

53
rej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**" IMPLEMENTACION Y VALIDACION DE
UN METODO ANALITICO PARA
CUANTIFICAR GRISEOFULVINA EN
SUSPENSION Y MICROESFERAS POR
ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA "**

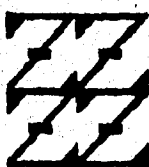
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :
JOSE ALBERTO ROSALES CASTILLO**

**A S E S O R E S :
Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
Q.F.B. RAMON SOTO VAZQUEZ**

**FES
ZARAGOZA**



**LO HUBIERO DJS
DE NUESTRA REALIZACION**

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
TESIS CON FALLA DE ORIGEN
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

**EL EXITO SOLO ES LA MITAD
DE BONITO CUANDO NO HAY
NADIE CON QUIEN COMPARTIRLO,
A MIS PADRES, NOVIA, PROFESORES,
COMPAÑEROS Y AMIGOS
LES AGRADESCO EL APOYO QUE
ME BRINDARON, POR QUE ES
GRACIAS A USTEDES QUE FUE
POSIBLE LA REALIZACION
DE ESTE TRABAJO.**

GRACIAS.

J. ALBERTO ROSALES CASTILLO

JURADO ASIGNADO:

PRESIENTE: Q.F.B. MAURO ARRIETA SANCHEZ

VOCAL: Q.F.B. RAMON SOTO VAZQUEZ

SECRETARIO: Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES

SUPLENTE (1) : Q. GUADALUPE CORONA VARGAS

SUPLENTE (2) : Q.F.B. VICTOR HUGO BECERRA LOPEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

F.E.S ZARAGOZA, EDIFICIO DE TECNOLOGIA, PLANTA

PILOTO.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	1
1. Fundamentación del Tema	1
1.1 Micosis	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Antimicóticos	2
1.2 Griseofulvina	3
1.2.1 Farmacología	3
1.2.2. Propiedades físicas y químicas	6
1.3 Métodos desarrollados para cuantificar griseofulvina	7
1.4 Espectrofotometría	8
1.4.1. Propiedades de la radiación electromagnética	8
1.4.2. Interacción de la radiación con la materia	9
1.4.3. Fundamentación de la espectrofotometría ultravioleta	11
1.4.3.1. Transmitancia	11
1.4.3.2. Absorbancia	12
1.4.3.3. Absortividad	13
1.4.3.4. Ley de Beer	14
1.4.3.5. Limitaciones de la ley de Beer	15
1.4.3.6. Especies absorbentes	16
1.5 Instrumentos utilizados para espectrofotometría	17
1.5.1 Fuente de radiación	18
1.5.2 Monocromadores	19
1.5.3 Recipientes para la muestra	21
1.5.4 Detectores de Radiación	22
1.5.5 Detectores de señales e instrumentos de lectura	23
1.6 Validación de métodos analíticos	27
1.6.1. Generalidades	27
1.6.2. Definiciones	29
1.6.3. Criterios	33
1.7 Formas farmacéuticas	34
1.7.1 Suspensiones	34
1.7.2 Microesferas	35
2 Planteamiento del problema	38
3 Objetivos	40
4 Hipótesis	41
5 Material y reactivos	42

6 Métodos	44
6.1 Desarrollo del método para suspensión	44
6.2 Desarrollo del método para microesferas recubiertas	49
6.3 Métodos desarrollados	50
6.3.1 Método para suspensión	51
6.3.2 Método para microesferas	51
6.4 Curva de calibración	52
6.4.1 Método para preparar la curva de calibración	52
6.4.2 Método para estándar añadido para la suspensión	53
6.4.3 Método placebo cargado para las microesferas	55
6.5 Método para el estándar	56
6.6 Métodos para la validación	57
6.6.1 Suspensión	58
6.6.2 Microesferas	64
7 Resultados	68
7.1 Resultado del desarrollo de los métodos	68
7.1.1 Suspensión	68
7.1.2 Microesferas	69
7.1.3 Resultados de niveles de suspensión	69
7.2 Resultados de la validación	70
7.2.1 Resultados de Sistema	70
7.2.2 Resultados Suspensión	72
7.2.3 Resultados Microesferas	78
8 Análisis de resultados	85
9 Conclusiones	90
10 Anexo	92
10.1 Formulario de análisis estadístico	92
10.2 Formulario de análisis estadístico complementario	94
10.3 Glosario	96
10.4 Métodos de cuantificación de griseofulvina	98
11 Bibliografía	99

INTRODUCCION

El objetivo principal de la Industria Farmacéutica es la fabricación de medicamentos, los cuales están destinados al consumo humano, por esto los productos deben de cumplir un estricto control de calidad en todos los niveles de manufactura y análisis, para que esto sea posible se requiere de métodos capaces de analizar las características de los materiales a utilizar y establecer si son o no aptas para la fabricación de estos.

Esto es posible mediante el seguimiento de una serie de normas, creadas para asegurar una unificación de criterios acerca de la calidad y como es posible obtenerla. Estas normas cubren todas las actividades en las cuales la Industria Farmacéutica se apoya en su desempeño, tales como: análisis de materiales, fabricación, desarrollo, estabilidad de materiales, etc.

Durante la fabricación de formas farmacéuticas uno de los pasos más importantes es el análisis de las materias primas con actividad farmacológica, para poder llevar a cabo la cuantificación el método empleado debe estar validado es decir, debe quedar establecido experimentalmente que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones deseadas.

Pero el tener un método capaz de esto no es suficiente, la Industria Farmacéutica al igual que todas está sometida a una fuerte competencia, gastos, etc. así que los métodos además de ser validados deben de ser simples, rápidos de realizar y baratos, por lo tanto el desarrollar o implementar métodos capaces de cubrir con todos estos requisitos es sumamente valioso.

Los antimicóticos son fármacos destinados al tratamiento de las enfermedades producidas por hongos, estas ocupan el vigésimo lugar en frecuencia en México. Uno de los antimicóticos más antiguos pero que aun se sigue dispensando es la griseofulvina.

La griseofulvina es un antimicótico de amplio uso en el tratamiento de micosis superficiales (especialmente tiña capitis), pero apesar de su eficacia tiene una desventaja muy grande, su biodisponibilidad es muy baja debido a su baja solubilidad en solventes polares y parcticamente no se absorbe en piel, por esto se planteó un proyecto en el cual se pretende desarrollar formas farmacéuticas que mejoren esto, para comprobar la calidad de estas formas se requiere realizar una serie de análisis de los culaes la cuantificación del activo es una de las más importantes, en la literatura se encuentran reportados una amplia gama de métodos con este fin, pero todos ellos son complejos y costosos, es por lo anterior que en este proyecto se pretendió implementar y validar un método por Espectrofotometría Ultravioleta para cuantificar Griseofulvina en microesferas y suspensión (las cuales junto con las emulsiones son las únicas formas de formularla), los cuales deberán ser rápidos, sencillos y de bajo costo.

Al término de este trabajo se consiguió implemetar los métodos requeridos, los resultados de la validación confirman que estos son: repetibles, reproducibles, lineales y específicos, además de sencillos y baratos, y por consiguiente adecuados para los propositos establecidos.

I FUNDAMENTACION DEL TEMA

1.1 MICOSIS

1.1.1 GENERALIDADES

Las micosis son enfermedades producidas por hongos, ocupando el vigésimo lugar en frecuencia de padecimientos transmisibles en México, se clasifican de la siguiente forma:

- 1) Superficiales (exclusivamente tegumentarias); estas solo afectan la piel y uñas, no atacan estructuras profundas, son contagiosas frecuentes y su curacion es sencilla.
- 2) Subcutaneas (inicialmente tegumentarias); se les considera no contagiosas, son relativamente frecuentes y de muy dificil terapia.
- 3) Profundas (secundariamente tegumentarias); son no contagiosas y poco frecuentes, no existe tratamiento eficaz.
- 4) Oportunistas; son no contagiosas poco frecuentes, se presentan solo en caso de inmunodeficiencia.

Se conocen millares de especies de hongos en la actualidad de los cuales solo unos 50 son patógenos al ser humano y solo las dermatomicosis (micosis superficiales) se transmiten con facilidad. Por lo general los hongos patógenos no producen toxinas, regularmente inducen una hipersensibilidad a sus constituyentes químicos, con pocas excepciones la mayoría de los hongos patógenos para el hombre se clasifican como imperfectos (solo producen esporas asexuales).

Para poder curar estas enfermedades el hombre a lo largo de los años ha descubierto y desarrollado una enorme cantidad de fármacos capaces de eliminar a los hongos patógenos y de los cuales se tratará en el apartado siguiente.

Referencias: 4, 16, 21, 26, 35

1.1.2 **ANTIMICOTICOS**

Los compuestos con actividad farmacológica que sirven para el tratamiento de las micosis se denominan antimicóticos, éstos se encuentran clasificados por su acción en fungistáticos (inhibición del crecimiento de los hongos) y fungicidas (destrucción de los mismos), en muchos casos la actividad depende de la dosis, a una baja dosificación el fármaco se comporta como fungistático y a una alta como fungicida.

Para el tratamiento de las micosis superficiales es común el uso de medicaciones tópicas, pero en algunos casos crónicos es necesario la administración sistémica de ellos, para estos casos los dos fármacos más utilizados son la griseofulvina y el ketoconazol.

En general podemos clasificar a los antimicóticos de la siguiente manera:

1) Fármacos de acción local:

- a) Derivados del imidazol (clotrimazol, miconazol, econazol, ketoconazol)
- b) Compuestos de azufre (tiocarbamilos, tiocarbamilidas)
- c) Derivados de los fenoles (haloprigna)
- d) Ácidos grasos fungicidas (ácido propiónico, ácido undecilénico)

2) Fármacos de acción sistémica:

- a) Antibióticos-antimicóticos ; i) Antibióticos poliénicos (nistatina)
ii) Benzofuranos (griseofulvina)
- b) Quimioterápicos; i) Pirimidinas fluoradas (flucitosina)
ii) Derivados del imidazol (ketoconazol)

La forma en que cada uno ejerce su acción farmacológica es diferente, debido a sus diversas formas químicas. El fármaco de interés para el presente trabajo es la griseofulvina la cual es importante ya que a pesar de ser un principio activo con mucho tiempo en el mercado aun es muy util y eficaz en el tratamiento de algunas dermatofitosis, en especial de la tinea capitis, se prefiere en estos casos su uso sobre el ketoconazol. Las propiedades de esta se describen en el apartado siguiente.

Referencias: 2, 3, 26

1.2 GRISEOFULVINA

1.2.1 FARMACOLOGIA

a) Farmacodinamia.

La Griseofulvina es un antibiótico-antifúngico de espectro reducido, pertenece a la familia de los benzofuranos, se extrae de diversas familias de *Penicillium*, especialmente del *Penicillium griseofulvum*.

Posee una acción especialmente fungistática, in vitro sobre los hongos que producen micosis cutáneas o dermatofitosis de los géneros *Microsporum* (específicamente *Maudouinii*), *Trichophyton* y *Epidermophyton* a concentraciones de 0.4 µg/ml, pero no posee acción terapéutica sobre *Candida albicans*, hongos que causan micosis profundas o sistémicas, ni sobre bacterias.

La griseofulvina se emplea en los casos de tiña capitis, corporal, inguinal (crural), dermatofitosis de los pies y uñas u onicomicosis, resistentes de los tratamientos con las fármacos fungicidas locales.

Por medio de diversos estudios se sabe que la Griseofulvina es antagonizada por precursores de los ácidos nucleicos como las purinas y sus derivados (ácido adenilico y ácido guanílico), lo que ha llevado a la conclusión de que dicho compuesto actúa como fungistático interfiriendo en la síntesis de los ácidos nucleicos, especialmente del ácido desoxirribonucleico por un mecanismo probable de competición.

Se ha encontrado que a dosis tóxicas en animales es capaz de producir lesiones hepáticas y sobre todo en los tubos seminíferos del testículo, con detención de la mitosis en la metafase, esto debido a la inhibición del metabolismo de ADN antes señalada. En el hombre no se han detectado a dosis terapéutica, pero es capaz de producir trastornos digestivos irritativos, hemáticos (leucopenia), nerviosos (cefalea), y cutáneos probablemente alérgicos.

b) Farmacocinética

La griseofulvina se absorbe bien por vía oral y parenteral; estudiando los niveles hemáticos luego de la ingestión de la droga, se ha demostrado que la absorción de ésta depende del tamaño de partícula, así de forma micronizada (2.7 μ m de diámetro) se absorbe dos veces más cantidad que el tamaño típico (10 μ m). Dichos niveles sanguíneos son máximos entre 4 y 8 horas después de la ingestión y si la misma es de 1 g los niveles alcanzan un promedio de 2 μ g/ml, superiores a los requeridos para llevar su acción fungistática.

En la sangre, la griseofulvina se encuentra combinada con las proteínas en un 80%, pasa a los tejidos y se deposita especialmente en la piel, en las células basales de la epidermis, de manera que cuando se vuelven queratinizadas retienen suficiente cantidad de la fármaco como para inhibir el crecimiento del dermatofito; una vez que se desprende de la capa córnea infectada, las nuevamente formadas están exentas de hongos.

No se conoce perfectamente el destino del antimicótico en el organismo, pero se sabe que se metaboliza e inactiva, y los metabolitos formados (no se han identificado con exactitud) son excretados en la orina. La vida media de la griseofulvina es de alrededor de 20 horas.

La griseofulvina es un fármaco poco tóxico, no obstante es capaz de producir algunas veces los trastornos siguientes:

- 1) Manifestaciones Gastrointestinales, consisten en ardor epigástrico, náuseas y diarrea.
- 2) Trastornos hemáticos, son la leucopenia con granulocitopenia
- 3) Manifestaciones renales, consisten en proteinuria.
- 4) Trastornos nerviosos, son la cefalea, depresión y lasitud.
- 5) Reacciones cutáneas, probablemente de tipo alérgico, consisten en erupciones morbiliformes y a veces edema angioneurótico.

Todas estas reacciones no son graves y desaparecen espontáneamente al cesar el tratamiento.

Al administrar este activo se recomienda evitar la ingestión simultánea con:

- 1) Hipnóticos, Por el mecanismo de inducción enzimática, los barbitúricos y en especial el fenobarbital es capaz de aumentar el metabolismo de la griseofulvina, con disminución de su acción.
- 2) Anticoagulantes orales, esta es capaz de aumentar el metabolismo de los anticoagulantes sintéticos por inducción enzimática, con disminución de los efectos de los mismos.
- 3) Antibiótico, produce hipersensibilidad cruzada.
- 4) Alcohol, provoca taquicardia, rubor, y mayor embriaguez.

Referencias: 2, 3, 26

1.2.2 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

Nombres Químicos:

- i) (2S-trans)-7-cloro-2',4,6,-trimetoxo-6'-metilspiro(benzofuran-2 (3H), 1'-(2) ciclohexeno) 3,4'-diona
- ii) 7-cloro-4,6-dimetoxicoumaran-3-ona-2-spiro-1'-(2'-metoxo-6'-metilciclohexen-2'-en-4'-ona)

Nombre Genérico:

Griseofulvina

Peso Molecular:

352.77 gramos/mol

Fórmula Condensada:

$C_{17}H_{17}ClO_6$

Fórmula Desarrollada:

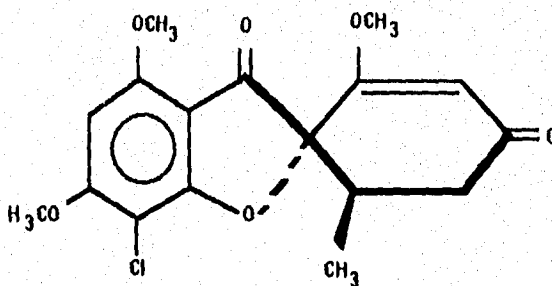


Figura 1
Estructura de la Griseofulvina
Referencia: 14

Propiedades Físicas:

Polvo cristalino, blanco, sin olor, p.f. 217-224 °C, su solubilidad a 25 °C en diversos solventes orgánicos es: acetona 30g/l, tetracloruro de carbono 2g/l, dicloroetano 80g/l, dimetilacetamida 40g/l, dioxano 30g/l, etil éter 0.7g/l, heptano 0.3g/l, metanol 0.4g/l, etanol 0.45g/L, agua 0.2g/l. Posee un máximo de absorción en el espectro U.V. en etanol de 291 m μ (E1%, 1cm 686).

Referencias: 7, 14, 15, 19, 20

1.3 METODOS DESARROLLADOS PARA CUANTIFICAR GRISEOFULVINA

En 1958 la griseofulvina llega a ser uno de los fármacos antifúngicos de más demanda debido a su gran eficiencia, apartir de aquí la necesidad de contar con métodos analíticos capaces de cuantificar a este durante su fabricación (vía fermentación), como materia prima y finalmente como parte de una forma farmacéutica se volvió indispensable.

Se han desarrollado una amplia gama de métodos que van desde una simple valoración colorimétrica o iodométrica hasta el uso de los más complejos aparatos como la cromatografía de gases o de líquidos de alta resolución, cada uno de estos métodos ha surgido como respuesta a una necesidad muy particular o simplemente para mantenerse a la vanguardia en métodos y equipos.

Uno de los primeros métodos en desarrollarse de los que se encuentran reportados es una valoración colorimétrica en el año de 1965, un año más tarde se desarrolla el método más antiguo para cuantificar griseofulvina en una forma farmacéutica el cual es por cromatografía de gases. En la década de los 70's son contados los métodos desarrollados para cuantificar a este activo en forma farmacéutica de aquí destaca por su relación con este

proyecto 1971 por espectrofotometría ultravioleta, de aquí se tiene un enorme hueco ya que hasta 1988 se reporta uno por espectrofotometría visible debido al auge que tuvieron los azoles como antimicóticos, pero en la década de los 90's la griseofulvina retoma su importancia y como consecuencia el interés por desarrollar métodos más actuales para cuantificarla, como por ejemplo por CLAR, espectrofotometría ultravioleta y cromatografía de gases principalmente.

En el Anexo se presenta la tabla 38 donde se reportan los métodos en orden cronológico así como su aplicación.

Referencias: 1, 5, 11, 13, 14, 22, 25, 31, 34, 37, 38

1.4 ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA

1.4.1 PROPIEDADES DE LA RADIACION ELECTROMAGNETICA

La radiación electromagnética es un tipo de energía que se transmite por el espacio a enormes velocidades. Adopta muchas formas, siendo las más fácilmente reconocibles la luz y el calor radiante. Manifestaciones menos evidentes son los rayos X, luz ultravioleta, microondas y ondas de radio.

Para caracterizar a muchas de las propiedades de la radiación electromagnética, es conveniente adjudicar una naturaleza ondulatoria a su propagación y describir estas ondas con parámetros como velocidad, frecuencia, amplitud y longitud de onda, a partir de esta última propiedad es de donde se puede formar el espectro de donde una parte corresponde a la región ultravioleta, el espectro completo se muestra en la figura 2.

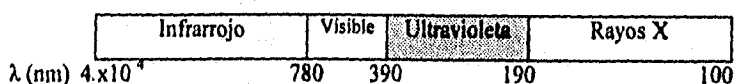


Figura 2

Espectro de radiación electromagnética.

Referencia: 10

El modelo ondulatorio para la radiación no explica completamente los fenómenos asociados con la absorción o la emisión de energía radiante; para estos procesos es necesario considerar la radiación electromagnética como un flujo de partículas discretas de energía llamadas fotones. La energía de un fotón es proporcional a la frecuencia de la radiación. Este doble punto de vista de la radiación como partículas y como ondas no son mutuamente excluyentes. En efecto, se ha visto que esta dualidad es aplicable al estudio de las propiedades de los haces de electrones u otras partículas elementales y se racionalizan fácilmente por medio de la mecánica ondulatoria.

1.4.2 INTERACCION DE LA RADIACION CON LA MATERIA

Cuando la radiación pasa desde el vacío a la superficie de una porción de materia, la radiación interacciona con los átomos y moléculas del medio. la naturaleza de esta interacción depende de las propiedades de la materia y puede dar lugar a la transmisión, la absorción o la dispersión de la radiación.

Se observa experimentalmente que la velocidad con que se propaga la radiación por una sustancia transparente es menor que su velocidad en el vacío; además, la velocidad depende de las clases y concentraciones de átomos, iones o moléculas presentes. Se deduce

de estas observaciones que la radiación debe interactuar en cierta forma con la materia. Pero, como hemos mencionado, no se observa un cambio de frecuencia; por ello la interacción no supone una transferencia permanente de energía.

Cuando pasa una radiación por una capa transparente de un sólido, líquido o gas, pueden eliminarse selectivamente ciertas frecuencias como consecuencia del proceso llamado *absorción*. En este caso, la energía electromagnética se transfiere a los átomos o moléculas que constituyen la muestra; como resultado de ello, éstas partículas pasan del estado de más baja energía al estado de mayor energía (estados excitados). A temperatura ambiente la mayoría de las sustancias se encuentran en su nivel energético más bajo, es decir estado fundamental. La absorción, por tanto produce por lo general una transición entre el estado fundamental y estados con mayor contenido energético.

Los átomos, moléculas o iones tienen un número limitado de niveles de energía cuantizada discreta; para que exista o se produzca absorción de radiación, la energía del fotón excitante debe igualar a la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados de la especie absorbente. Como estas diferencias de energía son únicas para cada especie, un estudio de las frecuencias de radiación absorbida ofrece un medio para caracterizar a los constituyentes de una muestra de materia. Para este objeto, se obtiene experimentalmente una gráfica de la reducción de la potencia (absorbancia) en función de la longitud de onda o frecuencia (espectros de absorción). En general se consideran dos tipos de espectros de absorción: absorción atómica y molecular, para efectos de este trabajo solo se tocará el segundo.

La absorción por moléculas poliatómicas, particularmente en el estado condensado, es un proceso considerablemente más complejo porque el número de estados de energía está muy aumentado. Aquí la energía total está dada por:

$$E = E_{\text{electrónica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}} \quad \text{Ecuación (1)}$$

donde $E_{\text{electrónica}}$ describe la energía electrónica de la molécula mientras que $E_{\text{vibracional}}$ se refiere a la energía de la molécula relacionada con las diferentes vibraciones atómicas. El

tercer término de la ecuación designa la energía asociada con la rotación molecular alrededor de su centro de gravedad. Para cada estado de energía electrónica de la molécula hay normalmente varios estados vibratorios posibles y a su vez, para cada uno de estos, existen numerosos estados rotatorios. Como consecuencia el número de posibles niveles de energía de una molécula es mucho mayor que el de una partícula atómica.

A diferencia de los espectros de absorción atómica que consisten en un conjunto de líneas netas y bien definidas, los espectros moleculares en las regiones ultravioleta y visible del espectro se representan generalmente como bandas de absorción que suelen abarcar un intervalo considerable de longitudes de onda. La absorción molecular también comprende transiciones electrónicas. Sin embargo con cada transición electrónica se asocian varias líneas de absorción estrechamente agrupadas, debido a la existencia de numerosos estados vibratorios. Además, como ya se ha mencionado, con cada uno de los estados vibratorios se asocian varios niveles de energía rotatoria. Como consecuencia, el espectro de una molécula consta a menudo de una serie de bandas de absorción estrechamente espaciadas. A menos que se emplee un instrumento de alta resolución, las bandas individuales pueden no llegar a detectarse y los espectros aparecen como curvas suaves. Finalmente en el estado condensado y en presencia de moléculas de disolvente, las bandas individuales tienden a ensancharse para dar el tipo de espectro clásico.

Referencias: 10, 21, 32

1.4.3 **FUNDAMENTO DE LA ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA**

1.4.3.1 **Transmitancia**

En la figura 3 se representa un haz de radiación paralela antes y después de pasar a través de un capa de solución de b centímetros de espesor, y que contiene una especie molecular que absorbe radiación cuya concentración es c . Como consecuencia de las interacciones entre los fotones y las partículas absorbentes, la potencia del haz disminuye

de P_0 a P . La *transmitancia* (T) de la solución, es la fracción de radiación incidente transmitida por la solución.

Referencia: 23

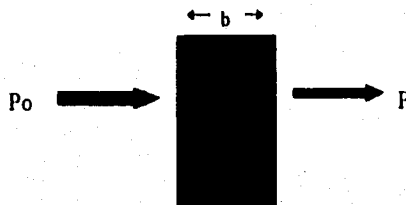


Figura 3

Esquema del paso de un haz de luz a través de una solución conteniendo una especie absorbente de concentración conocida.

Referencia: 32

O sea que:

$$T = P / P_0$$

Ecuación (2)

Por lo general, la transmitancia se expresa como porcentaje.

1.4.3.2 Absorbancia

La absorbancia (A) de una solución está definida por la ecuación:

$$A = -\log T$$

Ecuación (3)

$$A = \log P_0 / P$$

Ecuación (4)

Obsérvese que a diferencia de la transmitancia la absorbancia de una solución aumenta a medida que aumenta la atenuación del haz.

1.4.3.3 Absortividad

Como se verá a continuación, la absorbancia es directamente proporcional a la trayectoria de la radiación a través de la solución y a la concentración de la especie que produce la absorción. Es decir:

$$A = abc \quad \text{Ecuación (5)}$$

donde a es una constante de proporcionalidad llamada *absortividad*. Resulta evidente que la magnitud de a depende de las unidades utilizadas para b y c . Cuando se expresa la concentración en moles por litro y la trayectoria a través de la celda en centímetros, la absortividad se denomina *absortividad molar* y se representa con el símbolo ϵ . En consecuencia cuando b se expresa en centímetros y c en moles por litro.

$$A = \epsilon bc \quad \text{Ecuación (6)}$$

La relación dada para P y P_0 es inaplicable directamente al análisis químico. En la forma en que han sido definidos estos pueden medirse en forma práctica en el laboratorio debido a que la solución que se desea estudiar debe estar contenida en algún recipiente. Es inevitable la interacción entre la radiación y las paredes de este, lo que produce una pérdida de radiación en cada interfase; más aún, puede existir una radiación significativa en las paredes de la celda. Por último, el haz puede sufrir una disminución de potencia durante su pasaje a través de la solución, como consecuencia de la dispersión producida por las moléculas de gran tamaño o las inhomogeneidades. Las pérdidas por reflexión pueden ser importantes; por ejemplo, en el paso de la radiación visible a través de una interfase aire-vidrio o vidrio-aire se puede reflejar aproximadamente el 4%.

Con la finalidad de compensar estos efectos suele compararse la potencia del haz transmitido a través de la solución con la de un haz que pasa a través de una celda idéntica que contiene el disolvente de la muestra. De esta forma, se puede obtener una absorbancia que se aproxima al valor de la verdadera.

1.4.3.4 Ley de Beer

Las ecuaciones 5 y 6 constituyen expresiones de la ley de Beer. Estas relaciones pueden ser racionalizadas de la siguiente forma. Considérese un bloque de materia capaz de absorber radiación (sólido, líquido o gas). Un haz de radiación monocromática paralela de potencia P_0 incide perpendicularmente sobre una superficie de este cuerpo. Después de recorrer cierta trayectoria b dentro del mismo, que contiene n partículas capaces de absorber (átomos, iones o moléculas), su potencia disminuye a P como consecuencia de la absorción. Considérese ahora una sección transversal del bloque del área S y espesor infinitesimal dx . Dentro de esta sección hay dn partículas absorbentes, asociada con cada partícula absorbente se puede imaginar una superficie en la que puede producirse captura de fotones. Esto es, si un fotón llega por azar a una de estas áreas, se producirá absorción inmediatamente. El área total proyectada de estas superficies de captura en la sección será entonces dS/S . En un promedio estadístico, esta razón representa la probabilidad de captura de fotones dentro de la sección.

La potencia del haz que penetra en la sección P_x es proporcional al número de fotones por cm^2 por segundo y dP_x representa la cantidad eliminada por segundo en la sección; la fracción capturada es entonces $-dP_x / P_x$ y esta razón es un promedio igual a la probabilidad de captura. Al término se le da un signo negativo para indicar que P experimenta reducción. Así,

$$-dP_x / P_x = dS / S \quad \text{Ecuación (7)}$$

Si se considera que dS es la suma de las áreas de captura para las partículas de la sección; por consiguiente, debe ser proporcional al número de partículas, o

$$dS = a dn \quad \text{Ecuación (8)}$$

donde dn es el número de partículas y a es una constante de proporcionalidad que puede denominarse *sección transversal de captura*. Combinando las ecuaciones y asumiendo a través del intervalo de cero a n se obtiene una ecuación diferencial la cual al integrarla y darlo en logaritmo base 10 se obtiene:

$$-\log P_0 / P = an / 2.303 S \quad \text{Ecuación (9)}$$

la S también puede expresarse en términos de área $S = V/b$ lo que convierte la ecuación en:

$$-\log P_0/P = abc / 2.303 V \quad \text{Ecuación (10)}$$

Observese que n/V tiene unidades de concentración (partículas / cm^3); es posible entonces, convertir fácilmente las unidades a moles por litro:

$$c = n \text{ partículas} / 6.02 \times 10^{23} \text{ partículas / mol} \quad \text{Ecuación (11)}$$

$$c = 1000 n / 6.02 \times 10^{23} V (\text{mol / litro}) \quad \text{Ecuación (12)}$$

Si se combina esta con la ecuación se obtiene:

$$\log P_0/P = 6.02 \times 10^{23} abc / 2.303 \times 1000 \quad \text{Ecuación (13)}$$

Finalmente, las constantes de esta ecuación se pueden reunir en un término único ϵ , para dar:

$$\log P_0/P = \epsilon bc = A \quad \text{Ecuación (14)}$$

Ley de Beer

La ley de Beer se aplica también a las soluciones que contienen más de un tipo de sustancia absorbente. Siempre que se presenta interacción entre las diferentes especies, la absorbancia total para un sistema de varios componentes está dada por:

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n \quad \text{Ecuación (15)}$$

1.4.3.5 Limitaciones de la ley de Beer

La relación lineal entre la absorbancia y longitud de trayectoria para una concentración fija de sustancias absorbentes es una generalización para la cual no se conoce excepción. Por el contrario se encuentran frecuentemente desviaciones con relación a la proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración, estas las podemos clasificar de la siguiente manera:

a) Limitaciones reales, la ley de Beer describe bien la absorción de las soluciones diluidas; en este sentido es una ley límite: en altas concentraciones (0.01 M), la distancia media entre las especies que causan absorción disminuye hasta el punto en que cada una afecta a

la distribución de cargas de sus vecinas. Esta interacción a su vez, puede alterar su capacidad de absorber a una cierta longitud de onda de radiación dada. En algunas ocasiones se encuentra este mismo efecto en soluciones absorbentes a baja concentración en presencia de altas concentraciones de electrolitos, la proximidad de los iones y las moléculas capaces de absorber, altera la absorptividad molar de éstas por efecto de las interacciones electrostáticas. Por lo general este tipo de interacciones no se dan a concentraciones debajo de 0.01 M aunque se encuentran ciertas excepciones en algunas moléculas orgánicas de gran tamaño. Otra desviación se da por el índice de refracción de la sustancia, este afecta directamente a ϵ , pero generalmente esta desviación no se observa a concentraciones bajas 0.01M.

b) Limitaciones químicas, la principal de éstas obedece a la presencia de alguna reacción, disociación y asociación de la sustancia absorbente con el solvente.

c) Limitaciones instrumentales, estas se deben principalmente a que el haz de luz que se utiliza no es lo suficientemente puro, es decir, está contaminado con luz dispersa o es un haz policromático.

1.4.3.6 Especies Absorbentes

La absorción de radiación ultravioleta y visible por una especie M , puede considerarse como un proceso de dos etapas, la primera de las cuales corresponde a la excitación, indicada por la ecuación



donde M^* representa la partícula atómica o molecular en su estado electrónico excitado que se produce como resultado de la absorción del fotón $h\nu$, este estado excitado posee una existencia muy breve y desaparece a través de un proceso de relajación el cual puede ser:

conversión de energía por calor, por descomposición M^* (reacción fotoquímica), o por reemisión de radiación fluorescente o fosforescente.

La absorción de la radiación se da por lo general como consecuencia de la excitación de electrones de enlace, esto nos dice que la absorción depende de los tipos de enlace que contiene la molécula, por lo que la espectrofotometría ultravioleta-visible es útil tanto para el análisis de grupos funcionales como para las determinaciones cuantitativas, existen tres principales tipos de transición, donde participan:

- a) Los electrones n, σ y π
- b) Los electrones d y f
- c) Los electrones de transferencia de carga

Referencias: 10, 18, 23, 32, 33

1.5 INSTRUMENTOS UTILIZADOS PARA ESPECTROFOTOMETRIA

Los métodos espectroscópicos se basan en la cuantificación de una molécula en solución aprovechando ciertos fenómenos, tales como emisión, fluorescencia, dispersión o *absorción* de una cierta radiación a la que es expuesta el analito, para esto es necesario contar con instrumentos específicos para cada fenómeno. Para efectos de este trabajo solo se tratará aquellos que cuantifiquen a la absorción.

Los instrumentos para espectroscopía, contienen cinco componentes: 1) una fuente externa y estable de energía radiante, 2) un dispositivo que permite utilizar una región de longitud de onda restringida, 3) un recipiente transparente para colocar la muestra, 4) un detector de radiación o transductor que convierte la energía radiante en una señal utilizable (por lo general eléctrica) y 5) un dispositivo de procesamiento de la señal y de lectura.

1.5.1 FUENTE DE RADIACION

Una fuente de radiación adecuada para los estudios espectroscópicos debe producir un haz de radiación cuya potencia sea suficiente para facilitar la detección y medida. Además la señal de salida de la fuente de radiación debe ser estable, ya que varía en forma exponencial con la potencia eléctrica proporcionada, por lo que es necesario usar una fuente de poder regulada para alcanzar la estabilidad requerida. En la espectroscopía óptica se utilizan tanto las fuentes continuas (estas proporcionan una radiación cuya potencia no varía bruscamente entre longitudes de onda adyacentes) como las de líneas (la radiación se da en forma de unas pocas líneas de longitud de onda definidas), las primeras para los procedimientos de absorción y las segundas para fluorescencia y absorción atómica (en este trabajo solo se tratará a las fuentes continuas de absorción en la región ultravioleta).

Existen diversos tipos de lámparas según sea la longitud de onda que se desee trabajar.

La que se utiliza más comúnmente para las determinaciones en la región ultravioleta es la lámpara de *Hidrógeno o Deuterio*, la cual se basa en la excitación a baja presión de estos elementos por medio de una descarga eléctrica, existen dos tipos de lámparas de hidrógeno, las de alto voltaje que trabajan con electrodo de aluminio y las de bajo voltaje en las que se forma un arco entre un filamento revestido de óxido, calentado y un electrodo metálico. Estas lámparas producen un espectro continuo en la región comprendida entre 160-375 nm por lo cual es necesario usar ventanas de cuarzo en los tubos ya que el vidrio absorbe fuertemente en esta región de longitud de onda. La diferencia entre la lámpara de hidrógeno y la de deuterio es que en la primera la trayectoria de descarga es muy estrecha por lo que se produce una bola de radiación de aproximadamente 1- 1.5 mm de diámetro, en cambio en la de deuterio la bola de luz es un poco mayor.

Además de las lámparas de deuterio e hidrógeno existen otras que son capaces de producir radiación en el rango de longitud de onda ultravioleta como son: las lámparas de xenón, de tungsteno y el emisor de Nernst

1.5.2 MONOCROMADORES

Para poder cuantificar a un analito por medio de un método espectrofotométrico es necesario trabajar en un rango restringido (y adecuado) de longitud de onda, para esto los aparatos deben de contar con algún dispositivo que permita realizar esta función. La forma más común para poder hacer esto es por medio de un *monocromador*, éste trabaja por medio de ranuras, lentes, espejos, ventanas, prismas o rejillas de difracción.

En general los monocromadores poseen una ranura de entrada, una lente o espejo colimador para producir un haz de radiación paralela, un prisma o rejilla de difracción como elemento dispersor, y un elemento de enfoque que proyecta una serie de imágenes rectangulares de la ranura de entrada sobre una superficie plana (plano focal), además poseen ventanas de entrada y salida que se colocan para proteger los componentes del polvo y los vapores corrosivos del laboratorio.

El uso tanto de prismas como de rejillas es común en el diseño de aparatos que trabajan en el rango de luz ultravioleta.

Los prismas más comunes son los de 30° y 60°, los materiales para construirlos deben de cubrir ciertos requisitos tales como: alta transmitancia, variaciones altas en el índice de refracción (en el caso de los lentes y ventanas esta propiedad es inversa), resistentes a la acción mecánica y ataque por vapores producidos en los laboratorios, siendo el material más común el cuarzo. Como ya se mencionó la función del prisma es provocar una dispersión angular, esta es muy importante dado que la pureza espectral de la radiación que emerge de un monocromador de prisma depende de esto. El poder de resolución de un prisma consiste en su capacidad para separar imágenes adyacentes que tienen longitudes de onda ligeramente diferentes.

La radiación ultravioleta visible e infrarroja puede dispersarse haciendo pasar un haz por una rejilla de transmisión o reflejándolo en una rejilla de reflexión. Una rejilla de transmisión consta de una serie de surcos paralelos y poco espaciados abiertos en un pedazo de vidrio u otro material transparente. Una rejilla apropiada para uso en la región ultravioleta- visible tiene de 2000 a 6000 líneas por milímetro. Es fundamental que estas líneas estén en los varios centímetros de longitud de la rejilla típica. Estas rejillas requieren de complicados aparatos para su producción y por ello son costosas.

Cuando se ilumina una rejilla de transmisión a partir de una ranura, cada surco dispersa radiación y de esta manera se vuelve opaco. Las porciones no rayadas se comportan entonces como una serie de ranuras muy próximas entre sí, cada una de las cuales actúa como una nueva fuente de radiación; la interferencia entre esta multitud de haces produce difracción de la radiación, donde el ángulo de difracción depende de la longitud de onda.

Las rejillas ofrecen ciertas ventajas sobre los prismas como elementos dispersantes. Una de ellas consiste en que la dispersión es aproximadamente independiente de la longitud de onda, lo que permite simplificar de forma considerable el diseño de los monocromadores, otra consiste en que para un mismo tamaño dispersante puede lograrse una mayor dispersión, además las rejillas de difracción constituyen un medio para dispersar la radiación en el ultravioleta lejano y en el infrarrojo lejano donde la absorción hace imposible el uso de prismas.

Las rejillas tiene la desventaja de producir cantidades algo mayores de radiación dispersa así como espectros de órdenes superiores (pero esta no es una desventaja grande ya que se disminuye por el uso de filtros o mejorando el diseño del equipo). Inclusive ahora los precios entre un prisma y una rejilla son muy semejantes.

La ranura de un monocromador es importante ya que es por aquí por donde se hace la primera selección de longitud de onda, un monocromador cuenta con dos ranuras una de entrada y otra de salida, los bordes de las ranuras deben ser exactamente paralelos entre sí, deben estar en el mismo plano y ser del mismo tamaño (por lo que la imagen de entrada encaja exactamente en la ranura de salida), en algunos monocromadores las aberturas de las dos ranuras son fijas, aunque es más común que sean móviles, al mover las ranuras es posible ajustar a una longitud de onda determinada y descartar a otras y la suma de los ajustes del monocromador (en unidades de longitud de onda) que se necesitan para mover la imagen de la ranura de entrada a través de la ranura de salida se llama *ancho de banda* y si se tratara de la mitad del intervalo de longitudes de onda transmitidas por el instrumento a una longitud de onda nominal se le conoce como *ancho de banda nominal*.

A pesar de todos estos aditamentos el haz de luz obtenido no es puro, ya que contiene una cierta cantidad de radiación de longitudes de onda diferentes al deseado, esto es causado por reflexiones del haz provenientes de los diferentes componentes ópticos y de la instalación del monocromador, la dispersión de partículas de polvo atmosféricas o sobre la superficie de los componentes ópticos, esto se puede impedir revistiendo las superficies interiores con pintura negra mate, cerrando los monocromadores con ventanas sobre las ranuras o teniendo monocromadores dobles (estos contienen dos rejillas, dos prismas o una rejilla y un prisma).

1.5.3 RECIPIENTES PARA LA MUESTRA

Los recipientes utilizados para la cuantificación en la espectrofotometría u.v se denominan *celdas*, al igual que para los componentes de un monocromador una celda debe de ser de un material que no absorba la radiación de la longitud de onda deseada, en el caso de u.v. se usa cuarzo o sílice fundido (su uso se recomienda abajo de los 350 nm), además deben de tener ventanas perfectamente perpendiculares a la dirección del haz (para evitar la pérdida por reflexión). La longitud de celda más común es de 1 cm, la forma de la

celda es comúnmente prismática o cilíndrica, para este último hay que cuidar la posición de la celda con respecto al haz (las superficies curvas pueden ocasionar pérdidas por reflexión), las celdas deben limpiarse antes de cada uso tanto en su parte externa como en la interna.

1.5.4 DETECTORES DE RADIACIÓN

Los detectores de radiación (transductores) convierten la energía radiante en una señal eléctrica, para ser útil debe responder a un amplio rango de longitudes de onda, además debe ser sensible a bajos niveles de potencia radiante, responder rápidamente a la radiación, producir una señal eléctrica que pueda amplificarse fácilmente y tener un nivel de ruido relativamente bajo y finalmente que la señal producida sea directamente proporcional a la potencia del haz que incide en él.

Existen diversos tipos de detectores los fotoeléctricos (responde a los fotones), térmicos y visuales (o fotográficos, estos últimos ya no se usan), los detectores de fotones, que son los que interesan en este trabajo, se basan en la interacción de la radiación con una superficie reactiva que promueve electrones (fotoemisión) a estados energéticos en los que pueden producir electricidad (fotoconducción). Solo la radiación ultravioleta, visible e infrarroja cercana poseen energía suficiente para dar lugar a este proceso.

Existen diversos detectores dependiendo de la región del espectro en la que se vaya a trabajar, para la región ultravioleta los que se utilizan son:

a) Fototubo; Este consta de un cátodo semicilíndrico y un ánodo de alambre encerrado en un recipiente transparente al vacío. La superficie cóncava del cátodo tiene una capa de material fotoemisor que tiende a emitir electrones al ser irradiada, esto es, el resultado de una irradiación es una fotocorriente. El número de electrones emitidos por una superficie fotoemisora es directamente proporcional a la potencia radiante del haz que incide en la superficie y en la saturación de potencial la corriente se hace directamente proporcional a la potencia irradiada. Estos están fabricados de metales alcalinos mezclados con sus óxidos

correspondientes u óxido de plata, la sensibilidad del fototubo depende del material usado y la longitud de onda a la que se trabaje, si se requiere de una sensibilidad por debajo de los 350 nm el tubo debe tener una cubierta de cuarzo.

b) Tubos fotomultiplicadores; Este se usa principalmente para la medición de bajas potencias radiantes, la superficie del cátodo es similar a la del fototubo en el sentido que emite electrones al ser irradiada, además contiene electrodos adicionales llamados *diodos*, al incidir en el dínodo cada fotoelectrodo provoca la emisión de varios electrones más, éste proceso se repite tantas veces como el número de dínodos contenga el aparato, al final la cascada se recoge en el ánodo para su posterior amplificación y medición.

c) Diodo de silicio; Este consiste en una unión *pn* de polaridad inversa formada sobre un chip de silicio, esta unión produce una conductancia con valor de cero en la unión, al irradiar la región *n* se forman electrones que al pasar por la zona *p* se destruyen provocando un aumento en la conductancia la cual será proporcional a la energía radiante. Los detectores de diodos de silicio son un poco menos sensibles que los fotomultiplicadores, pero se puede formar un arreglo de diodos (15 000 fotodiodos por centímetro cuadrado) donde cada diodo es eléctricamente independiente de los que lo rodean, así al hacer incidir un haz de radiación el arreglo de diodos dividirá al haz en canales lo cual permitirá su lectura simultánea, es decir se puede hacer un barrido de longitud de onda sin necesidad de mover el monocromador con una resolución de 1 nm siendo el intervalo de trabajo para este detector de 200 a 800 nm.

1.5.5 DETECTORES DE SEÑALES **E INSTRUMENTOS DE LECTURA**

El procesador de señales es, por lo general un dispositivo electrónico que amplifica la señal eléctrica generada en un detector; puede además modificar la señal transformada de continua en alterna o filtrarla para quitar componentes indeseables y realizar operaciones matemáticas tales como diferenciación, integración o conversión logarítmica.

Para medir la cantidad de fotones incididos durante una determinación se requiere de "contadores de fotones", donde por medio de técnicas digitales se cuentan los pulsos electrónicos producidos individualmente por cada fotón y además posee un discriminador de alturas que rechaza todos los pulsos que no alcancen un voltaje mínimo preestablecido, también existen los procesadores analógicos que por medio de la corriente, potencial o conductancia (estas son proporcionales a la potencia radiante incidente) relacionada con el detector se amplifica y se registra o bien se envía a un medidor adecuado, éste último es el de uso más común en la espectrofotometría ultravioleta.

Referencias: 18, 23, 32, 33

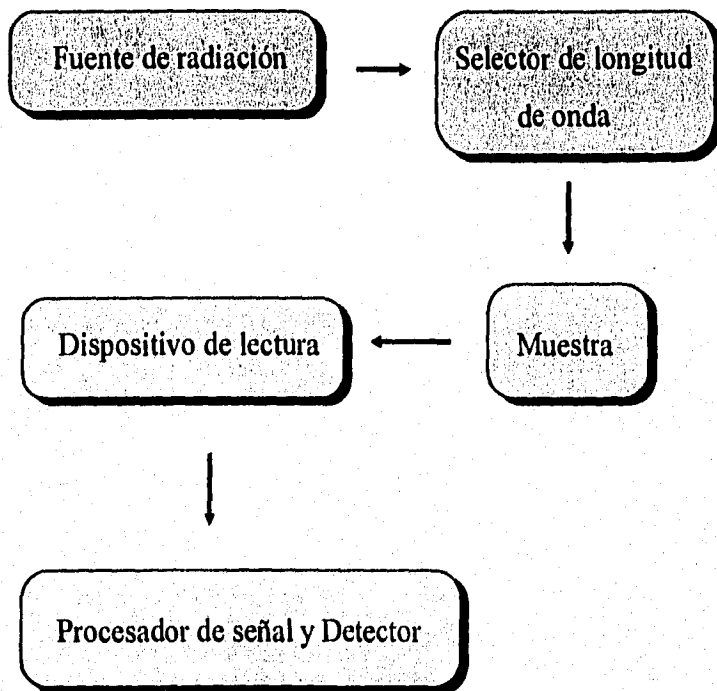


Figura 4
Esquema de las principales partes de un espectrofotómetro
Referencias: 32

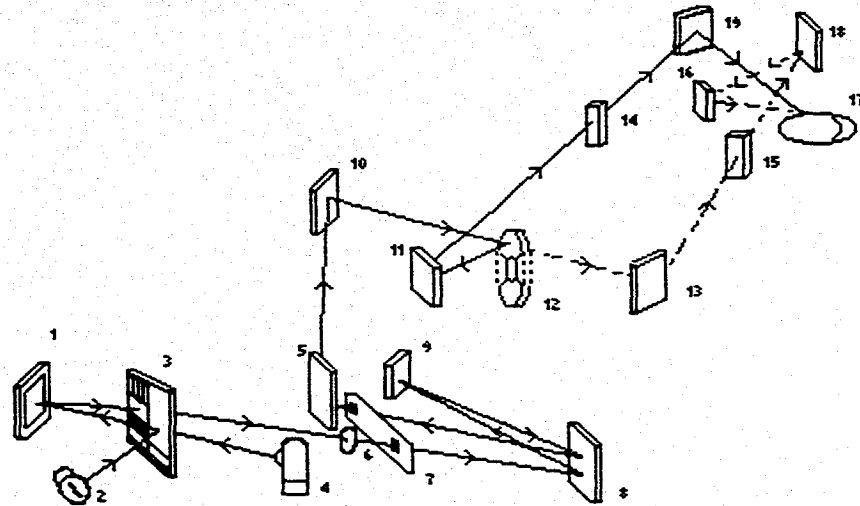


Figura 5

Esquema de un espectrofotómetro Lambda 3

1 Espejo fuente, 2 Lámpara de tungsteno, 3 Filtros (U.V., Vis.), 4 Lámpara de Deuterio, 5, 16 Espejos planos, 6 Lente condensadora, 7 Ranura de entrada y salida, 8 Espejo colimador, 9 Rejilla reflejante, 10, 11, 13, 18, 19 Espejos esféricos, 12 Divisor óptico, 14 Celda de referencia, 15 Celda de Muestra, 17 Fotomultiplicador.

Referencia: 22

1.6 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

1.6.1 GENERALIDADES

El tratar de controlar todo lo que rodea la fabricación de algún producto farmacéutico no es nuevo, la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de America fue la iniciadora de esto; primero por un comunicado de 1906 que exige el control de medicamentos para evitar su adulteración, posteriormente en 1938 convoca a los fabricantes para que estos eliminen de sus formulaciones cualquier sustancia que pudiera resultar tóxica y se implementa el acta de acondicionamiento de seguridad de los medicamentos. A partir de 1976 se emiten en el Registro Federal (Federal Register) normas de correcta fabricación y de control de calidad de los productos llamadas Prácticas Adecuadas de Manufactura (PAM's) en las que se consideran todos aquellos factores que contribuyen a la obtención de alta calidad en los procesos de fabricación, así como la reproducibilidad lote a lote, fue en este año cuando se introduce por primera vez el término *Validación*, aplicado en procesos de esterilización y uso de computadoras. En 1979 se publica un nuevo manual de PAM's (el que se maneja en la actualidad). Finalmente en 1983 se establecen los principios generales de la validación así como los criterios de aceptación y limitantes para considerar la validez de un proceso y/o de un método analítico, pero es hasta 1987 cuando dicha gufa se termina.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Generalmente en este proceso se evalúa la precisión, linealidad, exactitud y especificidad de un método proporcionando una medida estadística del comportamiento del mismo.

Debido a que los métodos analíticos tiene varias aplicaciones la validación de cada una incluye diferentes parámetros, las categorías que se contemplan en el manual de validación son: control de calidad (bajo ésta se trabajará en éste trabajo), indicadores de estabilidad (a bajas y altas concentraciones) biodisponibilidad y revalidación del método (con y sin cambio de condiciones de operación), las pruebas que requiere cada aplicación se resume en la tabla 1.

Parámetro	Control de Calidad	Indicadores de estabilidad		Biodisponibilidad	Revalidación del método	
		Bajas conc.	Altas conc.		sin cambio c.o.p.	con cambio c.o.p.
Linealidad y precisión del método	***	***	***	***	***	***
Límite de detección		***		***		
Límite de cuantificación		***		***		
Exactitud y repetibilidad al 100%	***	***	***	***	***	***
Linealidad del método	***	***	***	***	***	***
Precisión (reproducibilidad)	***	***	***	***		***
Especificidad (control de calidad)	***	***	***	***	***	***
Especificidad (estabilidad)		***	***			
Tolerancia del sistema		***	***	***		***
Estabilidad de la muestra	***	***	***	***		

Tabla 1
Parámetros a evaluar de dependiendo de la aplicación del método
c. p. = condiciones de operación

Referencia: 27

Referencias: 8, 27

1.6.2 DEFINICIONES

Al establecerse los criterios generales de validación de métodos analíticos se tuvo que crear un lenguaje que combinara el estadístico con el químico para poder todo lo específico que un análisis de este tipo requiere.

a) Linealidad de Sistema

La linealidad de un sistema 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, es decir los límites de concentraciones superior e inferior inclusive.

Esta prueba se lleva a cabo construyendo una curva de calibración de las concentraciones usadas contra la respuesta obtenida, utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una solución patrón y haciendo el análisis por duplicado para cada dilución. Dichas diluciones deben incluir la concentración al 100%, esta es la que proporciona una respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación.

b) Precisión del Sistema

Se define como la correlación que existe entre un valor determinado experimentalmente y un valor aceptado como referencia, obtenidos por un solo analista y utilizando los mismos aparatos y técnicas.

Se determina el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

c) Linealidad del Método

Mide el grado en que la respuesta del método al trabajar en un intervalo determinado de concentraciones se aproxima a una función lineal del tipo $y = mx + b$.

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado. Esto es, se diseña una curva de cantidad adicionada contra cantidad recuperada.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método (control de calidad, estudio de estabilidad, etc.) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

d) Exactitud y Repetibilidad al 100%.

La exactitud de un método analítico es la 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 la sustancia.

Se determina en cuando menos seis placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener el 100% utilizando el método propuesto, haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

e) Precisión (Reproducibilidad)

Precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales (independientes) cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto, bajo condiciones diferentes, esto es, diferentes analistas, días o laboratorios, generalmente se expresa en términos de desviación estándar o coeficiente de variación.

Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado, calculándose el porciento recuperado.

f) Especificidad.

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

El desarrollo de esta prueba depende de la aplicación del método evaluado, para métodos de control de calidad se analizan placebos del producto con el método propuesto y posteriormente se identifica(n) la(s) respuesta(s) del (los) activo(s), y de ser necesario, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

g) 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 bajo condiciones específicas.

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer almacenadas por un tiempo determinado, bajo condiciones predeterminadas, como son: temperatura, luz, material del contenedor, etc., dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia a analizar, se utiliza una sustancia de referencia de reciente preparación y se trabaja bajo las mismas condiciones de trabajo y por solo un analista.

1.6.3 Crterios

Parametro	Criterio
Linealidad del Sistema	$CV \leq 1.5\%$ $r \geq 0.99$ $r^2 \geq 0.98$
Precisi3n del Sistema	$CV \leq 1.5\%$
Linealidad del M3todo	$m \cong 1$ $b \cong 0$ $r^2 \geq 0.98$ %Recuperado 97 - 103 %* $CV \leq 3\%*$
Exactitud y repetibilidad al 100 %	% Recuperado 97 - 103%* $CV \leq 3\%*$
Precisi3n (Reproducibilidad)	$CV \leq 3\%*$ $F_{cal} \leq F_{tab}^{**}$
Especificidad	Confirmar que el m3todo desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de inter3s sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.
Estabilidad	La variaci3n del IC para la diferencia de media de la muestra con respecto a la media del an3lisis inicial no excede $\pm 3\%$.

Tabla 2:

Crterios de aceptaci3n para la validaci3n en control de calidad

* En caso de suspensiones se acepta un 1% m3s.

**Se refiere a una ANADEVa (An3lisis estadsttico completario).

Referencias: 26, 27, 28, 30

1.7 FORMAS FARMACEUTICAS

Se encuentran en el mercado una serie de productos con griseofulvina de diversas formas farmacéuticas entre los cuales tenemos:

Fulcina (suspensión), brofulin (tabletas), Fulcin forte (tabletas y suspensión), Fulvina P/G (tabletas), Grisovin FP (tabletas), Microgris (tabletas), Taidin (tabletas).

En la actualidad el desarrollo de una forma farmacéutica nueva o con ventajas sobre las existentes es muy importante, pero de poco serviría si no se contara con un método analítico para poder analizarla adecuadamente, para el desarrollo de tales metodologías se debe basar tanto en las propiedades del activo como en las características de la forma farmacéutica a utilizar.

1.6.1 SUSPENSIONES

Una suspensión farmacéutica es un sistema bifásico en el cual partículas de algún sólido finamente divididas (fase discontinua) las cuales distribuidas uniformemente a través de un vehículo en el cual el sólido es insoluble (fase continua). Estos son sistemas con tamaños de partículas menores a $0.1-0.2\mu$ por lo que se les considera coloidales, poseen propiedades que están en el umbral entre una solución real y una suspensión de partículas visibles.

Para su preparación existen diversos métodos los cuales son:

a) Precipitación, estos se subdividen en dos más la precipitación por algún solvente orgánico y por cambio de pH, en el primero un principio activo insoluble en agua es disuelto en un solvente miscible con agua y luego se mezclan ambas fases, el segundo necesita de un fármaco cuya solubilidad dependa del pH y en el último.

b) **Dispersión**, en este caso el uso de surfactantes, agentes suspensoros, etc. este consiste en añadir la parte sólida en el solvente lentamente bajo condiciones determinadas.

Los principales aditivos que componen la formulación de una suspensión son: agente dispersante, coloide protector, agente suspensor, edulcorante, conservador, sistema amortiguador, agente secuestrante, sabor, colorante y agua, así como principio activo.

Las suspensiones presentan una serie de ventajas sobre otras formas de dosificación como por ejemplo, permite formular activos insolubles en los solventes oficiales, debido a que se les puede adicionar un sabor en la fórmula pueden ocultar sabores desagradables, al ser una forma líquida es más fácil de tragar que una tableta o una cápsula, en general las suspensiones son muy estables, pero también posee desventajas las cuales son: una deficiente agitación repercutirá en una dosis inexacta, el portar fraco es estorbo, no se puede administrar a personas inconscientes.

Para este proyecto se utilizó una suspensión de marca comercial la cual contiene 2.5g de Griseofulvina micronizada por 100ml de suspensión.

1.6.2 **MICROESFERAS**

La microencapsulación es un proceso o técnica por la cual se aplican finas cubiertas de manera reproducible a pequeñas partículas de sólidos, gotitas de líquidos o dispersiones para formar microcápsulas.

Una *microesfera* es aquella partícula que contiene distribuido al principio activo; esto es, la estructura interna es la matriz del principio activo y el excipiente, generalmente polimérico. Las microesferas miden de 0.01 a 100 μ .

Las principales ventajas de las microesferas son: proteger materiales reactivos del medio ambiente, manejo seguro de los materiales que son tóxico y nocivos, control y mantenimiento de la liberación del fármaco, dosis exacta, pro tambien presentan deventajas de las cuales destacan: no se pueden administrar a personas inconcientes, su biodisponibilidad es inferior comparada con las formas farmacéuticas líquidas, etc.

Las microesferas se separan en cuatro categorías en base a sus métodos de preparación que son :

1) Coacervación, el proceso básicamente consiste en tres pasos: a) formación de tres fases inmiscibles-líquido manufacturado fase-vehículo, un material nuclear-fase droga y una fase de material de recubrimiento, b) depósito del polímero de recubrimiento líquido por sorción alrededor del material nuclear bajo un mezclado físico controlado de las tres fases, c) rigidización del recubrimiento, usualmente por ligandos o técnicas de desolvatación para formar una microesfera.

2) Polimerización interfacial, este método se basa en la formación de un polímero en la interfase, para esto se requiere de dos monómeros, uno va a estar en la fase discontinua, y el segundo en la fase continua. La reacción de los dos monómeros en la interfase causa polimerización. Un agente externo puede ser adicionado para que actue como agente ligando, para efectuar la polimerización en la interfase y prevenir alguna fase de migración.

3) Métodos electrotáticos, este proceso involucra atomizar juntos el material de la pared (recubrimiento) y el material nuclear. El aerosol producido puede contener cargas opuestas. Tres cámaras son usadas para este proceso, dos para la atomización de la pared y el material nuclear, y la tercera para el mezclado. Los iones de carga opuestas son generados y depositados sobre las gotas del líquido mientras estos son atomizados.

4) Métodos mecánicos, los métodos mecánicos son muy variados, entre estos podemos nombrar como los más importantes: Spray drying, Spray congelating, recubrimiento de lecho fluidizado, recubrimiento con bombo.

Referencias: 6, 9, 24, 35

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para la Industria Farmacéutica es indispensable el conocer las características Físicas y Químicas tanto de las materias que emplea en la fabricación de medicamentos, como del producto final. Uno de los análisis que sobresale por su importancia es la valoración del principio activo, tanto como materia prima como en su forma farmacéutica, ya que es un análisis decisivo para la aceptación o rechazo de éstos, para ello se debe contar con técnicas de análisis precisas, exactas, rápidas, sencillas y baratas.

La realización de este trabajo no se lleva a cabo como algo aislado sino que es parte de un proyecto global que involucra desde la preformulación de la griseofulvina, para luego llegar a la formulación de diversas formas farmacéuticas que pretenden mejorar la biodisponibilidad de ésta, ya con las formas formulaciones desarrolladas se requiere de métodos analíticos para cuantificar éste activo tanto en fluidos biológicos como sangre y orina, como en materia prima y forma farmacéutica.

Para el proyecto global se eligió a la griseofulvina, el cual es un antifúngico, debido a que sigue siendo un antimicótico de amplio uso debido a su alta eficiencia, se reporta que para el tratamiento de micosis cutáneas producidas por los géneros *Microsporum*, *Trychophyllum* y *Epidermophyllum* (las micosis ocupan el lugar 20 de frecuencia de las enfermedades transmisibles en México), es la primera elección, de hecho se prefiere su uso sobre Ketoconazol para el tratamiento de tiña capitis, pero presenta un problema trascendental, posee una biodisponibilidad muy baja debida principalmente a su baja solubilidad en solventes polares, por lo que el poder desarrollarla en diversas formas farmacéuticas que mejoren este aspecto es de gran importancia terapéutica, en el actual proyecto se trabaja con formulaciones tanto líquidas como sólidas, con respecto a las primeras dadas sus propiedades de solubilidad (hidrofóbica) las formas más factibles son las suspensiones y emulsiones (liposomas) y de las segundas se trabaja con microesferas recubiertas y tabletas (ambos con microacarreadores) y el tener métodos para

cuantificarlos es igual de importante, por lo anterior se decidió implementar métodos para cuantificar griseofulvina tanto para una forma líquida como para una sólida.

Se encuentran reportadas en la literatura una gama de técnicas para el análisis de la griseofulvina, tales metodologías las podemos clasificar en dos grandes grupos: el primero comprende a las titulaciones, como es la iodometría, el segundo incluye a los análisis instrumentales; espectrofluorometría (295- 335 nm), colorimetría (desarrollando color y leyendo a 420 nm), turbidimetría (para evaluar su potencia), polarografía, cromatografía de líquidos y cromatografía de gases; es necesario mencionar que todos los métodos antes mencionados son para materia prima, para analizar este activo en forma farmacéutica se reportan los métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución y cromatografía de gases.

Todos los métodos antes mencionados requieren de equipo costoso, de reactivos caros o requieren de un largo tiempo para llevarlos a cabo; lo que se pretende en este proyecto es implementar y validar un método barato, sencillo y rápido para cuantificar Griseofulvina en microesferas y suspensión por espectrofotometría Ultravioleta (290 nm).

Referencias: 1, 2, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 22, 24, 25, 28, 29, 31, 33, 37, 38

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar y validar un método analítico para cuantificar Griseofulvina en microesferas y suspensión por espectrofotometría ultravioleta.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

3.2.1 Implementar un método analítico sencillo y barato para cuantificar griseofulvina en microesferas por espectrofotometría ultravioleta.

3.2.2 Implementar un método analítico más sencillo y barato que los reportados en la literatura para cuantificar griseofulvina en suspensión por espectrofotometría ultravioleta.

3.2.3 Validar el método analítico implementado para las microesferas cumpliendo los requisitos para control de calidad.

3.2.4 Validar el método analítico implementado para la suspensión cumpliendo los requisitos para control de calidad.

4 HIPOTESIS

Debido a que la griseofulvina posee electrones π es susceptible a la excitación por la radiación ultravioleta, por lo tanto al extraer el activo con la ayuda de un disolvente orgánico adecuado es posible cuantificar éste tanto en suspensión como en microesferas por medio de la espectrofotometría ultravioleta, en un tiempo y a un costo menor que los métodos reportados en la literatura.

5 MATERIAL Y REACTIVOS

Espátula	
Soporte Universal	
Pinzas para Bureta	
Anillo de Acero	
Embudo de Separación 60 ml	Pyrex
Matraces volumétricos de 25ml	Pyrex
Celdas para espectrofotómetro	Perkin-Elmer
Tubos de ensaye 13 x 100	Pyrex
Tubos de ensaye 13 x 100 con tapa de baquelita	Pyrex
Camisas para centrífuga 13 x 100	Sol-Bat
Vaso de Precipitado de 25 ml	Pyrex
Vaso de Precipitado de 100 ml	Pyrex
Microbureta de 10 ml	Pyrex
Pipeta Graduada 2.2 ml	Kimax
Pipeta Graduada 5 ml	Kimax
Pipeta Pasteur	
Aguja de Acero Inoxidable 5 1/2"	Luer-Lok
Jeringa de 10 ml	Plastipak
Membrana 0.22 μ	Milipore Catálogo PLGC 01310
Cartucho para membrana	Milipore Catálogo SXOO 01300
Pipeta volumétrica 1ml	Pyrex
Pipeta volumétrica 2ml	Pyrex
Papel parafilm	American National Can
Baño de ultrasonido	Astrason; modelo: 11-H
Balanza Analítica	OHAUS; modelo: AP210S

Centrífuga	Sol-Bat (Aparatos Científicos); modelo: 1476
Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible	Perkin-Elmer Lambda 2
Etanol absoluto (grado reactivo)	J.T. Baker
Cloroformo (grado reactivo)	J.T. Baker
Dimetil-Formamida (grado reactivo)	J.T. Baker
Acetato de Etilo (grado reactivo)	J.T. Baker
Hidróxido de Sodio	Merk
Microesferas (materia prima)	Medix
PEG 6000 (materia prima)	Merck
Agua Destilada	
Suspensión de Griseofulvina de marca comercial	
Microesferas de Griseofulvina (formulación experimental)	
Griseofulvina (estándar)	COSUFAR

6 METODOS

Para el desarrollo de los métodos tanto para la suspensión como para las microesferas se usó un método parecido al que se reporta en la F.E.U.M quinta edición para Griseofulvina materia prima, en este se usa etanol como solvente, pero debido a que requería de 100mg de activo y 300ml de solvente (en dos diluciones) por cuantificación (para una concentración total 10 $\mu\text{g/ml}$), se decidió cambiar todo este sistema a 35mg de activo y un total de 75 ml de solvente (en tres diluciones) para minimizar el gasto de reactivos (así obtener una concentración final de 8.96 $\mu\text{g/ml}$).

6.1 DESARROLLO DEL METODO PARA SUSPENSION

Es necesario aclarar que para desarrollar el método de cuantificación para esta forma farmacéutica se utilizó una Suspensión de marca comercial, se hizo de esta manera dado que en el proyecto aún no se había completado el desarrollo de la forma líquida y en el mercado solo se encontró Suspensión.

Basándose en las propiedades de la Griseofulvina (solubilidad) y de la forma farmacéutica se decidió torhar dos rutas diferentes para cuantificar el activo en la suspensión.

a) Propuesta 1:

Extracciones sólido-líquido

- 1. Tomar un mililitro de la suspensión y colocarla en un recipiente adecuado.**
- 2. Adicionar el solvente orgánico o mezcla de estos en la proporción óptima.**
- 3. Filtrar el extracto para eliminar los componentes no solubles.**

4. Llevar al aforo a 25ml con la mezcla o solvente elegido (solución A).
5. Tomar una alícuota de 2ml llevar al aforo a 25ml con el solvente o mezcla de solventes determinados (solución B).
6. Repetir el paso anterior pero con la solución B, leer esta solución a 290nm.

Las modificaciones hechas se resumen en la tabla siguiente:

Método	Paso 2	Paso 3	Notas
1	Solvente: DMF*-Etanol Proporción: 1:1 Extracciones: 2 Recipiente: Tubo de ensaye Porción extractora: 7ml	Filtrado a Gravedad	La extracción se hizo en centrífuga a 3000 rpm.
2	Solvente: Etanol caliente Extracciones: 1 Recipiente: Vaso de precipitado 25ml Porción extractora: 20ml	Filtrado a Gravedad	Esta se realizó en una parrilla agitando con un magneto por 10min a ebullición.
3	Solvente: Etanol caliente Extracciones: 2 Recipiente: Vaso de precipitado 25 ml Porción extractora: 20ml	Filtrado a Gravedad	Esta se hizo en una parrilla agitando con un magneto por 10min a ebullición.
4	Solvente: Etanol caliente Extracciones: 3 Recipiente: Vaso de precipitado 25 ml Porción extractora: 20ml	Filtrado a Vacío	Esta se llevó a cabo en una parrilla agitando con un magneto por 10min a ebullición.

continúa...

Metodo	Paso 2	Paso 3	Notas
5	Solvente: Etanol caliente Extracciones: 2 Recipiente: Vaso de precipitado 25 ml Porción extractora: 20ml	Filtrado a Vacío	Primero se dispersó con 20ml de Sosa 0.01N y luego se colocó en una parrilla agitando con un magneto por 10min a ebullición.
6	Solvente: AE** Cloroformo Proporción: 8.5-1.5 Extracciones: 2 Recipiente: Embudo de extracción de 60ml Porción extractora: 15ml	Filtrado a Gravedad	No determinado

Tabla 3:

*DMF= Dimetil formamida **AE= Acetato de Etilo
Resumen de las variantes en la metodología de la propuesta 1 para cuantificar Griseofulvina en la Suspensión

b) Propuesta 2:

Separación del activo por medios físicos.

1. Tomar un mililitro de la suspensión y colocarla en un tubo de ensayo.
2. Adicionar 3ml Hidróxido de sodio, mezclar perfectamente.
3. Centrifugar y desechar la fase líquida.
4. Adicionar 3ml de etanol.
5. Filtrar.
6. Llevar el filtrado al aforo a 25ml con la mezcla o solvente elegido (solución A`).

7. Tomar una alícuota de 2ml llevar al aforo a 25ml con el solvente o mezcla de solventes adecuados (solución B').

8. Repetir el paso anterior pero con la solución B', leer esta solución a 290nm.

Los detalles de los métodos se dan en la tabla siguiente:

Metodo	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5
7	sosa 1.0N	centrifugado a 3000rpm por 3min. haciendo 3 lavados con la solución de sosa,	el etanol se colocó en vaso de pp y se calentó a ebullición con agitación con un magneto por 10min	filtrado a gravedad.
8	sosa 0.5N	centrifugado a 3000rpm por 3min haciendo tres lavados con la solución de sosa	el etanol se colocó en vaso de pp y se calentó a ebullición con agitación con un magneto por 10min	filtrado a gravedad.
9	sosa 1.0N	centrifugado a 4000rpm 5min haciendo 1 lavado, en la solución de sosa	No se modificó	filtrado a gravedad
10	sosa 1.0N	centrifugado a 4000rpm 5min haciendo 1 lavado, en la solución de sosa	después de adicionar el etanol se colocó en un baño de ultrasonido por 2min	filtrado a vacío
11	sosa 1.0N en etanol	centrifugado a 4000rpm 5min haciendo 1 lavado, en la solución de sosa	después de adicionar el etanol se colocó en un baño de ultrasonido por 2min	filtrado a vacío

continua...

Metodo	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5
12	sosa 1.0N	centrifugado a 4000rpm 5min haciendo 1 lavado en la solución de sosa	el etanol se calentó a ebullición, y después se colocó en un baño de ultrasonido por 2min	se filtró por cartucho y con membrana de 0.22 μ
13	sosa 0.5N	centrifugado primero a 4000rpm por 5min y luego a 3000 rpm 3min,	despues de la adición del etanol se colocó en el baño de ultrasonido 1min,	después se centrifugó y la porción líquida se filtró por membrana 0.22 μ , se repitió ésta operación una vez más juntando los filtrados.

Tabla 4

Resumen de las variaciones hechas a la propuesta 2

Nota: en el método 8 en el paso 8 se adicionó además

1ml de solución patrón a 10 μ g/ml en etanol.

pp: se refiere a un vaso de precipitado de 25ml

El método número 13 para suspensión fué el que dió mejores resultados, lo cual se aprecia fácilmente en la tabla 10 en la parte de resultados

6.2 DESARROLLO DEL METODO PARA MICROESFERAS RECUBIERTAS

Para el desarrollo se trabajó tanto con placebos cargados como con producto a granel. Las microesferas son una forma farmacéutica experimental la cual de forma general contiene, microesferas neutras, un acarreador (de propiedades hidrofóbicas) y griseofulvina, a partir de esto se propuso una serie de metodologías para cuantificar el activo, en general esta fué:

1. Macerar las microesferas en un mortero.
2. Pesar el equivalente a 35mg de griseofulvina.
3. Colocarlas en vaso de precipitado de 25ml y adicionar la mezcla extractora.
4. Separar la fase líquida de la sólida.
5. La cantidad obtenida llevarla al aforo a 25ml con la mezcla elegida.
6. Tomar una alícuota de 2ml de la solución anterior y llevarla al aforo a 25ml.
7. De la solución del paso 6 tomar una alícuota de 2ml y llevarla al aforo con la mezcla extractora y leer esta solución a 290nm.

METODO	PASO 3	PASO 4
1	Etanol 1 extracción de 15ml	Filtrado a gravedad
2	Cloroformo 1 extracción 15ml	Filtrado a gravedad
3	Metanol:Agua (4:1), 1 extracción de 15ml	Centrifugación a 3000rpm por 3min.
4	Cloroformo, 1 extracción de 15ml	Centrifugación a 3000rpm por 3min.
5	Etanol, 1 extracción de 15ml	Centrifugación a 3000rpm por 3min.

continua...

6	Acetonitrilo:Agua (1:1), 1 extracción de 15ml	Centrifugación a 3000rpm por 3min.
7	Cloroformo:Acetato de Etilo (1:1), 1 extracción de 15ml	Centrifugación a 3000rpm por 3min.
8	Cloruro de Metilo, 1 extracción de 15ml	Centrifugación a 3000rpm por 3min.
9	Cloroformo, 1 extracción de 15ml	Filtrado por membrana 0.22 μ
10	Etanol, 1 extracción de 15ml	Filtrado por membrana 0.22 μ
11	Etanol, 2 extracciones de 10ml	Filtrado por membrana 0.22 μ
12	Etanol, 1 extracción de 20ml	Filtrado por membrana 0.22 μ

Tabla 5

Resumen de los detalles de las metodologías realizadas para el desarrollo del método para cuantificar Griseofulvina en Microesferas

El método número 12 fué el que dió mejores resultados, lo cual se observa fácilmente en la tabla 11 de resultados.

6.3 METODOS DESARROLLADOS

Los métodos que tal y como se expresa en las tablas de resultados 10 y 11 fueron el 13 para suspensión y 12 para microesferas recubiertas, ambos se describen con detalle a continuación.

6.3.1 METODO PARA SUSPENSION

1. Tomar 1 ml de suspensión, limpiar con un papel la punta de la pipeta y colocarlo en un tubo de ensaye 13X100.
2. En otro tubo de ensaye 13X100 colocar 3ml de solución de hidróxido de sodio 0.5N y con ésta limpiar las paredes internas de la pipeta succionando y expeliendo la solución tantas veces sea necesario para dejar las paredes internas de la pipeta limpias de suspensión (para mejor resultado se recomienda purgar la pipeta con la solución de hidróxido de sodio antes de usarla para tomar la muestra de suspensión).
3. Mezclar el contenido de ambos tubos y homogeneizar.
4. Centrifugar a 4000rpm por 5min y retirar la fase líquida con una pipeta pasteur.
5. Adicionar otros 3ml de solución de hidróxido de sodio 0.5N, homogeneizar, centrifugar a 3000rpm por 3min y retirar la fase líquida con pipeta pasteur.
6. Adicionar 4ml de etanol, resuspender, colocar en un baño de ultrasonido por 1min y centrifugar a 3000rpm por 3min.
7. Con una jeringa y una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida, quitar la aguja y colocar un cartucho con membrana de 0.22 μ , filtrar directamente a un matraz volumétrico de 25ml.
8. Con el botón restante en el paso 7 repetir el proceso de los pasos 6 y 7 una vez más.
9. Llevar al aforo con etanol, tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, de esta solución tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, ésta solución se lee en el espectrofotómetro a 290nm.

6.3.2 METODO PARA MICROESFERAS

1. Pesar el equivalente de 35mg de griseofulvina de Microesferas.
2. Colocarlo en un vaso de 25ml

3. Adicionar 20ml de Etanol
4. Colocarlo en un baño de ultrasonido por 4min.
5. Con ayuda de una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida
6. Quitar la aguja y colocar un cartucho para filtrar con una membrana de 0.22 μ
7. Colocar el filtrado en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
8. Tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
9. De la solución anterior tomar una alícuota de 2ml y ponerla en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
10. Leer esta solución en el espectrofotómetro a 290nm.

6.4. CURVA DE CALIBRACION

Una vez desarrollados los métodos se procedió a encontrar los niveles de concentraciones que se ajustarán a la ley de Beer, se tomó como 100% 8.96 μ g/ml ya que se obtenía una lectura aproximadamente 0.580 unidades de absorbancia (aproximadamente el punto medio recomendado para este tipo de determinaciones) y de esto se partió para calcular un rango de 80-120%.

6.4.1 METODO PARA PREPARAR LA CURVA DE CALIBRACION

1. Pesar exactamente 35mg de estándar, transferirlo en un matraz de 25 ml, adicionar 20ml de etanol, colocarlo en un baño de ultrasonido por 2min y llevar al aforo con etanol.
2. De la solución anterior tomar alícuotas de: 1.6, 1.8, 2.0, 2.2 y 2.4 (equivalentes al 80, 90 100, 110 y 120%) y colocarlas en matraces volumétricos de 25ml, llevarlos al aforo con etanol.

3. De cada solución tomar una alícuota de 2ml colocarla en matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, leer todas éstas soluciones a 290nm en el espectrofotómetro.

Nivel	Concentración en la última dilución µg/ml	Cantidad requerida de activo por cada nivel en mg
80%	7.16	28.0
90%	8.06	31.5
100%	8.96	35.0
110%	9.85	38.5
120%	10.75	42.0

Tabla 6
Cantidad requerida y concentraciones correspondientes a la última dilución de griseofulvina para cada nivel.

Una vez encontrados los niveles adecuados se procedió a extrapolarlos a los métodos para las formas farmacéuticas.

6.4.2 METODO ESTANDAR AÑADIDO PARA LA SUSPENSION.

El método número 13 para suspensión fué el que dió mejores resultados, lo cual se aprecia fácilmente en la tabla 10 en la parte de resultados, pero debido a que se trabajó con una forma farmacéutica comercial se tuvo el problema, debido a su alta viscosidad y a sus excipientes, de como tomar la cantidad de activo relacionada con cada uno de los niveles elegidos, para esto se decidió trabajar con tres opciones: 1) tomar con una pipeta volumétrica o microbureta la cantidad necesaria de suspensión, 2) preparar una solución stock de suspensión en hidróxido de sodio 0.5N para disminuir la viscosidad y 3) hacer una solución de griseofulvina en cloroformo, la cual, al dejar evaporar el solvente completaría

la cantidad de activo correspondiente a cada nivel (estándar añadido), resultando esta última la mejor como se expresa en la tabla de resultados 12. El método final se describe a continuación:

1. Pesar 200mg de Griseofulvina y transferirlos a un matraz volumétrico de 25ml, adicionar 20ml de cloroformo, colocarlo en un baño de ultrasonido por 2min y llevarlo al aforo con cloroformo.
2. Tomar con ayuda de una microbureta alicuotas de: 2.12, 1.68, 1.25, 0.81 y 0.37ml de la solución anterior y colocarlas en tubos de ensayo (estos corresponden a los niveles de 100% - 80% respectivamente).
3. Dejar que el cloroformo se evapore y usar el método descrito en el apartado 6.3.1

Nivel	Concentración de estándar en la solución stock mg/ml	Concentración por 1 ml de suspensión mg/ml	Cantidad total de Griseofulvina por la solución stock y la suspensión en mg
80%	3.0	25.0	28.0
90%	6.5	25.0	31.5
100%	10.0	25.0	35.0
110%	13.5	25.0	38.5
120%	17.0	25.0	42.0

Tabla 7
Concentración de Griseofulvina correspondiente a cada nivel

Referencia: 29

6.4.3 METODO PLACEBO CARGADO MICROESFERAS

Para este caso y según se expresa en la tabla 11 de resultados el método más idóneo fué el 12. Gracias a que se conocía la formulación completa de las microesferas recubiertas (esta información estuvo disponible debido a que pertenece a este proyecto), para obtener los niveles solo se respetó tanto la cantidad correspondiente de activo como la de los excipientes de acuerdo a su proporción dentro de la formulación para cada nivel. Para la validación se trabajó con placebos cargados tal y como se pide legalmente. El método empleado se describe a continuación.

1. Pesar 35mg de griseofulvina, 35mg de microacarreador y 1.25g de microesferas neutras.
2. Colocarlo en un vaso de 25ml
3. Adicionar 20ml de Etanol
4. Colocarlo en un baño de ultrasonido por 4min.
5. Con ayuda de una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida
6. Quitar la aguja y colocar un cartucho para filtrar con una membrana de 0.22 μ
7. Colocar el filtrado en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
8. Tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
9. De la solución anterior tomar una alícuota de 2ml y ponerla en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
10. Leer esta solución en el espectrofotómetro a 290nm.

Nivel	Micro Esferas Neutras (g)	PEG 6000 (mg)	Griseofulvina Estándar (mg)
80%	1.000	28.0	28.0
90%	1.125	31.5	31.5
100%	1.250	35.0	35.0
110%	1.375	38.5	38.5
120%	1.500	42.0	42.0

Tabla 8

Cantidad de activo y excipientes correspondientes a cada nivel.

Referencia: 29

6.5 METODO PARA EL ESTANDAR

Para las partes de la validación donde se requería obtener un porcentaje de recobro se siguió el siguiente método de preparación de solución estándar.

1. Pesar 35mg de estándar, transferirlo a un matraz de 25 ml, adicionar 20ml de etanol, colocarlo en un baño de ultrasonido por 2min y llevar al aforo con etanol.
2. Tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
3. De ésta solución tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, esta solución se lee en el espectrofotómetro a 290nm.

6.6 METODOS PARA LA VALIDACION

Los métodos empleados para evaluar cada prueba de todos los parámetros requeridos se expresa detalladamente a continuación, siendo la linealidad y la precisión de sistema la misma para ambos dado que el sistema de diluciones y los niveles de concentración fueron los mismos.

a) PRECISION DE SISTEMA

1. Pesar 35mg de estándar, transferirlo a un matraz de 25 ml, adicionar 20ml de etanol, colocarlo en un baño de ultrasonido por 2min y llevar al aforo con etanol.
2. Tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
3. De esta solución tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, leer esta solución 6 veces en el espectrofotómetro a 290nm.

b) LINEALIDAD DE SISTEMA

1. Pesar 35mg de estándar por triplicado, transferir éstos a matraces de 25 ml, adicionar 20ml de etanol a cada uno, colocarlos en un baño de ultrasonido por 2min y llevarlos al aforo con etanol.
2. De las soluciones anteriores tomar alícuotas de: 1.6, 1.8, 2.0, 2.2 y 2.4 (equivalentes al 80, 90, 100, 110 y 120%) y colocarlas en matraces volumétricos de 25ml, llevarlos al aforo con etanol.
3. De cada solución tomar una alícuota de 2ml colocarla en matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, leer todas estas soluciones a 290nm en el espectrofotómetro.

6.6.1 SUSPENSION

a) LINEALIDAD DE METODO

1. Pesar 200mg de Griseofulvina y transferirlos a un matraz volumétrico de 25ml, adicionar 20ml de cloroformo, colocarlo en un baño de ultrasonido por 2min y llevarlo al aforo con cloroformo.
2. Tomar con ayuda de una microbureta alícuotas de: 2.12, 1.68, 1.25, 0.81 y 0.37ml por triplicado de la solución anterior y colocarlas en tubos de ensayo (de acuerdo a la tabla 7).
3. Dejar que el cloroformo se evapore.
4. Tomar 1ml de suspensión, limpiar con un papel la punta de la pipeta y colocarlo en los tubo de ensaye del paso 3.
5. En otro tubo de ensaye 13X100 colocar 3ml de solución de hidróxido de sodio 0.5N y con este limpiar las paredes internas de la pipeta succionando y expeliendo la solución tantas veces sea necesario para dejar las paredes internas de la pipeta limpias de suspensión (para mejor resultado se recomienda purgar la pipeta con la solución de hidróxido de sodio antes de usarla para tomar la muestra de suspensión).
6. Mezclar el contenido de ambos tubos y homogeneizar.
7. Centrifugar a 4000rpm por 5min y retirar la fase líquida con una pipeta pasteur.
8. Adicionar otros 3ml de solución de hidróxido de sodio 0.5N, homogeneizar, centrifugar a 3000rpm por 3min y retirar la fase líquida con pipeta pasteur.
9. Adicionar 4ml de etanol, resuspender, colocar en un baño de ultrasonido por 1min y centrifugar a 3000rpm por 3min.
10. Con una jeringa y una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida, quitar la aguja y colocar un filtro con membrana de 0.22 μ , filtrar directamente a un matraz volumétrico de 25ml.
11. Con el botón restante en el paso 7 repetir el proceso de los pasos 7-10 una vez más.

12. Llevar al aforo con etanol, tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, de esta solución tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, ésta solución se lee en el espectrofotómetro a 290nm.

b) EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

1. Pesar 200mg de Griseofulvina y transferirlos a un matraz volumétrico de 25ml, adicionar 20ml de cloroformo, colocarlo en un baño de ultrasonido por 2min y llevarlo al aforo con cloroformo.

2. Tomar con ayuda de una microbureta seis alícuotas de: 1.25ml de la solución anterior y colocarlas en tubos de ensayo (de acuerdo a la tabla 7).

3. Dejar que el cloroformo se evapore.

4. Tomar 1ml de suspensión, limpiar con un papel la punta de la pipeta y colocarlo en los tubo de ensaye del paso 3.

5. En otro tubo de ensaye 13X100 colocar 3ml de solución de hidróxido de sodio 0.5N y con este limpiar las paredes internas de la pipeta succionando y expeliendo la solución tantas veces sea necesario para dejar las paredes internas de la pipeta limpias de suspensión (para mejor resultado se recomienda purgar la pipeta con la solución de hidróxido de sodio antes de usarla para tomar la muestra de suspensión).

6. Mezclar el contenido de ambos tubos y homogeneizar.

7. Centrifugar a 4000rpm por 5min y retirar la fase líquida con una pipeta pasteur.

8. Adicionar otros 3ml de solución de hidróxido de sodio 0.5N, homogeneizar, centrifugar a 3000rpm por 3min y retirar la fase líquida con pipeta pasteur.

9. Adicionar 4ml de etanol, resuspender, colocar en un baño de ultrasonido por 1min y centrifugar a 3000rpm por 3min.

10. Con una jeringa y una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida, quitar la aguja y colocar un filtro con membrana de 0.22 μ , filtrar directamente a un matraz volumétrico de 25ml.

11. Con el botón restante en el paso 7 repetir el proceso de los pasos 7-10 una vez más.
12. Llevar al aforo con etanol, tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, de esta solución tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, ésta solución se lee en el espectrofotómetro a 290nm.

c) PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)

1. Pesar 200mg de Griseofulvina y transferirlos a un matraz volumétrico de 25ml, adicionar 20ml de cloroformo, colocarlo en un baño de ultrasonido por 2min y llevarlo al aforo con cloroformo (una por cada analista).
2. Tomar con ayuda de una microbureta alícuotas de: 1.25ml por triplicado de la solución anterior (por cada analista) y colocarlas en tubos de ensayo (de acuerdo a la tabla xx).
3. Dejar que el cloroformo se evapore.
4. Tomar 1ml de suspensión, limpiar con un papel la punta de la pipeta y colocarlo en los tubo de ensaye del paso 3.
5. En otro tubo de ensaye 13X100 colocar 3ml de solución de Hidróxido de sodio 0.5N y con este limpiar las paredes internas de la pipeta succionando y expeliendo la solución tantas veces sea necesario para dejar las paredes internas de la pipeta limpias de suspensión (para mejor resultado se recomienda purgar la pipeta con la solución de hidróxido de sodio antes de usarla para tomar la muestra de suspensión).
6. Mezclar el contenido de ambos tubos y homogeneizar.
7. Centrifugar a 4000rpm por 5min y retirar la fase líquida con una pipeta pasteur.
8. Adicionar otros 3ml de solución de hidróxido de sodio 0.5N, homogeneizar, centrifugar a 3000rpm por 3min y retirar la fase líquida con pipeta pasteur.
9. Adicionar 4ml de etanol, resuspender, colocar en un baño de ultrasonido por 1min y centrifugar a 3000rpm por 3min.

10. Con una jeringa y una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida, quitar la aguja y colocar un filtro con membrana de 0.22 μ , filtrar directamente a un matraz volumétrico de 25ml.

11. Con el botón restante en el paso 7 repetir el proceso de los pasos 7-10 una vez más.

12. Llevar al aforo con etanol la solución, tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, de esta solución tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, ésta solución se lee en el espectrofotómetro a 290nm.

d) ESTABILIDAD

Para la prueba estabilidad de la muestra se eligió trabajar solo con tiempos y temperaturas dado que el principal factor que alteraría a la muestra es la evaporación del solvente, debido a la alta presión de vapor de este, y la estabilidad de la Griseofulvina contra factores como: luz, temperatura, humedad, etc.

1. Pesar 200mg de Griseofulvina y transferirlos a un matraz volumétrico de 25ml, adicionar 20ml de cloroformo, colocarlo en un baño de ultrasonido por 2min y llevarlo al aforo con cloroformo.

2. Tomar con ayuda de una microbureta alícuotas de: 1.25ml por triplicado de la solución anterior y colocarlas en tubos de ensayo (de acuerdo a la tabla 7).

3. Dejar que el cloroformo se evapore.

4. Tomar 1ml de suspensión, limpiar con un papel la punta de la pipeta y colocarlo en los tubos de ensayo del paso 3.

5. En otro tubo de ensayo 13X100 colocar 3ml de solución de hidróxido de sodio 0.5N y con este limpiar las paredes internas de la pipeta succionando y expeliendo la solución tantas veces sea necesario para dejar las paredes internas de la pipeta limpias de suspensión (para mejor resultado se recomienda purgar la pipeta con la solución de hidróxido de sodio antes de usarla para tomar la muestra de suspensión).

6. Mezclar el contenido de ambos tubos y homogeneizar.
7. Centrifugar a 4000rpm por 5min y retirar la fase líquida con una pipeta pasteur.
8. Adicionar otros 3ml de solución de hidróxido de sodio 0.5N, homogeneizar, centrifugar a 3000rpm por 3min y retirar la fase líquida con pipeta pasteur.
9. Adicionar 4ml de etanol, resuspender, colocar en un baño de ultrasonido por 1min y centrifugar a 3000rpm por 3min.
10. Con una jeringa y una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida, quitar la aguja y colocar un filtro con membrana de 0.22 μ , filtrar directamente a un matraz volumétrico de 25ml.
11. Con el botón restante en el paso 7 repetir el proceso de los pasos 7-10 una vez más.
12. Llevar al aforo con etanol, tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, de esta solución tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol
13. De las soluciones obtenidas del paso anterior dividir las para su lectura como sigue: tomar una lectura inicial para cada muestra y almacenar 4 muestras para una lectura posterior a 30°C y 4°C a las 24 y 48 horas, tal y como se indica en la tabla siguiente:

Condicion / Muestra	Absorbancia	Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada	Porcentaje de recobro
Inicial				
24 horas 30°C				
24 horas 4°C				
48 horas 30°C				
48 horas 4°C				

Tabla 9

Resumen de las condiciones bajo las que se trabajaron las muestras para estabilidad (ver tablas 25 y 35).

e) ESPECIFICIDAD

Debido a que no se contaba con los excipientes empleados en la fabricación de la suspensión para llevar a cabo la prueba de especificidad se comparó la forma de la curva de absorción en todo el rango de la región ultravioleta, obtenida de dos problemas trabajados de forma independiente contra la de un estándar (si resultaban idénticas se consideró específico el método).

1. Trabajar a la par un estándar y una muestra problema de suspensión como sigue.
2. Tomar 1ml de suspensión, limpiar con un papel la punta de la pipeta y colocarlo en los tubos de ensaye 13X100.
3. En otro tubo de ensaye 13X100 colocar 3ml de solución de hidróxido de sodio 0.5N y con ésta limpiar las paredes internas de la pipeta succionando y expeliendo la solución tantas veces sea necesario para dejar las paredes internas de la pipeta limpias de suspensión (para mejor resultado se recomienda purgar la pipeta con la solución de hidróxido de sodio antes de usarla para tomar la muestra de suspensión).
4. Mezclar el contenido de los tubos de los pasos 2 y 3, y homogeneizar.
5. Pesar 25mg de griseofulvina estándar y transferirla a un tubo de ensayo
6. Centrifugar ambas muestras a 4000rpm por 5min y retirar la fase líquida con una pipeta pasteur.
7. Adicionar otros 3ml de solución de hidróxido de sodio 0.5N, homogeneizar, centrifugar a 3000rpm por 3min y retirar la fase líquida con pipeta pasteur.
8. Adicionar 4ml de etanol, resuspender, colocar en un baño de ultrasonido por 1min y centrifugar a 3000rpm por 3min.
9. Con una jeringa y una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida, quitar la aguja y colocar un filtro con membrana de 0.22 μ , filtrar directamente a un matraz volumétrico de 25ml.
10. Con el botón restante en el paso 9 repetir el proceso de los pasos 8 y 9 una vez más.

11. Llevar al aforo con etanol, tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol, de esta solución tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml, llevarlo al aforo con etanol y leer a 290nm.

6.6.2 MICROESFERAS

a) LINEALIDAD DE METODO

1. Pesar microesferas, PEG y griseofulvina como se muestra en la tabla 8 para todos los niveles por triplicado.
2. Colocarlos en vasos de 25ml
3. Adicionar 20ml de Etanol
4. Colocarlos en un baño de ultrasonido por 4min.
5. Con ayuda de una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida
6. Quitar la aguja y colocar un cartucho para filtrar con una membrana de 0.22 μ
7. Colocar el filtrado en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
8. Tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
9. De la solución anterior tomar una alícuota de 2ml y ponerla en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
10. Leer esta solución en el espectrofotómetro a 290nm.

b) EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

1. Pesar microesferas, PEG y griseofulvina como se muestra en la tabla xx para el nivel de 100% por sextuplicado.
2. Colocarlos en vasos de 25ml
3. Adicionar 20ml de Etanol

4. Colocarlos en un baño de ultrasonido por 4min.
5. Con ayuda de una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida
6. Quitar la aguja y colocar un cartucho para filtrar con una membrana de 0.22 μ
7. Colocar el filtrado en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
8. Tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
9. De la solución anterior tomar una alícuota de 2ml y ponerla en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
10. Leer esta solución en el espectrofotómetro a 290nm.

c) PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)

1. Pesar microesferas, PEG y griseofulvina como se muestra en la tabla 8 para el nivel de 100% por triplicado, por cada analista y se repetira por dos dias diferentes
2. Colocarlos en vasos de 25ml
3. Adicionar 20ml de Etanol
4. Colocarlos en un baño de ultrasonido por 4min.
5. Con ayuda de una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida
6. Quitar la aguja y colocar un cartucho para filtrar con una membrana de 0.22 μ
7. Colocar el filtrado en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
8. Tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
9. De la solución anterior tomar una alícuota de 2ml y ponerla en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
10. Leer esta solución en el espectrofotómetro a 290nm.

d) ESTABILIDAD

Para la estabilidad se eligió trabajar solo con tiempos y temperaturas dado que el mayor factor que alteraría a la muestra es la evaporación del solvente, debido a la alta estabilidad de la Griseofulvina contra factores como: luz, temperatura, humedad, etc. y la baja presión de vapor del solvente empleado.

1. Pesar microesferas, PEG y griseofulvina como se muestra en la tabla 8 para el nivel de 100% por triplicado.
2. Colocarlos en vasos de 25ml
3. Adicionar 20ml de Etanol
4. Colocarlos en un baño de ultrasonido por 4min.
5. Con ayuda de una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida
6. Quitar la aguja y colocar un cartucho para filtrar con una membrana de 0.22 μ
7. Colocar el filtrado en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
8. Tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.
9. De la solución anterior tomar una alícuota de 2ml y ponerla en un matraz volumétrico de 50ml y llevarlo al aforo con etanol.
10. Someter la solución anterior a las condiciones dadas en la tabla 9
11. Leer estas soluciones en el espectrofotómetro a 290nm.

Nota: Las condiciones en cuanto a tiempos y temperaturas se expresan en la tabla 9, ya que son las mismas que las usadas para la suspensión.

e) ESPECIFICIDAD

- 1. Pesar dos muestras la primera con microesferas, PEG y griseofulvina como se muestra en la tabla 8 para el nivel de 100% por duplicado, la segunda con microesferas y PEG como se muestra en la misma tabla.**
- 2. Colocarlos en vasos de 25ml**
- 3. Adicionar 20ml de Etanol**
- 4. Colocarlos en un baño de ultrasonido por 4min.**
- 5. Con ayuda de una aguja de acero inoxidable recuperar la fase líquida**
- 6. Quitar la aguja y colocar un cartucho para filtrar con una membrana de 0.22 μ**
- 7. Colocar el filtrado en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.**
- 8. Tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.**
- 9. De la solución anterior tomar una alícuota de 2ml y ponerla en un matraz volumétrico de 25ml y llevarlo al aforo con etanol.**
- 10. Leer esta solución en el espectrofotómetro a 290nm.**

V RESULTADOS

7.1 RESULTADOS DEL DESARROLLO DE LOS METODOS

7.1.1 SUSPENSION

Metodo	Absorbancia Estandar	Absorbancia Problema (promedio)	% de Recobro Promedio
1	0.450	No determinado	No determinado
2	0.450	0.380	84.4440
3	0.460	0.370	80.4347
4	0.458	0.310	67.6855
5	0.485	0.725*	166.666*
6	0.480	0.100	23.2558
7	0.436	0.419	96.1009
8	0.431	0.522**	28.2366**
9	0.429	0.389	90.6750
10	0.443	0.486	98.4198
11	0.439	No determinado	No determinado
12	0.442	0.428	96.8326
13	0.445	0.448	100.6741

Tabla 10

Resultados del desarrollo del método para suspensión.
Los resultados de absorbancia problema y % de recobro
son el promedio de al menos dos lecturas independientes.

*En este caso el problema resultó turbio.

**Aqui se usó un método de estándar añadido.

En todo el desarrollo se uso estandar y problema con 25 mg de activo.

7.1.2 MICROESFERAS RECUBIERTAS

Metodo	Absorbancia Estandar	Absorbancia Problema (promedio)	% de Recobro Promedio
1	0.542	0.163	30.0738
2	0.542	0.186	34.8708
3	0.580	0.120	20.6896
4	0.585	0.055	9.4017
5	0.575	0.195	33.6130
6	0.58	0.200	34.4827
7	0.565	0.255	45.1327
8	0.570	0.300	52.6315
9	0.576	0.219	38.0208
10	0.582	0.472	81.0996
11	0.585	0.560	95.7264
12	0.581	0.585	100.6884

Tabla 11
Resultados del desarrollo del método para Microesferas recubiertas.
Los resultados de absorbancia problema y % de recobro son el promedio de al menos dos lecturas independientes.
En este caso se usó estándar y problema con 35 mg de activo.

7.1.3 RESULTADOS DEL ESTANDAR AÑADIDO PARA LA SUSPENSION

Metodo	Resultados
1	Debido a la alta viscosidad de la suspensión y a la estrecha salida de los instrumentos volumétricos no fue posible tomar fracciones de volumen muy pequeños.
2	La viscosidad de la suspensión se disminuyó, pero la solución final resultó muy poco homogénea.
3	De esta forma se obtuvieron soluciones homogéneas y el método es repetible.

Tabla 12
Resultados de los métodos empleados para niveles de suspensión.

7.2 RESULTADOS DE LA VALIDACION

7.2.1 RESULTADOS DEL SISTEMA

a) PRECISION DE SISTEMA.

MUESTRA	ABSORBANCIA
1	0.539
2	0.539
3	0.538
4	0.538
5	0.538
6	0.538

Tabla 13
Resultados experimentales obtenidos para la precisión del sistema

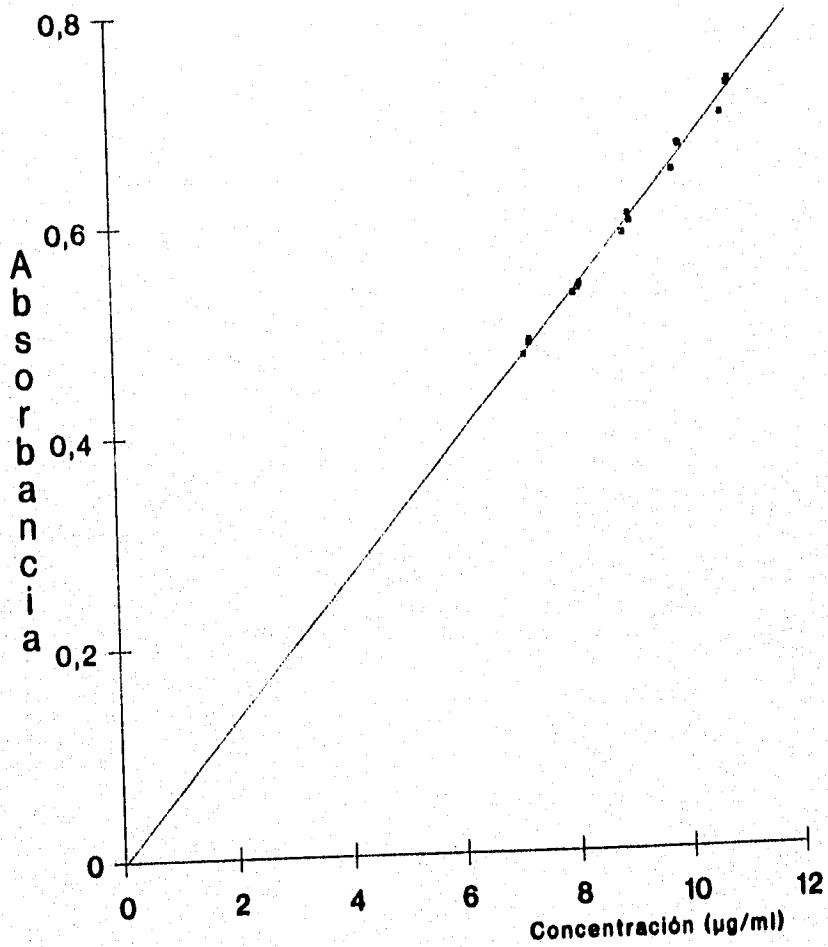
PARAMETRO	CRITERIO	VALOR OBTENIDO
C.V.	≤ 1.5%	0.099274%

Tabla 14
Resultados del análisis estadístico para la precisión del sistema.

b) LINEALIDAD DEL SISTEMA

MUESTRA	CONCENTRACION µg/ml	ABSORBANCIA
1	7.18	0.472
2	7.29	0.486
3	7.27	0.483
4	8.08	0.529
5	8.20	0.538
6	8.17	0.534
7	8.98	0.585
8	9.11	0.596
9	9.08	0.603
10	9.88	0.644
11	10.02	0.667
12	9.99	0.669
13	10.78	0.696
14	10.93	0.728
15	10.90	0.724

Tabla 15
Resultados experimentales obtenidos para la linealidad del sistema



Gráfica 1
Linealidad de Sistema

PARAMETRO	CRITERIO	VALOR OBTENIDO
C.V.	$\leq 1.5\%$	1.0861
r^2	≥ 0.98	0.9937
r	≥ 0.99	0.9968

Tabla 16
Resultados del análisis estadístico para la linealidad del sistema.

7.2.2 RESULTADOS SUSPENSION

a) EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

MUESTRA	ABSORBANCIA	CANTIDAD ADICIONADA µg/ml	CANTIDAD RECUPERADA µg/ml	PORCENTO DE RECUBRO
1	0.581	8.96	9.08	101.3658
2	0.592	8.96	9.25	103.2819
3	0.572	8.96	8.94	99.7926
4	0.560	8.96	8.75	97.6991
5	0.576	8.96	9.00	100.4905
6	0.565	8.96	8.83	98.5714
STD	0.565	8.83		

Tabla 17
Resultados experimentales obtenidos para exactitud y repetibilidad al 100% para suspensión

PARAMETRO	CRITERIO	VALOR OBTENIDO
C.V.	$\leq 4.0\%$	1.9963
Desviación Estandar	-----	2.0018
Varianza (S^2)	-----	4.0072
Promedio de Recobro	96 - 104%	100.1997

Tabla 18
Resultados del análisis estadístico para la exactitud y repetibilidad al 100%.

Intervalo de confianza
 para la varianza
 $P (1.5614 < \sigma^2 < 24.11) = 0.95$
 Prueba de Hipótesis e Intervalo de confianza
 para la media
 $H_0: \mu = 100$
 $H_a: \mu \neq 100$
 $t_{cal} = 0.17742$
 $t_{0.975} = 2.5776$
 $\therefore H_0$ se acepta
 $P (98.4982 < \mu < 101.7917) = 0.95$
 El valor de la media se encuentra dentro del intervalo

b) LINEALIDAD DE METODO

MUESTRA	ABSORBIANCIA	CANTIDAD ADICIONADA g/ml	CANTIDAD RECUPERADA g/ml	PORCIENTO DE RECUBRIMIENTO
1	0.480	7.16	7.3476	102.6212
2	0.486	7.16	7.4395	103.9039
3	0.476	7.16	7.2864	101.7660
4	0.545	8.06	8.3426	103.5071
5	0.539	8.06	8.2508	102.3676
6	0.520	8.06	7.9599	98.7591
7	0.570	8.96	8.7253	97.3813
8	0.602	8.96	9.2152	102.8483
9	0.594	8.96	9.0927	101.4816
10	0.650	9.85	9.9499	101.0150
11	0.634	9.85	9.7050	98.5285
12	0.640	9.85	9.7969	99.4609
13	0.720	10.75	11.0215	102.5257
14	0.699	10.75	10.7000	99.5354
15	0.685	10.75	10.4857	97.5418
STD	0.587	8.98	-----	-----

Tabla 19
 Resultados experimentales obtenidos para la linealidad del método para suspensión

PARAMETRO	CRITERIO	VALOR OBTENIDO
C.V.	$\leq 4.0\%$	2.0835%
Porcentaje de Recobro	96- 104%	100.8829
Pendiente (b)	$\cong 1$	0.9351
r^2	≥ 0.98	0.9810
Ordenada al origen (a)	$\cong 0$	0.6457

Tabla 20
Resultados del análisis estadístico para la linealidad del método.

Prueba de Hipótesis e Intervalo de confianza para la pendiente

$$H_0: B = 1$$

$$H_a: B \neq 1$$

$$t_{cal} = 1.8085$$

$$t_{0.975} = 2.1604$$

$\therefore H_0$ se acepta

$$P (0.85774 < B < 1.01261)$$

El valor de la pendiente se encuentra dentro del intervalo

Prueba de Hipótesis e Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$H_0: A = 0$$

$$H_a: A \neq 0$$

$$t_{cal} = 1.9775$$

$$t_{0.975} = 2.1604$$

$\therefore H_0$ se acepta

$$P (-0.05927 < A < 1.34152)$$

El valor de la ordenada al origen se encuentra dentro del intervalo

c) PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)

MUESTRA	ABSORBANCIA	CANTIDAD ADICIONADA µg/ml	CANTIDAD RECUPERADA µg/ml	PORCIENTO DE RECUBRO
D1A1	0.581	8.96	9.0821	101.3628
	0.592	8.96	9.2540	103.2819
	0.576	8.96	9.0039	100.4905
D1A2	0.593	8.96	8.7253	97.3813
	0.578	8.96	9.2152	102.8483
	0.567	8.96	9.0927	101.4816
D2A1	0.570	8.96	9.0128	100.5894
	0.602	8.96	8.7848	98.0450
	0.594	8.96	8.6176	96.1791
D2A2	0.599	8.96	8.6583	96.5354
	0.570	8.96	8.8287	98.5354
	0.566	8.96	8.7668	97.8439

Tabla 21

Resultados experimentales obtenidos para la precisión (reproducibilidad) para suspensión

D1A1 = Día Primero Analista 1

D1A2 = Día Primero Analista 2

D2A1 = Día Segundo Analista 1

D2A2 = Día Segundo Analista 2

PARAMETRO	CRITERIO	VALOR OBTENIDO
C.V.	≤ 4.0%	2.4293%
Repetibilidad	-----	1.996463

Tabla 22

Resultados del análisis estadístico para la precisión (reproducibilidad).

Análisis de Varianza para Precisión (Reproducibilidad)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F _{cal}	F _{tab}
Analista	1	30.00678	30.00678	7.528	7.57
Día	1	2.220115	2.220115	0.557	7.57
Día-Analista	1	0.236986	0.236986	0.059	7.57
Error	8	31.88605	3.985756	****	****

Tabla 23

Resultados de la ANADEV A Dos Factores Fijos para la precisión
(reproducibilidad) con una significancia de 0.025

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F _{cal}	F _{tab}
Analista	1	30.00678	30.00678	24.424	38.51
Día	2	2.457102	1.228551	0.308	6.06
Error	8	31.88605	3.985756	****	****

Tabla 24
Resultados de la ANADEVa de Bloques Aleatorios para la precisión (reproducibilidad) con una significancia de 0.05

d) ESTABILIDAD

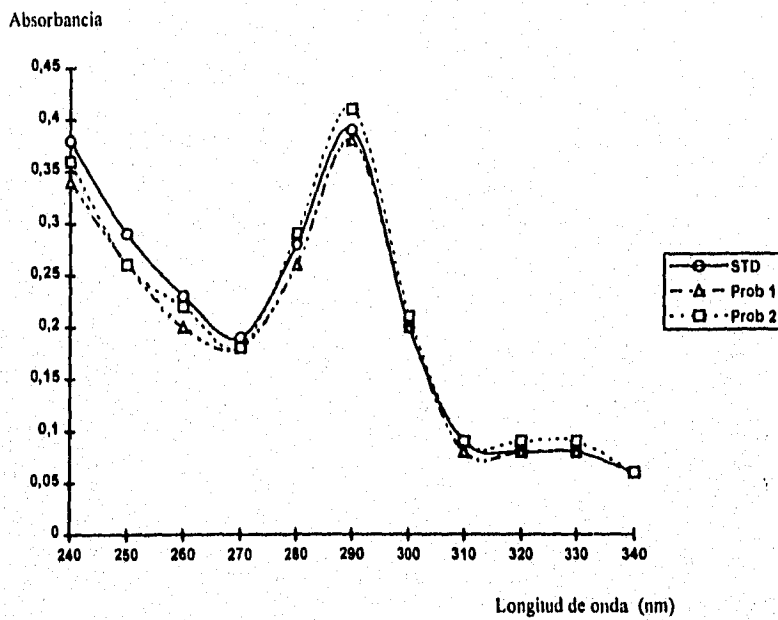
MUESTRA	ABSORBANCIA	CANTIDAD ADICIONADA ug/ml	CANTIDAD RECUPERADA ug/ml	PORCIENTO DE RECUBRO
Inicial	0.583	8.96	8.8608	98.8931
	0.575	8.96	8.7392	97.5361
	0.590	8.96	8.9672	100.0805
24hrs 30°C	0.571	8.96	9.2056	102.7415
	0.565	8.96	9.1089	101.6619
	0.576	8.96	9.2862	103.6411
24hrs 4°C	0.558	8.96	8.9960	100.4023
	0.543	8.96	8.7542	97.7033
	0.562	8.96	9.0605	101.1221
48hrs 30°C	0.615	8.96	9.5257	106.3145
	0.609	8.96	9.4328	105.2773
	0.623	8.96	9.6496	107.6974
48hrs 4°C	0.607	8.96	9.4018	104.9315
	0.600	8.96	9.2934	103.7214
	0.612	8.96	9.4793	105.7959

Tabla 25
Resultados experimentales obtenidos para la estabilidad para suspensión

CONDICION	INTERVALO DE CONFIANZA	T PROMEDIO
24hrs 30°C	1.6343 - 6.0254	103.8930
24hrs 4°C	-2.0849 - 3.9563	100.9424
48hrs 30°C	5.2153 - 9.9709	107.6839
48hrs 4°C	3.7560 - 8.2033	106.0527

Tabla 26
Resultados del análisis estadístico para la estabilidad.
Con un t de Dunnet de 0.05 de significancia.

e) ESPECIFICIDAD



Gráfica 2
Curvas de absorción en la región ultravioleta de dos problemas y un estandar de Griseofulvina.

7.2.3. RESULTADOS MICROESFERAS

a) EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

MUESTRA	ABSORBANCIA	CANTIDAD ADICIONADA μg/ml	CANTIDAD RECUPERADA μg/ml	PORCIENTO DE RECUBRO
1	0.564	8.9600	8.9849	100.2785
2	0.556	8.9856	8.8575	98.5745
3	0.561	9.0368	8.9371	98.8974
4	0.558	8.9088	8.8893	99.7819
5	0.585	9.1648	9.3195	101.6880
6	0.568	9.1136	9.0486	99.28770
STD	0.601	-----	-----	-----

Tabla 27
Resultados experimentales obtenidos para la exactitud y repetibilidad al 100% para Microesferas

PARAMETRO	CRITERIO	VALOR OBTENIDO
C.V.	≤ 3.0%	1.1305
Desviación Estandar	-----	1.1277
Varianza (S ²)	-----	1.2717
Promedio de Recobro	97 - 103%	99.7513

Tabla 28
Resultados del análisis estadístico para la exactitud y repetibilidad al 100%.

Intervalo de confianza
para la varianza
 $P(0.4955 < \sigma^2 < 7.6518) = 0.95$
Prueba de Hipótesis e Intervalo de confianza
para la media
Ho: $\mu = 100$
Ha: $\mu \neq 100$
tcal = 0.5400
 $t_{0.975} = 2.5776$
∴ Ho se acepta
 $P(98.5679 < \mu < 100.9348) = 0.95$
El valor de la media se encuentra dentro del intervalo

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

b) LINEALIDAD DE METODO

MUESTRA	ABSORBANCIA	CANTIDAD ADICIONADA g/ml	CANTIDAD RECUPERADA g/ml	PORCIENTO DE RECUBRO
1	0.458	7.3216	7.2375	98.8517
2	0.455	7.1963	7.1901	99.9141
3	0.461	7.1963	7.2849	101.2317
4	0.531	8.2688	8.3911	101.4791
5	0.525	8.4736	8.2962	97.9075
6	0.527	8.1664	8.3279	101.9776
7	0.578	9.0112	9.1338	101.3608
8	0.576	9.1392	9.1022	99.5953
9	0.583	9.0880	9.2128	101.3736
10	0.622	10.0096	9.8291	98.1970
11	0.618	9.8148	9.7659	99.6035
12	0.640	9.9072	10.1135	102.0831
13	0.700	10.7520	11.0617	102.8806
14	0.696	10.7520	10.9985	102.2927
15	0.687	11.0336	10.8562	98.3930
STD	0.567	8.96	-----	-----

Tabla 29
Resultados experimentales obtenidos para la linealidad del método para Microesferas

PARAMETRO	CRITERIO	VALOR OBTENIDO
C.V.	$\leq 3.0\%$	1.5779%
Porciento de Recobro	97- 103%	100.4761
Pendiente (b)	≈ 1	1.0172
r^2	≥ 0.98	0.9859
Ordenada al origen (a)	≈ 0	-0.1109

Tabla 30
Resultados del análisis estadístico para la linealidad de método.

Prueba de Hipótesis e Intervalo de confianza
para la pendiente

$H_0: B = 1$

$H_a: B \neq 1$

$t_{cnl} = -0.5120$

$t_{0.975} = 2.1604$

continua...

∴ Ho se acepta

$$P(0.9445 < B < 1.0899) = 0.95$$

El valor de la pendiente se encuentra dentro del intervalo

Prueba de Hipótesis e Intervalo de confianza

para la ordenada al origen

$$H_0: A = 0$$

$$H_a: A \neq 0$$

$$t_{\text{cal}} = 0.03107$$

$$t_{0.975} = 2.1604$$

∴ Ho se acepta

$$P(-3.6809 < A < 3.4590) = 0.95$$

El valor de la ordenada al origen se encuentra dentro del intervalo

c) PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)

MUESTRA	ABSORBANCIA	CANTIDAD ADICIONADA g/ml	CANTIDAD RECUPERADA g/ml	PORCIENTO DE RECUBRO
D1A1	0.578	9.0112	9.1338	101.3608
	0.576	9.1392	9.1022	99.5753
	0.583	9.0880	9.2128	101.3736
D1A2	0.559	9.0112	8.9053	98.8248
	0.562	8.9344	8.9530	100.2092
	0.578	8.9600	9.2079	102.7677
D2A1	0.556	8.9856	8.8575	98.5745
	0.561	9.0368	8.9371	98.8974
	0.558	9.1648	8.8893	101.6880
D2A2	0.586	9.4464	9.3693	99.1840
	0.565	8.9856	9.0335	100.5338
	0.559	8.9856	8.9376	99.4661

TABLA 31

Resultados experimentales obtenidos para la precisión (reproducibilidad) para
Microesferas

D1A1 = Día Primero Analista 1

D1A2 = Día Primero Analista 2

D2A1 = Día Segundo Analista 1

D2A2 = Día Segundo Analista 2

PARAMETRO	CRITERIO	VALOR OBTENIDO
C.V.	< 3.0%	1.4425%
Repetibilidad	-----	1.438056

Tabla 32
Resultados del análisis estadístico para la precisión (reproducibilidad).

Análisis de Varianza para Precisión (Reproducibilidad)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Fcal	Ftab
Analista	1	2.193613	2.193613	1.0607	5.25
Día	1	0.001946	0.001946	0.0009	5.25
Día-Analista	1	0.121780	0.121780	0.0588	5.25
Error	8	16.54406	-----	-----	-----

Tabla 33
Resultados de la ANADEVa de Dos Factores Fijos para la precisión (reproducibilidad) con una significancia de 0.05

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Fcal	Ftab
Analista	1	0.001946	0.001946	0.0019	38.51
Día	2	2.315394	1.157697	0.5598	6.06
Error	8	16.54406	2.068007	-----	-----

Tabla 34
Resultados de la ANADEVa de Bloques Aleatorios para la precisión (reproducibilidad) con una significancia de 0.05

d) ESTABILIDAD

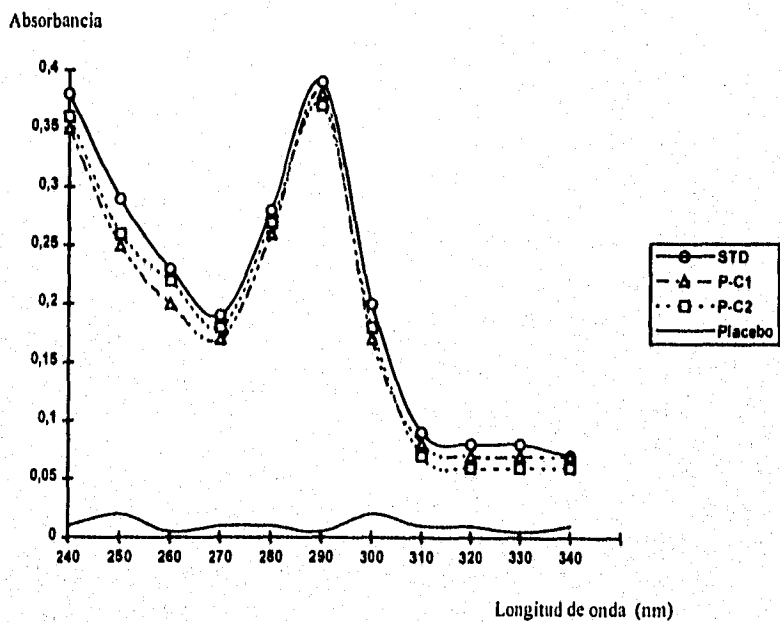
MUESTRA	ABSORBANCIA	CANTIDAD ADICIONADA g/ml	CANTIDAD RECUPERADA g/ml	PORCIENTO DE RECUBRO
Inicial	0.571	9.1648	8.9454	97.6068
	0.565	8.8064	8.8514	100.5118
	0.564	8.9088	8.8358	99.1806
24hrs 30°C	0.615	9.1648	9.4359	102.9588
	0.590	8.8064	9.0523	102.7933
	0.588	8.9088	9.0217	101.2674
24hrs 4°C	0.601	9.1648	9.2211	100.6150
	0.578	8.8064	8.8682	100.7026
	0.592	8.9088	9.0830	101.9563
48hrs 30°C	0.629	9.1648	9.6507	105.3026
	0.606	8.8064	9.2978	105.5810
	0.621	8.9088	9.5208	106.9507
48hrs 4°C	0.619	9.1648	9.4973	103.6285
	0.601	8.8064	9.2211	104.7098
	0.610	8.9088	9.3592	105.0563

Tabla 35
Resultados experimentales obtenidos para la estabilidad para Microesferas

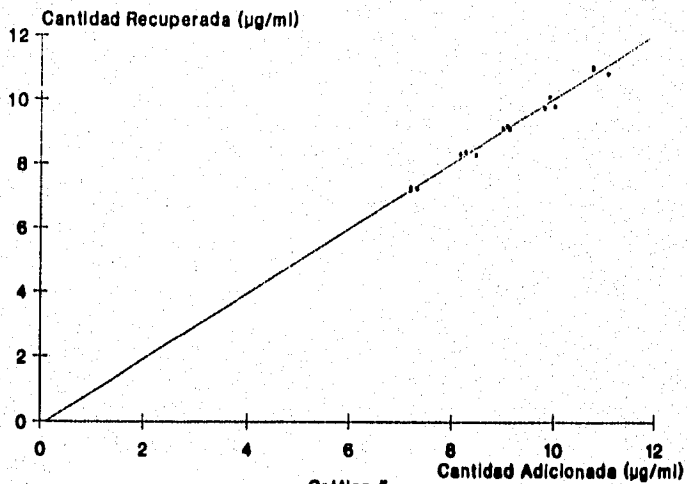
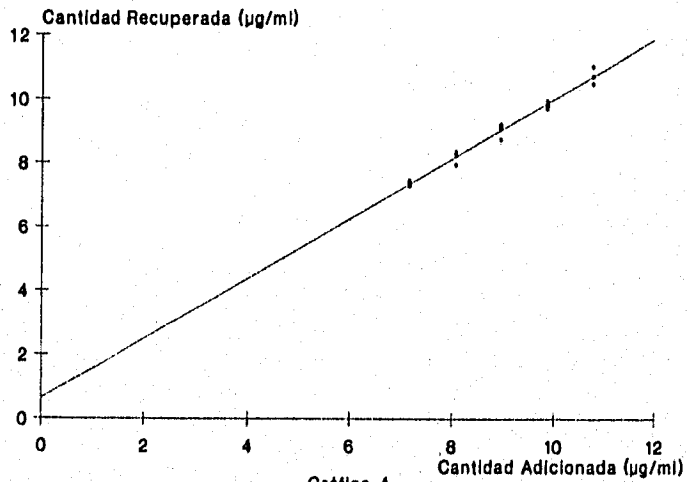
CONDICION	INTERVALO DE CONFIANZA	FACTOR PROMEDIO
24hrs 30°C	0.9052 a 5.5749	103.2857
24hrs 4°C	-0.2200 a 4.2032	102.0234
48hrs 30°C	4.5461 a 9.1439	106.9207
48hrs 4°C	3.1569 a 7.5733	105.4233

Tabla 36
Resultados del análisis estadístico para la estabilidad.
Con una t de Dunnet 0.05 de Significancia.

c) ESPECIFICIDAD



Gráfica 3
Espectros de absorción en la región ultravioleta para estandar (STD) y dos
placebos cargados (P-C1 y P-C2) y un placebo.



II ANÁLISIS DE RESULTADOS

Como se observa en la tabla 10 en la parte de Resultados en el desarrollo del método para suspensión el método que mostró mejores resultados en cuanto a porcentaje de recobro promedio fue el número 13, y para las microesferas el más adecuado resultó ser el número 12 como se observa en la tabla 11. Tanto para la suspensión como para las microesferas el solvente de elección es el etanol, para la suspensión cualquier solvente no polar que se pusiera en contacto con esta provoca un precipitado color café oscuro así como la formación de un coágulo el cual impide la cuantificación del activo y de los solventes polares restantes el etanol es el menos tóxico, menos caro y se contaba con una cantidad suficiente para realizar este proyecto, para el caso de las microesferas se determinó experimentalmente que el etanol da mejores resultados que los otros solventes y mezclas de estos utilizados.

La suspensión fue un caso especial en este proyecto, ya que, una vez desarrollado el método para cuantificar el activo el siguiente paso era encontrar la manera de tomar la cantidad necesaria de griseofulvina para cada nivel, el principal problema radicó en que se desconocen los excipientes y como se reporta en la tabla de resultados 10 no fue posible extraer con algún disolvente la cantidad de griseofulvina, la otra alternativa era tomar la cantidad requerida por medio de algún instrumento volumétrico, esto tampoco fue posible dado que este tipo de material es de un diámetro interno muy pequeño y la viscosidad de la suspensión muy alta por lo que ésta simplemente no fluye, otro intento consistió en disminuir la viscosidad de la suspensión por medio de un solvente adecuado, se encontró que usando una solución de hidróxido de sodio de 0.5-1 N, esta idea surgió debido a que durante el desarrollo del método para esta forma farmacéutica se encontró que agregando esta solución a la suspensión era factible centrifugarla y recuperar la parte suspendida, pero el resultado fue nuevamente malo, si se logró bajar la viscosidad pero la mezcla suspensión-hidróxido resultó poco homogénea, esto es, la concentración de activo tomado dependía del

punto donde se tomará la alicuota, finalmente se trato de colocar una cantidad conocida de suspensión y completar de alguna manera la cantidad de activo para cada nivel, por medio de una pesada directa no fue posible dada la cantidad tan pequeña de activo, así que se decidió preparar una solución de griseofulvina de concentración conocida con algún solvente (en este caso se uso cloroformo debido a su alta presión de vapor) y colocar la alicuota con la cantidad adecuada de activo en tubo de ensayo, dejar evaporar el solvente y con la griseofulvina cristalizada agregarle la suspensión y trabajar el método desarrollado, el resultado fue favorable ya que se lograron resultados precisos, como se ve en la validación de dicho método.

En el caso de las microesferas fue más sencillo ya que al ser una forma farmacéutica desarrollada dentro del proyecto del cual forma parte este trabajo se conocían los excipientes empleados y solo se prepararon placebos cargados, tal y como lo menciona la legislación.

Para el desarrollo de los métodos tanto de la suspensión como de las microesferas se utilizó el mismo sistema y el mismo solvente (etanol), esto fue para poder ahorrar reactivos.

Como ya se mencionó para la validación de los métodos desarrollados en este trabajo se utilizó un sistema para ambos, los resultados del análisis estadístico obtenidos para el sistema cumplen con los valores mínimos establecidos por la legislación los cuales se encuentran en la tabla 2, como se observa en las tablas de resultados 14 y 16 los coeficientes de variación tanto de linealidad como de precisión son menores a 1.5%, los valores tanto de coeficiente de correlación como de determinación confirman la congruencia y dependencia entre los valores y las lecturas obtenidas para los diversos niveles probados para esta validación dado que ambos son mayores 0.99, esto también se puede apreciar en la gráfica 1.

En las tablas 18 y 28 se presentan los resultados estadísticos para exactitud y repetibilidad al 100%, para los métodos de suspensión y microesferas respectivamente, en ambos casos el coeficiente de variación resultó por debajo del límite establecido aunque para las microesferas fue menor que para la suspensión debido probablemente al mayor grado de complejidad de este último, de igual forma el porcentaje de recobro promedio quedo situado dentro del rango exigido, es necesario recordar que la legislación permite para la validación de los métodos de cuantificación de suspensiones y semisólidos un aumento de 1% para los valores de coeficiente de variación y porcentaje de recobro, tal y como se expresa en la tabla 2. Para este parámetro se realizó un análisis estadístico complementario el cual consistió en realizar pruebas de hipótesis para la media (con varianza desconocida), e intervalos de confianza tanto para la media como para la varianza, en los resultados de estas pruebas para suspensión y microesferas se observo que, la hipótesis nula para la media se aceptaba por lo tanto la media era igual a 100 (en porcentaje de recobro) y para valores experimentales obtenidos para la media y la varianza estuvieron dentro de los intervalos de confianza por lo que el método se considera exacta y repetible para ambos métodos.

Los resultados para la linealidad de método se reportan de las tablas 20 y 30 para suspensión y microesferas respectivamente, los valores para coeficiente de variación, porcentaje de recobro promedio y coeficiente de determinación están por debajo de los límites establecidos, para la pendiente y ordenada al origen la legislación pide que los valores sean de 1 y 0 respectivamente, los valores obtenidos experimentalmente aunque cercanos son diferentes por lo que se requirió hacer un análisis complementario el cual consistió en realizar pruebas de hipótesis e intervalos de confianza tanto para la media como para ordenada al origen, los resultados de las pruebas de hipótesis para ambos métodos establecieron que estadísticamente las pendientes y las ordenadas al origen tienen un valor de 1 y 0 esto lo reafirmaron los intervalos de confianza donde los valores experimentales se situaron dentro del intervalo calculado, esto se puede apreciar esquemáticamente en las gráficas 4 y 5.

Para la prueba precisión (reproducibilidad), se siguió el modelo dado en el manual de validación, es decir un 2 x 2, considerando dos días y dos analistas diferentes, para esta prueba el único parámetro estadístico requerido es el coeficiente de variación, cuyo valor para la suspensión y las microesferas resulto menor al límite establecido, como se observa en las tablas 22 y 32, para complementar el análisis estadístico de esta prueba se realizaron dos análisis de varianza, uno de bloques aleatorios y el otro de dos factores fijos, en ambos casos se estableció que no hay diferencia estadística significativa entre los valores obtenidos en dos días diferentes, por dos analistas diferentes o por la interacción día-analista, esto se reportan en las tablas 23, 24, 33 y 34.

Para la estabilidad de la muestra se eligió solamente someterla a condiciones de temperatura ambiente y refrigeración, esto fue por que la griseofulvina es una materia extremadamente estable tanto en forma sólida o solución, ya que no es factible modificarla ya sea por temperatura, radiaciones de luz ultravioleta o visible, etc., aunado al hecho de que no es posible que ésta reaccione con ninguno de los componentes presentes en la solución problema (que hayan sido extraídos durante el proceso), lo anterior se afirmo dado que existen pruebas de compatibilidad para ambas formas farmacéuticas, la única posibilidad de modificación de las características de la muestra es la pérdida de solvente por evaporación, por esto no se eligió una temperatura superior a la ambiente y sí la de refrigeración, por un tiempo de 48 horas, éste análisis probó que la muestra es estable solamente a las condiciones de refrigeración hasta un tiempo de 24 horas, tanto para suspensión como para microesferas, como se observa en las tablas 26 y 36, lo que se comprueba analizando los resultados de las tablas 25 y 35 donde se muestra un aumento en la cantidad de griseofulvina recobrada, esto por la evaporación de solvente, cabe mencionar que para el almacenamiento de las muestras se utilizaron tubos de ensayo con tapa de rosca cubierta con papel parafilm, para minimizar la pérdida de solvente.

Para llevar a cabo la especificidad se siguieron métodos y razonamientos diferentes para las microesferas y para la suspensión, para el primer caso se prepararon dos placebos cargados, un estándar y un placebo, se obtuvieron las curvas de absorción de la región ultravioleta para todos estos y los resultados se aprecian en la gráfica 3 donde se observa que las curvas del estándar y los placebos cargados son idénticas en cuanto a su forma, la altura de sus picos depende de las cantidades adicionadas de griseofulvina las cuales en cada caso varían, estas contrastan totalmente con la obtenida para el placebo donde no se puede considerar como curva de absorción sino solamente ruido del aparato, por lo que se considera este método como específico, esto concuerda con lo reportado en la literatura ya que se menciona que entre la griseofulvina y el PEG no se presenta ningún tipo de interacción cuando se encuentran en solución, para el caso de la suspensión es diferente dado que se desconocen los excipientes contenidos se decidió correr dos muestras problemas y un estándar para obtener sus curvas de absorción para la región ultravioleta, el criterio de esta prueba fue, si encontraba que las curvas de los problemas eran diferentes ya sea en la forma, tamaño o número de picos comparado con la del estándar se consideraría como no específico el método, los resultados obtenidos muestran tres curvas idénticas en forma, tamaño y número de picos y cuya única diferencia es la altura de los picos la cual se da por la diferencia en la cantidad extraída de la suspensión por lo que se considera a este método específico.

10 CONCLUSIONES

El objetivo general que se planteó al principio de este trabajo se cumplió, se desarrollaron los métodos para cuantificar griseofulvina tanto en suspensión como en microesferas, se validaron los métodos conforme a los parámetros establecidos para control de calidad y los resultados estadísticos establecieron su eficacia.

En cuanto a los objetivos particulares podría decirse que se cumplieron, los métodos que se desarrollaron tanto para microesferas como para suspensión resultaron de bajo costo dado que los solventes requeridos no son caros y el material necesario para llevarlos a cabo se encuentra típicamente en los laboratorios de análisis. El método para microesferas no solo es barato sino que extremadamente simple toma alrededor de 15 minutos llevarlo a cabo, lo cual es muy valioso si se requiere de un análisis rápido, el método para suspensión es todo lo opuesto es largo, complejo, la muestra se manipula y trasvasa en varias ocasiones, el realizarlo toma aproximadamente 70-90 minutos, esta no es ninguna ventaja con respecto a los reportados en las diversas farmacopeas y libros relacionados, pero como ya se mencionó con anterioridad sí es más barato en cuanto a equipo y reactivos lo cual sí es una ventaja.

Un método analítico resulta muy poco útil en la actualidad si no cumple con los criterios de validación establecidos, para este caso los métodos desarrollados fueron sometidos a las pruebas de validación dadas para control de calidad, el análisis estadístico de estas pruebas demostró que los métodos desarrollados eran adecuados ya que son repetibles, reproducibles, precisos y exactos, por lo tanto se consideran confiables y adecuados para los propósitos establecidos.

Si consultamos la bibliografía actual donde se describe los métodos de análisis para diversas materias encontramos que lo más común es el análisis por CLAR donde quizá el único inconveniente sea el altísimo costo del equipo y reactivos requeridos, trabajos de este tipo van encaminados a laboratorios ya sean de docencia, investigación o de industria que no cuentan con la infraestructura necesaria para adquirir esos equipos y por esto deben de ajustarse a presupuestos limitados.

10 ANEXO

10.1 FOMULARIO DEL ANALISIS ESTADISTICO

a) LINEARIDAD DE SISTEMA

$$r^2 = \frac{[nt^{**}(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt^{**}(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][nt^{**}(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$
$$r = \frac{[nt^{**}(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]}{\sqrt{[nt^{**}(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][nt^{**}(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}}$$
$$F^*m = \Sigma F^* / N$$
$$DE = [N(\Sigma F^{**2}) - (\Sigma F^{**})^2 / N(N-1)]^{1/2}$$
$$CV = DE \times 100 / F^{**}m$$

b) PRECISION DE SISTEMA

$$DE = [N(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2 / N(N-1)]^{1/2}$$
$$CV = DE \times 100 / ym$$
$$ym = \Sigma y / N$$

c) LINEALIDAD DE METODO

$$m = \frac{nt^{**}(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{nt^{**}(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$
$$b = \frac{(\Sigma y) - m(\Sigma x)}{nt^{**}}$$
$$r^2 = \frac{[nt^{**}(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt^{**}(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][nt^{**}(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$
$$r = \frac{[nt^{**}(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]}{\sqrt{[nt^{**}(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][nt^{**}(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}}$$
$$DE = [N(\Sigma R) - (\Sigma R)^2 / N(N-1)]^{1/2}$$
$$CV = DE \times 100 / Rm$$

$$R_m = \Sigma R / N$$

d) EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

$$DE = [N (\Sigma R) - (\Sigma R)^2 / N (N-1)]^{1/2}$$

$$CV = DE \times 100 / R_m$$

$$R_m = \Sigma R / N$$

e) PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)

$$DE = [N (\Sigma y^2) - (\Sigma y \dots)^2 / N (N-1)]^{1/2}$$

$$CV = DE \times 100 / y_m$$

$$y_m = \Sigma y / N$$

f) ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

$$S_{pm}^2 = 2S_0^2 + 2S_m^2 / 2(c+1)$$

$$IC = [(Y_1 - Y_0) \pm t^*] \times [(S_{pm}^2 (2/3))^{1/2}]$$

$$I_m = \Sigma I / N_i$$

10.2 FOMULARIO DEL ANALISIS ESTADISTICO COMPLEMETARIO

a) PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)

ANADEVA I

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Medios de Cuadrados	F _{ca}	F _{tab}
Analista (a)	gla = a - 1	$SCa = [(\sum y_{i..}^2) / d r_e] - [(\sum y_{...})^2 / ad]$	$MCa = SCa / gla$	$Fa = MCa / MCd$	F 1- α , gla, gld
Día (d)	gld = d - 1	$SCd = [(\sum \sum y_{ij.}^2) / r_e] - [(\sum y_{i..}^2) / d]$	$MCd = SCd / gld$	$Fd = MCd / MCe$	F 1- α , gld, gle
Error (e)	gle = (r _e - 1) ad	$SCe = (\sum \sum \sum y_{ijk}^2) - [(\sum \sum y_{ij.}^2) / r_e]$	$MCe = SCe / gle$	*****	*****

Tabla 36

Tabla de Análisis de Varianza de Bloques Aleatorios

ANADEVA II

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F cal	F tab
Día (d)	gld = d - 1	$SCd = [(\sum^2 i_{..}) / ni.] - [(\sum^2 x_{...}) / N]$	$MCd = SCd / gld$	Fd = MCd / MCe	F 1- α , gld, gle
Analista (a)	gla = a - 1	$SCa = [(\sum^2 j_{.}) / n.j] - [(\sum^2 x_{...}) / N]$	$MCa = SCa / gla$	Fa = MCa / MCe	F 1- α , gla, gle
Interacción n	gln = (d-1)(a-1)	$SCln = SCsub - SCd - SCa$	$MCl_n = SCln / gln$	Fln = MCl_n / MCe	F 1- α , gln, gle
Subtotal	glSub = ad-1	$SCsub = [(\sum \sum x^2_{ij.}) / nij] - [(\sum^2 x_{...}) / N]$	*****	*****	***** *
Error (e)	gle = NT - ad	$SCe = SCtotal - SCsub$	$MCe = SCe / gle$	*****	***** *
Total	gIT = NT - 1	$SCtotal = (\sum \sum \sum x^2_{ijk}) - [(\sum^2 x_{...}) / N]$	*****	*****	***** *

Tabla 37

Tabla de Análisis de Varianza
Dos Factores Fijos

$$\text{Repetibilidad} = (\text{MCE})^{1/2}$$

$$Y_{\text{media total}} = \Sigma y_{...} / \text{adr}_e$$

$$S_{\text{total}} = [(\text{adr}_e) (\Sigma \Sigma \Sigma y_{ijk}^2) - (\Sigma y_{...})^2] / [\text{adr}_e (\text{adr}_e - 1)]$$

$$\text{CV}_{\text{total}} = (S_{\text{total}}) (100) / Y_{\text{media total}}$$

b) EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

$$P((n-1)s^2) / \chi^2_{1-\alpha/2} < \sigma^2 < (n-1)s^2) / \chi^2_{\alpha/2} = 1 - \alpha$$

$$P(x_{\text{media}} \pm (t_{1-\alpha/2})(s/n^{1/2}) < \mu <) = 1 - \alpha$$

$$t = (x_{\text{media}} - \mu_0) / (s/n^{1/2})$$

c) LINEALIDAD DE METODO

$$S_{Y/X} = ((n-1)(n-2) (S_y^2 - b^2 S_x^2))^{1/2}$$

$$t = (b - B_0) / (S_{Y/X}) / (n-1)^{1/2} (S_x)$$

$$P(b \pm (t_{1-\alpha/2, n-2}) ((S_{Y/X}) / (n-1)^{1/2} (S_x) < B <) = 1 - \alpha$$

$$t = (a - A_0) - (S_{Y/X}) (n^{-1} + (X_{\text{media}}^2 / (n-1) S_x^2))^{1/2}$$

$$P(a \pm (t_{1-\alpha/2, n-2}) ((S_{Y/X}) (n^{-1} + (X_{\text{media}}^2 / (n-1) S_x^2))^{1/2}) < A <) = 1 - \alpha$$

10.3 GLOSARIO

a = número de analistas

d = número de días

r_e = número de repeticiones

r² = coeficiente de determinación

r = coeficiente de correlación

F^* = propiedad de medida (y) / Concentración de la dilución de la solución patrón (x)
 DE = desviación estándar
 CV = coeficiente de variación
 F^*m = media de los valores F
 n = número de replicaciones
 t^{**} = número de diluciones o número de cantidades adicionadas
 R = Cantidad recuperada X 100 / Cantidad adicionada
 R_m = media de los valores de R
 y_m = media de los valores de y
 S_{pm}^2 = varianza ponderada de la emésima muestra
 S_0^2 = varianza ponderada de la muestra inicial
 S_m^2 = varianza de la emésima muestra
 c = número de comparaciones en la prueba de t de Dunnet
 IC = Intervalo de confianza
 Y_j = media de los valores de la jésima condición/tiempo
 Y_0 = media de los valores de la condición inicial
 t^* = valor de la distribución de t de Dunnet
 S_{pi}^2 = varianza ponderada de la iésima muestra
 I = análisis de la muestra bajo las condiciones preestablecidas X 100 / análisis inicial
 I_m = media de los I
 N_i = número de muestras por cada condición tiempo
 t = distribución de student
 F = distribución de Fisher

10.4 **MÉTODOS DE CUANTIFICACION**
DE GRISEOFULVINA

TÉCNICA	APLICACIÓN	AÑO EN QUE SE REPORTA
Colorimetría	Materia prima	1965
Cromatografía de Gases	Forma farmacéutica	1966
Cromatografía de Gases	Materia prima	1966
Espectrofotometría U.V.	Materia prima	1971
Espectrofotometría U.V.	Forma farmacéutica	1971
Iodometría	Materia prima	1972
Polarografía	Materia prima	1972
Turbidimetría	Materia prima	1975
Cromatografía de gases	Fermentación	1975
Espectrofotometría Visible	Materia prima	1988
Espectrofotometría Visible	Forma farmacéutica	1988
CLAR	Materia prima	1990
CLAR	Forma farmacéutica	1990
Espectrofotometría U.V.	Fermentación	1990
Espectrofotometría Visible	Forma farmacéutica	1991
CLAR	Materia prima	1991
Espectrofotometría Visible	Materia prima	1993
Espectrofotometría U.V.	Materia prima	1993
Espectrofotometría U.V.	Materia prima	1994
Espectrofotometría Visible	Materia prima	1994
Espectrofotometría U.V.	Materia prima	1994
Cromatografía de gases	Forma farmacéutica	1994

Tabla 38

Relación de algunos de los métodos desarrollados para cuantificar Griseofulvina

II BIBLIOGRAFIA

1. Abdel-Moety, M.; Moustafa, A. Spectrophotometric determination of griseofulvin in raw materials and in tablets, *Analytical Abstracts* 1988; 50 (5): 1099
2. Aditya, K; Gupta, M.D. Antifungal agents: An overview. Part I, *Journal of the American Academy of Dermatology* 1994; 30 (5): 677-699
3. Aditya, K; Gupta, M.D. Antifungal agents: An overview. Part II, *Journal of the American Academy of Dermatology* 1994; 30 (6): 911-933
4. Bevan, J. Fundamentos de farmacología, México.: Ed Harla, 1978: 525-527
5. British pharmacopeia, United Kingdom: Ed Department of health Scottish home and health department Welsh office, 1993: 316, 317, 933, 934.
6. Carstensen, J. Theory of pharmaceutical systems, U.S.A.: vol 2, Ed Academic press: 1973: vol 2: 4-7
7. Clarke, D. Isolation and identification of drugs, U.S.A.: Ed Pharmaceutical press, 1974: 355-356.
8. Chapman, K.; Harris, J.; Computer system validation staying current, *Pharmaceutical Technology* 1989; 60 (5): 60-66
9. Diccionario de especialidades farmacéuticas, 40ed, México: Ed P.L.M., 1994: 711-712
10. Diccionario de química, 1ed, España: Ediciones Generales Anaya, 1985: 179

11. El-Adl, S. Utility of fluoranil for spectrophotometric determination of griseofulvin and dexamethasone, *Analytical Abstracts* 1994; 55 (6) : 976
12. Escobar, C; Bernard, M.J. Dissolution behavior of drugs from binary and ternary systems, *International Journal of Pharmacy* 1993; 93 (1-3): 215-220
13. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6a ed., México: Ed Secretaría de Salud-Comisión permanente de la F.E.U.M., 1994: 578, 579, 1163, 1164.
14. Florey, K. Analytical profiles of drug substances, U.S.A: Ed Academic Press, 1979: vol. 8: 219-249.
15. Florey, K. Analytical profiles of drug substances, U.S.A: Ed Academic Press, 1979: vol. 9: 583-600.
16. Goodman, L.; Gilman, A. Bases Farmacológicas de la terapéutica, 5ta ed., México: Ed Interamericana, 1978: 985-1040
17. Gómez, O.; Llópez, M, Las referencias bibliográficas en los escritos médicos, *Salud Pública* 1988; 30 (5): 760-765
18. Hargis, L. Analytical chemistry principles and techniques, U.S.A.: Ed Prentice Hall, 1988: 377-406
19. Hawley, G. Diccionario de Química y de Productos Químicos, España: Ed. Omega., 1975: 556

20. Index Merck an encyclopedia of chemicals, drug and biological, 11th ed., U.S.A.: Ed Merck and Co. Inc., 1989: 715
21. Jawest, E.; Melnick, J.; Manual de microbiología médica, 4a ed., México: Ed Manual Moderno, 1970: 271-272
22. Jiménez, M.; Sanchis, V.; Detection and quantification of patulin and griseofulvin by HPLC in diferent strains of *Penicillium griseofulvum*, *Anaytical Abstracts*, 1990; 52 (5): 79
23. Kennedy, J. Analytical chemistry principles, U.S.A.: Ed Harcourt Brace Jovanovich Publishers, 1984: 405-438
24. Lachman, L. The theory and practice of industrial pharmacy, Lea and Febiger 1986: 485-497
25. Lashine, S.; Shanawani, A. Spectroscopic investigation of griseofulvin, carvone and menthose-7,7,8-8-tetracyanoquinodimethane complex, *Analytical Abstracts* 1994; 55 (10): 1762
26. Litter, M.; Farmacología experimental y clínica, 7a ed., Argentina: Ed Ateneo, 1988: 1428, 1429, 1630-1636.
27. Manual de Validación de Métodos Analíticos, México: Ed S.S.A.: 1-38, 55-65
28. Marques, M.J.; Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas, Preedición, México: Ed Mc Graw-Hill, 1991: 152-155, 256-265, 394-406, 437-440.
29. Quattrochi, A., Abelaira, S.; Introducción a la HPLC, Argentina: Ed Merck, 1992: 264

30. Sánchez, J.F. Aplicaciones del diseño experimental a la farmacia y química clínica, México: Ed F.E.S. Zaragoza U.N.A.M. 1995: 3, 5, 6, 11-13, 17
31. Sastry, B.; Rao, J. Estimation of griseofulvin in dosage form, *Analytical Abstracts* 1991; 53 (5): 514
32. Skoog, D.; West, D. Análisis instrumental, 2da ed., México: Ed Interamericana 1987: 157-170
33. Strobel, H.; Heineman, E. Chemical instrumentation: a systematic approach 3a ed., U.S.A.: Ed John Wiley and sons, 1989: 194-198, 252-260, 278-291, 302-338, 593-629.
34. United States Pharmacopeia XXII, 22nd ed., U.S.A.: Ed Mark Printing Company 1990: 616-618
35. Uriarte, V.; Guía de Medicamentos, México: Ed. Sianex 1990: 223
36. Velasco, O.; Mendez J.; Introducción a la micología médica, Mexico: Ed. Mendez 1985: 18, 19
37. Yang, H.; Lu, M. HPLC for determination of griseofulvin, *Analytical Abstracts* 1991; 53 (5): 719
38. Zorya, B.; Petrenko, V. Spectrophotometric determination of griseofulvin by reaction with isatin hydrazone, *Analytical Abstracts* 1992; 54 (5): 719