

Nº 167
251



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
POR TITULACION EN MEDIO NO ACUOSO
PARA LA DETERMINACION DE
NITRATO DE MICONAZOL EN CREMA

T E S I S

Que Para obtener el Titulo de :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a
PEDRO SALVADOR VALADEZ ESLAVA

México, D.F

1992

FALLA EN EL ORIGEN



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.

I N D I C E

INDICE

	Pag.
CAPITULO 1.- Monografía del principio activo y producto terminado.	4
CAPITULO 2.- Generalidades de análisis volumétrico y medio no acuoso.	10
- Condiciones necesarias para realizar una valoración	20
- Tipos de titulaciones	22
- Estandarización	26
- Historia sobre el medio no acuoso	28
- Casos en los que se recomienda emplear el medio no acuoso.	29
- Tipos y clasificación de los disolventes empleados en medio no acuoso.	29
- Efecto nivelante y diferenciador.	32
- Elección del disolvente.	41
- Titulación de bases.	42
- Efecto de la presencia del agua.	45
- Titulación de ácidos.	47
- Efecto de la temperatura y como corregirlo.	50
- Detección del punto final.	51
- Métodos gráficos y métodos matemáticos.	58

CAPITULO 3.- Generalidades sobre validación de métodos analíticos.	61
- Definiciones de términos relacionados con validación.	63
- Pasos para llevar a cabo una validación.	65
- Parámetros a determinar.	68
- Fuentes de error.	73
CAPITULO 4.- Desarrollo y validación del método analítico	74
- Método optimizado.	80
- Validación del método analítico empleando indicador (Cristal violeta) y método potenciométrico.	83
- Prueba de anadema.	92
- Comparación estadística de los métodos validados	98
- Especificidad.	101
CAPITULO 5.- Discusión de resultados y conclusiones.	112
- Recomendaciones.	113
- Análisis de resultados.	114
- Conclusiones.	115
BIBLIOGRAFIA	117

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION

Desde hace varios años, la industria farmacéutica desarrolla métodos analíticos para el análisis de materia prima, producto a granel, producto terminado y más recientemente para estudios de estabilidad, pero surge la pregunta: El método que se está utilizando es confiable?. Para responder adecuadamente a ésta pregunta es necesario contar con la evidencia documentada de una serie de estudios de laboratorio, que demuestran que el método analítico cumple con los requisitos que se han establecido para ser considerado confiable.

El objetivo de este trabajo es validar un método analítico, para la cuantificación de nitrato de miconazol en crema, que presente ventajas sobre los métodos reportados, los cuales son laboriosos y complicados.

El método analítico consiste en la titulación del nitrato de miconazol en medio no acuoso, previa extracción del principio activo con cloroformo. La determinación del punto final en la valoración se determinó de dos maneras:

- 1.- Con un indicador visual.
- 2.- Con un método potenciométrico, y los resultados se compararon estadísticamente.

El presente trabajo consta de 5 capítulos en donde se presentan en orden los siguientes temas:

- 1.- Monografía del principio activo y del producto terminado.
- 2.- Generalidades de análisis volumétrico y medio no acuoso.
- 3.- Generalidades sobre Validación de métodos analíticos.
- 4.- Desarrollo y validación del método analítico.
- 5.- Discusión de resultados y conclusiones.

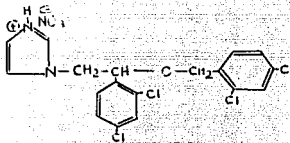
La importancia del método que se desarrolló y validó está en que presenta ventajas sobre los otros métodos reportados como son: disminución en el tiempo de análisis, menor complejidad, y disminución de costos.

El método desarrollado presenta la limitación que únicamente puede ser utilizado para el control de calidad de producto a granel y terminado.

M O N O G R A F I A D E L
P R I N C I P I O A C T I V O
Y
P R O D U C T O T E R M I N A D O

MONOGRAFIA DEL NITRATO DE MICONAZOL.

FORMULA DESARROLLADA:



FORMULA CONDENSADA: $C_{18}H_{18}Cl_4N_3O_4$

PESO MOLECULAR: 479.2

PESO EQUIVALENTE: 479.2 g/eq (Titulación en ácido acético glacial)

NOMBRE QUIMICO: Nitrato de 1-[2-(2,4-diclorofenil)-2[(2,4-diclorofenil)metoxietil]-1H-imidazol].

DESCRIPCION: Polvo cristalino blanco ó amarillo pálido.

CONSTANTE DE DISOCIACION: pka= 6.7

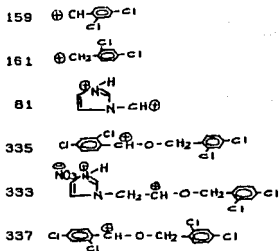
SOLUBILIDAD: Muy ligeramente soluble en agua y éter, soluble 1 en 125 de etanol, 1 en 300 de cloroformo y 1 en 70 de metanol.

PUNTO DE FUSION ISOMERO (+): 135.3 C.

PUNTO DE FUSION ISOMERO (-): 135 C.

ROTACION ESPECIFICA: = + 59 (metanol). Forma dextrorrotatoria.
= - 58 (metanol). Forma levorrotatoria.

ESPECTRO DE MASAS: principales m/c. 159, 161, 81, 335, 333, 337.



IDENTIFICACION:

1.- El espectro de absorción al infrarrojo, de una muestra preparada en pastilla de bromuro de potasio exhibe máximos a las siguientes longitudes de onda.

λ (cm ⁻¹)	Grupo funcional.
822	Nitrato.
859	Fenilos sustituidos.
1035	Amina terciaria.
1082	Eter.
1400	Nitrógeno cuaternario.
1470	Metileno.
1580	Grupo amino en anillo aromático.

2.- El espectro de absorción ultravioleta de una solución 1 en 2500 de nitrato de miconazol en una solución 1 en 10 de solución 0.1 N de ácido clorhídrico en alcohol isopropílico, presenta máximos a 254nm y 272 nm y el mínimo a 248 nm.

3.- Pesar alrededor de 3 mg de nitrato de miconazol, adicionar 0.1 ml de ácido sulfúrico y 0.05 ml de una solución que contenga 0.5 g de difenilamina en una mezcla de 50 ml de ácido sulfúrico y 10 ml de agua. Se produce un color azul intenso.

4.- Quemar 20 mg de la muestra empleando 5 ml de solución 0.02 N de hidróxido de sodio como líquido de absorción. Cuando el proceso es completo, diluir con 20 ml de agua y acidificar con solución 0.1 N de ácido nítrico. La solución resultante da positiva la prueba característica para cloruros.

PERDIDA AL SECADO: Secar a 105°C por 2 horas, no debe perder más de 0.5 % de su peso.

RESIDUO A LA IGNICION: No más de 0.2%.

PUREZA CROMATOGRAFICA:

Solución problema.- Disolver 100 mg de la materia prima en 10 ml de una mezcla cloroformo-metanol (1:1).

Solución estándar.- Preparar una solución de nitrato de miconazol sustancia de referencia en una mezcla de cloroformo-metanol (1:1) para obtener una concentración de 10 mg/ml. **Solución estándar diluida:** Preparar a partir de la solución estándar una solución que contenga 25 mcg/ml.

Aplicar en carriles separados porciones de 50 μ l de las 3 soluciones, en una placa de sílica gel GF 254 de 0.25 mm de espesor y dejar correr el cromatograma utilizando una fase móvil de hexano:cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (60:30:10:1) hasta que el frente del solvente llegue hasta tres cuartas partes de la placa.

El valor de Rf de la mancha principal de la solución problema debe corresponder al obtenido por la solución estándar y ninguna otra mancha observada en la solución problema debe ser de mayor intensidad que la presentada por la solución estándar diluida (0.25%).

VALORACION.- pesar con exactitud aproximadamente 350 mg de nitrato de miconazol, pasarlo a un vaso de precipitados, disolver con 50 ml de ácido acético glacial y titular con solución 0.1 N de HClO₄. Determinar el punto final potenciométricamente empleando un electrodo de vidrio y calomel. Hacer un blanco para efectuar la corrección necesaria. Cada mililitro de solución 0.1 N de HClO₄ es equivalente a 47.92 mg de nitrato de miconazol.

FARMACOLOGIA.

La molécula de nitrato de miconazol presenta un anillo imidazolínico, el cual le confiere una actividad antifúngica de amplio espectro y también una cierta actividad antibacteriana.

El nitrato de miconazol es fungicida para varias especies de Trichophyton, Epidermophyton, Microsporun, Cándida, Cryptococcus, Aspergillus, Coccidioides, Paracoccidioides. Cladosporium, Phialophora, Madurella, Blastomyces e Histoplasma.

Su mecanismo de acción se basa en la característica de que el nitrato de miconazol embebe por permeabilidad la quitina de la pared celular fúngica y aumenta la permeabilidad de la membrana a diversas sustancias intercelulares. El fármaco penetra fácilmente al estrato córneo de la piel y permanece ahí más de 4 días después de su aplicación.

El nitrato de miconazol es empleado para el tratamiento del pie de atleta, alivia el prurito en pocos días, y las vesículas curan rápidamente. Estudios realizados (Brugmans y Col. 1970), indican que el índice de curación es del 98%. Otros padecimientos para los cuales es útil son: tina cruris, pitiriasis versicolor, dermatomicosis, onicomycosis y candidiasis cutánea.

El miconazol es efectivo contra bacterias gram positivas, en el

tratamiento de la candidiasis vulvovaginal, la frecuencia de cura al final del mes es entre el 80 y 95%, comparada con cerca del 85% de la nistatina, el prurito en algunas ocasiones es mejorado después de una simple aplicación. Algunas infecciones vaginales causadas por *T. glabratus* solo responden al miconazol.

En algunos casos es usado para el tratamiento de la micosis oftálmica.

TOXICIDAD, EFECTOS SECUNDARIOS Y PRECAUCIONES.

Algunas ocasiones causa quemaduras y maceración en la aplicación cutánea, dolor, prurito, urticaria, erupciones, cefalea y calambres pelvianos pueden producirse después de una aplicación intravaginal, la frecuencia de estos efectos es menor del 0.2 %.

Las reacciones adversas después de su administración intravenosa incluyen náuseas, flebitis, anemia, trombocitopenia y especialmente prurito. Se ha observado hiponatremia hasta en el 50 % de los pacientes, artralgia, anafilaxia, psicosis aguda e hiperlipidemia también se han registrado.

METABOLISMO

Una dosis de 50 mg alcanza su máxima concentración en sangre de 4 a 8 horas después de administrada. Del 18 al 20 % de la dosis es excretada por al orina en 4 días y solo menos del 1 % es excretado inalterado.

Presenta absorción incompleta después de la administración oral y absorción pobre después de la administración tópica.

Cerca del 10 al 20 % de la dosis oral es excretada en la orina en 6 días, y cerca del 1 % es excretada inalterada. El 50 % de la dosis es excretada por las heces.

Su vida media en el plasma es de cerca de 24 horas, su volumen de distribución es de aproximadamente 20 L/Kg, la fijación de proteínas en el plasma es alrededor del 92 %. La dosis letal media (DL 50) por vía oral en ratones es de 578.1 mg/Kg.

Su metabolismo consiste en la oxidación a ácido 2,4-diclorosandélico.

PREPARACIONES

El nitrato de miconazol se vende en loción o crema al 2% para usarse en la piel y uñas, o en crema vaginal al 2 %.

Se aplica una o dos veces por día a la piel durante 4 semanas, o una vez por día intravaginalmente durante 14 días.

El nitrato de miconazol también se usa por vía parenteral para el tratamiento de infección fúngica sistémica severa; para este propósito se vende en ampollitas de 20 ml que contienen 10 mg de miconazol por mililitro, esta dosis se administra habitualmente cada 8 horas.

MONOGRAFIA DEL NITRATO DE MICONAZOL EN CREMA.

FORMULA:

Nitrato de miconazol.....0.4 g.

Excipiente c.b.p.....20.0 g.

DESCRIPCION: crema homogénea, de color blanco, textura suave y untuosa, libre de partículas extrañas.

TEMPERATURA DE FUSION: entre 50 y 60°C.

pH: entre 3 y 4.5

CONSERVACION: Preservar en tubos colapsables y herméticos.

FUGAS: Seleccionar una muestra de 10 tubos, limpiar y secar completamente la superficie exterior de cada uno, con una tela absorbente. Colocar cada tubo en posición horizontal, sobre una hoja de papel secante y mantener en una estufa a 60°C durante 8 horas. Durante la prueba no debe haber fugas, ni en el cuerpo del tubo ni en la tapa. Si se observa fuga en un tubo, repetir la prueba con 20 tubos más. La muestra satisface la prueba si no se encuentran fugas en los primeros 10 tubos probados o si solamente uno de los 30 tubos probados presenta fugas.

LIMITES MICROBIANOS: La muestra no debe contener más de 100 colonias/gramo y debe estar libre de microorganismos patógenos.

IDENTIFICACION: Pesar una muestra equivalente a 50 mg de nitrato de miconazol, llevar a 10 ml con una mezcla de

cloroformo-metanol (1:1) y agitar 15 minutos, filtrar la solución a un tubo de ensayo. Preparar una solución de nitrato de miconazol sustancia de referencia con la misma mezcla de disolventes a la misma concentración. En una placa de sílica gel GF 254 previamente activada por 30 minutos a 80° C, aplicar por duplicado 400 µcl de la preparación del estándar y de la muestra problema. Desarrollar la cromatoplaaca en una cámara utilizando un sistema compuesto de: n-hexano:cloroformo:metanol:hidróxido de amonio, (80:30:10:1), hasta que el frente del disolvente alcance las tres cuartas partes de la placa. Observar bajo luz U.V., el valor de Rf de la mancha principal de la solución problema corresponde a la de la solución estándar.

PESO PROMEDIO: Seleccionar una muestra de 10 tubos, pesarlos individualmente y calcular el contenido neto por diferencia del contenido bruto menos el contenido de cada envase.

VARIACION DE PESO: El promedio del contenido neto de 10 tubos probados no deberá ser menor que el de la cantidad expresada en el envase.

IRRITABILIDAD: Preparar un parche cuadrado de gasa quirúrgica que mida 2.5 X 2.5 cm y con un grosor de dos monocapas conteniendo 0.5 g de la crema.

Los animales se inmovilizan con los parches asegurados en su lugar con tela adhesiva. Todo el tronco del animal se envuelve en un

material impermeable, por un periodo de 24 horas. Después de la exposición se quitan los parches, y se evalúan las reacciones resultantes según los criterios establecidos.

VALORACION. - (Gases).

Solución de estándar interno.- Pesar 10 mg de colestano, pasar a un matraz volumétrico de 10 ml, disolver y llevar a volumen con una mezcla de volúmenes iguales de metanol y cloroformo, mezclar. Esta solución contiene 1 mg/ml de colestano.

Solución de referencia.- Pesar una cantidad de la sustancia de referencia equivalente a 12.5 mg de nitrato de miconazol, pasar a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver y llevar a volumen con metanol. Pasar una parte alícuota de 10 ml de la solución anterior a un tubo de ensayo y evaporar a sequedad sobre un B.M. con la ayuda de corriente de aire filtrado. Disolver el residuo en un parte alícuota de 2 ml de solución de estándar interno. Esta solución contiene 2500 mcg/ml de nitrato de miconazol.

Preparación de la muestra.- Pesar una cantidad de la muestra equivalente a 20 mg de nitrato de miconazol, pasar a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y llevar a volumen con una mezcla de volúmenes iguales de alcohol isopropílico y cloroformo, mezclar. Pasar una parte alícuota de 25 ml de la solución anterior a un vaso de precipitados de 150 ml y evaporar a sequedad sobre B.M. con ayuda

de una corriente de nitrógeno. Agregar al residuo 10 ml de cloroformo y calentar sobre un B.M. a ebullición. Sacar el vaso de precipitados del B.M. y agitarlo. Evitar la excesiva evaporación del cloroformo. Agregar 50 ml de pentano en porciones pequeñas con movimiento continuo. Dejar reposar de 10 a 15 minutos para permitir la cristalización. Filtrar a través de un filtro de porosidad media con ayuda de aplicación de aire en la superficie, a través de un orificio en el tapón fijado sobre el embudo. Lavar el vaso de precipitados con cuatro porciones de pentano de 5 ml cada una. Secar el precipitado contenido en el filtro haciendo pasar por el mismo aire filtrado durante varios minutos. Colocar el filtro conteniendo el precipitado sobre un matraz volumétrico de 50 ml y disolver el precipitado adicionando pequeñas porciones de metanol y aplicando aire filtrado al embudo para facilitar la filtración. Llevar a volumen con metanol y mezclar. Pasar una parte alícuota de la solución anterior a un tubo de ensayo y evaporar a sequedad con ayuda de aire filtrado. Disolver el residuo en una parte alícuota de 2 ml de solución de estándar interno.

Condiciones del equipo.- Gas de arrastre: helio; detector de ionización de flama; temperatura de la columna 250°C; temperatura del inyector 250°C; temperatura del detector 300°C; flujo 50 ml/min; columna de 1.2 m X 2.0 mm empacada con tierra silicea para cromatografía de gases de 80 a 100 mallas, que previamente ha sido fundida por calcinación mezclando tierra de diatomeas con carbonato de sodio, fundida y calcinada a más de 900°C, lavada con

ácido y después con agua hasta reacción neutra sin lavar con álcali y recubierta con un tres por ciento de una mezcla de 20 % de fenilmetil y 80 % de dimetil polixano.

Procedimiento.- inyectar al cromatógrafo por separado 5 μ l de la preparación de referencia, ajustar los parámetros de operación y el tamaño de los picos correspondientes a colestano y nitrato de miconazol, que son eluidos en este orden. El coeficiente de variación no debe ser mayor del 3 % y el factor de resolución entre el colestano y el nitrato de miconazol, no debe ser menor de 2. Una vez cumplidos los parámetros anteriores, inyectar al cromatógrafo por separado 5 μ l de la preparación de referencia y de la muestra, obtener sus respectivos cromatogramas y calcular las áreas relativas correspondientes.

Calcular la cantidad en miligramos de nitrato de miconazol/gramo de la muestra por medio de la siguiente fórmula: $0.04 C/P (R_m/R_{ref})$, en donde C es la concentración en μ g/ml de la preparación de referencia; R_m y R_{ref} son las áreas relativas obtenidas en el cromatograma con la preparación de la muestra y referencia respectivamente y P es el peso de la muestra en gramos, hasta miligramos.

**GENERALIDADES
DE
ANALISIS
VOLUMETRICO
Y
MEDIO NO ACUOSO**

ANALISIS VOLUMETRICO

En el análisis titulométrico se denomina valoración a la operación experimental básica. En una valoración, una solución de reactivo de concentración exactamente conocida (solución estándar), se añade a otra solución, cuya concentración se desea determinar, tomando las disposiciones para determinar el momento en que la solución estándar ha reaccionado con la totalidad de la sustancia problema, y conociendo además la concentración de la solución estándar y la estequiometría de la reacción, es posible determinar la cantidad de la sustancia problema.(1)

Al momento donde la totalidad de la sustancia problema, ha reaccionado con la solución estándar recibe el nombre de "punto de equivalencia", también llamado "punto final estequiométrico" y "punto final teórico", a la estimación de este punto ya sea por alguna propiedad de la solución (como por ejemplo, el color dado por un indicador) o por otro método, recibe el nombre de punto final. Así, en realidad se determina en una valoración el punto final, el cual debe estar lo más cerca posible del punto de equivalencia, para tener un error de titulación pequeño.

La titulometría es un método de análisis clásico muy usado en el análisis farmacéutico, como se comprueba hojeando las últimas ediciones de diferentes farmacopeas y formularios nacionales e internacionales.

CONDICIONES NECESARIAS PARA REALIZAR UNA VALORACION

- 1.- Es necesario que se efectue una reacción.
- 2.- La reacción debe ser rápida, de manera que la duración de la titulación no sea exagerada y que no se necesite esperar largo tiempo después de cada adición de reactivo titulante.
- 3.- Se requiere conocer los coeficientes estequiométricos, es decir la estequiometría de la reacción debe ser conocida y perfectamente definida bajo las condiciones de trabajo. En caso de no conocer los coeficientes estequiométricos es posible saber la equivalencia del titulante con la sustancia problema, pesando un estándar y titulándolo en las condiciones de la valoración, conociendo así la equivalencia por mililitro de titulante con la sustancia problema. Este caso se presenta en la titulación de las penicilinas.
- 4.- Cuando se trata de una alícuota de la solución problema, éste volumen debe ser medido con material volumétrico, En caso de conocer exactamente la densidad de la sustancia problema, el volumen puede conocerse por pesada de una de una cantidad determinada de la solución.
- 5.- La concentración del titulante debe ser conocida con precisión, lo cual indica precauciones relativas a la preparación de esta solución (denominada solución patrón), la cual debe estar normalizada..

6.- El volúmen de la solución del reactivo titulante hasta el punto de equivalencia debe ser conocido con exactitud, debe usarse una bureta calibrada con la capacidad adecuada para tener un error mínimo (80 % de su capacidad).

7.- Cuando la sustancia por valorar se encuentre en disolución acompañada por otras sustancias, éstas no deben interferir en el desarrollo de la reacción de titulación, es decir no debe impedir ni deben consumir reactivo titulante.

8.- La cuantitatividad de la reacción de titulación debe ser grande. Dicho en otra forma, un valor de constante de equilibrio alto.

9.- Debe existir algún medio adecuado para detectar el punto de equivalencia.

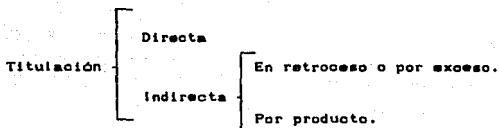
10.- La sustancia a titular y el reactivo titulante deben ser estables en las condiciones de desarrollo de la reacción.

11.- La sustancia titulante debe, cuando sea posible, tener un peso equivalente alto para reducir los efectos de incertidumbre debidos a la determinación de peso.

No siempre es posible cumplir todas estas condiciones, pero siempre debe tratarse que se satisfagan el mayor número posible.

TIPOS DE TITULACIONES

Las titulaciones se dividen en:



TITULACION DIRECTA.

El reactivo titulante reacciona directamente con la sustancia problema. La adición del reactivo titulante se suspende cuando se llega al punto de equivalencia.

Siempre que sea posible se debe tratar de realizar las valoraciones por medio de una titulación directa.

Diagrama:

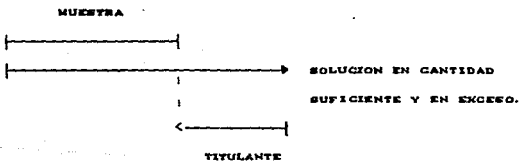


TITULACIONES INDIRECTAS.

En retroceso o por exceso: A la sustancia problema se le añade una cantidad conocida de una solución la cual es suficiente para reaccionar con esta, quedando además un exceso de la solución, el cual se valora con una solución patrón.

Conociendo la cantidad y la concentración de la primera solución y restando el exceso del mismo se tiene el número de miliequivalentes o milieoles que reaccionaron con la sustancia problema.

Diagrama:



Este tipo de titulaciones se llevan a cabo principalmente porque la titulación directa no es cuantitativa, por esta razón se requiere adicionar además de la cantidad suficiente de titulante, un exceso, para desplazar el equilibrio hacia los productos, logrando así la cuantitativa requerida en toda valoración.

Estas titulaciones tienen más error que las directas, debido a que intervienen dos soluciones, con sus respectivas medidas de volumen.

A veces se utiliza la valoración por retroceso para muestras volátiles e insolubles.

* En el caso de hacer un blanco no es necesario conocer exactamente la concentración de la solución que se encuentra en exceso, debido a que al hacer el blanco se obtiene la equivalencia del volumen de una concentración X con el volumen de concentración exactamente conocido del titulante con el que se determina el exceso presente en la muestra. Así, para los cálculos se utilizan dos volúmenes pero una sola concentración.

TITULACION INDIRECTA POR PRODUCTO.

En éste caso la sustancia problema se transforma en otro compuesto (sal soluble, insoluble, complejo etc), el cual generalmente es necesario separar y valorar por titulación directa.

Diagrama:



CURVAS DE VALORACION.

Una curva de valoración es una representación gráfica de alguna variable que esta en función del volumen de titulante añadido durante la titulación. En el caso de una valoración ácido-base en medio acuoso se grafica pH vs ml de titulante (Fig. 1), y para valoraciones en medio no acuoso, de precipitación, oxido-reducción y formación de complejos se grafica mV (milivoltios) vs mililitros de titulante (Fig. 2).

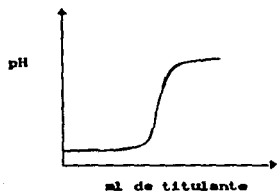


Figura 1.

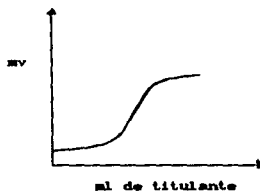


Figura 2.

Es posible predecir estas curvas de valoración, conociendo la concentración de la sustancia problema, del titulante y las ecuaciones que definen la valoración al inicio, antes del punto de equivalencia, en el punto de equivalencia y después de éste.

ESTANDARIZACION

En todos los métodos analíticos se requiere de un estándar, con base en el cual se realizan todos los cálculos, por lo que de su adecuada preparación dependerán en gran parte los resultados. En el caso de las titulaciones se utiliza como estándar una solución normalizada con un patrón primario, resultando así una solución patrón secundario con el que se efectúa la valoración, de ahí la importancia de hacer adecuadamente la normalización, la cual se puede definir como una titulación en donde se encuentra la concentración de una solución o el título, expresado en términos de alguna sustancia. Esta se realiza por titulación de una cantidad conocida de una sustancia llamada patrón primario, y debe realizarse cuando menos por triplicado.

Condiciones requeridas para una normalización.

Disponer de un patrón primario que debe satisfacer los siguientes requisitos.

1.- Debe tener alta pureza (el contenido total de impurezas no debe exceder de 0.01 a 0.02 %), para lograrlo es necesario que la sustancia sea fácil de obtener, además debe mantener su estado puro. Este requisito no se encuentra habitualmente en los hidratos ya que es difícil eliminar completamente la humedad sin provocar una

descomposición, lo cual conduce a sustancias de composición desconocida.

2.- La sustancia debe permanecer inalterada al contacto con el aire, en el transcurso de la pesada, por tanto, no debe ser higroscópico ni debe reaccionar con el oxígeno o con el dióxido de carbono.

3.- No debe reaccionar con el recipiente que lo contiene.

4.- Debe ser posible controlar las impurezas mediante ensayos cualitativos o de otra naturaleza.

5.- Debe tener una masa equivalente tan alta como sea posible con el fin que los errores de pesada sean despreciables. (Para que el error no sea mayor de 0.1 % se requiere pesar por lo menos 0.2 g cuando se utiliza una balanza con sensibilidad de 0.1 mg.

6.- Debe disolverse fácilmente en las condiciones que se va a utilizar.

7.- Debe satisfacer todas las condiciones para realizar una valoración, mencionadas anteriormente.

Además se deben de cumplir los siguientes requisitos:

- La normalización debe efectuarse por titulación directa. No se recomienda utilizar titulaciones por retroceso, porque aumentan las posibilidades de error.

- Debe efectuarse realizando por lo menos tres determinaciones que deben coincidir con un error no mayor de 0.2 %.

MEDIO NO ACUOSO

Desde hace muchos años se sabe que se pueden observar en disolventes no acuosos fenómenos análogos a las reacciones ácido-base en agua, tales como los cambios de color de los indicadores y reacciones estequiométricas perfectamente definidas de ácidos y bases. En 1912, Folin y Flanders valoraron ácidos en benceno, cloroformo, y mezclas de cloroformo-etanol, en 1927, Conanty Hall dieron a conocer sus importantes investigaciones sobre el comportamiento de las bases en ácido acético glacial, pero fue hasta los años comprendidos entre 1940 y 1950, cuando se iniciaron extensos estudios prácticos y teóricos, sobre el comportamiento ácido-base en medio no acuoso.(1)

Estos estudios muestran que la utilización de diferentes disolventes ofrecen numerosas posibilidades, puesto que las propiedades químicas pueden verse modificadas cuando se cambia el disolvente.(6)

Cuando se pasa de un disolvente a otro, no solamente pueden cambiar las constantes de los equilibrios sino que también pueden dejar de existir en el nuevo disolvente las especies químicas que existían en el agua y en su lugar pueden aparecer otras especies, nuevos grados de oxidación, ácidos, bases o complejos diferentes.(6)

Esto ofrece numerosas nuevas posibilidades y éstas a su vez se

pueden multiplicar en gran número utilizando mezclas de disolventes, en diferentes proporciones, haciendo variar así de forma continua las propiedades del sistema.(6)

Casos en los que se recomienda emplear el medio no acuoso.

1.- Cuando se requiere valorar un ácido o base con K_a o $K_b < 10E-5$, ya que si se quisiera valorar este tipo de ácidos o bases en agua, no competirían de manera efectiva con el disolvente por el protón o hidroxilo, (titulante) en términos prácticos no sería valorable.

2.- Para valorar sustancias orgánicas débilmente ácidas o básicas insolubles o de solubilidad limitada en agua, pero que se disuelven fácilmente en un disolvente orgánico adecuado.

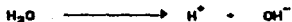
3.- Para valorar mezclas de ácidos o bases que en agua parecen tener la misma fuerza, como es el caso de los ácidos: $HClO_4$, H_2SO_4 , HCl y HNO_3 , los cuales se les considera de la misma fuerza en agua, pero al titularlos en ácido acético glacial presentan fuerzas diferentes.

TIPOS Y CLASIFICACION DE LOS DISOLVENTES EMPLEADOS EN MEDIO NO ACUOSO.

Existen varias clasificaciones, la primera de ellas los agrupa en disolventes disociables y no disociables.

DISOLVENTES DISOCIABLES.

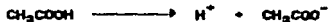
El ejemplo clásico es el agua que se disocia de acuerdo con la reacción:



Otros disolventes se disocian de manera similar. El etanol reacciona para originar el ión etóxido:



y el ácido acético glacinal:



En estos casos el protón se encuentra solvatado por lo que es una especie diferente en cada disolvente.

Algunos disolventes se disocian sin producir el protón solvatado, el anhídrido acético es uno de ellos:



DISOLVENTES NO DISOCIABLES.

Los éteres e hidrocarburos son ejemplos de este grupo. En realidad, incluso estas sustancias pueden disociarse un grado mínimo pero tal disociación no es detectable.

Otra clasificación agrupa a los disolventes en:

- 1.- Protogénicos.
- 2.- Protofilicos.
- 3.- Anfipróticos.
- 4.- Apróticos o inertes.

1.- Disolventes Protogénicos: Originan un protón solvatado al disociarse, son conocidos por sus propiedades ácidas. Ejemplos: ácido acético, ácido sulfúrico, ácido fórmico.

2.- Disolventes Protofilicos: Son capaces de aceptar un protón, pueden ser disolventes disociables o no disociables, son conocidos por sus propiedades básicas. Ejemplos: anhídrido acético, éter, piridina, amoniaco líquido, butilamina, etilendiamina y cetonas.

3.- Disolventes Anfipróticos: cuando tienen propiedades ácidas o básicas. Ejemplos: agua, metanol, etanol, etilenglicol e isopropanol.

4.- Disolventes apróticos o inertes: No tienen tendencia a dar o aceptar protones, carecen de carácter ácido o básico. Ejemplos: cloroformo, e hidrocarburos.

La última clasificación los agrupa en disolventes moleculares poco disociados y disolventes disociados.

-Disolventes moleculares poco disociados: tienen una constante dieléctrica baja, menor a 20.

-Disolventes moleculares disociantes: su constante dielectrica es superior a 20.

EFECTO NIVELANTE Y DIFERENCIADOR.

Son dos los factores que dictan el grado de protólisis de un ácido: Primero está su fuerza intrínseca, esto es, su tendencia inherente a ceder protones. El otro factor es la basicidad del disolvente, es decir su tendencia a ganar protones.

Por ejemplo, en un disolvente de basicidad alta, los ácidos con fuerzas intrínsecas relativamente bajas, pueden llegar a ceder por completo sus protones al disolvente, y se comportan entonces como ácidos fuertes a pesar de que no lo son, esto quiere decir que este disolvente ejerce un efecto nivelador para los ácidos, porque los iguala en cuanto a sus fuerzas debido a la alta basicidad del disolvente.

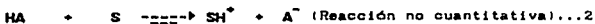
Otro ejemplo de efecto nivelador se tiene con los ácidos clorhídrico, sulfúrico (primera disociación), nítrico y perclórico, los cuales tienen la misma fuerza en agua, debido a que todos son lo suficientemente fuertes para convertir cuantitativamente el agua en H_3O^+ , el cual es el ácido más fuerte que puede existir en el agua, por lo que se puede decir que el agua es un disolvente nivelador para los ácidos minerales mencionados.

Se puede representar este efecto por medio de la siguiente reacción.



Donde S representa al disolvente.

Pero cuando un ácido o una base no reaccionan cuantitativamente con el disolvente, la reacción se puede representar de la siguiente manera:



Aparentemente parece el mismo caso de la reacción (1), la diferencia está en que en la reacción (1) el equilibrio está totalmente desplazado hacia los productos y en la reacción (2) el equilibrio no se desplaza totalmente hacia los productos.

Como un ejemplo de la reacción (2) se tiene al ácido acético en agua.

Ahora, cuando se tienen en agua, ácido clorhídrico y ácido acético, éstos presentan fuerzas diferentes, por lo que se dice que el agua es un disolvente diferenciador para estos ácidos.

Se puede aplicar este efecto para diferenciar a los ácidos minerales si se disuelven en una sustancia poco básica, como el ácido acético glacial en donde por la baja basicidad de éste se presentan con fuerzas diferentes.

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ELECCION DEL DISOLVENTE.

- 1.- Su acidez o basicidad.
- 2.- La constante de autoprotólisis o autodisociación.
- 3.- La constante dieléctrica.

1.- Acidez o basicidad del disolvente.

Se establece como regla general que un disolvente con propiedades fuertemente ácidas hace que un soluto muestre

características básicas más notorias, así la constante de disociación para una base débil alcanza valores más altos en estos disolventes que en el agua, la cual presenta propiedades ácidas y básicas más débiles.

Un disolvente con propiedades fuertemente básicas ocasiona que el soluto presente características ácidas más marcadas.

Se puede decir entonces que cuanto más ácido o básico es el disolvente, más hacia la derecha está desplazado el equilibrio y por consiguiente es más factible que la reacción se lleve a cabo.

2.- Constante de autoprotólisis o autodisociación.

El grado de cuantitatividad de una reacción de titulación ácido base en el punto de equivalencia en un solvente anfiprótico es función de la constante de autoprotólisis del disolvente, la cual indica el grado en el cual se disocia el disolvente; puede representarse para un disolvente AB como: $AB \rightleftharpoons A^+ + B^-$,

La constante de autoprotólisis viene dada por:

$$K_{auto} = (A^+)(B^-) \quad \text{o} \quad pK_{auto} = pA + pB$$

que en el caso del agua $(A^+) = (H^+)$ y $(B^-) = (OH^-)$

$K_{auto} = 1 \times 10^{-14}$ ($pK_{auto} = 14$), es por esto que la escala de

pH va de 0 a 14 (Fig. 3), así para el etanol con un valor de $K_{auto} = 8 \times 10^{-20}$ ($pK_{auto} = 19.1$) la escala de pH va de 0 a 19.1. (Fig. 4)

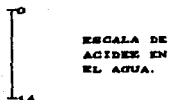


Figura 3.

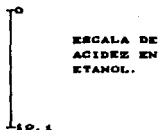


Figura 4.

Para comprender la importancia de esta diferencia de valores de la K_{auto} se tiene que en agua, para pasar de un pA (es decir $pH = 1$) hasta un pB ($pOH = 1$ o $pH = 13$), ha de atravesarse un margen de acidez de 12 órdenes de magnitud ya que $pA + pB = 14$, (Figura 5). En etanol sin embargo para pasar desde $pA=1$ hasta un $pB=1$ se requiere un intervalo de 17.1 órdenes de acidez, (Figura 6). Esta diferencia se refleja en que en etanol se dispone de un mayor intervalo para valorar sustancias de fuerzas variables, además la cuantitatividad mejora ya que el salto de pH en el punto de equivalencia es mayor que en el agua.

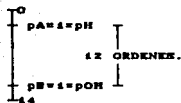


Figura 5.

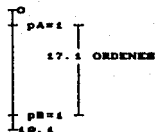
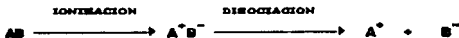


Figura 6.

La constante de autoprotólisis tiene relación con el efecto nivelador ya que si esta es grande, ejercerá un efecto nivelador también grande sobre los solutos; por lo tanto en tal disolvente no existe un campo amplio de fuerzas ácidas y básicas, en cambio cuando se tiene una constante de autoprotólisis pequeña el efecto nivelador disminuye a tal grado que se dice que el disolvente tiene un efecto diferenciador grande. (1)

3.- Constante dieléctrica.

Ionización y disociación. La ionización es el proceso de producción de iones y la disociación es la separación de especies. La ecuación general que representa estos procesos es:



La especie A^+B^- se denomina par iónico.

La constante dieléctrica (D) representa la cantidad de trabajo requerido para separar, en el proceso de disociación las partículas de carga opuesta de un soluto en el disolvente, y puede calcularse con la siguiente ecuación:

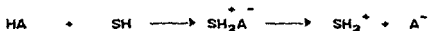
$$D = \frac{e^2}{F r^2}$$

Donde e es la carga eléctrica, D es la constante dieléctrica, r es la distancia entre los iones y F es la fuerza de atracción.

En cualquier disolvente SH un soluto B "sin carga" y con propiedades básicas reacciona de la siguiente manera:



En tanto que un soluto HA sin carga con propiedades ácidas se disocia según:



Ambas reacciones requieren transferencia de carga, (etapa de ionización) y la separación de las partículas cargadas, (etapa de disociación). (3)

En disolventes de elevada constante dieléctrica, los enlaces iónicos se rompen totalmente y los pares iónicos prácticamente no existen, esto es lo que sucede en medio acuoso (Dague=78.5) Tabla 1.

Y de forma general en los disolventes de constante dieléctrica superior a 40.

Tabla 1.

Constantes dieléctricas de los principales disolventes.

Disolvente.	Constante dieléctrica	Temperatura °C
N-metilacetamida	178.8	30
Acido cianhídrico.	118.3	18
Formamida.	109.0	25
Acido sulfúrico.	101.0	25
Acido fluorhídrico.	83.6	0
Agua.	78.5	25
Acetamida fundida.	60.6	94
Acido fórmico.	56.1	25
Hidracina.	51.7	25
Sulfóxido de dimetilo.	48.8	20
Tetrametilsulfona.	44.0	30
Oxocloruro de selenio.	46.2	20
Glicerol.	42.5	25
Etilenglicol.	37.7	25
Etanolamina.	37.7	25
Dimetilformamida.	36.7	25
Acetonitrilo.	36.2	25
Nitrometano.	35.8	30
Tricloruro de amonio.	33.2	75
Metanol.	32.8	25
Etanol.	24.3	25
Amoniaco líquido.	22.4	-33
Anhidrido acético.	22.1	20
Acetona.	20.7	25
n-Propanol.	20.1	25
Metiletilcetona	18.4	20
Isopropanol.	18.3	25
Isobutanol.	17.7	25
Metilcelosolve.	16.0	30
Cloruro de acetilo.	15.9	20
Ciclohexanol.	15.0	25
Etilendiamina.	14.2	30
Anhidrido sulfuroso.	14.1	20
Oxocloruro de fósforo.	13.8	20
Piridina.	12.3	25
1,2-Dicloro etano.	10.4	25
Sulfuro de hidrógeno.	10.2	-60
Cloruro de sulfuro.	10.0	22

Cuando la constante dieléctrica es baja, los ácidos y las bases se ionizan pero sus cargas tienden a unirse formando pares iónicos y de estos sólo una parte se disocia. (7)

Por todo lo anterior resulta evidente que la reacción de disociación de un soluto "sin carga" estará más desplazada hacia la derecha en un disolvente de constante dieléctrica alta que en uno que posea una constante baja. (3)

Cuando el soluto es un ácido o base débil "cargado", la situación es diferente, y para solutos de propiedades ácidas o básicas se tiene respectivamente:



Aquí se tiene transferencia de cargas pero ninguna "separación de cargas". En estas circunstancias la magnitud de la constante dieléctrica tiene poco o ningún efecto sobre la constante de disociación del soluto.

Debido a que del valor de la constante dieléctrica dependerá en gran parte la disociación, ésta influirá sobre el grado de cuantitatividad de la reacción. Cuanto mayor sea el valor de la constante tanto mayor será el grado de cuantitatividad de la reacción en el punto de equivalencia. (3)

ELECCION DEL DISOLVENTE.

Resulta evidente que en la elección de un disolvente para una titulación dada, sin considerar la obvia necesidad de una situación de solubilidad operacional para el soluto, se regirá por varios factores, los más importantes son:

1.- Las propiedades ácidas o básicas del disolvente, es decir su capacidad para donar o recibir un protón resultarán de importancia. En la titulación de un ácido débil, debe utilizarse de preferencia un disolvente que posea propiedades básicas fuertes y visceversa.(3)

2.- La magnitud de la constante de autoprotólisis del disolvente resultará de importancia, de preferencia un valor bajo de ésta favorecerá la posibilidad para determinar el punto de equivalencia con razonable exactitud.(3)

3.- La constante dieléctrica del disolvente influirá sobre el grado de cuantitatividad de la reacción de titulación. Cuanto mayor sea el valor de la constante tanto mayor será el grado de cuantitatividad en el punto de equivalencia. (3)

Claro que todas estas condiciones no pueden presentarse en el caso más favorable, pero hay que tratar de cumplir la o las que tengan una influencia mayor según la sustancia que se vaya a titular.

TITULACION DE BASES.

DISOLVENTES. - Deben ser ácidos o neutros todos los que se utilizan como medio para la valoración de bases, esto favorece a que el equilibrio de la reacción se desplace hacia la derecha.

El ácido acético glacial es el disolvente más empleado ya que prácticamente no tiene basicidad. El anhídrido acético sirve para el análisis de bases muy débiles tales como amidas que no son fácilmente acetiladas. El dioxano se utiliza solo o mezclado con ácido acético, también pueden emplearse acetonitrilo, acetona, isopropanol, y metilisobutil cetona.

Disolventes neutros pueden ser empleados, como el benceno, cloroformo o mezclas de glicol-hidrocarburo las cuales son adecuadas para sustancias difícilmente solubles, ya que por lo general el componente hidroxilado es un buen disolvente.

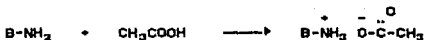
TITULANTES. - En titulometría en medio acuoso, la selección de uno de los ácidos minerales como valorante es indiferente, y que en el agua los nivela hasta una misma fuerza. Pero en ácido acético glacial u otro disolvente de los mencionados el efecto diferenciador ocasiona que los ácidos minerales tengan fuerzas diferentes, escogiendo entonces al ácido perclórico, el más fuerte de ellos disuelto en ácido acético glacial. Otros titulantes utilizados son el ácido paratoluensulfónico y el ácido fluorosulfónico. (1)

TITULACIONES EN ACIDO ACETICO GLACIAL.

Por ser el disolvente más empleado se requiere profundizar un poco más acerca de él. Por sus propiedades marcadamente ácidas las bases débiles se ionizan completamente, pero por su constante dieléctrica baja forman pares iónicos que se disocian solo parcialmente.

Las reacciones que se llevan a cabo cuando se titula una base en ácido acético glacial son:

1.- La base al disolverse en el disolvente reacciona con éste.



de manera que forma la base conjugada del ácido acético (acetato) en cantidad equivalente a la base por valorar, el acetato formado es la base más fuerte que puede existir en este disolvente y es esta la que reacciona con el titulante.

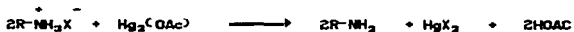


formando el clorato correspondiente y ácido acético glacial.

Muchas sustancias de interés farmacéutico son bases débiles y experimentan las reacciones anteriores, pero otras se encuentran en

forma de sales de amina, que se pueden valorar como ácidos en medios acuosos, pero dado que generalmente la porción amino es la que tiene interés, ésta es la parte que se ha de analizar.

La base al estar protonada no puede ser titulada por un ácido, para desprotonarla se emplea un método propuesto por Pifer y Wollish que hace reaccionar la sal con un exceso de acetato mercurico* el cual libera la amina para la valoración .



* Prácticamente indisociable en ácido acético glacial.

Bases que se pueden titular en medio no acuoso.

- Aminas primarias, secundarias, terciarias y aromáticas.
- Heterocíclios nitrogenados: Oxazoles, piridonas, quinolinas, purinas, pirroles, indoles, carbazoles y alcaloides.
- Amidas en anhídrido acético.
- Sales de amonio sodio o potasio de ácidos carboxílicos.
- Sales de ácidos inorgánicos: sulfato de sodio, bromuro de sodio, cianuro de sodio, carbonato de sodio y bicarbonato de sodio.
- Algunos aminoácidos por su baja solubilidad en ácido acético glacial, son cuantificados agregando una cantidad suficiente y en exceso de ácido perclórico para reaccionar con el aminoácido, el

exceso es titulado por retroceso con acetato de potasio disuelto en ácido acético glacial.

- Determinación de sustancias que no son intrínsecamente básicas, generalmente por conversión a un derivado básico. El más utilizado de estos procedimientos es el introducido por Pfizer y Wollish, mencionado anteriormente.

- Bases de Schiff del tipo ArCH=N-Ar y ArCH=R , azocompuestos, imidas, nitrilos, oximas, sulfonamidas, ureas y tioureas.

- Sulfatos y Nitratos de aminas. (Nitrato de Miconazol)

EFFECTO DE LA PRESENCIA DEL AGUA.

Muchas aminas pueden ser tituladas en ácido acético conteniendo hasta un 2 a 3 % de agua. Si una cantidad mayor de agua se encuentra presente, el punto final no es bien definido y se obtienen resultados inexactos.

En alcohol se presenta un efecto similar, pero la tolerancia puede ser un poco más grande porque éste es menos básico que el agua.

Aunque muchas aminas pueden ser tituladas en presencia de alguna cantidad de agua, la determinación adecuada de muchas bases débiles requiere la menor cantidad de agua posible.

Se sabe que el titulante puede introducir agua al sistema, en el

caso del ácido perclórico se debe añadir una cantidad suficiente de anhídrido acético y esperar un día para que reaccione con el agua proveniente del ácido perclórico al 70%, a pesar de esto algo de agua esta presente durante la titulación porque el ácido acético grado reactivo contiene de 0.2-0.5% de agua. Una técnica conveniente para evitar la presencia de agua es llevando a cabo la titulación en un disolvente conteniendo un exceso de anhídrido acético, una limitación de esta técnica es que solo es aplicable para la determinación de aminas terciarias y algunas sales, las cuales debido a sus propiedades básicas no son destruidas por acetilación. Se ha demostrado que en ciertos casos la acilación de aminas primarias y secundarias puede ser prevenida haciendo la titulación a 0°C.

Quando el agua está presente, probablemente el $\overset{+}{\text{H}}_2\overset{-}{\text{AC}}\overset{-}{\text{ClO}}_4$ es convertido a $\overset{+}{\text{H}}_2\overset{-}{\text{O}}\overset{-}{\text{ClO}}_4$ el cual es un ácido considerablemente más débil, por lo tanto la reacción se vuelve menos cuantitativa.

La Figura 7 muestra el efecto de la adición de pequeñas cantidades de agua sobre el ácido acético glacial y el nitroetano, se observa que ocasiona una considerable caída del potencial.

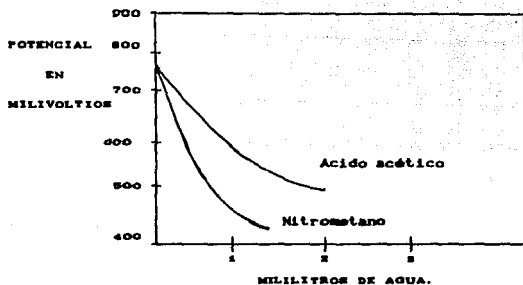


Figura 7.

Resulta preferible la total ausencia de agua para no aumentar la debilidad de la sustancia por titular.

TITULACION DE ACIDOS.

DISOLVENTES. - Deberán solubilizar perfectamente al compuesto que se va a titular y deberán tener propiedades marcadamente básicas o neutras, la basicidad del disolvente hace aumentar el carácter ácido; y los disolventes neutros son adecuados para la valoración de mezclas.

La dimetilformamida, n-butilamina y piridina son disolventes básicos que se emplean ampliamente, éstos absorben fácilmente el CO₂ atmosférico por lo que hay que sellar el sistema y hacer un blanco para la corrección correspondiente.(1)

Otros disolventes usados son: el benceno, metanol, etanol, acetona, metiletilcetona, metilisobutilcetona, alcohol terbutílico, isopropanol y amoniaco líquido, el cual tiene la desventaja de tener que emplearse a temperaturas bajas. (7)

TITULANTES. - Debe ser una base fuerte en un disolvente no ácido y estable a largo plazo. El metóxido de sodio en benceno y en alcohol metílico o el hidróxido de tetrabutil amonio, en benceno y alcohol metílico o isopropanol se emplean como titulantes. Los metóxidos de sodio y potasio presentan las desventajas de que forman precipitados gelatinosos durante el curso de muchas valoraciones y estos geles pueden dificultar la detección del punto final. (El metóxido de litio no forma estos geles), además el error alcalino impide usar el electrodo de vidrio.(8)

Por otro lado las soluciones no acuosas de hidróxido de tetrabutil amonio u otros hidróxidos cuaternarios de amonio generalmente forman sales solubles en los disolventes que se utilizan, además de que se pueden obtener curvas potenciométricas muy exactas empleando los electrodos de vidrio y calomei.(8)

Otro titulante es el aminoácido de sodio que da buenos resultados cuando el disolvente es una mezcla de etilendiamina-etanol. (7)

* Efecto producido por los metales alcalinos como sodio y potasio los cuales al estar en grandes concentraciones ocasionan que el electrodo de vidrio los confunda con los iones H^+ y entonces se produce una disminución en los valores de pH, impidiendo seguir la titulación potenciométrica.

Las reacciones que se llevan a cabo son semejantes a las de las bases:

- Reacción del ácido con el disolvente.



- Titulación de la dimetilformamida protonada, proveniente de la reacción con el ácido.



Ácidos que se pueden titular en medio no acuoso.

Fenoles, ácidos carboxílicos, enoles, imidas, halogenuros de ácidos, anhídridos, sulfonamidas, sales de aminas aromáticas, ácidos

sulfónicos, pirroles, ciertos compuestos nitrogenados y diversos compuestos que contienen azufre.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y COMO CORREGIRLO.

Uno de los inconvenientes de utilizar titulantes preparados en disolventes no acuosos es su alto valor de coeficiente de expansión cúbica. Esto significa que con cambios de temperatura la normalidad de la solución valorante varia más ampliamente que lo que lo hace una disolución acuosa.

Por ejemplo el coeficiente de expansión cúbica para el ácido acético es de 1.07×10^{-3} /grado y para el agua es de 0.21×10^{-3} , por tanto cabe considerar que una disolución de ácido perclórico preparada en ácido acético glaciale cambia un 0.1 % por cada grado celsius que varie la temperatura, es por esto que no se puede despreciar este efecto. Para corregirlo lo que se hace es lo siguiente: al normalizar el titulante se registra su temperatura, así la concentración obtenida será solo válida para esa temperatura, y siempre que se use esta solución se tomará su temperatura y se aplicará la siguiente corrección: + 0.0001N por cada grado de descenso, (porque el titulante se contrae y por lo tanto se concentra) y -0.0001N por cada grado de aumento. (el titulante se dilata y por consiguiente se diluye).

DETECCION DEL PUNTO FINAL.

Al igual que en medio acuoso los dos métodos más empleados son: utilizando indicadores y la determinación potenciométrica.

Indicadores.— Es posible el uso de indicadores también en medio no acuoso ya que se lleva a cabo una neutralización, pero debido a que las características en este medio son diferentes a las que se presentan en el agua el número de indicadores es más limitado. El indicador más adecuado para la valoración de bases es el cristal violeta o violeta de genciana, el violeta de metilo estrechamente relacionado con el anterior, se comporta de manera similar. El cambio de color del cristal violeta es pasando del violeta (color básico), al azul, verde azulado, verde, verde amarillento y amarillo (color ácido) Figura (8).

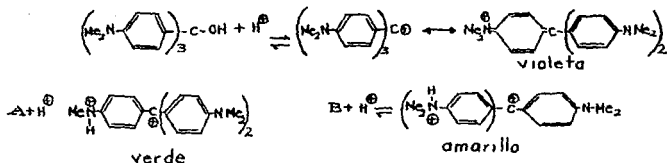


Figura 8.

Muchas aminas pueden ser tituladas usando cualquiera de estos indicadores, si se toma como punto final cuando el color violeta desaparece. Otros indicadores para la valoración de bases son el rojo de metilo, anaranjado de metilo modificado, violeta de metilo y 1-naftolbenzeína. (5) La p-naftolbenzeína es uno de los indicadores más adecuados para las valoraciones en ácido acético glacial, el cambio de color es de amarillo en la forma básica, hasta el verde en la ácida. Otro buen indicador básico es el rojo de quinaldina, más fuerte que el anterior, el viré es de rosa en la forma básica a incoloro en solución ácida. En la siguiente tabla de indicadores se pueden ver los más comunes.

Tabla de indicadores.

CONSTANTES DE FORMACION DE ALGUNOS INDICADORES ($K_f^{HClO_4}$), EN ACIDO ACETICO GLACIAL.

Indicador.	Constante de formación.	Color y longitud de máxima absorción.	
		Forma Básica	Forma Ácida.
Rojo de metilo	4×10^6	Rojo, 558	Incoloro.
Cristal violeta.	6×10^5 (Kf1)	Violeta, 590	Azul, 685
	2×10^2 (Kf2)	Azul, 685	Amarillo, 485
Sudán III	7×10^2	Amarillo, 612	Azul, 618
Sudán IV	5×10^2	Rojo, 540	Azul, 625
Rojo de Quinaldina.	1×10^7	Rojo, 525	Incoloro.
Verde de malaquita.	2×10^5	Verde-azul.	Amarillo.
p-Naftolbenzeína.	1×10^5	Amarillo, 454	Verde, 625.

Para la valoración de ácidos un buen indicador cuando se titula en benceno o en dimetilformamida, es el azul de timol que vira de amarillo a azul. El violeta azo(p-nitrobenceno-azoresorcina) se emplea como indicador en las valoraciones de los ácidos que son demasiado débiles para dar el punto final con azul de timol.

Es importante mencionar que la variación de color correspondiente al punto final dependerá de la base en particular y del disolvente, por lo que es recomendable para una mayor exactitud titular una muestra con indicador potenciométricamente, registrando los colores durante la valoración y escogiendo el color que marca el punto de equivalencia determinado potenciométricamente.

DETERMINACION POTENCIOMETRICA DEL PUNTO DE EQUIVALENCIA.

La potencimetría se basa en la determinación de la fuerza electromotriz de una celda química. El que esta técnica pueda aplicarse a una determinación en particular, dependerá de encontrar los electrodos adecuados.

El sistema se compone de un potenciómetro con un electrodo de medida y uno de referencia.

ELECTRODOS DE REFERENCIA.

Para determinar potenciométricamente el punto final en una

titulación en medio no acuoso, se usa al igual que en medio acuoso el electrodo de calomel saturado con solución de cloruro de potasio. Algunos autores recomiendan cambiar la solución acuosa de cloruro de potasio por solución saturada del mismo en metanol.

Otros proponen el empleo de un puente salino que contenga un disolvente no acuoso en la parte que entra en contacto con la solución problema para que el potencial no varíe con las propiedades ácido-básicas del agua. Otro electrodo de referencia que se ha empleado para este tipo de titulaciones es de plata-cloruro de plata con un puente salino de solución saturada de cloruro de potasio en dimetilsulfóxido.

ELECTRODOS DE MEDIDA.

El electrodo de vidrio es el más empleado debido a que proporciona resultados satisfactorios tanto para ácidos como para bases en una gran variedad de disolventes. Sin embargo, cuando se utiliza este electrodo en disolventes no acuosos de carácter muy básico se tienen errores muy grandes debidos a la falta de moléculas de agua entre las superficies de la membrana de vidrio, las cuales son extraídas por la acción deshidratante del disolvente, además al titular con metóxidos se produce el error alcalino por lo que se utilizan otros tipos de electrodos como pueden ser el de oro, platino o platino polarizado.

DETERMINACION DEL PUNTO DE EQUIVALENCIA.

Métodos gráficos y métodos matemáticos.

Métodos gráficos.- estos se basan en la curva que resulta al graficar pH o mV en función del volumen del titulante.

Método de la bisección.- Esta técnica representada en la Figura (9) suele aplicarse a curvas relativamente simétricas, donde se obtienen secciones aproximadamente rectas antes y después del punto de equivalencia.

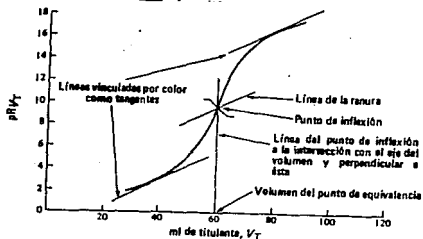


Figura 9.

Método de las tangentes paralelas.- Se trazan dos tangentes paralelas que toquen, cada una en un punto a la curva una antes del punto de equivalencia y la otra después del punto de equivalencia, y a partir de estos puntos se mide la misma distancia en dirección al centro de la curva, enseguida se unen estos dos puntos y el lugar donde cruzan la curva corresponde al punto de equivalencia. Figura (10).

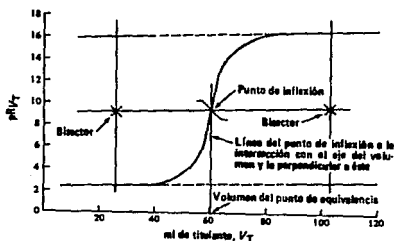


Figura 10.

Método de los Círculos.- Se trazan círculos cuyas curvaturas correspondan a las secciones inmediatamente anterior y posterior al punto de equivalencia, tratando de que el círculo toque el mayor número de puntos de la curva, enseguida se unen con una recta los centros de cada círculo, y donde esta línea cruza la curva, es el punto de equivalencia. Figura (11).

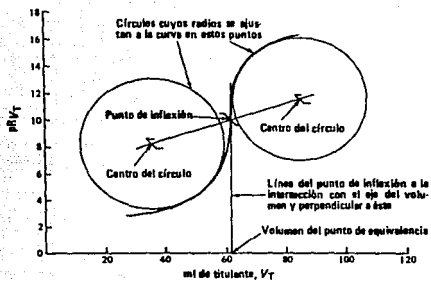


Figura 11.

METODOS MATEMATICOS

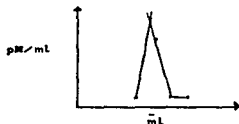
METODO DE LA PRIMERA DERIVADA

Ejemplo:

Con los datos de mililitros de titulante (Columna 1) y pH o mV (Columna 2), obtener los siguientes valores:

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5	Columna 6
ml de tit	pM	$\bar{m}l$	pM	ml	pM/ml
(X1) 0.00	(X1) 4.30	----	----	----	
(X2) 0.05	(X2) 4.60	0.025	0.3	0.05	6.0
(X3) 10.00	(X3) 7.00	0.075	2.4	0.05	4.8
10.05	6.40	10.025	2.4	0.05	4.8
10.10	6.70	10.075	0.3	0.05	6.0
10.20	10.00	10.150	0.3	0.05	6.0

- 1.- Obtener los mililitros promedio, ($\bar{m}l$, columna 3), de la siguiente manera: $x_1 + x_2$ de la columna 1 entre 2, $x_2 + x_3$ entre 2, etc.
- 2.- Obtener el valor del incremento en pH, (pM, columna 4), de los datos de la columna 2 restando $x_2 - x_1$, $x_3 - x_2$, etc.
- 3.- Obtener el incremento en mililitros, (ml, columna 5), restando de la columna 1, $x_2 - x_1$, $x_3 - x_2$, etc.
- 4.- Obtener el pM/ml, (columna 6), dividiendo los valores de la columna 4 entre los de la columna 5.
- 5.- Graficar pM/ml, (columna 6), contra $\bar{m}l$, (columna 3), unir los puntos de la gráfica, prolongar si es necesario. El punto donde se unan corresponde al volumen de titulante en el punto de equivalencia.



METODO DE LA SEGUNDA DERIVADA

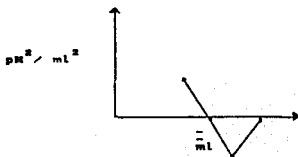
Ejemplo:

A partir de los datos de la primera derivada, (columnas 3,4 y 5) se obtienen los siguientes valores.

Column 3	Column 4	Column 5	Column 7	Column 8	Column 9	Column 10
\bar{ml}	pH	ml	\bar{ml}	pH^2	ml^2	pH^2 / ml^2

(X1) 9.025	(X1) 0.8	0.05	-----	-----	-----	
(X2) 9.975	(X2) 2.4	0.05	9.05	2.1	0.0	2.1
(X3) 10.025	(X3) 2.4	0.05	10.00	0.0	0.0	0.0
10.075	0.8	0.05	10.05	-2.1	0.0	-2.1
10.100	0.8	0.05	10.11	0.0	0.0	0.0

- 1.- Obtener el promedio de los mililitros promedio, (\bar{ml} , columna 7), de la siguiente manera: $x_1 + x_2$ de la columna 3 entre 2, $x_2 + x_3$ entre 2, etc.
- 2.- Obtener el incremento de los incrementos de pH, (pH^2 , columna 8), de los datos de la columna 4 restando $x_2 - x_1$, $x_3 - x_2$, etc.
- 3.- Obtener el incremento de los incrementos de mililitros, (ml^2 , columna 9), de la columna 5, restando $x_2 - x_1$, $x_3 - x_2$, etc.
- 4.- Obtener el pH^2 / ml^2 , (columna 10), dividiendo los valores de columna 8 entre los de la 9, si los valores de la columna 9 son diferentes a cero, si iguales a cero la columna 10 será igual a la columna 8.
- 5.- Graficar el pH^2 / ml^2 , (columna 9), contra \bar{ml} , (columna 7), el punto de la grafica donde cruza con el eje X, corresponde al punto de equivalencia.



**GENERALIDADES
SOBRE
VALIDACION DE
METODOS ANALITICOS**

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

En todo laboratorio farmacéutico es necesario contar con métodos analíticos adecuados para cuantificar los diferentes principios activos, tanto durante el desarrollo de una nueva formulación como en la fabricación del producto. Es indispensable que el método analítico sea confiable para garantizar que el medicamento lleve realmente la cantidad correcta de fármaco, ya que de esto, además de otros aspectos de la formulación, dependerá que el paciente se cure o no.

Por esta razón es necesario demostrar la efectividad y confiabilidad de las técnicas analíticas. Para cubrir esta necesidad se requiere llevar a cabo la "Validación de métodos analíticos", que puede definirse como el proceso por el cual queda establecido después del tratamiento estadístico de una serie de experiencias de laboratorio, que el método analítico es confiable para cuantificar una sustancia, por cualquier químico en cualquier momento.

El tratamiento estadístico consiste en obtener una serie de parámetros y compararlos contra un criterio establecido, si el método cumple con el criterio se considera que ha quedado validado, considerándolo confiable.

Durante la validación se trabaja inicialmente con el principio activo, para determinar si el método lo detecta adecuadamente.

enseguida se cuantifica el principio activo en placebos adicionados, para saber si los excipientes interfieren, y finalmente se analiza el producto terminado, en donde se evalúa si el procedimiento de manufactura afecta a la formulación, de manera que evite cuantificar el principio activo.

El criterio de aceptación dependerá de la complejidad del método analítico y de la forma farmacéutica, ya que no es lo mismo trabajar con tabletas, que con cremas en donde se presenta mayor dificultad en el análisis, debido a que en ocasiones el principio activo es soluble en los mismos disolventes que los excipientes.

La validación es un cúmulo de experimentos sucesivos con el fin de establecer que tan variable y exacto es el método.

La validación se enfoca a conocer el error de los métodos analíticos y si ese error es menor que el establecido, se considera validado.

Actualmente la validación del método analítico es una parte integral del desarrollo de un medicamento por lo que no es posible considerarlos por separado.

DEFINICIONES DE TERMINOS RELACIONADOS CON VALIDACION

LINEARIDAD.- La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

INTERVALO.- Concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método descrito es preciso, exacto y lineal.

EXACTITUD.- Concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de sustancia.

PRECISION.- Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea de producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones de operación.

REPETIBILIDAD. - Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio etc).

REPRODUCIBILIDAD. - Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

LIMITE DE DETECCION. - Es la mínima concentración de la sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

LIMITE DE CUANTIFICACION. - Es la menor concentración de una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

ESPECIFICIDAD. - Es la habilidad del método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

TOLERANCIA. - Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo

modificaciones de las condiciones normales de operación. tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, modificación de las diluciones, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales , etc.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.- Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

PASOS PARA LLEVAR A CABO LA VALIDACION DE UN METODO ANALITICO

- 1.- Hacer una revisión bibliográfica exhaustiva, acerca de las propiedades de la sustancia y los métodos reportados para cuantificarla. Esto permitirá ahorrar tiempo y trabajo.
- 2.- Definir el criterio de aceptación con base en el tipo de método y forma farmacéutica.
- 3.- Determinar si se cuenta con el equipo y reactivos necesarios.
- 4.- Capacitar al personal.
- 5.- Hacer estudios preliminares para determinar el método con más

posibilidades de éxito, así como las posibles fuentes de error.

Es indispensable llevar un registro experimental de ***todas*** prueba experimental que se realice, aún las que no proporcionen resultados adecuados. Este registro debe llevarse de tal manera que cualquier persona capacitada, pueda conocer con exactitud los avances del experimento en cualquier momento.

6.- Validación: llevar a cabo las determinaciones necesarias para la validación siguiendo el siguiente orden:

6.1.- Pruebas para conocer la respuesta del sistema utilizado, se trabaja con estándares de concentración conocida. (Linealidad y precisión del sistema.)

6.2.- Pruebas con el placebo adicionado de diferentes cantidades de estándar. (Linealidad y exactitud del método). Especificidad con el placebo únicamente.

6.3.- Pruebas para el producto terminado.(precisión del método, expresada como repetibilidad y reproducibilidad, estabilidad de la muestra y tolerancia del método).

Notas:

Es necesario evaluar estadísticamente cada uno de los pasos o experimentos inmediatamente para conocer si cumple o no con el criterio establecido antes de pasar a otra prueba. Esto tiene por

objeto determinar desde un principio y paso a paso si el método cumple o no con el propósito para el cual esta siendo desarrollado y evitar gasto de tiempo y trabajo innecesario.

Todas las determinaciones necesarias para la validación del método deben ser realizadas por una sola persona con excepción de la reproducibilidad en donde se requiere más de una persona.

Los resultados parciales o finales de la validación pueden dar como conclusión que:

1.- El método es confiable y por consiguiente se considera validado.

2.- Requiere modificaciones y una vez llevadas a cabo, iniciar o completar la validación.

3.- El método no es confiable para cuantificar a la sustancia problema entonces es necesario desarrollar una nueva técnica e iniciar la validación.

PARAMETROS A DETERMINAR

Linealidad del sistema.- Es la relación que se establece mediante una recta, entre una propiedad química o biológica con la cantidad de fármaco, en el caso de un método analítico es la relación entre la cantidad adicionada y la respuesta del aparato o equipo.

Se determina construyendo una curva de calibración, (cantidad adicionada contra respuesta obtenida), de una misma solución patrón utilizando cuando menos cinco diluciones correspondientes a cinco concentraciones, dos arriba del 100 % y dos abajo, usualmente 80 %, 60 %, 100 %, 120 %, 140 %, haciendo el análisis por duplicado para cada dilución.

Criterio de aceptación:

$$C.V. \leq 1.5 \%$$

$$r \geq 0.99 \quad r^2 \geq 0.98$$

Nota: Para métodos microbiológicos $r \geq 0.98$

Precisión del sistema.- Se determina analizando por sextuplicado una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

Criterio de aceptación:

$$C.V. \leq 1.5 \%$$

Nota: Para métodos microbiológicos $C.V. \leq 3 \%$

Linealidad del método.- Se determina a partir de placebos adicionados con la sustancia de interés, cada uno de manera independiente, utilizando un mínimo de tres concentraciones incluyendo el 100 % haciendo el análisis por triplicado para cada dilución.

El objetivo de esta determinación es conocer el intervalo de concentraciones en el cual la respuesta es lineal, en este intervalo los excipientes no deben presentar ninguna interferencia para la cuantificación del principio activo.

Se grafica cantidad adicionada contra cantidad recuperada.

Criterio de aceptación:

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada.

$$m = 1 \quad b = 0 \quad r^2 \geq 0.98$$

Los por cientos recuperados y los C.V. a cada nivel y el global de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo a la Tabla 1.

Tabla 1

	PROBIO DE RECIBO	C. V.
METODO:		
CRONATOGRAFICOS	98 - 102 %	≤ 2 %
TITRIMETRICOS	98 - 102 %	≤ 2 %
QUIMICOS Y ESPECTROFOTOME- TRICOS	97 - 103 %	≤ 3 %
MICROBIOLOGICOS	95 - 105 %	≤ 5 %

Nota: Para suspensiones y semisólidos se acepta una ampliación del 1 % en el intervalo expresado en el promedio de recobro y el C.V. \leq 3 % .

Exactitud y repetibilidad al 100 % .- Se determina analizando cuando menos 6 placebo cargados con el 100 % de la sustancia de interés manera independiente en las mismas condiciones de operación.

Esta prueba demuestra que el método analítico es confiable cuando lo efectúa en varias ocasiones un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Criterio de aceptación:

El por ciento recuperado y el C.V. deberán de estar de acuerdo a la Tabla 1.

Precisión (Reproducibilidad).- Indica cuando se cumple con el criterio, que el método proporciona resultados confiables utilizando al efectuarse por distintos analistas y haciendo las determinaciones en días, equipos o laboratorios diferentes.

Se debe llevar a cabo con una muestra homogénea del producto terminado cercana al 100%, esta muestra se analiza cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado cada muestra.

En esta prueba además del efecto que pueden tener al trabajar con analistas, equipos, laboratorios o días diferentes se evalúa el efecto que tiene el procedimiento de manufactura de la forma farmacéutica sobre la formulación, para la cuantificación del principio activo.

Es importante que la muestra se homogenice y se conserve adecuadamente, para evitar tener resultados erróneos debidos a estos factores.

Criterio de aceptación:

El C.V. deberá estar de acuerdo a la tabla 1.

Estabilidad de la muestra.- Esta prueba es muy importante, ya que muchas veces es necesario suspender un análisis por diversas razones para continuarlo después. El objetivo es conocer las condiciones y tiempo durante las cuales la muestra mantiene sus características originales.

Se determina analizando muestras almacenadas a diferentes condiciones, como pueden ser temperatura ambiente, refrigeración protegidos de la luz etc., durante diferentes tiempos, para después reanalizar las muestra bajo las mismas condiciones de operación, comparando los resultados con el análisis inicial.

Nota: Esta prueba se hace con la muestra lista para leer, inyectar o titular.

Criterio de aceptación.-

LA muestra es estable si el intervalo de Confianza para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no excede los siguientes porcentajes:

Cromatográficos	$\pm 2 \%$
Titrimétricos	$\pm 2 \%$
Químicos y espectrofotométricos	$\pm 3 \%$
Microbiológicos	$\pm 5 \%$

Tolerancia del sistema.- En esta prueba se varían ligeramente las condiciones del método analítico como son: cambios de pH, composición de la fase móvil, columnas, reactivos, temperaturas etc. y se determina si existen diferencias en los resultados con respecto al análisis realizado en condiciones normales de operación.

Criterio de aceptación: C.V. $\leq 3 \%$

FUENTES DE ERROR

- Reactivos contaminados, mal preparados, mal normalizados o caducos.
- Material sucio, contaminado o roto.
- Equipo e instrumentos: descalibrados o mal manejados.
- Factores ambientales: condiciones extremas de temperatura y/o humedad.
- Evaporación de solventes.
- Alteración del principio activo por cambios de valores de pH.
- Manejo inadecuado de la muestra.
- Personal : No capacitado o mal capacitado.
- Método: Los errores determinados cuando no se detectan, el escribir sin el suficiente detalle.

D E S A R R O L L O Y
U A L I D A C I O N D E L
M E T O D O A N A L I T I C O

DESARROLLO DEL METODO.

Como se mencionó en la introducción, el propósito de este trabajo fué desarrollar un método que presente ventajas sobre los ya reportados, los cuales constan de un gran número de pasos además de carecer de reproducibilidad con la formulación empleada.

Por ser el nitrato de miconazol una sal de amonio con carácter básico débil y baja solubilidad en agua se contempló la posibilidad de titularlo en medio no acuoso, (ácido acético glacial), con ácido perclórico como en el caso del análisis de materia prima; esto solo sería posible si se lograra extraer cuantitativamente de la crema sin que la cantidad de excipientes arrastrados interfirieran en la titulación.

Antes de desarrollar el sistema de extracción se realizó la linealidad del sistema para determinar dentro de que intervalo de cantidades la respuesta, (ml de $HClO_4$ gastados), era lineal, resultando un intervalo entre 120 y 240 mg de nitrato de miconazol. Este experimento se hizo disolviendo el nitrato de miconazol en 75 ml de ácido acético glacial y titulando con solución 0.05 N de ácido perclórico; se justifica el empleo de esta concentración ya que en el centro del intervalo encontrado corresponde a un volumen de 8 ml el cual constituye el 80 % de la capacidad de una bureta de 10 ml lo cual es muy recomendable para minimizar errores debidos a la lectura en los métodos titulométricos.

Después de este experimento se realizó la precisión del sistema la cual se hizo titulando 200 mg de nitrato de miconazol obteniendo un volumen de titulante entre 8 y 9 ml y un coeficiente de variación igual a 0.37 %.

En seguida se procedió a desarrollar un sistema para extraer de la crema 200 mg de nitrato de miconazol.

- Desarrollo del sistema de extracción.

Cantidad de crema: 10 g (equivalentes a 200 mg de nitrato de miconazol).

pka : 6.7

pH de la crema: entre 3 y 4

A pesar de ser una sal el nitrato de miconazol no es soluble en agua debido a su estructura de carácter no polar (Fig. 14)

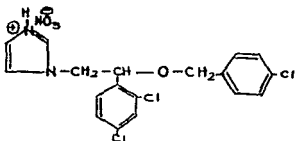


Figura 14.

Ya que el pH de la crema está entre 3 y 4 más del 99.9 % del nitrato de miconazol se encuentra en forma de sal.

Por los valores reportados de solubilidad de nitrato de miconazol en cloroformo y por ser más denso que el agua se decidió probar con este solvente. Para determinar el volumen de extracción y el número de extracciones se realizó el siguiente experimento.

Técnica.

Colocar en un embudo de separación de 125 ml un volumen de 35 ml de agua, adicionar la cantidad de nitrato de miconazol indicada en la Tabla 1, agregar 30 ml de cloroformo, agitar durante 3 minutos, recibir la fase inferior en un matraz erlenmeyer de 125 ml, evaporar en baño maría casi a sequedad, reconstituir con 75 ml de ácido acético glacial, agregar 3 gotas de cristal violeta y titular con solución 0.05 N de ácido perclórico hasta aparición de un color verde esmeralda.

TABLA 1

mg adicionados	mg recuperados	% de recuperacion.
200.0	187.4	93.70
200.2	185.0	92.90
200.1	186.8	93.38

$$\% \text{ remanente} = 100 - 93.32 = 6.68$$

Esto indica que el por ciento recuperado con una extracción es bastante elevado más no lo suficiente para emplear una sola extracción. Teóricamente para 2 y 3 extracciones se tendrían los por cientos de extracción de la Tabla 2.

TABLA 2

NUMERO DE EXTRACCIONES	% EXTRAIDO	% NO EXTRAIDO
1	93.32	6.68
2	99.55	0.45
3	99.97	0.03

Como se observa en la Tabla 2, son necesarias 3 extracciones para tener un sistema cuantitativo, para corroborar que esto realmente sucede se extrajo una cantidad (200 mg) suspendidos en agua con tres porciones de 30ml obteniendose un por ciento de recuperación del 99.93 % lo cual confirma lo que marca la Tabla 2.

El siguiente experimento se efectuó para determinar si el nitrato de miconazol podría ser extraído cuantitativamente en presencia de los excipientes. Para lo cual se titularon placebos

adicionados con 200 mg de nitrato de miconazol obteniéndose porcentajes de recuperación que van desde 98.5 a 100.75 % con base en esto se consideró al método adecuado para proceder a optimizarlo y validarlo.

Durante la validación se hicieron las siguientes modificaciones:

- La crema se pesa por diferencia en una jeringa de 10 ml lo cual facilita su transferencia al embudo de separación sin pérdida alguna.
- Se calientan los 35 ml de agua entre 60 y 70 °C se depositan en el embudo donde se recibirá la crema, esto para evitar que porciones de crema pudieran quedar ocluidas en la parte más angosta del embudo y favorecer con esto la fusión de la crema para su posterior extracción, además se agita durante un minuto con el agua antes de ser extraído.
- La evaporación de los extractos clorofórmicos se lleva hasta que quedan entre 2 y 3 ml de cloroformo, debido de que al evaporar a sequedad se forma una pasta que tarda mucho en disolverse en el ácido acético glacial.
- Se mide la temperatura del titulante para corregir la variación que tiene la concentración por la dilatación o contracción de la

solución .

El método que se validó incluye dos maneras de determinar el punto final: potenciométricamente y usando un indicador visual.

El método optimizado que se validó fue el siguiente:

Vaciar el contenido de 2 tubos en un vaso de precipitados homogenizar la muestra, llenar con la cresa una jeringa de 10 ml a su máxima capacidad, pesar por diferencia el equivalente a 200 mg de nitrato de miconazol (10g) y transferir a un embudo de separación con 35 ml de agua destilada a una temperatura entre 60 y 70 °C , agitar durante 1 minuto. Extraer el nitrato de miconazol con 3 porciones de 30 ml de cloroformo, agitar 3 minutos en cada extracción, recibir los extractos clorofórmicos en un matraz erlenmeyer si el punto final se determinará usando indicador o en un vaso de precipitados si se usará un método potenciométrico.

Evaporar los extractos clorofórmicos hasta que queden aproximadamente 2 ml, reconstituir con 75 ml de ácido acético glacial, agregar tres gotas de cristal violeta o introducir el electrodo combinado (vidrio y calomel), titular con solución 0.05 N de ácido perclórico a la cual se le determinó previamente la temperatura, hasta aparición de un color verde esmeralda o registrar los potenciales a lo largo de la titulación y determinar el punto final gráficamente o usando un método matemático.

Hacer la determinación de un blanco para hacer la corrección

correspondiente.

- Preparación de la solución de ácido perclórico 0.05 N.

Mezclar 4.25 ml de ácido perclórico comercial (70-72 %) con 500 ml de ácido acético glacial, adicionar 10.5 ml de anhídrido acético, enfriar y adicionar ácido acético glacial para hacer un litro. Dejar reposar 24 h la solución para que el anhídrido acético reaccione con el agua presente.

- Normalización de la solución de ácido perclórico 0.05 N.

Pesar con exactitud alrededor de 200 mg de biftalato de potasio previamente secado a 120°C por 2 horas, disolver en 75 ml de ácido acético glacial, adicionar tres gotas de cristal violeta y titular con la solución de ácido perclórico hasta que el color cambie a verde esmeralda. Hacer tres determinaciones y obtener el promedio. Registrar la temperatura del titulante y hacer la determinación de un blanco para la corrección correspondiente.

Cálculos:

$$N = \frac{\text{masa de biftalato (mg)}}{(\text{Vol de la muestra} - \text{vol del blanco}) \text{ ml} \times \text{Eq. bift.}}$$
$$N = \frac{\sum N}{n} \quad \text{Eq. bift.} = 204.2 \text{ mg/eq}$$

- Corrección de la normalidad por efecto de la temperatura.

En el caso que la temperatura sea diferente a la temperatura de normalización restar 0.0001 por cada grado de ascenso, y sumar 0.0001 por cada grado de descenso de la temperatura.

VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE NITRATO
DE MICONAZOL EN CREMA.
EMPLEANDO INDICADOR (CRISTAL VIOLETA) Y UN METODO
POTENCIOMETRICO.

Los parámetros que se evaluaron para validar el método fueron los siguientes:

- Linealidad del sistema.
- Precisión del sistema.
- Linealidad del método.
- Precisión: Repetibilidad. Exactitud al 100% y
Reproducibilidad.
- Especificidad.

LINEARIDAD DEL SISTEMA

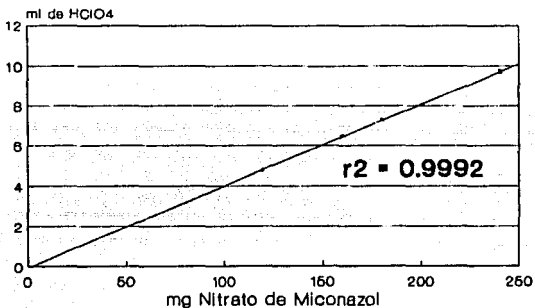
Se determinó haciendo una curva de calibración de diferentes cantidades del fármaco vs volumen de titulante, empleando muestras pesadas independientemente, utilizando cinco cantidades disueltas en ácido acético glacial y tituladas con solución 0.05 N DE HClO₄, haciendo el análisis por duplicado.

LINEARIDAD DEL SISTEMA

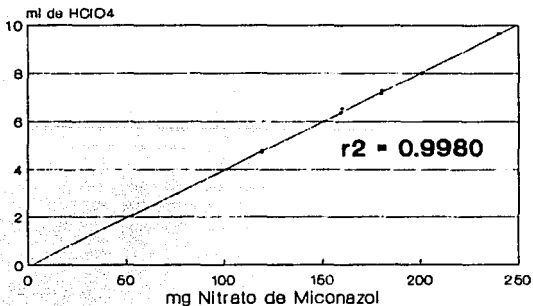
CANTIDAD DE Ni ²⁺ NO ₃ (mg)	ml de HClO ₄ (INDICADOR)	ml de HClO ₄ (POTENC.)	F (ml/mg) (IND)	F (ml/mg) (POTEN)
110.0	4.75	4.70	0.039715719	0.039207658
110.0	4.80	4.77	0.040033361	0.039783152
150.2	6.42	6.35	0.040320033	0.039990034
150.0	6.47	6.51	0.040462789	0.040712045
180.2	7.30	7.13	0.040510543	0.039907147
180.0	7.25	7.20	0.040166204	0.040221606
200.4	8.05	7.99	0.040160000	0.039870259
200.0	8.05	8.00	0.040120011	0.039880398
240.1	9.75	9.64	0.040600079	0.040149937
240.0	9.65	9.64	0.040124740	0.040083160

PARAMETRO	RESULTADOS		CRITERIO
	INDICADOR	POTENCIOMETRICO	
COEFICIENTE DE DETERMINACION (r ²)	0.9992	0.998	≥ 0.98
COEFICIENTE DE VARIACION (c.v.)	0.0500 %	0.0018 %	≤ 1.5 %

LINEARIDAD DEL SISTEMA NITRATO DE MICONAZOL (INDICADOR)



LINEARIDAD DEL SISTEMA NITRATO DE MICONAZOL (POTENCIOMETRICO)



PRECISION DEL SISTEMA

Se determinó analizando por sextuplicado muestras de principio activo pesadas independientemente correspondientes al 100%.

VOLUMEN (ml) INDICADOR	PORCENTAJE DE RECUPERACION	VOLUMEN (ml) POTENCIOMETRICO	PORCENTAJE DE RECUPERACION
8.18	100.15	8.16	100.05
8.18	100.05	8.16	100.00
8.23	100.70	8.21	100.71
8.18	100.06	8.16	100.01
8.20	100.56	8.27	100.51
8.23	100.88	8.21	100.83

PARAMETRO	RESULTADOS		CRITERIO
COEFICIENTE DE VARIACION (C.V.)	INDICADOR 0.37 %	POTENCIOMETRICO 0.46 %	C.V. \leq 1.5 %

LINEARIDAD DEL METODO

Se efectuó analizando placebos cargados independientemente, a tres diferentes concentraciones incluyendo el 100% y haciendo el análisis por triplicado.

LINEARIDAD DEL METODO

%	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (INDICADOR)	CANTIDAD RECUPERADA (POTENCIOMET)	POR CIENTO RECUPERADO (INDICADOR)	POR CIENTO RECUPERADO (POTENCIOM)
85	170.5	171.5	171.5	100.60	100.28
	169.8	168.0	167.6	98.98	98.70
	170.1	168.7.5	168.5	99.18	99.06
100	201.4	202.2	201.7	100.38	100.15
	201.5	202.9.	201.7	100.68	100.10
	198.7	199.4	198.7	100.35	100.00
120	243.1	242.2	241.7	99.63	99.42
	234.0	234.3	233.6	100.13	99.83
	243.0	243.6	242.6	100.25	99.83

RESULTADOS

A) Cantidad adicionada VS Cantidad recuperada.

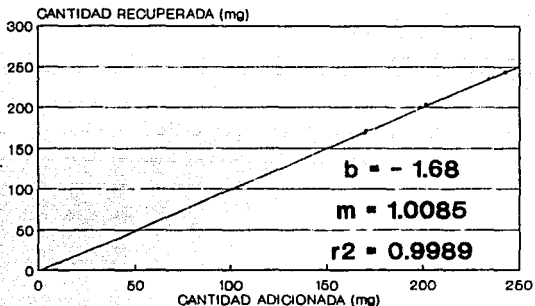
PARAMETRO	INDICADOR	POTENCIOMETRICO	CRITERIO
Pendiente (m)	1.0065	1.0047	m = 1
Intercepto (b)	-1.668	-1.57	b = 0
Coef. de (r ²) determinación	0.9989	0.9988	r ² ≥ 0.98

B) Con respecto al por ciento recuperado.

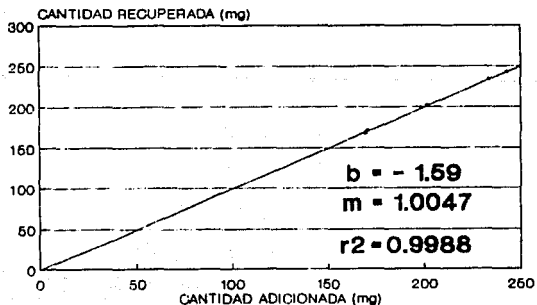
PARAMETRO	INDICADOR	POTENCIOMETRICO	CRITERIO
Promedio % recuperado (\bar{x})	100.02	99.71	98 - 102 %
C. V. GLOBAL	0.62	0.54	≤ 2 %

NIVEL	C. V. (INDICADOR)	C. V. (POTENCIOMETRICO)	Criterio
95 %	0.35 %	0.84 %	≤ 2 %
100 %	0.15 %	0.08 %	
120 %	0.33 %	0.24 %	

LINEARIDAD DEL METODO NITRATO DE MICONAZOL (INDICADOR)



LINEARIDAD DEL METODO NITRATO DE MICONAZOL (POTENCIOMETRICO)



EXACTITUD DEL METODO

Se determinó analizando por sextuplicado placebos cargados independientemente con cantidades correspondientes al 100 %.

CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	POR CIENTO RECUPERADO	POR CIENTO RECUPERADO
	INDICADOR	POTENCIOMET.	INDICADOR	POTENCIOMET.
201.4	202.2	201.7	100.39	100.15
201.5	202.9	201.7	100.69	100.10
199.7	199.4	198.7	100.35	100.00
202.0	202.7	202.0	100.35	100.00
199.2	198.5	198.2	99.65	99.50
199.2	194.8	194.5	99.28	99.13

RESULTADOS

PARAMETRO	INDICADOR	POTENCIOMETRICO	CRITERIO
Promedio (\bar{x})	100.12 %	99.81 %	98 - 102 %
Coef. de variación (C.V.)	0.53 %	0.41 %	≤ 2 %

REPRODUCIBILIDAD

Se llevo a cabo por dos analistas en dos días diferentes analizando una misma muestra por triplicado y utilizando el mismo equipo.

		INDICADOR		POTENCIOMETRICO	
		ANALISTA		ANALISTA	
		1	2	1	2
D	1	101.05	102.13	100.50	100.56
		102.75	100.79	100.70	101.30
		100.66	101.26	100.76	100.42
A	2	101.11	102.50	101.11	101.19
		101.70	101.87	100.83	100.74
		102.71	102.54	101.01	100.92
		C. V. = 0.76 %		C. V. = 0.27 %	

CRITERIO: C. V. < 2 %

PRUEBA DE ANADVA

Se aplica para determinar si existe un efecto debido a diferentes analistas, días o día-analista.

Criterio:

Si $F_{TEORICA} > F_{CALCULADA}$.

No existe ningún efecto debido al analista, día o día-analista.

	ANALISTA	
DIA	1	2
1	Y_{111}	Y_{211}
	Y_{112}	Y_{212}
	Y_{113}	Y_{213}
2	Y_{121}	Y_{221}
	Y_{122}	Y_{222}
	Y_{123}	Y_{223}

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD.	SUMA DE CUADRADOS.	CUADRADO MEDIO.	F CALCULADA.
ANALISTA l	$(l-1)$	$\frac{sy^2 l}{jk} - \frac{sy^2 ..}{ljk}$	$\frac{sc_l}{l-1}$	$\frac{cm_l}{cm_k}$
DIA j	$(j-1)$	$\frac{sy^2 j}{lk} - \frac{sy^2 ..}{ljk}$	$\frac{sc_j}{j-1}$	$\frac{cm_j}{cm_k}$
ANALISTA DIA j	$(l-1)(j-1)$	$\frac{sy^2 lj}{k} - \frac{sy^2 l}{jk} - \frac{sy^2 j}{lk} + \frac{sy^2 ..}{ljk}$	$\frac{sc_{lj}}{(l-1)(j-1)}$	$\frac{cm_{lj}}{cm_k}$
ERROR(lj(k-1))	$(j(k-1))$	$sy^2 ljk - \frac{sy^2 lj}{k}$	$\frac{sc_k}{(j(k-1))}$	

Cálculos:

$$S_y^2 \dots = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + \dots + Y_{223})^2$$

$$S_y^2(j) = Y_{111}^2 + Y_{112}^2 + Y_{113}^2 + Y_{121}^2 + Y_{122}^2 + Y_{123}^2 + Y_{211}^2 + \dots + Y_{223}^2$$

$$S_y^2(j) = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + \dots + Y_{223})^2$$

$$S_y^2(i) = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$S_y^2(i) = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + \dots + Y_{223})^2$$

Donde:

l = Número de analistas.

j = Número de días.

k = Número de replicaciones por día y por analista.

S_y²... Suma total cuadrada de los porcentajes cuantificados por ambos analistas a los dos diferentes días.

S_y²_j Suma total cuadrada de los porcentajes obtenidos por ambos analistas en un solo día.

S_y²_i Suma total cuadrada de los porcentajes obtenidos por un solo analista en ambos días.

S_y²_{ijk} Suma total cuadrada de cada uno de los porcentajes obtenidos por ambos analistas en ambos días.

S_y²_{ij} Suma total cuadrada de los porcentajes obtenidos por cada uno de los analistas en cada uno de los días.

a = Analista.

d = Día.

e = Error

g.l. = Grados de libertad.

F_a = Valor de F de Fischer a un nivel acumulado de 0.95 con g.l.a en el numerador y g.l.e en el denominador.

F_d = Valor de F de Fischer a un nivel acumulado de 0.95 con g.l.d en el numerador y g.l.e en el denominador.

F_{a/d} = Valor de F de Fischer a un nivel acumulado de 0.95 con g.l.a/d en el numerador y g.l.e en el denominador.

ANALISIS DE VARIANZA

Método con indicador

Fuente de variación.	Grados de libertad.	Suma de cuadrados.	Cuadrado medio.	F Calculada.	F Teórica.
ANALISTA.	1	0.1027	0.1027	0.1047	5.82
DIA.	1	1.107	1.1070	1.0204	5.80
ANALIS/DIA	1	0.2224	0.2224	0.0728	5.80
ERROR.	8	4.0864	0.0288		

Hipótesis:

SI $F_{TEORICA} > F_{CALCULADA}$

No existe ningún efecto debido al analista, día o analista/día.

Por lo tanto se acepta la hipótesis y en el método no existe ningún efecto debido al analista, día o analista/día.

ANALISIS DE VARIANZA

Método potenciométrico.

Fuente de variación.	Grados de libertad.	Suma de cuadrados.	Cuadrado medio.	F Calculada.	F Teórica.
ANALISTA.	1	0.0040	0.0040	0.0510	5.32
DIA.	1	0.2028	0.2028	2.5866	5.32
ANALISTA/DIA	1	0.0147	0.0147	0.1870	5.32
ERROR.	8	0.0271	0.0784		

Hipótesis:

$$S_i F_{TEORICA} > F_{CALCULADA}$$

No existe ningún efecto debido al analista, día o analista/día.

Por lo tanto se acepta la hipótesis y en el método no existe ningún efecto debido al analista, día o analista/día.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Se analizaron muestras de un lote de análisis inicial conocido después de mantenerlas en las condiciones descritas a continuación para determinar si son estables o no.

LOTE 8911037 Muestra	Inicial	Temperatura Ambiente SIN EVAPORAR		Temperatura Ambiente EVAPORADAS	
		1 h	48 h	1 h	48 h
1	100.06	93.25	87.17	92.07	86.22
2	101.05	94.10	85.28	92.20	88.09

RESULTADOS

-Intervalo de confianza para la diferencia de las medias.

Horas	Muestras a T.A. sin evaporar Intervalo de confianza	Muestra a T.A. evaporadas Intervalo de confianza
2	- 6.28 a - 8.07	- 8.33 a - 9.18
48	- 12.79 a - -16.46	- 11.86 a -15.54

Criterio: El intervalo de confianza debe incluir el valor de cero

Resultado: Las muestras evaporadas y sin evaporar no son estables en las condiciones ensayadas.

- Factor I.

CONDICION	SIN EVAPORAR		EVAPORADAS	
	1 h	48 h	1 h	48 h
FACTOR (I)	92.88%	85.40%	91.35%	86.41 %

Criterio: La media del factor (I) para cada condición deberá encontrarse entre el 98 y 102 %.

Resultado: La media del factor (I) para las condiciones ensayadas no se encuentra entre los límites establecidos, las muestras no son estables en las condiciones ensayadas.

TOLERANCIA

Se probó un cambio en el grado del ácido acético de R.A. a grado industrial, se titularon muestras de diferentes lotes no encontrándose un efecto sobre el método desarrollado.

COMPARACION ESTADISTICA DE LOS METODOS VALIDADOS

Para demostrar que los métodos son equivalentes se compararon los resultados obtenidos utilizando la prueba de t de Student tomando en cuenta la siguiente hipótesis:

Si teorica > texperimental

Las diferencias entre los dos métodos no son significativas.

Si teorica < texperimental

Las diferencias entre los dos métodos son significativas.

Linealidad del método:

Parámetro estadístico	Método con indicador	Método potenciométrico
N	6	6
x	100.02	99.77
DE	0.6185	0.5387
I.C.95%	(99.65-100.39)	(99.39-100.03)
Pendiente(m)	1.0085	1.0047
Ordenada(b)	-1.688	-1.590
Coefficiente de determinación	0.9989	0.9988
C.V.	0.62%	0.54%

Fórmulas empleadas:

$$SS = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}$$

$$S^2 = \frac{SS_{IND} + SS_{POT}}{N_{IND} - N_{POT} - 2}$$

$$S(\bar{x}_{\text{ind}} - \bar{x}_{\text{pot}}) = \sqrt{S \left[\frac{1}{N_{\text{ind}}} + \frac{1}{N_{\text{pot}}} \right]}$$

$$t_{\text{experimental}} = \frac{\bar{x}_{\text{ind}} - \bar{x}_{\text{pot}}}{S(\bar{x}_{\text{ind}} - \bar{x}_{\text{pot}})}$$

Grados de libertad = $N_{\text{ind}} + N_{\text{pot}} - 2$

Donde:

S^2 = Varianza del número total de observaciones.

N_{ind} y N_{pot} = Número total de observaciones experimentales en los métodos con indicador y potenciométrico respectivamente

\bar{x}_{ind} y \bar{x}_{pot} = Valor promedio de los datos experimentales en ambos métodos.

SS_{ind} y SS_{pot} = Suma del cuadrado de los datos experimentales con respecto al promedio.

teórica > experimental

Por lo tanto ambos métodos son equivalentes.

Exactitud del método.

Parámetro estadístico	Método con indicador	Método potenciométrico
\bar{x}	6	6
DE	100.12	99.81
C.V.	0.5348	0.4075
I.C.	0.53	0.41
	(99.68-100.56)	(99.44-100.18)

teórica= 1.812

experimental= 4.11.

experimental > teórica

Por lo tanto la exactitud de ambos métodos no es equivalente.

Precisión del método.

CMe 1	CMe 2	Fcalculada	Fteórica
0.6233	0.07839	7.95	3.44

Donde:

CMe 1= Cuadrado medio del error del método con indicador.

CMe 2= Cuadrado medio del error del método potenciométrico.

g.l.= Grados de libertad.

F de Fischer= Valor a un nivel acumulado de 0.95 con f.l. CMe 1 en el numerador y g.l. CMe 2 en el denominador.

$$F_{calculada} = \frac{CMe\ 1}{CMe\ 2} = \frac{0.6233}{0.0784} = 7.95$$

Fcalculada= 7.95

Por lo tanto la precisión de ambos métodos no es equivalente.

ESPECIFICIDAD

Con esta prueba se demuestra la habilidad del método para obtener respuesta debido solo a la sustancia de interés.

Especificidad del método para Control de Calidad.

Se trató el placebo de la misma manera que la muestra obteniéndose los siguientes resultados:

Volumen de HClO_4 consumido por el placebo = 0.18 ml.

Volumen de HClO_4 consumido por el blanco = 0.13 ml.

Volumen consumido por los excipientes = $0.18 - 0.13 = 0.05$ ml.

El volumen gastado por una muestra de Nitrato de Miconazol equivalente al 100 %, es igual a 8.3 ml.

El volumen consumido por los excipientes representa con respecto al volumen anterior el 0.6 %.

Este 0.6 % de respuesta del placebo no afecta significativamente si se considera que el error del método por tratarse de una crema y tener que llevar a cabo extracciones es del 3%.

Por todo lo anterior se afirma que el método cumple con la especificidad requerida para Control de Calidad.

- Especificidad del método para estudios de estabilidad.

Un método indicador de estabilidad debe ser específico, esto quiere decir que la respuesta este únicamente dada por la sustancia de interés, para métodos cromatográficos se dice que un método es específico cuando es capaz de separar la sustancia de interés de sus productos de degradación, síntesis o metabolitos además de cuantificar a la sustancia de interés.

En este trabajo se realizaron diferentes pruebas para desarrollar un método indicador de estabilidad por cromatografía en capa fina.

El sistema cromatográfico con el que se trabajó es el reportado en la USP XXII.

Fase estacionaria: Sílica gel GF 254 de 0.25 mm de espesor, previamente activada por 30 min a 80°C.

Fase móvil: Hexano:Cloroformo:Metanol:NH₄OH (60:30:10:1).

Concentración de las muestras: 500 mcg/ml en una mezcla de cloroformo-metanol 1:1.

Volumen de aplicación: 30 μ l.

Revelador: Luz UV.

El cromatograma se desarrolló 15 cm a partir del punto de aplicación, el nitrato de miconazol en estas condiciones presentó un $R_f=0.6$

Se hicieron diferentes experimentos para hacer cuantitativo el sistema cromatográfico, considerando que se necesitaba aplicar una cantidad suficiente para que al desarrollar la placa, raspar y reconstituir con un disolvente se obtuviera una lectura de absorbancia cercana a 0.4, pero debido a las siguientes razones no fue posible:

- 1.- La baja concentración de nitrato de miconazol en la crema (2%) y las solubilidades semejantes de los excipientes.
- 2.- La baja solubilidad del nitrato de miconazol impide obtener la concentración requerida en un volumen adecuado para aplicar en la placa sería necesario aplicar más de un mililitro.
- 3.- Los excipientes aumentan la cantidad de disolvente para solubilizar la muestra, esto ocasiona que se aumente aún más la cantidad a aplicar.
- 4.- El bajo coeficiente de extinción del nitrato de miconazol ocasiona que se requiera una concentración elevada para obtener una absorbancia idónea.

5.- Solubilidades semejantes de los excipientes lo cual impide obtener una óptima separación en las concentraciones usadas.

Por estas razones no fue posible cuantificar el nitrato de miconazol empleando cromatografía en capa fina.

A pesar de que no fue posible cuantificar el nitrato de miconazol se hicieron los experimentos suficientes para demostrar ~~«cualitativamente»~~ que el sistema cromatográfico escogido es capaz de separar al nitrato de miconazol de sus productos de degradación y de los excipientes.

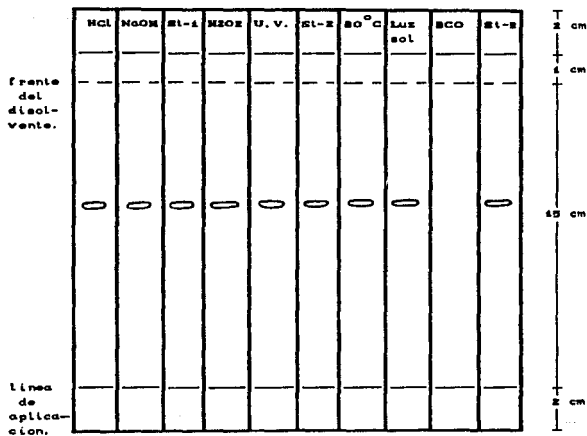
Para demostrar que el sistema cromatográfico es capaz de lograr esta separación, lo ideal sería conseguir los productos de degradación del principio activo y de los excipientes, pero esto en México, para la mayoría de los laboratorios es muy difícil debido a la dificultad y costo que representa.

Es por esto que para obtener los productos de degradación, se sometieron muestras de principio activo, placebo y producto terminado a las siguientes condiciones:

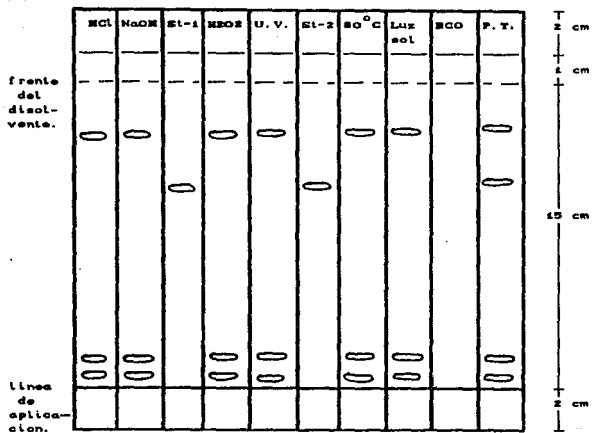
Condición	Principio activo	Placebo	Producto terminado
Reflujo HCl 0.1N metanólico.	3 h	3 h	3 h
Reflujo NaOH 0.1N metanólico.	3 h	3 h	3 h
Luz solar.	30 días	30 días	30 días
H ₂ O ₂ al 30%	30 días	30 días	30 días
Luz U.V.	30 días	30 días	30 días
80 °C	30 días	30 días	30 días

Al terminar el tiempo de exposición las muestras de cada una de las condiciones se aplicaron en el sistema cromatográfico descrito obteniéndose los siguientes resultados:

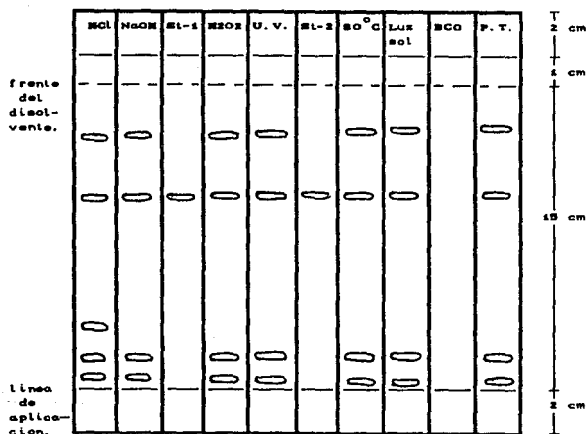
CROMATOPLACA PARA EL PRINCIPIO ACTIVO



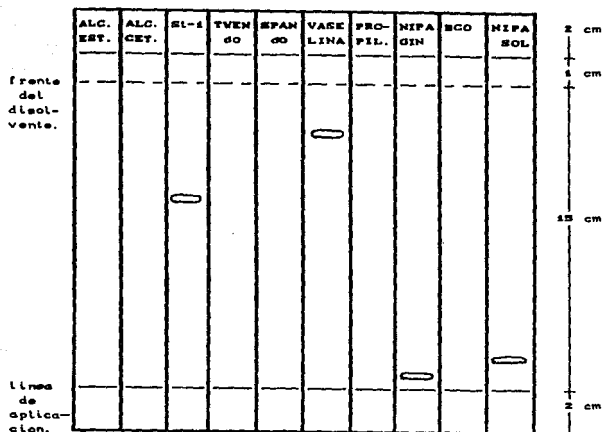
CROMATOPLACA PARA EL PLACEBO



CROMATOPLACA PARA EL PRODUCTO TERMINADO



CROMATOPLACA COMPLEMENTARIA



Los Rf's encontrados corresponden a las siguientes sustancias:

Rf	Sustancia
0.08	Metilparabeno
0.10	Propilparabeno
0.15	Producto de degradación
0.60	Nitrato de miconazol
0.80	Vaselina

Las cromatoplaacas muestran que la Única condición donde hay degradación es en medio ácido (Rf= 0.15), también se aprecia que el sistema es capaz de separar al nitrato de miconazol de los componentes de la formulación.

Para corroborar que no existe otro producto de degradación "bajo" la mancha del principio activo, se raspó esta y se aplicó en otra cromatoplaaca y se desarrolló en el sistema formado por CHCl₃:Hexano:NH₄OH (30:60:1), observandose como resultado en todos los casos una sola mancha con un Rf= 0.7, este experimento comprueba que la mancha con un Rf= 0.6 en el primer sistema es debida Únicamente al nitrato de miconazol.

La prueba de cromatografía en capa fina acompañada del resultado de la titulación en medio no acuoso pueden ser usados para

obtener datos en un estudio de estabilidad, pero en el momento en que aparezca el producto de degradación ya no es válido el resultado de la titulación debido a que el volumen gastado es consumido por el nitrato de miconazol y su producto de degradación.

D I S C U S I O N
D E
R E S U L T A D O S
Y
C O N C L U S I O N E S

RECOMENDACIONES

- Sumergir el electrodo combinado en solución 0.1 N de ácido acético durante 30 minutos antes de introducirlo al ácido acético glacial, con el objeto de que el cambio al medio deshidratante no sea tan brusco.

- Evitar evaporar en exceso los extractos cloroformicos ya que esto provoca resultados bajos.

- Emplear una bureta de 10 ml para que el volumen gastado represente el 80 % de la capacidad del instrumento y con esto el error debido a la lectura disminuye.

- Normalizar la solución de HClO_4 cada vez que se vaya a usar, ya que por estar preparada en un disolvente orgánico se evapora más fácilmente y cambia su concentración.

- Tomar la temperatura del titulante para hacer la corrección a la normalidad.

- Mantener la solución de ácido perclórico y el ácido acético glacial el menor tiempo destapados para evitar la absorción de agua.

- Usar el método potenciométrico cuando se disponga de un titulador automático, para aumentar la precisión y disminuir el tiempo de análisis.

ANALISIS DE RESULTADOS.

- La precisión y exactitud no son equivalentes debido a que estadísticamente presentan diferencias significativas.

- El nitrato de miconazol es una sustancia muy estable ya que de todas las condiciones experimentales para degradarlo únicamente en condiciones ácidas se encontró un producto de degradación.

Las condiciones a que debe someterse una muestra para degradarla varían según la naturaleza del compuesto.

- El sistema cromatográfico tiene buena resolución separando al principio activo de excipientes y productos de degradación.

- El por ciento de recobro del método con indicador está más cercana al 100 %, esto puede deberse a una diferencia entre el punto final y el punto de equivalencia a favor de la media.

El método con indicador presentó en varias pruebas una mejor precisión que el método potenciométrico.

CONCLUSIONES

- El método desarrollado es confiable para determinación de nitrato de miconazol en crema usando un indicador visual o un método potenciométrico para determinar el punto final, ya que cumplen con los requisitos de linealidad exactitud y precisión.

Las muestras evaporadas o sin evaporar no son estables ni cuando menos 1h, por lo que estas deben ser tituladas al finalizar la evaporación.

- El método es rápido, económico, además de no necesitar de equipo muy sofisticado.

- El sistema cromatográfico es adecuado para separar al principio activo de los excipientes y de sus productos de degradación.

- El método desarrollado se puede utilizar acompañado de una cromatografía del sistema ensayado para obtener datos para un estudio de estabilidad siempre y cuando la placa no presente algún producto de degradación.

La amplitud del criterio de aceptación en la validación de un método analítico depende de la complejidad de éste por lo que hay que tomar en cuenta la forma farmacéutica y el tipo de método.

La validación de métodos analíticos es indispensable para demostrar la confiabilidad de un método, durante la validación se corrigen errores del método y se logra optimizarlo.

La amplitud del estudio dependerá de los fines para los cuales se destine el método analítico, pero todos deben cumplir con una serie de requisitos mínimos.

En la Validación de métodos analíticos hay que tomar en cuenta el criterio del analista.

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Curso de análisis farmacéutico.
Kenneth A. Connors.
Editorial Reverté.
p.p. 3 - 74 y 125 - 171.
- 2.- Manual de Prácticas de Química Analítica I . (Q.F.B.)
Facultad de Química U.N.A.M. 1981.
p.p. 58 - 67
- 3.- Química Analítica.
John G. Dick.
Editorial el Manual Moderno, 1979.
p.p. 88 - 91, 218 - 257, 437 - 450.
- 4.- Química Analítica Cuantitativa.
H. A. Flascka Vol 1.
Compañía Editorial Continental. 1973.
p.p. 209 - 215
- 5.- Química Cuantitativa.
Glenn H. Bron y Eugene M. Salle.
Editorial Reverté 1967.
p.p. 227 - 250.
- 6.- Curso de Química Analítica General.
Soluciones Acuosas y no Acuosas. Vol 1.
Toray - Masson.
Barcelona 1980.
p.p. 230 - 254.

- 7.- Química Analítica.
Margarita Watty B.
Editorial Alambra Mexicana. 1982.
p.p. 115 - 128.
- 8.- Quantitative Organic Analysis.
James S. Fritz George S. Hammond.
John Wiley Sons.
New York 1957.
p.p. 23 - 58.
- 9.- Instrumentación Química.
Howard A. Strobel.
Editorial Limusa México. 1982.
p.p. 503 - 528.
- 10.- Pharmaceutical Analysis.
Takeru Higuchi y Einar Brochsann-Hanssen.
John Wiley Sons 1981.
p.p. 808 - 825.
- 11.- USP XXII - National Formulary XVII 1989.
- 12.- The Merck Index.
Tenth Edition. 1983.
- 13.- Goodman y Gilman.
Bases Farmacológicas de la Terapéutica.
Sexta Edición.
Editorial Interamericana.
- 14.- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
Requisitos Mínimos para la Validación de Métodos Analíticos.