanceado).

Por prueba de hipótesis asumimos que:

$$\mu_A = \mu_B \quad \text{Hipótesis nula}$$

$$\mu_A < \mu_B \quad \text{Hipótesis alternativa}$$

la región crítica la podemos encontrar en tablas de t^* y para que la diferencia sea significativa:

$$t_0 < t_{0.05}^*$$

1).- FORMULAS EMPLEADAS

a) Media:
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_j$$

b) Variancia
$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2$$

c) Desviación estándar:

$$s = \sqrt{s^2}$$

d) Error estándar de la media:

$$Es = S\bar{x} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

e) Coeficiente de variación:

$$C.V = (s/\bar{x}) (100)$$

f) Cálculo de t_0 :

$$t_0 = (\bar{x}_A - \bar{x}_B) / Sd$$

como $n_A = n_B$

$$t_0 = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{s_A^2 - s_B^2}} \sqrt{n}$$

g) Grados de libertad:

$$N = n_A + n_B - 2$$

2).- El resultado de la prueba fue el siguiente:

Cuando $n = 100$

$$t_{0.05}^* = -1.96$$

$$t_o = -8.28$$

$$t_o < t_{0.05}^*$$

Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa, se rechaza la hipótesis nula y la diferencia es significativa.

Cuando $n = 10$ (análisis por lote)

$$t_{0.05}^* = -1.734$$

t_0	No. de Lote
- 3.303	137-9-84
- 1.334	5-2-85
- 1.765	6-2-85
- 3.185	138-9-84
- 2.236	182-10-84
- 3.628	186-11-84
- 7.253	181-10-84
- 4.287	184-11-84
- 2.188	187-11-84
- 1.738	17-3-85

Por lo tanto de 10 lotes en 9 $t_0 < t_{0.05}^*$
por lo que se acepta la hipótesis alternativa.

CUADRO No 1.- PARAMETROS ESTADISTICOS OBTENIDOS

PARAMETRO ESTADISTICO	MET. PERDIDA POR SECADO AL VACIO	METODO DE KARL FISCHER
N	100	100
\bar{x}	3.56 %	4.30 %
s^2	0.246	0.550
s	0.499	0.745
E_s	0.049	0.074
C.V	14.02 %	17.32 %

CUADRO No 2.- PARAMETROS ESTADISTICOS POR LOTE.

LOTE 137-9-84	
$\bar{x}_A = 3.676$ $s_A = 0.4818$ $s_A^2 = 0.2322$	$\bar{x}_B = 4.818$ $s_B = 0.9812$ $s_B^2 = 0.9628$
LOTE 5-2-85	
$\bar{x}_A = 3.641$ $s_A = 0.2790$ $s_A^2 = 0.0778$	$\bar{x}_B = 3.899$ $s_B = 0.5444$ $s_B^2 = 0.2964$
LOTE 6-2-85	
$\bar{x}_A = 3.376$ $s_A = 0.3756$ $s_A^2 = 0.1411$	$\bar{x}_B = 3.706$ $s_B = 0.4565$ $s_B^2 = 0.2084$
LOTE 138-9-84	
$\bar{x}_A = 3.758$ $s_A = 0.6807$ $s_A^2 = 0.4633$	$\bar{x}_B = 4.621$ $s_B = 0.5205$ $s_B^2 = 0.2709$

CUADRO No 3.- PARAMETROS ESTADISTICOS POR LOTE.

LOTE 182-10-84	
$\bar{x}_A = 3.667$	$\bar{x}_B = 4.335$
$s_A = 0.7174$	$s_B = 0.6142$
$s_A^2 = 0.5146$	$s_B^2 = 0.3773$
LOTE 186-11-84	
$\bar{x}_A = 3.948$	$\bar{x}_B = 4.837$
$s_A = 0.4867$	$s_B = 0.6027$
$s_A^2 = 0.2369$	$s_B^2 = 0.3633$
LOTE 181-10-84	
$\bar{x}_A = 3.033$	$\bar{x}_B = 4.311$
$s_A = 0.1045$	$s_B = 0.5472$
$s_A^2 = 0.0109$	$s_B^2 = 0.2995$
LOTE 184-11-84	
$\bar{x}_A = 3.402$	$\bar{x}_B = 4.561$
$s_A = 0.4040$	$s_B = 0.7534$
$s_A^2 = 0.1632$	$s_B^2 = 0.5677$

CUADRO No 4.- PARAMETROS ESTADISTICOS POR LOTE.

LOTE 187-11-84	
$\bar{x}_A = 3.82$	$\bar{x}_B = 4.367$
$s_A = 0.2704$	$s_B = 0.7425$
$s_A^2 = 0.0731$	$s_B^2 = 0.5514$
LOTE 17-3-85	
$\bar{x}_A = 3.279$	$\bar{x}_B = 3.58$
$s_A = 0.2194$	$s_B = 0.5018$
$s_A^2 = 0.0481$	$s_B^2 = 0.2518$

* Método Pérdida por secado con aplicación de vacío = (A)

Método de Karl Fischer = (B)

V.- DISCUSION

Los resultados obtenidos con las dos técnicas empleadas (método de Karl Fischer y método de pérdida por secado con aplicación de vacío), muestran que existe una diferencia significativa entre ambos.

Esto se deduce del resultado de la prueba de hipótesis donde $t_0 = - 8.28$ resultó menor que la $t^* = - 1.96$ por lo que concluimos que las dos técnicas no son estadísticamente equivalentes (13, 14, 15) y no se deben usar indistintamente. Además en la prueba por lote también se demuestra lo anterior porque en 9 de 10 lotes se cumple $t_0 < t_{0.05}^*$.

Al analizar los parámetros estadísticos obtenidos para ambos métodos (CUADRO No 1) se ve que la variabilidad de cada técnica se puede determinar con la desviación estándar, la cual se considera como una medida de la EXACTITUD de las mediciones, (9, 10, 11).

En el método de pérdida por secado con aplicación de vacío, esta desviación estándar es menor que en el método de Karl Fischer, por lo que se dice que estadísticamente el de pérdida por secado es más exacto.

La PRECISION es una medida del grado de concordancia entre las mediciones repetidas de una misma propiedad. La repetición esta íntimamente relacionada con la dispersión de los resultados, siendo los estadísticos que determinan esta dispersión: la desviación estándar y el coeficiente de variación, (13).

Observando estos parámetros en el método de pérdida por secado con aplicación de vacío, son más pequeños que en el de Karl Fischer por lo que decimos que es más PRECISO el primero.

El coeficiente de variación (C.V), expresa en porcentaje la desviación del método y así permite comparar diversas muestras entre sí a pesar de que tengan medias diferentes (13, 18, 19). En la técnica de Karl Fischer esta desviación es de 17.32 % y en el de pérdida por secado es de 14.02 % por lo que el primero se desvía un 3.3 % más que el segundo.

Estos parámetros estadísticos obtenidos indican que el método de pérdida por secado con aplicación de vacío tiene menor variabilidad que el de Karl Fischer.

De lo anterior el método de Karl Fischer está fundamentado en una reacción química específica entre el reactivo utilizado y pequeñas trazas de agua de la muestra, (1, 4, 6, 8). Ahora el método de pérdida por secado, es un método no muy específico. Es decir si la muestra tiene otros componentes volátiles además del agua, los resultados se ven alterados por el incremento en el valor de la humedad residual.

Lo anterior puede parecer contradictorio con los resultados obtenidos porque el método de Karl Fischer siendo más específico tiene una mayor variabilidad.

Esto tal vez se deba a que existen más fuentes de variación:

1) Al agregar la muestra:

Cada vez que se agrega una muestra se tiene que destapar la cámara, lo que trae como consecuencia que se introduzca cierta cantidad de humedad atmosférica. Esto parece un error porque para agregar la muestra el aparato cuenta con unas "cucharas" diseñadas especialmente para tal fin sin destapar la cámara; pero por el tipo de muestra que se trabaja no se puede hacer uso de ellas ya que los productos liofilizados poseen una estructura muy porosa, de ahí su facilidad de absorber humedad y retornar a su estado líquido, (2); por esto la muestra se adhiere casi totalmente a las paredes de dichas cucharas. Además sería otra operación más, lo que mantendría a la muestra al contacto más prolongado con el medio ambiente.

En el laboratorio de Control Físicoquímico de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, en un trabajo anterior a éste, trataron de corregir lo antes mencionado de la siguiente manera: determinaron la humedad atmosférica que se introducía en la cámara cada vez que se agregaba la muestra. Es decir se hacía toda la operación de agregar la muestra pero sin agregarla y se procedía a titular la humedad introducida. El promedio que obtuvieron fue un gasto de 0.1 ml de reactivo de Karl Fischer. Por lo que en cada titulación de una muestra problema, al gasto final de reactivo de Karl Fischer se le restaba 0.1 ml.

Lo anterior no deja de ser una mera aproximación por que no tomaron en cuenta el contenido de humedad del medio ambiente, así como la concentración del reactivo de Karl Fischer (factor). Esto sería válido si se controlara la humedad atmosférica y se determinara la cantidad en mg de agua que se introducía cada vez que se abriera la cámara, así tomando en cuenta el factor del reactivo en el momento de trabajar se determinaría la cantidad de reactivo a restar.

2) Determinación del factor de Karl Fischer.

Otra fuente de variación es el determinar el factor de Karl Fischer; la forma de obtenerlo (agregando una gota de agua cada vez, y por diferencia de peso obtener la cantidad de agua agregada), presenta el inconveniente de manejar pesos muy pequeños en los cuales una pequeña variación de ellos involucra un error significativo.

Se han propuesto como estándares primarios hidratos cristalinos por lo que se podría hacer uso de ellos, así tenemos al tartrato de sodio dihidratado, el cual contiene teóricamente 15.66 % de agua.

También se puede hacer uso de microjeringas y considerar la densidad del agua para calcular el peso del agua agregada. Asimismo se puede preparar una solución estándar de agua, agregando aproximadamente 1 ml de agua exactamente pesado, en un matraz aforado de 100 ml y aforar con metanol absoluto.

3) Humedad atmosférica.

Una fuente de variación más, es la humedad atmosférica; las condiciones ambientales son de gran importancia en este tipo de análisis. Lo ideal sería trabajar en un ambiente controlado, ya que durante la operación y por el tipo de muestra que se trabaja, es muy factible la absorción de humedad atmosférica.

Las condiciones en las que se recomienda trabajar es 40 % de H.R como máximo y 20°C, (16); y las condiciones promedio bajo las cuales se trabajó fueron: 54.2 % de H.R y 19.8°C.

En el método de pérdida por secado con aplicación de vacío existen menos fuentes de variación:

1) Desecante usado.

Se debe controlar el tipo de desecante usado, en este caso se usó SILICA GEL con indicador de humedad.

Cada vez que se trabaja se debe secar en la estufa porque al enfriar la muestra desecada, al prepararla para pesarla, es una posible fuente de error (2). Si la muestra esta más seca que el desecante, el agua pasará del desecante a la muestra; de aquí que se tenga que usar un agente desecante eficaz y mantenerlo siempre libre de humedad.

VI.- CONCLUSIONES

1) Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el método de pérdida por secado con aplicación de vacío es más preciso y exacto que el método de Karl Fischer, en las mismas condiciones ambientales de trabajo.

2) Empleando prueba de hipótesis, se demuestra que no son estadísticamente equivalentes, por lo que se concluye que no se deben usar indistintamente en la determinación cuantitativa de humedad residual en vacuna anti-rábica liofilizada.

3) La diferencia en la media es de 0.74 % más alto en Karl Fischer que en pérdida por secado con aplicación de vacío.

4) Algunas recomendaciones para trabajar cada método son las siguientes:

METODO DE KARL FISCHER

a) Determinar cuidadosamente el factor de Karl Fischer cada vez que se trabaje.

b) Usar otros estándares primarios para obtener el factor:

- Sulfaguanidina (Codex); contiene 7.76% de agua, (16)

- Tartrato de sodio dihidratado, contiene 15.66 % de agua teóricamente, (1).

c) Cambiar constantemente las trampas de humedad del aparato.

d) Trabajar como máximo 3 muestras con una misma espátula.

e) Realizar lo más rápido posible las operaciones para exponer la muestra al medio ambiente el menor tiempo posible.

f) Evitar corrientes de aire, (no abrir puertas en el momento de trabajar y evitar movimientos bruscos).

g) Usar guantes de hule, cubreboca y cubrepelo.

METODO PERDIDA POR SECADO CON APLICACION DE VACIO.

a) Cambiar o secar el desecante cada que se trabaje, tanto en la trampa de humedad del aparato como en el desecador.

b) Llevar un registro del peso de cada uno de los pasafiltros.

c) Utilizar una espátula por muestra.

d) Realizar todas las operaciones lo más rápido que sea posible.

e) Evitar corrientes de aire, (mantener la puerta cerrada y evitar movimientos bruscos en el momento de trabajar).

f) Usar guantes de hule, cubreboca y cubrepelo.

VII.- R E S U M E N

HERNANDEZ ZUÑIGA AGUSTIN.- "Estudio estadístico comparativo de dos métodos para determinar la humedad residual en vacuna antirrábica liofilizada."

Bajo la dirección de: Q.F.B. Maricela Noé Martínez y E.V.Z. Laura Patricia Noé Martínez.

Se compararon estadísticamente utilizando prueba de hipótesis los resultados obtenidos en la determinación cuantitativa de la humedad residual en vacuna antirrábica liofilizada, empleando los métodos de Karl Fischer y de pérdida por secado con aplicación de vacío.

A 200 muestras de 10 distintos lotes de producción de vacuna antirrábica cepa Acatlán elaborada en la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, se les determinó la humedad residual: 100 muestras por el método de Karl Fischer y 100 por pérdida por secado con aplicación de vacío.

Tratando de que las condiciones ambientales de trabajo fueran las mismas, cada vez se trabajaron 10 muestras por cada método.

La evaluación demostró que el método de pérdida por

secado con aplicación de vacío es más preciso y exacto que el de Karl Fischer.

La prueba de hipótesis demostró que la diferencia entre los resultados obtenidos por los dos métodos es significativa y por lo tanto no son estadísticamente equivalentes por lo que no se deben usar indistintamente en la determinación de la humedad residual en vacuna an tirrámica liofilizada.

VIII.- B I B L I O G R A F I A

- (1) Connors, Kenneth A.
"Curso de Análisis Farmacéutico"
(Ensayo del medicamento)
Ed. Reverté S.A.
Segunda Edición, 1980.

- (2) Dr. Noé Montesinos.
Q.B.P Humberto Rodríguez.
"Proceso de Liofilización" (Seminario).
Instituto Mexicano de Capacitación y Adiestramiento de la Industria Farmacéutica y Químico Farmacéutica.
Agosto de 1983.

- (3) Pemberton J.R "Critical Factors of the vacuum oven Technique which influence the estimation of moisture in veterinary biologics". Biol. Standar. 1977, vol. 36, pp: 191-199.

- (4) Dick, J.G.
Química Analítica.
Ed. El Manual Moderno, S.A.
Primera Edición, 1979.

- (5) Fisher Award. "Aquametric methods in organic analysis". Analytical Chemistry, October 1964 No 11, vol. 36.
- (6) Vogel, Arthur I.
Química Analítica Cuantitativa, Vol. II
Edit. Kapeluz.
Segunda Edición, 1981.
- (7) Helman, José.
Farmacotecnia. Teórica y práctica.
Edit. C.E.C.S.A
Primera Edición, 1981.
- (8) Flaschka, H.A.
Química Analítica Cuantitativa.
Editorial C.E.C.S.A.
Primera edición, 1973.
- (9) Erwin Kreyszig.
Introducción a la Estadística Matemática.
Principios y métodos.
Editorial Limusa.
Primera edición, 1979.

- (10) Natrella, M.G.
Experimental Statistics.
National Bureau of Standards Handbook.
USGPO, 1963.
- (11) E.P Box G. Hunter, W. Hunter J.S.
Statistics for Experimenters.
John Wiley E. Sons.
Primera edición, 1978.
- (12) Huntsberger D.U.
Elements of Statistical Inference.
Allyn and Dacon.
Segunda edición, 1968.
- (13) Q.F.B Raquel López A.
Guía para la validación de métodos analíticos
Apuntes para la materia Desarrollo Analítico
(9º Semestre) Q.F.B
F.E.S.C - U.N.A.M
1984.
- (14) González-Soberón-Gutierrez-Garzón.
Comparación de los métodos analíticos específicos para la determinación del acetato del a cetónido de fluocinolona, en un polifármaco de uso tópico.
Departamento de Desarrollo Farmacéutico.
SYNTEX, S.A

- (15) Valdez; Gutierrez; Garzón.
Comparación de dos métodos analíticos para la
determinación de estabilidad del sulfato de
Gentamicina en un polifármaco.
Departamento de Desarrollo farmacéutico.
SYNTEX, S.A.
- (16) Simatos, D.
Constante diélectrique et teneur en eau des
produits lyophilisés. XIth International Con-
gress of Refrigeration, Munich.
Sub-Commission 6 C.
- (17) REY L.R. Thermal analysis of eutectics in
freezing solutions. Ann. N.Y Acad. Sci. 1960
85, pp: 510-513.
- (18) Maisel, L.
Probabilidad y Estadística.
Fondo Educativo Interamericano.
Primera edición, 1977.
- (19) Hayslett, HT.
Estadística Simplificada.
Compañía General de Ediciones.
Primera edición, 1980.

- (20) Ing. Carlos Rodarte G.
La técnica de la Liofilización, (Seminario).
Instituto de Capacitación en Especialidades,
S.C. México, D.F.
Julio de 1981.
- (21) Jawetz, E. Melnick, J.L. y Adelberg.
Manual de Microbiología Médica
Edit. El Manual Moderno.
7a. Edición.
México, D.F. 1977.
- (22) Mohanty, S.B and Dutta, S.K.
Veterinary Virology.
Lea & Febiger.
Philadelphia, U.S.A
1981.
- (23) Roberts, A.W and Carter G.R.
Essentials of Veterinary Virology.
Michigan, State University Press.
Michigan, U.S.A
1981.