

10524
57



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

**"DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE TENSOACTIVOS NO IÓNICOS DE
TIPO POLOXAMEROS MEDIANTE LA TÉCNICA DE
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN
(HPTLC)"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA ZAIDA URBÁN MORLÁN

ASESORES: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DRA. ADRIANA GANEM RONDERO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



VII UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

ESTADO DE CUERPOS
CUAUTITLAN

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos la TESIS:

"Desarrollo de un Método para la Cuantificación de Tensioactivos No
Iónicos de Tipo Poloxameros Mediante la Técnica de Cromatografía en
Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC)"

que presenta la pasante: María Zaida Urbán Morlán
con número de cuenta: 9755023-1 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de Noviembre de 2002

PRESIDENTE	<u>D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	
VOCAL	<u>O.F.B. Elia Granados Enriquez</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. David Quintanar Guerrero</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Eva Ma. Molina Trinidad</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>O.F.B. Marina L. Morales Galicia</u>	

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por brindarme su constante amor y dejarme finalizar esta etapa de mi vida.

A MIS ASESORES: Dr. David Quintana y Dra. Adriana Caram

Con cariño, admiración y respeto, por darme la oportunidad de realizar este trabajo con ustedes, por todos sus consejos y sugerencias, por apoyarme en momentos difíciles de mi vida estudiantil.

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Que siempre recordaré con cariño, por haber hecho posible mi formación como profesionista.

A TODOS MIS PROFESORES

Porque con sus enseñanzas me fue posible terminar esta etapa, especialmente a los profesores *Celina Urrutia, Enrique Angeles y Julio Botello*, que primeramente me transmitieron sus conocimientos y fueron un ejemplo de dedicación y amor a la carrera, y más tarde me dieron consejos, apoyo y amistad.

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO: Miriam, José Juan, Lupita, Lulú, Briza, David, Marlene, Luis, etc.

Porque siempre estuvieron en la mejor disposición de ayudarme cuando lo necesité, porque escucharon mis quejas o lamentos cuando algo no me salía, porque también en muchas ocasiones reímos de tonterías, los recordaré con cariño.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

A MI MAMÁ: Judith Morán Casas

Porque con tu amor y apoyo incondicional veo realizada una más de mis metas, este trabajo también es tuyo "mami". Gracias por todos los sacrificios que has hecho por darme lo mejor, por tus consejos y por impulsarme a ser alguien mejor (valió la pena el esfuerzo, ¿no crees?). Te amo.

A MIS ABUELITOS: Aurelio y Tita

Por ser un apoyo más para mí, por inculcarme a ser una persona trabajadora, por corregirme cuando lo he necesitado y darme siempre su amor, por eso y más, gracias... los quiero mucho.

A MIS TÍOS Y TÍAS: Juanita, Lucha, Lulú, Aurelio, Lupita, Javier y Bety
Porque siempre me han brindado cariño y apoyo en todo momento.

A MIS PRIMOS: Alcega, Marco, Nestali, Brenda, Beto, Edna, Karla, Daniela, Cintia, José Manuel, Jacson y Kalin

Por ser para mí como mis hermanitos, gracias por hacerme pasar muchos momentos felices y espero que tomen esto como un ejemplo.

A Oscar

Por ser mi amigo y compañero. Porque con tu amor, apoyo y consejos me has hecho crecer como persona en todos los aspectos y tú más que nadie sabe lo que he tenido que pasar para ver terminada esta etapa... y lo que falta. TAMMMMMMMMMMMB.

A Catalina

Porque juntas aprendimos el valor de la amistad y el compañerismo. Tu estuviste conmigo en momentos difíciles y también en otros tantos de alegría, espero que estés conmigo para lo que venga...

A MIS AMIGOS: Alma, Edgar, Ruth, Rodrigo, Francisco, Brenda

Por tantos años de amistad, porque hemos compartido muchos sueños y experiencias, porque han estado ahí para escucharme, felicitarme, regañarme, ayudarme, etc., etc.

CON CARINO
Zaida

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE GENERAL

	Página
INDICE DE TABLAS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE ABREVIACIONES.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	v
1. CONCEPTOS GENERALES.....	1
1.1. DEFINICIÓN.....	1
1.2. CLASIFICACIÓN.....	2
1.2.1. POLOXAMEROS.....	3
1.2.2. PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS.....	3
1.2.3. APLICACIONES FARMACÉUTICAS.....	5
1.3. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN.....	7
1.4. FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFÍA.....	8
1.4.1. GENERALIDADES.....	8
1.4.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN (HIGH PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, HPTLC).....	11
1.4.2.1. ASPECTOS GENERALES DE HPTLC.....	11
1.4.2.2. VENTAJAS.....	12
1.4.2.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	13
1.4.3. CUANTIFICACIÓN EN HPTLC.....	16
1.4.3.1. DENSITOMETRÍA.....	17
1.4.3.3. TEORÍA DE LA DENSITOMETRÍA.....	19

1.4. VALIDACIÓN.....	21
1.4.1. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.....	21
2. OBJETIVOS.....	25
3. HIPÓTESIS.....	25
4. MATERIAL Y EQUIPO.....	26
5. METODOLOGÍA.....	30
5.1. Preparación del reactivo revelador (reactivo de Dragendorff).....	30
5.2. Determinación de la λ de lectura.....	30
5.3. Linealidad del sistema.....	31
5.4. Exactitud del sistema.....	32
5.5. Precisión.....	32
5.5.1. Repetibilidad.....	32
5.5.2. Reproducibilidad.....	32
5.6. Límite de detección.....	33
5.7. Límite de cuantificación.....	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
7. CONCLUSIONES.....	62
8. PERSPECTIVAS.....	64
9. ANEXOS	
ANEXO 1 CARACTERÍSTICAS DE LOS SURFACTANTES.....	65
ANEXO 2 FORMULARIO.....	69
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Resultados para determinar la linealidad del sistema de poloxamero 188.....	34
Tabla 2. Ecuaciones de regresión que explican la relación lineal que existe entre la cantidades del poloxamero 188 y su respectiva área.....	35
Tabla 3. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema.....	35
Tabla 4. Análisis de variancia para evaluar la linealidad del sistema.....	36
Tabla 5. Resultados de la prueba del intercepto.....	37
Tabla 6. Resultados para determinar la exactitud del sistema.....	38
Tabla 7. Resultados obtenidos para determinar la precisión.....	39
Tabla 8. Resultados del promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cada cantidad aplicada.....	40
Tabla 9. Parámetros estadísticos calculados para evaluar la repetibilidad.....	41
Tabla 10. Datos para determinar la reproducibilidad.....	41
Tabla 11. Análisis de variancia para evaluar la reproducibilidad a diferentes cantidades aplicadas.....	42
Tabla 12. Áreas Bajo la Curva obtenidas para aplicaciones a niveles bajos de poloxamero 188 para determinar los límites de detección y cuantificación.....	44
Tabla 13. Límites de confianza de las aplicaciones de poloxamero 188 a cantidades bajas.....	45
Tabla 14. Límites de confianza para las ABC pronosticadas por la ecuación de regresión.....	46
Tabla 15. Porcentajes de recuperación a cantidades bajas de poloxamero 188 con sus respectivos coeficientes de variación (CV).....	47
Tabla 16. Resultados para determinar la linealidad del sistema de poloxamero 407.....	48

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 17. Ecuaciones de regresión que explican la relación lineal que existe entre las cantidades del poloxamero 407 y su respectiva área.....	49
Tabla 18. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema.....	49
Tabla 19. Análisis de variancia para evaluar la linealidad del sistema.....	51
Tabla 20. Resultados de la prueba del intercepto.....	52
Tabla 21. Resultados para determinar la exactitud del sistema.....	52
Tabla 22. Resultados obtenidos para determinar la precisión.....	53
Tabla 23. Resultados del promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cada cantidad aplicada.....	54
Tabla 24. Parámetros estadísticos calculados para evaluar la repetibilidad.....	55
Tabla 25. Datos para determinar la reproducibilidad.....	56
Tabla 26. Análisis de variancia para evaluar la reproducibilidad a diferentes cantidades aplicadas.....	57
Tabla 27. Áreas Bajo la Curva obtenidas para aplicaciones a niveles bajos de poloxamero 407 para determinar los límites de detección y cuantificación.....	58
Tabla 28. Límites de confianza de las aplicaciones de poloxamero 407 a cantidades bajas.....	59
Tabla 29. Límites de confianza para las ABC pronosticadas por la ecuación de regresión.....	60
Tabla 30. Porcentajes de recuperación a cantidades bajas de poloxamero 407 con sus respectivos coeficientes de variación (CV).....	61
Tabla 31. Especificaciones farmacopeicas para el poloxamero 188.....	65
Tabla 32. Solubilidad del poloxamero 188 en distintos solventes.....	66
Tabla 33. Especificaciones farmacopeicas para poloxamero 407.....	67
Tabla 34. Especificaciones farmacopeicas para poloxamero 188 y poloxamero 407 (BP = Britanic Farmacopeia; USP = United States Pharmacopeia).....	68

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación de una molécula de tensoactivo.....	1
Figura 2. Esquema de moléculas de Poloxameros en una interfase agua-aceite.....	3
Figura 3. Un polímero puede ser adsorbido en forma de cadenas, burbujas y espirales.....	6
Figura 4. Esquema de la cromatografía líquida en fase normal y en fase inversa....	10
Figura 5. Estructura del complejo Poloxamero-tetraiodobismutato.....	16
Figura 6. Diagrama de un densitómetro configurado en haz simple.....	18
Figura 7. Diagrama de la configuración de los densitómetros comerciales.....	18
Figura 8. Gráfico representativo de la determinación de los límites de detección y el de cuantificación.....	24
Figura 9. Aplicador automatizado.....	26
Figura 10. Densitómetro con computadora adaptada.....	27
Figura 11. Placas para cromatografía.....	27
Figura 12. Aspersor de vidrio.....	27
Figura 13. Cámaras cromatográficas.....	28
Figura 14. Curva de regresión global para poloxamero 188.....	36
Figura 15. Gráfica de los límites de confianza para poloxamero 188.....	46
Figura 16. Curva de regresión global para poloxamero 407.....	50
Figura 17. Gráfica de los límites de confianza para poloxamero 407.....	60

LISTA DE ABREVIACIONES

ABC	Área Bajo la Curva
CV	Coefficiente de variación
F cal	F calculada
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
K	Coefficiente de distribución o reparto
OE	Oxido de etileno
OP	Oxido de propileno
POE	Polioxi-etileno
POP	Polioxi-propileno
RF	Factor de retención
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultravioleta
λ	Longitud de onda

INTRODUCCIÓN

La Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC) es una técnica que todavía no ha sido muy utilizada y difundida hasta el momento en nuestro país puesto que se tiene la idea generalizada de que esta se emplea solo con fines cualitativos, sin embargo, se utiliza rutinariamente en muchos laboratorios del mundo para realizar análisis cuantitativos obteniendo resultados tan buenos o mejores que los obtenidos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Algunas de las ventajas que tiene el uso de HPTLC son su bajo costo, la facilidad para preparar la muestra antes de su aplicación, el análisis de varias muestras a la vez, la capacidad de detectar componentes sin necesidad de elución, etc.

El interés de desarrollar un método por HPTLC para la cuantificación de tensoactivos no iónicos surge debido a que los métodos descritos en la literatura para la determinación de estos fueron desarrollados originalmente para el análisis en aguas de ríos y en aguas de desechos, además emplean técnicas que requieren más recursos y un gran número de pasos para obtener finalmente un resultado de dudosa repetibilidad. En el presente trabajo se muestra el desarrollo de un método más rápido, preciso, sensible y barato para la cuantificación de dos poloxameros, el 188 y el 407 (tensoactivos no iónicos). Estos poloxameros son los más utilizados en la industria farmacéutica. Ambos tienen baja toxicidad. El 407 tiene la capacidad de formar geles claros termorreversibles, lo cual los hace adecuados para aplicaciones farmacéuticas, como las formulaciones dermatológicas u oftálmicas, así como en el área de sistemas de liberación controlada. El 188 es uno de los pocos aceptados para la administración parenteral.

Para probar la confiabilidad del método desarrollado se recurre a evaluarlo mediante parámetros de validación, aplicando cálculos estadísticos, los cuales permiten determinar si es conveniente el uso del método o se requiere de algún ajuste a las condiciones de trabajo; esto le da otra ventaja sobre los métodos existentes, puesto que aquéllos no hacen uso de la estadística para su validación o no pueden ser sometidos a validación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PAGINACIÓN DISCONTINUA

1. CONCEPTOS GENERALES

1.1. DEFINICIÓN

Los agentes tensoactivos, o también llamados surfactantes, son sustancias que, a bajas concentraciones, se adsorben sobre las superficies o interfases de un sistema y alteran las propiedades de dicha interfase. Estas sustancias tienen una estructura característica, poseen una porción polar (hidrofilica) y una porción no polar (hidrofóbica), ambas en la misma molécula. Por lo anterior, se dice entonces, que los surfactantes son de naturaleza anfílica (Figura 1).



Figura 1. Representación de una molécula de tensoactivo (..... Porción hidrofóbica, Porción hidrofílica)

Los tensoactivos no sólo son importantes como el constituyente activo de los agentes limpiadores (jabones, detergentes, etc.), que es su principal uso, sino también son vitales en la estabilización de emulsiones (por ejemplo, en alimentos y cosméticos), como agentes de desprendimiento de moldes en la industria de los plásticos, en la suavización de textiles, en las pastas anticonceptivas, en la perforación de pozos petroleros entre otras aplicaciones.

Debido a sus propiedades únicas, los tensoactivos tienen un amplio uso en preparaciones farmacéuticas. Estas incluyen, dependiendo del tipo de producto, el mejoramiento de la solubilidad o estabilidad de un fármaco en una formulación líquida, estabilización y modificación de la textura en una formulación semisólida, o alteración de las propiedades de flujo de un granulado, ayudando así en la manufactura de la formulación sólida. Además de estos usos, los tensoactivos pueden ser incluidos en una formulación con el fin de mejorar la eficacia o biodesempeño del producto. Las propiedades de los surfactantes son tales que pueden alterar la actividad termodinámica, la solubilidad, la difusión, la desintegración y la velocidad de disolución de un fármaco.¹

1.2. CLASIFICACIÓN

Los tensoactivos se clasifican de acuerdo a la naturaleza del grupo hidrofílico de la molécula, teniendo así cuatro grupos principales de ellos:

1. Aniónicos: el grupo hidrofílico posee carga negativa, como los grupos carboxilo (RCOO^-), sulfonato (RSO_3^-) o sulfato (ROSO_3^-).

Algunos ejemplos de importancia farmacéutica son el laurato de potasio, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOK}^+$, y lauril sulfato de sodio, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}^+$.

2. Catiónicos: el grupo hidrofílico tiene carga positiva (por ejemplo las sales cuaternarias de amonio, $(\text{R}_4\text{N}^+\text{Cl}^-)$).

Ejemplos de importancia farmacéutica incluyen cetrimida, una mezcla que consiste de bromuros de tetradecil (65%), dodecil (22%), y hexadeciltrimetilamonio (7%), así como cloruro de benzalconio, una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio de fórmula general $[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{R}]\text{Cl}^-$, donde R representa una mezcla de grupos alquilo desde C_8H_{17} a $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$.

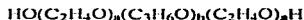
3. Anfóliticos: la molécula contiene, o puede contener, ambas cargas, positiva y negativa, (p. ej., las sulfobetainas, $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$).

Ejemplos de importancia farmacéutica son: N-dodecil-N,N-dimetilbetaina, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$.

4. No iónicos: el grupo hidrofílico no posee carga, pero su solubilidad en agua se debe a grupos altamente polares, tales como los grupos hidroxilo o polioxi-etileno ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$). Ejemplos de importancia farmacéutica son: esteres de sorbitan (Spans), polisorbatos (Tweens) y los poloxameros.^{4, 2}

1.2.1. POLOXAMEROS

Los poloxameros se encuentran clasificados dentro de los tensoactivos no iónicos y los nombres comerciales más comunes para éstos son: Pluronic®, Lutrol® (BASF, Corp.) y Tensapol®. Son copolímeros en bloque que consisten de unidades de polioxietileno-polioxiopropileno-polioxietileno con fórmula general:



Donde: **a** son las cadenas de polioxietileno y **b** las de polioxiopropileno.

1.2.2. PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS

Todos los poloxameros son químicamente similares en composición, sólo difieren en las cantidades relativas de óxidos de propileno y etileno adicionados durante su manufactura. La porción polioxiopropileno (POP) representa la cadena central hidrofóbica, mientras que las dos cadenas laterales de polioxietileno (POE), representan la porción hidrofílica (Figura 2), pudiendo ser clasificados como poliéteres o éter-alcoholes.

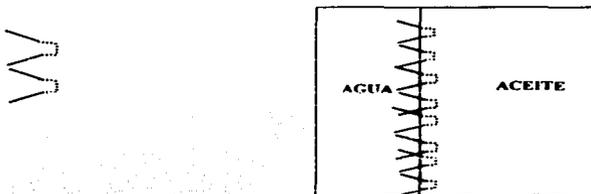


Figura 2. Esquema de moléculas de en una interfase agua-aceite. (..... Porción hidrofoba, POP; — Porción hidrofílica, POE)

Los grupos éter unidos a los monómeros son particularmente inertes a reacciones químicas. Ellos reaccionan sólo bajo condiciones vigorosas con ácidos fuertes como HBr ó HI para dar el correspondiente haluro de alquilo. Los éteres en cadena larga, como los poloxameros, pueden también formar un complejo con metales pesados, bases, o iones alcalino-térreos de un tamaño apropiado. Los poloxameros no reaccionan con cationes como el calcio o magnesio.

El estado físico de los poloxameros varía de líquido a sólido al aumentar el contenido de óxido de etileno y el peso molecular. Los poloxameros generalmente se encuentran como granulos blancos, cerosos, que fluyen libremente. Practicamente no tienen ni sabor ni olor. Su solubilidad en agua aumenta al elevarse el contenido de óxido de etileno y disminuye al aumentar el peso molecular de la parte correspondiente al óxido de propileno. Por su carácter no iónico son miscibles y compatibles tanto con tensoactivos no iónicos como con los aniónicos y catiónicos.

Por el hecho de que en su fabricación es posible variar tanto el peso molecular de la parte hidrofílica como de la hidrofóbica, los poloxameros presentan una composición muy variada, lo cual los hace apropiados para muy diversas aplicaciones.

Las principales propiedades y efectos de estos productos pueden ser: acción humectante, acción dispersante, acción solubilizante, inhibidor de la formación de espuma, entre otros. Pueden emplearse como auxiliares con acción impregnante, plastificante, higroestática, lubricante, modificadora de la viscosidad, despegante y dispersante.

La denotación que se les ha dado a los poloxameros consiste en lo siguiente: los dos primeros dígitos multiplicados por 100, corresponden aproximadamente al promedio del PM de la porción de polioxipropileno y el tercer dígito, multiplicado por 10, corresponde al porcentaje en peso de la porción polioxietileno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2.3. APLICACIONES FARMACÉUTICAS

Las aplicaciones que han tenido los poloxameros en formulaciones farmacéuticas y tecnológicas son: como agentes de mojado, en ungüentos, bases para supositorios, geles y en tabletas como aglutinantes. Son agentes estabilizantes en emulsiones oleosas intravenosas y como agentes solubilizantes para mantener la claridad de los elixires y ungüentos, como detergentes en limpiadores quirúrgicos y en soluciones limpiadoras de lentes de contacto, así mismo como dispersantes y estabilizadores en antibióticos, dispersiones de vitaminas y en formulaciones tópicas.^{4, 5} Además de esto, su baja toxicidad y capacidad de formar geles claros los hacen particularmente adecuados para aplicaciones farmacéuticas, como las formulaciones dermatológicas u oftálmicas, así como en el área de sistemas de liberación controlada.^{6,7,8,9} Los quizá puedan usarse terapéuticamente como agentes de mojado en formulaciones oftálmicas y como un agente de limpieza para piel herida o lastimada.⁷

La forma en que los poloxameros actúan como estabilizantes, es mediante un mecanismo de efecto estérico. La estabilización estérica se refiere a la prevención de la floculación de partículas coloidales por la adsorción de moléculas de polímero no iónico. El término protección se usó antes para describir la estabilización por moléculas derivadas naturalmente. La estabilización estérica debe ser distinguida de la protección porque en la primera hay ausencia de cualquier componente electrostático.¹⁰

La estabilización se atribuye a la adsorción del polímero en forma de espirales, de colas y de cadenas, sobre la superficie, previniendo estéricamente a las partículas de estar lo suficientemente cerca por las fuerzas atractivas de London-van der Waals y así llegar a la floculación (Figura 3). La acción estabilizante de la parte saliente del polímero es extremadamente eficiente; un solo espiral o cola proporciona una barrera de $20 kT$ (la repulsión total debe exceder a la atracción para que exista una barrera energética que es al menos muchas veces mayor que la energía térmica, designada por el término kT).^{11,12}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

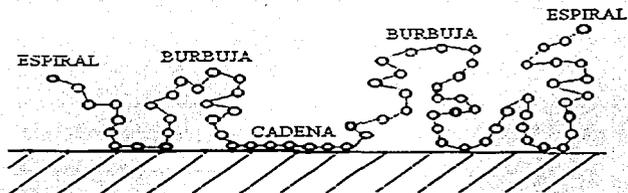


Figura 3. Un polímero puede ser adsorbido en forma de cadenas, burbujas y espirales.

Como ya se mencionó anteriormente, los poloxameros consisten de una parte o bloque de un polímero al cual se le unen uno o dos bloques de otro polímero diferente. Estos dos polímeros se escogen para ser selectivamente solubles en la fase acuosa o en la fase oleosa, respectivamente. Con un peso molecular adecuado de la parte polimérica, que es soluble en la fase continua, se logra una excelente estabilidad. La interacción de los átomos de oxígeno de la cadena de óxido de etileno con porciones polares de la superficie, determinará la facilidad de la formación del espiral y la extensión de la cadena de óxido de etileno sobre la superficie. Las dispersiones coloidales estabilizadas estéricamente presentan una mayor estabilidad a la adición de electrolitos, a la agitación mecánica, al congelamiento y deshielo, comparadas con las dispersiones que se estabilizan electrostáticamente. Otra ventaja de la estabilización estérica es que ésta funciona bien tanto en sistemas acuosos y no acuosos.¹¹

De la amplia gama de poloxameros, los más importantes en cuanto a sus aplicaciones farmacéuticas y/o cosméticas, son el 188 y el 407. Esto se debe a que dichos poloxameros poseen diversas propiedades que los hacen particularmente adecuados para emplearlos en formulaciones de dosificación tópica; éstas incluyen su baja toxicidad y su habilidad para formar geles claros en medio acuoso. Por ejemplo, el poloxamero 407 es de particular interés debido a que puede formar geles termorreversibles y es muy poco tóxico. Mientras que los diferentes usos que se le ha dado al poloxamero 188 (p.ej. lubricante, estabilizante,

6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

dispersante, etc.) también lo han hecho un material interesante para la industria farmacéutica y cosmética (anexo 1).

1.3. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

Existen tres métodos descritos en la literatura para la determinación de poloxameros: el método con tiocianato de cobalto, el método de Wickbold y el método de borato de tetrakis (4-halofenil) potasio.¹ Todos estos métodos fueron desarrollados originalmente para el análisis de surfactantes no iónicos en agua de ríos y en aguas de desechos.

El método de Wickbold involucra la formación de un complejo entre el poloxamero y tetraiodobismutato (Reactivo de Dragendorff modificado). El precipitado se disuelve en tartrato de amonio y se titula con ditiocarbamato pirrolidona. El método descrito por Wickbold incluye el uso de un aparato específicamente diseñado para concentrar el complejo, requiriendo un tiempo relativamente largo de análisis.⁴ El otro método desarrollado por Tsubouchi y colaboradores¹³, involucra la titulación de poloxamero con borato de tetrakis (4-halofenil). En este método, el poloxamero es extraído de la fase orgánica de una mezcla de dos fases y el punto final se determina detectando el exceso de borato de tetrakis (4-halofenil) con un indicador, azul Victoria. Estos dos métodos requieren mucho tiempo y además un volumen aproximado de muestra de 1 l.

Un método más prometedor involucra la complejación de poloxamero con tiocianato de cobalto.¹⁴ La absorbancia del complejo ya solubilizado se mide espectrofotométricamente a 624 nm y se usa como una medida cuantitativa de poloxamero 188. Este último método ha sido modificado por algunos investigadores que se interesan en la cuantificación de poloxamero 188 en cultivos de células animales, ya que este surfactante se usa rutinariamente en procesos de cultivos de células de mamíferos para la producción comercial de biológicos; en donde la función del poloxamero 188 es proteger a las células de los efectos deteriorantes del rociamiento de burbujas el cual es necesario para la oxigenación de las suspensiones de cultivos a larga escala.¹

Los métodos para la cuantificación de tensoactivos no iónicos reportados emplean técnicas que requieren muchos recursos y tiempo.^{14,15} Como se ha podido ver, se han elegido principalmente las reacciones complejométricas para determinar la concentración del poloxamero, pero ello implica un gran número de pasos para obtener finalmente un resultado.

El presente estudio tiene la finalidad de desarrollar un método sencillo, barato, rápido, sensible y preciso para la cuantificación de poloxameros. A pesar de que aún se tiene la idea de que la Cromatografía en Capa Fina (PLC), es una técnica con fines cualitativos, es posible realizar análisis cuantitativos con excelentes resultados, tan buenos como los obtenidos por HPLC. La Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC), es una técnica analítica que se emplea cotidianamente en muchos laboratorios del mundo y que sin embargo está poco difundida en nuestro país.

1.4. FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFÍA

1.4.1. GENERALIDADES

La cromatografía es un método fisicoquímico de separación de especies químicas, en el que éstas se distribuyen en forma molecular entre dos fases no miscibles.¹⁶

La cromatografía es una técnica que se utiliza para la separación, identificación y cuantificación de compuestos. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se disuelve en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. La fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible e inerte de composición fija, dispuesta en una columna cilíndrica, en una placa o en una tira. Ambas fases se eligen de tal manera, que los componentes de la muestra se distribuyan de forma distinta entre la fase estacionaria y la fase móvil.¹⁶ Las moléculas de soluto que se retengan preferentemente en la fase estacionaria, estarán una fracción de tiempo más pequeña en la fase móvil y no serán transportadas a lo largo de la columna, placa o tira; por el contrario

los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Este proceso trae como consecuencia que los componentes de la muestra se separen en bandas definidas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

La importancia del proceso cromatográfico es la distribución en el equilibrio de los diversos componentes de la muestra entre las fases estacionaria y móvil. La relación entre las concentraciones de una sustancia en ambas fases, determinado en condiciones de equilibrio, se llama coeficiente de distribución o de reparto.

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad (1)$$

donde C_S es la concentración molar del analito en la fase estacionaria y C_M es la concentración molar en la fase móvil. La importancia de este coeficiente en cromatografía radica en que se puede determinar la facilidad de una separación y la velocidad a la que se mueve una banda en la columna, placa o tira.

En la cromatografía en película, en papel o en capa fina, la velocidad de migración de la banda se mide por el factor de retención R_f , que es igual a la distancia recorrida por el centro de la banda, dividido por la distancia que recorre el frente del disolvente, y esta dado por la expresión:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la muestra}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}} \quad (2)$$

La selectividad de un sistema de cromatografía depende de las interacciones de los componentes de la muestra con las dos fases. Esas interacciones pueden ser:

- 1) ion-ion: descritas por la ley de Coulomb, la cual dice que la interacción entre dos iones es función directa de sus cargas e inversa al cuadrado de las distancias entre ellos.
- 2) ion-dipolo: esta interacción se presenta entre iones y moléculas que poseen un momento dipolar, permanente o inducido. Los dipolos surgen, respectivamente, de la distribución no uniforme de electrones en los enlaces covalentes entre átomos que difieren bastante en su electronegatividad, y de la polarización por los iones de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

moléculas con electrones de valencia de una movilidad relativamente alta. La interacción dipolo-dipolo ocurre, en la mayoría de los casos, por alineación de los mismos y disposición adyacente de las cargas de distinto signo de cada dipolo. El ejemplo más común de este tipo de interacción es el enlace por puente de hidrógeno.

- 3) interacciones de tipo no polar: surgen de la interacción entre los dipolos instantáneos producidos por el desplazamiento relativo de electrones y núcleos; dichas fuerzas aumentan con el grado de similitud de las moléculas, con la facilidad de pérdida de electrones y con el número de éstos.

Por lo tanto, los adsorbentes polares tenderán a adsorber compuestos polares. El orden en el que las especies químicas son preferentemente adsorbidas depende de la naturaleza química del adsorbente y del disolvente, además de la concentración en la solución de las sustancias a separar (Figura 4).

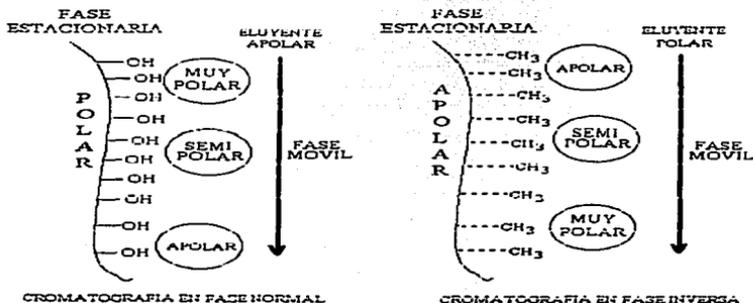


Figura 4. Esquema de la cromatografía líquida en fase normal y en fase inversa. Los círculos representan los diferentes tipos de compuestos presentes en muestras y su posición relativa en la dirección del flujo de la fase móvil indica su orden de elución.

1.4.2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN (HIGH PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, HPTLC)

1.4.2.1. ASPECTOS GENERALES DE HPTLC

Todos los métodos cromatográficos involucran el mismo proceso para la separación de una mezcla de sustancias, el cual se basa en la migración de los componentes individuales a diferentes velocidades debido a sus distribuciones únicas entre la fase estacionaria y la fase móvil.

La Cromatografía en Capa Fina (TLC) es un tipo de cromatografía de líquidos, en la que la fase estacionaria es una capa delgada y uniforme de partículas finas de un adsorbente sobre una placa de vidrio, aluminio o plástico. En el procedimiento básico en TLC, una solución de la muestra se aplica en la parte baja de la placa, que es entonces colocada en una cámara cerrada, cuya base ha sido cubierta con una cierta cantidad de la fase móvil, usualmente una mezcla de solventes. Después del desarrollo de la placa, esta se saca de la cámara, y se marca el frente del disolvente para calcular el R_f, que es la distancia que recorrió la muestra dividida entre la distancia recorrida por el disolvente.¹⁷

La HPTLC, se inició por el año de 1975 con la introducción de placas comercialmente disponibles de alta eficiencia, las cuales son más pequeñas (10 x 10 ó 10 x 20 cm), tienen una capa más delgada (0.1-0.2 mm) compuesta de un adsorbente con tamaño de partícula más fino (5-6 µm) y una distribución del tamaño de partícula más uniforme (4-8 µm), y el cromatograma se desarrolla en distancias más cortas (3-7 cm); comparadas con las de TLC, que son generalmente de 20 x 20 cm con una capa de 0.25 mm conteniendo partículas con un tamaño promedio de 10-12 µm.¹⁷ Así, la principal diferencia entre HPTLC y la TLC convencional es el tamaño de poro y de partícula de los adsorbentes. Los adsorbentes de HPTLC son producidos con un tamaño de partícula y de poro más uniforme y pequeño.¹⁸

El uso de las placas de alto desempeño mejora la resolución, reduce el tiempo de análisis, aumenta la sensibilidad y mejora la cuantificación *in situ*. La TLC cualitativa o

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

semicuantitativa tradicional es simple de usar y requiere materiales de muy bajo costo (una cámara para cromatografía, un capilar de vidrio, una placa precubierta y un reactivo de detección o revelado).¹⁷

En HPTLC cuantitativa se requiere de instrumentos más caros y es un poco más compleja de efectuar; sin embargo, utiliza el procedimiento básico de TLC para desarrollar el cromatograma, con la diferencia de que la aplicación de la muestra no se hace con capilares de vidrio, sino que ésta se realiza con aplicadores automatizados que reducen errores y variaciones, además de aplicar el volumen requerido.¹⁷

1.4.2.2. VENTAJAS

Las ventajas de utilizar HPTLC son:

- a) Bajo costo (utiliza aproximadamente el 5% de disolvente con respecto a HPLC).
- b) La preparación de la muestra antes de la aplicación suele ser sencilla, ya que frecuentemente no se necesita remover aditivos u otras impurezas, pues las placas se usan una sola vez.
- c) No es necesario eluir los componentes para detectarlos. Todos los componentes se detectan sobre la placa.
- d) No hay restricción en cuanto a la elección de la fase móvil (por ejemplo, pueden usarse disolventes de baja transparencia al UV, pues estos son evaporados antes de la detección).
- e) Es posible correr muchas muestras al mismo tiempo (por ejemplo, en una placa de 20 cm de largo pueden correrse hasta 70 muestras).

1.4.2.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

A) Preparación de la muestra

Los procedimientos para preparar la muestra son similares a aquéllos usados en HPLC y en cromatografía de gases. Las muestras deben ser representativas, de tamaño adecuado para que sea posible la detección del analito de interés y lo suficientemente puras para que el analito pueda ser separado como una zona o mancha compacta. Si la concentración del analito es alta, las formas farmacéuticas pueden ser simplemente disueltas en un disolvente que solubilice por completo al analito y deje a los excipientes o compuestos extraños sin disolver para dar una solución del analito que pueda ser directamente aplicada para análisis en TLC. Para obtener una óptima resolución y sensibilidad, el punto de aplicación no debe ser mayor que 1-3 mm de diámetro. Si el analito se encuentra en bajas concentraciones en una muestra compleja, se debe extraer el solvente, purificar y concentrar la muestra, antes de realizar TLC, esto con el fin de maximizar al analito y minimizar componentes extraños de la solución de prueba.¹⁷

B) Fases Estacionarias

La placa y la fase móvil se eligen de acuerdo a la naturaleza de los analitos y de la matriz de la muestra. Las placas precubiertas comerciales son utilizadas en la mayoría de los casos, excepto cuando placas con características especiales se necesitan para un análisis en particular (Figura 11). Las placas de sílica gel con una fase menos polar, como cloroformo-metanol, han sido usadas en más del 90% de los análisis reportados para fármacos.

Las separaciones en sílica gel se basan principalmente en uniones de hidrógeno e incluyen interacciones dipolo-dipolo entre la placa polar y los grupos funcionales del compuesto. Las placas lipofílicas químicamente modificadas, tales como: C-8 (octadecilsilil), C-18 (octadecilsilil) y fenilo, se usan para TLC de fase reversa. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es no polar. Las placas de fase reversa comercialmente disponibles varían en la longitud de la cadena unida desde trimetil a 22 carbonos. El alargamiento de la cadena alquilo, incrementa la retención del analito y promueve la separación entre mezclas.

La sílica gel puede ser impregnada con varios disolventes, amortiguadores y reactivos selectivos para mejorar las separaciones. Las placas algunas veces se limpian mediante un pre-desarrollo con fase móvil o cloruro de metileno-metanol (1:1) antes de la aplicación de la muestra. ¹⁷

C) Fases Móviles

La fase móvil para una separación en particular se selecciona algunas veces empíricamente usando la experiencia personal o los reportes de la literatura de separaciones similares. Los sistemas de disolventes generales que han sido utilizados comúnmente, basados en sus diferentes propiedades de selectividad, son dietil éter, cloruro de metileno y cloroformo, combinados individualmente o juntos con hexano como el disolvente que ajusta la fuerza para TLC de fase normal, así como metanol, acetoneitrilo, y tetrahidrofúrano mezclados con agua para ajustar la fuerza en TLC de fase reversa. ¹⁷

D) Aplicación de Muestras y Estándares

Para lograr la máxima resolución y el mejor análisis cuantitativo, la aplicación debe ser pequeña, de forma regular y precisamente colocada en la zona deseada, sin dañar la superficie de la capa. El disolvente debe ser removido por evaporación antes del desarrollo del cromatograma para que la selectividad y la zona de aplicación no se vean alteradas. El coleo de ciertas zonas puede originarse si toda o parte de la muestra se solidifica o adsorbe en la superficie de la capa.

Las muestras y estándares se aplican manualmente en la parte inferior de la placa con micropipetas de vidrio o con microdispensadores digitales. Asimismo, instrumentos manuales y automatizados están disponibles para la aplicación de la solución. Las zonas iniciales, en forma de manchas con un diámetro variable (se recomienda que sean de 1-3 mm), son aplicadas y los volúmenes de dichas aplicaciones pueden predeterminarse. Existen pipetas de capilares de vidrio o de platino-iridio que están colocadas en un dispositivo mecánico para hacer los puntos de aplicación y que se encuentran controlado electrónicamente; éste aparato guía al capilar a la posición deseada y la regresa, poniéndolo en contacto uniforme con la placa para que así descargue la solución.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Un aplicador completamente automatizado, se encuentra controlado por una computadora y consiste de un capilar de acero inoxidable conectado a una jeringa de dosificación, la cual es operada por un motor. La muestra es rociada por un atomizador controlado por presión de nitrógeno. Esta clase de dispositivo, puede aplicar secuencialmente (en banda o en punto) un volumen constante o variable de la muestra, eligiendo entre un número de viales que están en un soporte. Este instrumento ha sido el más utilizado que cualquier otro para la cuantificación densitométrica en análisis farmacéutico.¹⁷

El paso siguiente es la detección, la cual se realiza mediante la aplicación de un reactivo que permita visualizar la mancha. Hay pocos reactivos de detección para surfactantes no iónicos. Los reactivos que se encuentran disponibles generalmente se decoloran rápidamente, excepto el ácido sulfúrico, aunque éste no es específico. El reactivo más usado es el de Dragendorff modificado, una mezcla de iodobismutato de potasio/cloruro de bario en ácido acético concentrado, el cual reacciona con cierta especificidad con los grupos polialcoxi. La habilidad de los poloxameros, que tienen grupos poliéteres, de formar complejos con cationes grandes tales como K^+ ó Ba^{2+} es usada en este estudio para la detección de las muestras aplicadas y obtener una respuesta cuantitativa (área bajo la curva o altura). El complejo se forma como un par iónico con un anión lipofílico grande que se detecta o mide por su espectro de absorbancia en la región visible o UV. Una desventaja del reactivo de Dragendorff es su baja estabilidad, debida a que el ion yoduro es liberado, lo cual afecta la determinación porque el ion triyoduro compete con el ion tetraiodobismutato para unirse con el complejo entre el bario y el surfactante no iónico.¹⁹ Se propone que la estructura del complejo poloxamero-tetraiodobismutato de bario es debida a una complejación del ion Ba^{2+} (M^{2+}) con los grupos oxígeno en el éter para formar el ion *oxonio*, éste reacciona con un anión adecuado (X^-) como el tetraiodobismutato.² La estructura propuesta del complejo se muestra en la Figura 5.

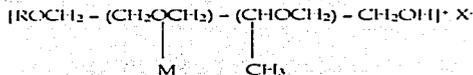


Figura 5. Estructura del complejo poloxamero-tetraiodobismutato. X: un anión, en este caso, el tetraiodobismutato; M: un metal, aquí se trata de Ba^{2+} .

Sin embargo, se encontró más tarde que muchos átomos de oxígeno del éter interactúan con el ion inorgánico (un metal pesado, una base, o iones de metales alcalino térreos) y que el complejo forma una configuración de helice para acomodar el ion en el centro.³

Con los surfactantes no iónicos, el desarrollo del color no sólo se relaciona a la concentración molar, sino que también es una función de la longitud de la cadena etóxica y el hidrófobo correspondiente. Sin embargo, el análisis cuantitativo es difícil ya que el tamaño e intensidad de las manchas son dependientes del porcentaje de óxido de etileno en la molécula, así como la masa de la mancha.¹⁹

1.4.3. CUANTIFICACIÓN EN HPTLC

La cuantificación de analitos por HPTLC se puede realizar mediante dos métodos:

- a) Indirectos: involucran la remoción del analito de la placa, seguido de un paso para cuantificarlo.
- b) Directos: involucran algún tipo de medición directamente sobre la placa, como cálculo del área, comparación visual o densitometría.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

1.4.3.1. DENSITOMETRÍA

Un densitómetro es un dispositivo que tiene ajustada una lámpara de haz de luz simple con una abertura rectangular o circular que sirve para realizar análisis cuantitativos en HPTLC *in situ*, midiendo las zonas de las muestras y estándares

Todos los densitómetros tienen ciertas características en común. Estas incluyen una fuente de luz, un dispositivo de selección de la longitud de onda, sistemas de enfoque y condensación, y un detector fotosensible. Además, se necesita de un mecanismo que permita mover a la placa bajo el haz de luz enfocado con el fin de examinar la placa.

El dispositivo que selecciona el haz de luz es un monocromador (MC) y el detector es un tubo fotomultiplicador (FM). Cuando el fotomultiplicador se coloca debajo de la placa, el instrumento opera en el modo de transmitancia (T). Colocando el fotomultiplicador arriba de la placa se tiene el modo de reflexión (R). Esta configuración se muestra en la Figura 6 para un instrumento de haz de luz simple.¹⁹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

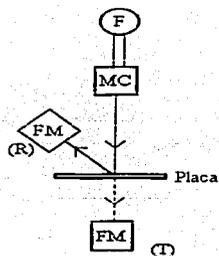


Figura 6. Diagrama de un densitómetro configurado en haz simple. F: fuente, MC: monocromador, FM: fotomultiplicador, R: modo de reflexión, T: modo de transmitancia.

En la Figura 7 se muestra un densitómetro de haz de luz simple ajustado para mediciones de absorción en el modo de reflexión. Una lámpara de tungsteno o halógeno es la fuente para examinar las zonas coloridas (absorción visible) y una lámpara de deuterio para examinar zonas que absorben en UV directamente. El monocromador puede ser un prisma o una rejilla siendo esta última la más frecuentemente usada. El detector es un fotomultiplicador o fotodiodo.¹⁴

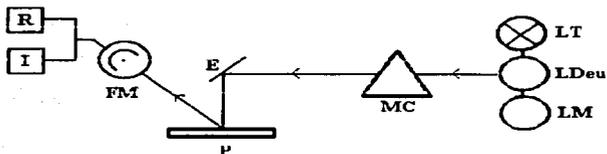


Figura 7. Diagrama que muestra la configuración de los densitómetros comerciales para un barrido de absorción. G: grabadora, I: integrador, F: fotomultiplicador, P: placa, E: espejo, MC: monocromador, LT: lámpara de tungsteno, LDeu: lámpara de deuterio, LM: lámpara de mercurio.

Existen varios densitómetros comercialmente disponibles que tienen diferentes capacidades de medición. Se puede efectuar una medición simultánea de reflexión o transmitancia, o solamente transmitancia, mediante un segundo detector colocado en el lado opuesto de la placa.

El densitómetro se conecta a una grabadora, a un integrador o a una computadora, siendo ésta última la más utilizada. Algunas de las tareas que puede realizar la computadora son: a) adquisición de datos, b) búsqueda automática de los picos y optimización del scanning de cada zona deseada, c) scanning a múltiples longitudes de onda y d) cálculo de áreas bajo la curva o alturas de muestras y estándares.

Las curvas de calibración densitométricas relacionadas con una señal de absorción (altura o área del pico) y cantidad (concentración o peso) de estándares sobre la placa, generalmente son no lineales, especialmente a altas concentraciones, y no pasan por el origen.¹⁷

1.4.3.2. TEORÍA DE LA DENSITOMETRÍA

Las ecuaciones de Kubelka y Munk constituyen la base de la teoría aplicable en el análisis cuantitativo sobre placas de capa fina por densitometría. Estas ecuaciones están dadas por una ecuación diferencial (ecuaciones 3 y 4):

$$-\frac{di}{dx} = -(S + K)i + Sj \quad (3)$$

$$-\frac{dj}{dx} = -(S + K)j + Si \quad (4)$$

donde i es la intensidad de la luz que viaja adentro de la placa hacia la superficie alejada (no iluminada), j es la intensidad de luz que viaja en la placa hacia la superficie cercana

(iluminada), S es el coeficiente de dispersión por unidad de profundidad (grosor), K es el coeficiente de absorción por unidad de profundidad (grosor) y x es la distancia de la superficie alejada de la placa.¹⁹

En este caso, la dispersión se define como la desviación irregular de luz en superficies internas.

Algunas condiciones implícitas están asociadas con estas ecuaciones:

- a) el haz de luz incidente es perpendicular a la superficie iluminada
- b) las reflexiones y absorciones ocurren a distancias infinitesimales y son constantes por encima del rango de la longitud de onda de la luz, el área iluminada y la profundidad de la placa.

Resolviendo las ecuaciones (3) y (4) se obtienen finalmente las siguientes ecuaciones:

$$T = T_0 = \frac{1}{SX + 1} \quad (5)$$

$$R = R_0 = \frac{SX}{SX + 1} \quad (6)$$

Donde T es la transmitancia, R la reflexión y X el grosor de la placa.

Se estableció de acuerdo a bases teóricas, que las mediciones por transmitancia eran más sensibles que las que se hacían por reflexión, y probaron esto experimentalmente. Sus conclusiones fueron las siguientes¹⁹:

1. La luz que ilumina no necesita ser exactamente paralela y perpendicular a la superficie. Sin embargo, la distribución angular de la luz, debe mantenerse constante.
2. La luz monocromática es importante para que se cumpla la ley de Beer.
3. La apertura del haz de luz debe ser pequeña para que se cubra un intervalo limitado de absorciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. Las mediciones por reflexión son más sensibles a la no uniformidad de la aplicación de la muestra que las mediciones por absorción.
5. Las variaciones en el coeficiente de dispersión S , como una función del área de iluminación, intervalo de la longitud de onda, y profundidad de la placa, son probablemente menores que las variaciones en absorción.

1.4. VALIDACIÓN

Cuando ha sido desarrollado un método de análisis el paso siguiente es validar dicho método para tener la seguridad de que los resultados obtenidos a partir de él son confiables. La validación de un método es el proceso para establecer, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método analítico son adecuadas para la aplicación deseada.^{20,21,22,23,24}

1.4.1. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Los parámetros que comúnmente se evalúan para métodos en HPTLC son los siguientes^{20,22}:

- a) Linealidad de la curva de calibración
- b) Exactitud
- c) Precisión:
 - i. Repetibilidad
 - ii. Reproducibilidad
- d) Límite de detección y cuantificación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A) LINEALIDAD

Es la relación que se establece mediante una recta entre una propiedad física, química o biológica con la concentración del analito. La respuesta analítica puede ser obtenida directamente o por medio de una transformación matemática y debe ser proporcional a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Para su determinación se prepara una serie de al menos cinco muestras con el estándar, éstas muestras se inyectan al menos por duplicado y se determina la curva de regresión $Y =$

$$mx + b,^{20,21,22,24}$$

B) EXACTITUD

Es el grado de concordancia que existe entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia (cifra verdadera). Se determina con la diferencia numérica entre la media de una serie de mediciones replicadas y el valor real (se puede expresar como el porcentaje del valor verdadero).

La recuperación del analito debe estar cerca al 100% para considerar que el método es exacto.^{20,21,22,24}

C) PRECISIÓN

Se define como la concordancia relativa obtenida entre una serie de mediciones repetidas realizadas por un solo analista, utilizando los mismos aparatos y las mismas condiciones del sistema de medición.^{20,21}

Es una característica del método analítico, la cual consiste en indicar la concordancia de los resultados analíticos entre sí. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

La precisión mide el grado de repetibilidad y/o reproducibilidad del método bajo las condiciones normales de operación.

i. Repetibilidad: es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio) pero en diferente día.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ii. Reproducibilidad: es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones (diferente analista, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando diferentes equipos, etc.).²¹

D) LIMITE DE DETECCIÓN:

Permite conocer la mínima concentración de principio activo que puede dar una respuesta, pero no puede ser cuantificada, bajo condiciones normales de operación. Se expresa normalmente como la concentración de analito en la muestra.^{20,21,22}

E) LIMITE DE CUANTIFICACIÓN:

Es la mínima concentración de principio activo que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo condiciones normales de operación.^{20,21,22}

Los límites de detección y cuantificación pueden ser determinados de la siguiente forma ²¹:

- a) Construir una curva de calibración a bajas concentraciones de la sustancia de interés.
- b) Determinar el intervalo de confianza para cada nivel de concentración.
- c) El límite de detección será la concentración estimada del límite de confianza superior del intercepto de la recta de regresión (respuesta en función de la concentración) (Figura 8).
- d) Proponer concentraciones cercanas al límite de detección estimado y determinar sus intervalos de confianza.
- e) El límite de cuantificación será aquella concentración que tenga un límite inferior de confianza semejante al intervalo de confianza superior del intercepto (Figura 8)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

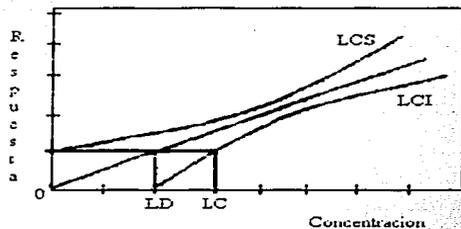


Figura 8. Gráfico representativo de la determinación del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) con ayuda de los límites de confianza superior (LCS) e inferior (LCI).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. OBJETIVOS

General

Desarrollar un método para la cuantificación de tensoactivos no iónicos de tipo poloxameros mediante la técnica de Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC).

Particulares

- Desarrollar un procedimiento mediante HPTLC definiendo las condiciones óptimas de trabajo, tanto químicas como instrumentales entre las que se encuentran: fase móvil, fase estacionaria, tiempo de saturación de la cámara, tiempo de lavado de placas, tiempos de secado, volumen aplicado de reactivo revelador, λ de lectura, etc., para la cuantificación de los poloxameros 188 y 407.
- Determinar los siguientes parámetros: linealidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, utilizando calculos estadísticos para establecer la confiabilidad del método.

3. HIPÓTESIS

Si el método desarrollado por HPTLC para cuantificar poloxameros es lineal, preciso, repetible, reproducible, exacto y tiene definidos el límite de detección y de cuantificación, entonces se obtendrán resultados confiables.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. MATERIAL Y EQUIPO

- Balanza analítica B1C32 (Boeco); Germany.
- Cromatógrafo de Capa Fina de Alta Resolución, Automatic TLC Sampler III (Camag); Switzerland. (Figura 9)
- Scanner 3 para Cromatografía de Capa Fina (Camag); Switzerland. (Figura 10)
- Placas de sílica gel C18, fase reversa (Machery-Nagel); Germany. (Figura 11)
- Aspersor de vidrio (Figura 12)
- Cámaras cromatográficas de fondo plano (Figura 13)
- Cristalería en general

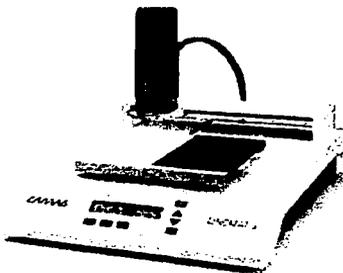


Figura 9. Aplicador automatizado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

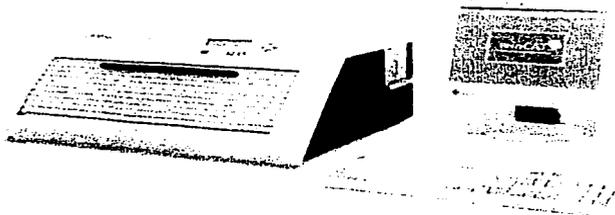


Figura 10. Densitómetro con computadora adaptada.

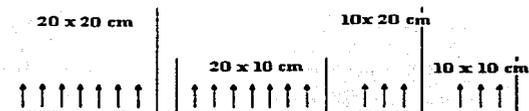


Figura 11. Placas para cromatografía



Figura 12. Aspersor de vidrio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

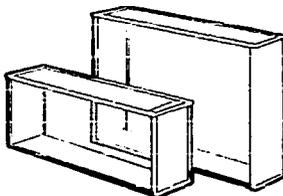


Figura 13. Cámaras cromatográficas

REACTIVOS

a) *Surfactantes*

- Poloxamcro 188, copolímero en bloques de polioxicetileno-polioxiopropileno; (Pluronic F68®) BASF, Corp.; Germany
- Poloxamcro 407, copolímero en bloques de polioxicetileno-polioxiopropileno; (Pluronic F127®) BASF, Corp.; Germany

b) *Solventes*

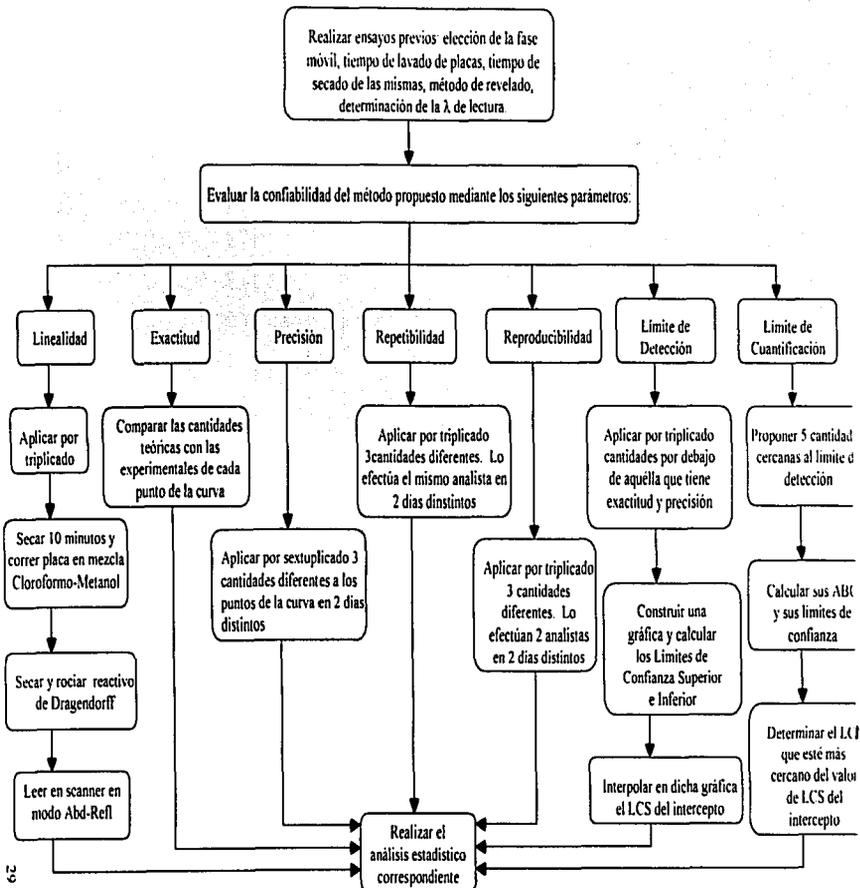
- Metanol, reactivo analítico, Fermont; México
- Cloroformo, reactivo analítico, Fermont; México

c) *Reactivos para el reactivo de Dragendorff*

- Ácido Acético Glacial, reactivo analítico, Merck ; México
- Cloruro de Bario, Productos Químicos Monterrey, S.A. de C.V.; México
- Nitrato de Bismuto, J.T. Baker Analyzed® Reactivo; México
- Yoduro de Potasio, J.T. Baker Analyzed® Reactivo; México

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Diagrama de flujo de la Metodología



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. METODOLOGÍA

5.1. Preparación del reactivo revelador (reactivo de Dragendorff).

Solución A:

Se pesaron 0.17 g de Nitrato de Bismuto y se disolvieron con 2 ml de Ácido Acético Glacial. Por otro lado se pesaron 4.0 g de Yoduro de Potasio y se les añadió 10 ml de agua destilada para disolverlos. De esta última solución se tomaron 8 ml y se mezclaron con los 2 ml de la solución de Nitrato de Bismuto.

Solución B:

Se pesaron 1.5 g de Cloruro de Bario y se disolvieron con 7.5 ml de agua destilada.

Reactivo final

Se mezclan los 10 ml de la solución A con 5 ml de la solución B, éste es el reactivo de Dragendorff.

5.2. Determinación de la λ de lectura

Se preparó una solución de 5.004 mg/ml de poloxamero 188 y de ésta se hicieron diez aplicaciones en banda de 2 mm de ancho y con 10 mm de distancia entre cada una, sobre una placa de fase reversa de 10 cm de largo por 5 cm de ancho. La placa fue previamente "lavada" durante 30 minutos dentro de la cámara de elución de fondo plano con 10 ml de fase móvil, esto se hizo con la finalidad de mejorar la forma de la mancha. Dicha fase móvil consistió de una mezcla de Cloroformo-Metanol (90:10) y la elección de ésta se realizó mediante ensayos de prueba y error. Una vez transcurridos los 30 minutos, la placa se secó a temperatura ambiente durante 20 minutos. El volumen aplicado fue de 1000 μ l (correspondiente a 5004 ng). Transcurridos 10 minutos, se introdujo la placa en la cámara de elución que contenía 10 ml de la fase móvil, la cual se dejó correr a una altura de 4 cm. Una vez seca la placa, se roció con el reactivo de Dragendorff, empleando un aspersor, hasta la aparición de manchas anaranjadas. Inmediatamente se realizó un barrido en región visible (rango 400-800 nm, con lámpara de Tungsteno, modo Absorción-Reflexión) para

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

determinar la λ de onda adecuada a la cual se leerían las pruebas posteriores. Se hizo lo mismo para el poloxamero 407, pero esta vez la fase móvil consistió en una mezcla de Clorotorno-Metanol (88:12).

Cabe señalar que las placas se leyeron dentro de los primeros 10 minutos de haberlas rociado con el reactivo revelador, ya que se observó que las manchas perdían su color progresivamente.

5.3. Linealidad del sistema

Se determinó preparando una solución madre de poloxamero 188 de 5 mg/ml. De esta solución se hicieron las aplicaciones, sobre placas lavadas con anterioridad, de cantidades conocidas: 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 y 4500 ng; cada una por triplicado con 2 mm de ancho y 8 mm de separación entre ellas. Se dejaron secar 10 minutos y se corrió la placa hasta la altura antes mencionada. Enseguida se rociaron con el reactivo de Dragendorff y se leyeron a 513 nm en el scanner evaluándose con el Software Cats 4. Posteriormente se obtienen las ABC y se grafica la cantidad contra ABC para obtener la regresión lineal.

Además los promedios del ABC de cada nivel de cantidad aplicada se graficaron relacionando cantidad contra ABC y se realizó el correspondiente análisis de regresión.

El proceso que se sigue para la determinación de la linealidad del sistema se efectuó en dos días diferentes, obteniéndose una curva por día y a las cuales se les hace la prueba de F para verificar si se tiene una relación lineal entre la cantidad y el ABC.

Para el 407 se preparó una solución madre de 5 mg/ml. Las cantidades aplicadas fueron de 1750, 2000, 2500, 2750, 3000, 3250 y 3500 ng. Las placas se leyeron a 512 nm para construir el gráfico cantidad de poloxamero 407 contra el ABC y se determinó la linealidad con un análisis de regresión lineal. Esta curva fue preparada en dos días, y se hizo la prueba de F para demostrar la linealidad de la curva obtenida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.4. Exactitud del sistema

Tanto para el 188 como para el 407 la exactitud, se valoró comparando la concentración teórica de cada uno de los puntos de la curva (como el 100%) y la concentración experimental, calculándose el porcentaje de recuperación de cada nivel. Los distintos porcentajes de recuperación se suman y se dividen entre el número de estándares para obtener la recuperación promedio, la cual mientras más cercana se encuentre de 100, indicará una mayor exactitud.

5.5. Precisión del sistema

Para el 188: se determinó mediante el análisis por sextuplicado de tres cantidades aplicadas correspondientes a 1500, 3000 y 4500 ng. Este análisis se realizó en dos días. El criterio de precisión del sistema se define con el promedio de los coeficientes de variación de los dos días.

Para el 407: se realizó el mismo procedimiento anterior, pero las cantidades aplicadas fueron 1750, 2500 y 3250 ng.

5.5.1. Repetibilidad (Precisión expresada en términos de repetibilidad)

Para el 188: se evaluó con los resultados obtenidos por un mismo analista, con el mismo equipo y en dos días diferentes, mediante el análisis por triplicado de tres diferentes cantidades aplicadas (1000, 2500 y 3500 ng). La prueba estadística que se hizo para comprobar la repetibilidad fue la de t-Student.

Para el 407: se hizo el mismo procedimiento y las cantidades aplicadas fueron 2000, 2750 y 3500 ng.

5.5.2. Reproducibilidad (Precisión expresada en términos de reproducibilidad)

Para el 188: se evaluó mediante el análisis por triplicado de tres cantidades aplicadas: 1150, 2800 y 4100 ng. Las determinaciones se realizan con dos diferentes analistas y en dos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

diferentes días y se hace un análisis de variancia jerárquico para comprobar que si hay reproducibilidad.

Para el 407: en este caso las cantidades aplicadas fueron 1850, 2600 y 3400 ng. por triplicado y se analizaron estadísticamente igual que para el 188.

5.6. Límite de detección

Para el 188: se hicieron aplicaciones a partir de la última cantidad que cumple con los requisitos de precisión y exactitud (500 ng), y éstas fueron: 100, 200, 250, 300 y 400 ng por triplicado. Luego se hizo una grafica de la cantidad aplicada contra los promedios de las ABC a partir de la cual se pudieron calcular y graficar los intervalos de confianza para obtener el límite de detección.

Para el 407: las aplicaciones se hicieron a partir de la última cantidad que cumple con los requisitos de precisión y exactitud (1750 ng): 550, 600, 700, 800, 900 y 1000 ng. Se construyó la gráfica de cantidad aplicada contra los promedios de las ABC y se calcularon sus respectivos límites de confianza.

5.7. Límite de cuantificación

Para el 188: a partir de la curva construida para el límite de detección, se propusieron cinco cantidades: 12, 14, 18, 22 y 25 cercanas al límite de detección y se determinaron sus ABC correspondientes. Se calcularon los límites de confianza superior e inferior de esas cantidades.

Para el 407: la cantidades propuestas en este caso fueron: 35, 45, 50, 60 y 65. Se determinaron sus ABC correspondientes y se calcularon los límites de confianza correspondientes.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.a. LINEALIDAD

En la tabla 1 se muestran las ABC obtenidas para cada nivel de cantidad aplicada del poloxamero 188 y con los cuales se evaluó la linealidad del sistema.

Tabla 1. Resultados para determinar la linealidad del sistema de poloxamero 188.

CURVA 1		
Cantidad (ng)	ABC (mm ²)	Promedio ABC (mm ²)
500.8	2551.2	2535.6333
500.8	2478.9	
500.8	2576.8	
1001.6	4664.6	4757.9000
1001.6	4780.6	
1001.6	4828.5	
1502.4	6646.2	6607.1333
1502.4	6707.8	
1502.4	6467.4	
2003.2	9429.5	9531.6333
2003.2	9451.0	
2003.2	9714.4	
2504.0	10426.2	10677.7000
2504.0	10950.1	
2504.0	10656.8	
3004.8	12667.0	12549.0000
3004.8	12498.5	
3004.8	12481.5	
3505.6	15964.5	15314.0000
3505.6	15492.4	
3505.6	14488.1	
4006.4	17428.2	17411.3000
4006.4	17316.6	
4007.2	19876.8	
4507.2	19949.0	19772.6333
4507.2	19492.7	

CURVA 2		
Cantidad (ng)	ABC (mm ²)	Promedio ABC (mm ²)
501.2	2872.1	2919.5667
501.2	2923.1	
501.2	2963.5	
1002.4	4853.3	4762.2333
1002.4	4659.3	
1002.4	4774.1	
1503.6	7093.1	6947.7667
1503.6	6715.0	
1503.6	7035.2	
2004.8	9346.1	9221.7667
2004.8	9242.0	
2004.8	9082.0	
2506.0	11127.6	10838.0000
2506.0	10787.8	
2506.0	10598.6	
3007.2	11637.1	11671.8667
3007.2	11596.1	
3007.2	11782.4	
3508.4	14335.9	14392.7000
3508.4	13927.2	
3508.4	14915.0	
4009.6	15677.9	15624.6333
4009.6	15617.9	
4009.6	15782.1	
4510.8	18014.3	18162.6333
4510.8	18203.6	
4510.8	18270.0	

El análisis estadístico se realizó aplicando el software Excel 2000.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las ecuaciones obtenidas de las dos curvas a partir del análisis de regresión se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Ecuaciones de regresión que explican la relación lineal que existe entre las cantidades del poloxamero 188 y su respectiva área.

CURVA	ECUACIÓN
1	$ABC = 4.25/8 * \text{Cantidad de Poloxamero 188} + 405.78$
2	$ABC = 3.6877 * \text{Cantidad de Poloxamero 188} + 1263.30$
Global	$ABC = 3.9627 * \text{Cantidad de Poloxamero 188} + 834.53$

A partir de estas ecuaciones fue posible calcular los siguientes parámetros estadísticos (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema.

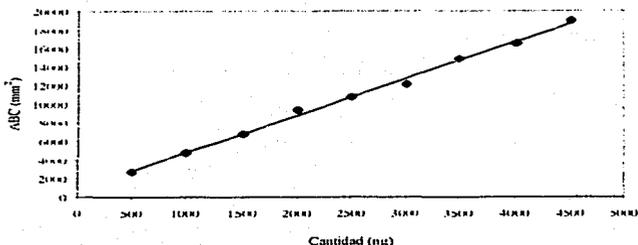
Parámetros estadísticos de la regresión	Curva 1	Curva 2	Global
Coefficiente de correlación (r)	0.9982	0.9969	0.9981
Coefficiente de determinación (r ²)	0.9964	0.9938	0.9962
Intercepto (b)	405.7842	1263.3000	834.5300
Pendiente (m)	4.2378	3.6877	3.9627
Coefficiente de variación (C.V., %)	1.9202	1.8298	1.8750

Se observa, a partir del análisis estadístico de regresión, que existe una relación lineal altamente significativa entre las cantidades que se aplicaron del poloxamero 188 y su respectiva ABC, teniendo así que el 99.62 % de la variación del ABC esta explicada por los cambios en la cantidad del poloxamero 188 (Figura 14).

En la Figura 14 se puede observar la relación lineal que existe entre la cantidad y el ABC evaluada, en el intervalo de cantidades de 500 – 4500 ng.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 14. Curva de regresión global para poloxamero 188. $y = 3.9627x + 834.53$, $r^2 = 0.9962$



Para demostrar si existe una relación lineal entre las variables estudiadas (cantidad aplicada y ABC) se realizó un análisis de variancia y se estableció la siguiente hipótesis.

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe relación lineal entre la cantidad de poloxamero 188 y su respectiva ABC.

Hi: Existe una relación lineal entre la cantidad de poloxamero 188 y su respectiva ABC.

Criterio de aceptación: Si $F_{calc} > F_{critica}$ se rechaza H_0 , y por lo tanto, existe relación lineal entre la cantidad de poloxamero 188 y su respectiva ABC.

La tabla 4 muestra los resultados del análisis de variancia.

Tabla 4. Análisis de variancia para evaluar la linealidad del sistema.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítico ($\alpha = 0.05$)
Desviación de medias debida a la regresión	5	7688720427.4	1537744085.5	30533.5275	2.4500
Desviación debida a la media	48	2417398.9	50362.5		
Desviación total	53				

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

De acuerdo con la hipótesis que se estableció y a los resultados obtenidos del análisis de variancia, se debe rechazar H_0 , y entonces hay evidencia estadística con un nivel de significancia de 0.05 que la variación del ABC se explica por una variación en la cantidad aplicada de poloxamer 188.

También se evaluó si los valores de ordenadas al origen eran significativamente diferentes del valor de cero, con un nivel de significancia de 0.05, por lo que se estableció la siguiente hipótesis:

Prueba de hipótesis:

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_1 : la ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación: si $t_{cal} < t_{crítica}$, no se rechaza

H_0 , y por lo tanto el intercepto es igual a cero.

En la tabla 5 se muestran los valores obtenidos para el intercepto y para t .

Tabla 5. Resultados de la prueba del intercepto.

Parámetro	Curva 1	Curva 2
Ordenada al origen	405.7843	1263.2657
t calculada	2.2885	6.9334
t crítica	2.0555	2.0555

Observando los resultados obtenidos y de acuerdo a la hipótesis establecida, existe evidencia estadística de que la ordenada al origen de la recta de regresión es diferente de cero (con una probabilidad del 95%) esto se debe a la existencia de errores indeterminados del sistema, debido a causas comunes de variación en la temperatura, humedad, variaciones de voltaje que afecta a los equipos, etc. Además se sabe que las curvas de calibración densitométricas relacionadas con una señal de absorción (altura o área del pico) y cantidad (concentración o peso) generalmente son no lineales y/o no pasan por el origen.¹⁷

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2.a. EXACTITUD

Como la exactitud puede variar dependiendo de la cantidad aplicada, ésta se evaluó en todo el intervalo de las cantidades de la curva de calibración para obtener los porcentajes de recuperación o recobro. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados para determinar la exactitud del sistema.

Cantidad teórica (ng)	Cantidad experimental (ng)	Promedio ABC (mm^2)	ABC estimada (mm^2)	Recuperación (%)
500	501	2727.6000	2819.8427	96.7288
1000	1002	4760.0667	4805.1554	99.0617
1500	1503	6777.4500	6790.4681	99.8083
2000	2004	9377.5000	9775.7808	106.8566
2500	2505	10757.8500	10761.0935	99.9699
3000	3006	12110.4333	12746.4062	95.0106
3500	3507	14853.3500	14731.7189	100.8256
4000	4008	16517.9667	16717.0316	98.8092
4500	4509	18967.7333	18702.3443	101.4190

El promedio de los porcentajes de recuperación es 99.8322%, por lo que se concluye que el sistema de medición es exacto en ese intervalo de cantidades aplicadas, puesto que dicho valor se encuentra dentro del rango de porcentajes especificados para métodos cromatográficos (98-102%).²⁴

6.3.a. PRECISIÓN DEL SISTEMA

Para evaluar si las ABC en el intervalo propuesto son precisas se analizaron por sextuplicado tres niveles diferentes de cantidades aplicadas y se les hizo un tratamiento estadístico. En las tablas 7 y 8 se muestran los resultados

Tabla 7. Resultados obtenidos para determinar la precisión.

Cantidad (ng)	ABC (mm ²)		
	DÍA 1		
1502.4	6646.2	6467.4	6628.1
	6707.8	6578.3	6634.7
3004.8	12667.0	12481.5	12569.5
	12498.5	12364.2	12511.1
4507.2	19876.8	19492.7	19879.4
	19949.0	19969.2	19657.6
DÍA 2			
1502.4	7093.1	7035.2	7026.4
	6715.0	6989.7	7032.9
3004.8	11637.1	11782.4	11838.4
	11596.1	11529.3	11798.3
4507.2	18014.3	18270.0	18435.5
	18203.6	18315.6	18524.7

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 8. Resultados del promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cada cantidad aplicada.

Cantidad (ng)	Promedio ABC (mm ²)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
DÍA 1			
1502.4	6610.4167	31.4268	1.2318
3004.8	12515.3000	100.2238	0.8008
4507.2	19804.1167	188.4896	0.9518
DÍA 2			
1502.4	6982.0500	134.9695	1.9331
3004.8	11696.9333	126.0483	1.0776
4507.2	18293.9500	179.2716	0.9800

Se observa que en todos los niveles de cantidades aplicadas el coeficiente de variación es menor de 2%, valor límite especificado para métodos cromatográficos, por lo tanto el sistema es preciso.²²

6.3.1.a. REPETIBILIDAD

La repetibilidad se evaluó mediante la prueba de "t" de student con los datos obtenidos en dos días diferentes para 1000, 2500 y 3500 ng (ver datos en tabla 1) y para eso se estableció la siguiente hipótesis.

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe efecto del día en el análisis.

Hi: Si existe efecto del día en el análisis.

Criterio de aceptación: Si $t_{cal} < t_{critica}$ no se rechaza Ho, y por lo tanto hay repetibilidad entre días.

Al probar la hipótesis propuesta se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 9.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9. Parámetros estadísticos calculados para evaluar la repetibilidad.

Cantidad de F68 (ng)	Media	Desviación estándar	C V (%)	t cal	t crítica $\alpha=0.05/2, gl=8$
1000	4760.0667	91.1507	1.9098	-0.0582	2.3060
2500	10757.8500	265.3259	2.4662	-0.7399	
3500	14853.3500	639.2898	4.1915	1.7650	

Con éstos datos se determina, con un 95% de confianza, que no existe diferencia estadística significativa del método desarrollado entre diferentes días, en ninguna de las cantidades evaluadas.

6.3.2.a. REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad se determinó en dos días por dos analistas, analizando tres muestras aplicadas correspondientes a las cantidades de: 1150, 2800 y 4100 ng, bajo las mismas condiciones de análisis.

En la tabla 10 se muestran los datos correspondientes a la reproducibilidad.

Tabla 10. Datos para determinar la reproducibilidad.

Cantidad de Poloxamero 188 (ng)	ABC (mm ²)			
	Analista 1		Analista 2	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
1150	6742.7	7326.2	4742.9	4577.3
	7064.4	7273.1	4971.9	4668.6
	6593.1	7338.8	4895.4	4523.2
2800	13242.0	14231.5	10076.3	10505.3
	13228.7	14130.5	9658.9	10597.0
	13412.9	14260.7	9999.8	9854.1
4100	17695.3	16694.7	13466.5	13281.5
	17696.4	16761.7	13027.3	13058.1
	17235.5	17546.4	13942.6	13064.0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estos datos se analizaron mediante un análisis de variancia anidado o jerárquico para determinar si existía diferencia significativa entre los resultados obtenidos por dos analistas, para cada nivel de cantidad aplicada, estableciendo la siguiente hipótesis:

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe efecto del analista en el análisis.

Hi: Si existe efecto del analista en el análisis.

Criterio de aceptación: Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza Ho, y entonces existe reproducibilidad entre diferentes analistas.

En la tabla 11 se muestran los resultados del análisis estadístico.

Tabla 11. Análisis de variancia para evaluar la reproducibilidad a diferentes cantidades aplicadas.

Para 1150 ng:

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal	F crítica ($\alpha=0.05$)
Analista	1	16237806.7500	16237806.7500	63.4168	18.51
Día	2	512097.6033	256048.8017	13.0959	4.46
Error	8	156414.2200	19551.7775		

Para 2800 ng:

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal	F crítica ($\alpha=0.05$)
Analista	1	39657488.9417	39657488.9417	52.9091	18.51
Día	2	1499081.1283	749540.5642	13.1117	4.46
Error	8	457325.8600	57165.7325		

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para 4100 ng:

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal	F crítica ($\alpha=0.05$)
Analista	1	47163675.3333	47163675.3333	152.7424	18.51
Día	2	617558.5333	308779.2667	2.3721	4.46
Error	8	1041357.5333	130169.6917		

Como se puede observar, la $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza H_0 , entonces se afirma que el analista tiene efecto sobre el análisis, para los tres niveles de cantidades aplicadas.

También con este análisis se puede evaluar la repetibilidad y se observa que para 1150 y 2800 ng existe una diferencia significativa entre días, y sólo para la cantidad de 4100 ng se observa que existe repetibilidad. De acuerdo a esto se considera que el análisis de variancia no siempre puede llevarnos a tomar una decisión adecuada en cuanto a la aceptación o el rechazo del método.

Posiblemente estas variaciones son debidas a factores como la temperatura de trabajo, la humedad, o el criterio del analista en cuanto al manejo de instrumentos y/o equipo. Otro factor de importancia es el hecho de que en el proceso de manufactura de éste Poloxamero no se puede purificar totalmente, existiendo otros compuestos como restos del catalizador de la reacción (KOH), polietilenglicol y polipropilenglicol, residuos de óxido de etileno o de propileno, e impurezas de bajo peso molecular (OE, OP, 1,4-dioxano, acetaldehído, etilenglicol, dietilenglicol) de las reacciones paralelas de los óxidos.¹⁹

Esos productos indeseables pueden ser causa de las variaciones en los resultados obtenidos por diferentes analistas y en diferentes días. Finalmente, con este tipo de surfactantes el desarrollo del color se relaciona tanto con la concentración molar como con la longitud de la cadena etóxica y el hidrofobo correspondiente, resultando en un análisis cuantitativo difícil debido a que el tamaño e intensidad de las manchas dependen del porcentaje de óxido de etileno en la molécula, así como del tamaño de la mancha.¹⁹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.4.a. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Para determinar el límite de detección y de cuantificación se analizaron aplicaciones de la solución madre de poloxamero 188 pero a bajas cantidades y se determinó su ABC correspondiente. La tabla 12 muestra las ABC que se obtuvieron.

Tabla 12. Áreas Bajo la Curva obtenidas para aplicaciones a niveles bajos de poloxamero 188 para determinar los límites de detección y cuantificación.

Cantidad (ng)	ABC (mm ²)
100.04	723.2
	752.0
	751.4
200.08	1367.5
	1305.8
	1364.9
250.10	1655.3
	1653.7
	1654.8
300.12	1953.0
	1979.7
	1977.3
400.16	2451.6
	2426.8
	2452.3

Se realizó un análisis de regresión lineal con dichos datos y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$ABC = 3.9627 * \text{Cantidad de Poloxamero 188} + 834.5300$$

(Ecuación 7)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con esta ecuación se estimó el ABC correspondiente para cada nivel de cantidad aplicada y se les determinó sus respectivos intervalos de confianza (límites de confianza), esos resultados son los que muestra la tabla 13.

Tabla 13. Límites de confianza de las aplicaciones de poloxamero 188 a cantidades bajas.

Cantidad (ng)	Promedio ABC (mm^2)	LCI al 95% del ABC	LCS al 95% del ABC
0.00		133.769	264.7876
100.04	772.0790	728.2169	815.9411
200.08	1344.8781	1317.6737	1372.0802
250.10	1621.2776	1606.9472	1655.6078
300.12	1917.6771	1890.4727	1944.8792
400.16	2490.4761	2446.6141	2534.3382

(LCI = Límite de confianza inferior, LCS = Límite de confianza superior).

El valor de 264.7876, que corresponde al límite de confianza superior para la cantidad 0.00 ng, se interpoló en la curva de regresión que se obtuvo para los datos de la tabla 12 (ABC vs Cantidad de poloxamero 188). Se estimó la cantidad de 11.4412 ng, la cual corresponde al límite de detección.

El límite de cuantificación se evaluó proponiendo 5 cantidades a aplicar cercanas al límite de detección y se determinaron sus ABC aplicando la ecuación 7. En la tabla 14 se muestran dichos resultados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

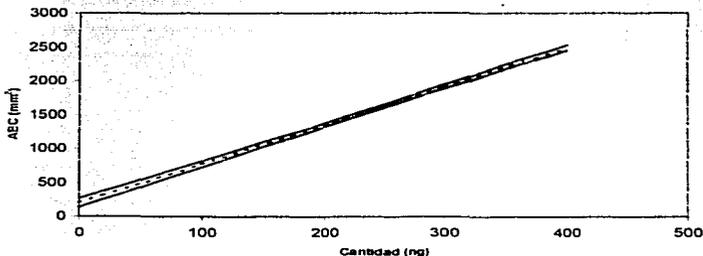
Tabla 14. Límites de confianza para las ABC pronosticadas por la ecuación de regresión.

Cantidad (ng)	ABC estimada (mm ²)	LCI de ABC	LCS de ABC
12	267.5884	205.1775	330.7993
14	279.4398	217.0770	341.8026
18	302.3426	240.8744	363.8108
22	325.2454	264.6693	385.8215
25	342.4225	282.5139	402.3311

La cantidad de **22 ng** corresponde al límite de cuantificación, debido a que su límite de confianza inferior (**264.6693**) es el que se encuentra más cercano al límite de confianza superior del intercepto (264.7876).

En la Figura 15 se muestra el gráfico obtenido con los datos calculados de los límites de confianza.

Figura 15. Gráfica de los límites de confianza de las ABC en función de la cantidad aplicada de poloxamero 188. (----- ABC estimada, — LCI y LCS)



Con base al intervalo de cantidades bajas de 100 a 400 ng se determinó experimentalmente el límite de cuantificación mediante la evaluación del coeficiente de variación de los porcentajes de recuperación para cada nivel de cantidad aplicada.

En los resultados que se presentan en la tabla 15 se observa que el menor coeficiente de variación corresponde a la cantidad de 250.10 ng, además se tiene la mejor precisión y el porcentaje de recuperación es el que más se acerca al 100% (101.4297%) es por esto que el límite de cuantificación determinado experimentalmente es de 250.10 ng.

Tabla 15. Porcentajes de recuperación a cantidades bajas de poloxamero 188 con sus respectivos coeficientes de variación (C.V.).

Cantidad ng	% Recuperación	C.V. (%)
100.04	93.6692	2.2174
	97.3994	
	97.3216	
200.08	101.6821	2.5925
	97.0943	
	101.4888	
250.10	101.4726	0.0495
	101.3745	
	101.4420	
300.12	101.8420	0.7498
	103.2343	
	103.1091	
400.16	98.4390	0.5944
	97.4432	
	98.4671	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.1.b. LINEALIDAD

Los datos que se obtuvieron para cada nivel de cantidad de poloxamero 407 aplicada para evaluar la linealidad del sistema se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Resultados para determinar la linealidad del poloxamero 407.

CURVA 1			CURVA 2		
Cantidad (ng)	ABC (mm ²)	Promedio ABC (mm ²)	Cantidad (ng)	ABC (mm ²)	Promedio ABC (mm ²)
1751.4	2791.2	3801.4000	1751.4	2464.3	2449.6000
1751.4	2781.7		1751.4	2463.5	
1751.4	2831.3		1751.4	2421.0	
2001.6	3444.9	3439.0000	2001.6	2796.6	2966.8000
2001.6	3433.1		2001.6	3005.1	
2001.6	3439.0		2001.6	3098.7	
2502.0	5232.5	5283.6333	2502.0	3265.0	3867.7667
2502.0	5242.9		2502.0	3910.9	
2502.0	5375.5		2502.0	3827.4	
2752.2	6589.0	6670.6667	2752.2	4696.7	4744.1000
2752.2	6452.0		2752.2	4823.4	
2752.2	6971.0		2752.2	4712.2	
3002.4	7243.9	7219.0000	3002.4	5186.0	5189.5667
3002.4	7085.1		3002.4	5113.3	
3002.4	7328.0		3002.4	5269.4	
3252.6	7910.8	7910.7500	3252.6	5845.8	5789.2667
3252.6	7955.5		3252.6	5213.6	
3252.6	7865.9		3252.6	5708.4	
3502.8	8615.5	8991.6667	3502.8	6452.9	6783.6333
3502.8	8754.7		3502.8	6895.7	
3502.8	9604.8		3502.8	7002.3	

Mediante el análisis de regresión que se les hizo a las curvas elaboradas los dos días se obtuvieron las ecuaciones que se muestran en la tabla 17.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 17. Ecuaciones de regresión que explican la relación lineal que existe entre las cantidades de poloxamero 407 y su respectiva área bajo la curva.

CURVA	ECUACIÓN
1	$ABC = 3.5766 * \text{Cantidad de Poloxamero 407} - 3541.9$
2	$ABC = 2.3959 * \text{Cantidad de Poloxamero 407} - 1881.1$
Global	$ABC = 2.2371 * \text{Cantidad de Poloxamero 407} - 2714.1$

Los parámetros estadísticos que se calcularon a partir de esas ecuaciones se presentan en la tabla 18.

Tabla 18. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema.

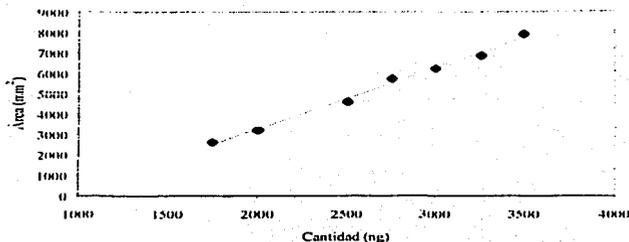
Parámetros estadísticos de la regresión	CURVA 1	CURVA 2	GLOBAL
Coefficiente de correlación (r)	0.9965	0.9934	0.9969
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9931	0.987	0.9939
Intercepto (b)	-3541.9	-1881.1	-2714.1
Pendiente (m)	3.5766	2.3959	2.9871
Coefficiente de variación (C.V. %)	2.1262	2.2577	2.1920

Con el análisis estadístico de regresión, se puede observar que existe una relación lineal altamente significativa entre las cantidades que se aplicaron del poloxamero 407 y su respectiva ABC. La variación del ABC se explica por los cambios en la cantidad de poloxamero 407 en un 99.39 %.

En la figura 16 se puede observar la relación lineal que existe entre la cantidad aplicada de poloxamero 407 y el ABC evaluada, en el intervalo de cantidades de 1750 – 3500 ng.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 16. Curva de regresión global para poloxamero 407. $y = 2.9871x - 2714.1$; $r^2 = 0.9939$.



Se estableció la siguiente hipótesis para demostrar si existe una relación lineal entre las variables estudiadas (cantidad aplicada y ΔBC) y se realizó un análisis de variancia.

Prueba de hipótesis:

H_0 : No existe relación lineal entre la cantidad de poloxamero 407 y su respectiva ΔBC .

H_1 : Existe una relación lineal entre la cantidad de poloxamero 407 y su respectiva ΔBC .

Criterio de aceptación: Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza H_0 , y por lo tanto, existe relación lineal entre la cantidad de poloxamero 407 y su respectiva ΔBC .

En la tabla 19 se muestran los resultados del análisis de variancia.

Tabla 19. Análisis de variancia para evaluar la linealidad del sistema.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítico ($\alpha = 0.05$)
Desviación de medias debida a la regresión	5	1338876039.0	267775207.8	9438.3119	2.5300
Desviación debida a la media	36	1021359.3	28371.1		
Desviación total	41	1339897398.3			

De acuerdo con la hipótesis establecida y los resultados obtenidos del análisis de variancia, se rechaza H_0 , y por lo tanto hay evidencia estadística con un nivel de significancia de 0.05 que la variación del ABC se explica por una variación en la cantidad aplicada de poloxamero 407.

Para determinar si los valores de ordenadas al origen eran significativamente diferentes del valor de cero, se estableció la siguiente hipótesis con un nivel de significancia de 0.05:

Prueba de hipótesis:

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_1 : la ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación: si $t_{cal} < t_{crítica}$, no se rechaza

H_0 , y por lo tanto el intercepto es igual a cero.

Los resultados obtenidos al probar dicha hipótesis se muestran en la tabla 20.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 20. Resultados de la prueba del intercepto.

Parámetro	Curva 1	Curva 2
Ordenada al origen	-3541.9	-1678.6
t calculada	12.7996	9.0086
t crítica	2.0860	2.0360

Con base a los resultados obtenidos y la hipótesis establecida, se tiene que hay evidencia estadística de que la ordenada al origen de la recta de regresión es diferente de cero (con una probabilidad del 95%) esto se debe a la existencia de errores indeterminados del sistema (variación en la temperatura, humedad, variaciones de voltaje que afecta a los equipos, etc.).

6.2.b. EXACTITUD

La exactitud fue evaluada obteniendo los porcentajes de recuperación o recobro en todo el intervalo de las cantidades de la curva de calibración, ya que la exactitud puede variar dependiendo de la cantidad aplicada. Los resultados se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Resultados para determinar la exactitud del sistema.

Cantidad teórica (ng)	Cantidad experimental (ng)	Promedio ABC (mm ²)	ABC estimada (mm ²)	Recuperación (%)
1750.0	1751.4	2625.9000	2517.5069	104.2897
2000.0	2001.6	3202.9000	3264.8794	98.1016
2500.0	2502.0	4575.7000	4759.6242	96.1357
2750.0	2752.2	5676.5667	5506.9966	103.0792
3000.0	3002.4	6204.2833	6254.3690	99.1992
3250.0	3252.6	6850.0683	7001.7415	97.8329
3500.0	3502.8	7887.6333	7749.1139	101.7876

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El promedio de los porcentajes de recuperación es 100.0608%, por lo que el sistema de medición es exacto en ese intervalo de cantidades aplicadas, puesto que dicho valor se encuentra muy cercano al 100% de recuperación y dentro del rango de porcentajes aceptables para métodos cromatográficos (98-102%).²⁴

6.3.b. PRECISIÓN DEL SISTEMA

Para evaluar la precisión en el intervalo propuesto se hizo el análisis por sextuplicado a tres niveles diferentes de cantidades aplicadas y se les hizo un tratamiento estadístico. En la tabla 22 se muestran los resultados.

Tabla 22. Resultados obtenidos para determinar la precisión del sistema.

Cantidad (ng)	ABC (mm ²)		
	DÍA 1		
1751.4	2791.2	2831.3	2756.4
	2781.7	2687.3	2802.6
2502.0	5232.5	5375.5	5349.2
	5242.9	5426.1	5240.8
3252.6	7910.8	7865.9	7781.0
	7955.6	7928.9	7756.7
DÍA 2			
1751.4	2464.3	2421.0	2498.6
	2463.5	2546.3	2469.7
2502.0	3865.0	3827.4	3871.5
	3910.9	3986.4	3815.1
3252.6	5845.8	5708.4	5822.3
	5813.6	5749.0	5834.9

Se calculó también el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación; esos resultados se observan en la tabla 23.

Tabla 23. Resultados del promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cada cantidad aplicada.

Cantidad (ng)	Promedio ABC (mm ²)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
DÍA 1			
1751.4	2775.0833	49.5500	1.7855
2502.0	5311.1667	83.1808	1.5661
3252.6	7866.4750	81.4338	1.0352
DÍA 2			
1751.4	2477.2333	41.9561	1.6937
2502.0	3879.3833	62.5292	1.6118
3252.6	5795.6667	54.5468	0.9412

El coeficiente de variación es menor de 2%, valor límite especificado para métodos cromatográficos, en todos los niveles de cantidades aplicadas, por lo tanto el sistema es preciso.²²

6.3.1.b. REPETIBILIDAD

La repetibilidad se evaluó con la prueba de "t" de student con los datos obtenidos en dos días diferentes para 2000, 2750 y 3500 ng (ver datos en tabla 16) y se estableció la siguiente hipótesis.

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe efecto del día en el análisis.

Hi: Si existe efecto del día en el análisis.

Criterio de aceptación: Si $t_{cal} < t_{critica}$ no se rechaza Ho, y por lo tanto hay repetibilidad entre días.

Los datos obtenidos al realizar la prueba estadística se observan en la tabla 24.

Tabla 24. Parámetros estadísticos calculados para evaluar la repetibilidad.

Cantidad de F127 ng	Media	Desviación estándar	C.V (%)	t cal	t crítica $\alpha=0.05/2, gl=8$
2000	3202.9000	109.4328	2.6921	5.2847	2.3060
2750	5707.3833	196.3654	2.7444	12.0167	
3500	7887.6500	431.0875	5.1253	6.2735	

Debido a que la t calculada es mayor que la t crítica, se determina que existe diferencia estadística significativa del método desarrollado entre diferentes días, para las cantidades evaluadas, esto se puede explicar por las variaciones indeterminadas en el sistema, tales como temperatura, humedad, presencia de productos indeseables en el copolímero provenientes de la reacción de polimerización, problemas de purificación completa del mismo, etc.

6.3.2.b. REPRODUCIBILIDAD

Para determinar la reproducibilidad se hizo el análisis por triplicado de las cantidades 1850, 2600 y 3400 ng, en dos días diferentes y por dos analistas.

La tabla 25 muestra los datos empleados para evaluar la reproducibilidad.

Tabla 25. Resultados para determinar la reproducibilidad.

Cantidad de Poloxamero 407 (ug)	ABC (mm ²)			
	Analista 1		Analista 2	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
1850	2370.2	3642.3	4425.2	3523.6
	2429.1	3668.4	4557.0	3568.5
	2347.9	3592.8	4435.4	3491.1
2600	4867.5	5664.9	6668.6	5176.4
	4878.4	5682.5	6537.2	5169.9
	4841.9	5700.2	6649.5	5183.1
3400	6445.4	8793.5	10050.3	8276.5
	6513.9	8792.4	10143.8	8301.2
	6436.8	8753.5	9951.4	8262.6

Con estos datos se realizó un análisis de variancia anidado o jerárquico para determinar si existía diferencia significativa entre los resultados obtenidos por dos analistas, para cada nivel de cantidad aplicada, estableciendo la siguiente hipótesis:

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe efecto del analista en el análisis.

Hi: Si existe efecto del analista en el análisis.

Criterio de aceptación: Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza Ho, y entonces existe reproducibilidad entre diferentes analistas.

Los resultados del análisis de variancia se observan en la tabla 26.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 26. Análisis de variancia para determinar la reproducibilidad.

Para 1850 ng:

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal	F crítica ($\alpha=0.05$)
Analista	1	2920632.0217	2920632.0217	1.5667	19.51
Día	2	3728315.1750	1864157.5875	651.8639	4.46
Error	8	22877.8733	2859.7342		

Para 2600 ng:

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal	F crítica ($\alpha=0.05$)
Analista	1	1171437.5408	1171437.5408	0.5676	18.51
Día	2	4127337.8083	2063668.9042	1436.4701	4.46
Error	8	11493.0000	1436.6250		

Para 3400 ng:

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal	F crítica ($\alpha=0.05$)
Analista	1	7146096.3408	7146096.3408	0.2614	18.51
Día	2	54665820.9883	27332910.4942	0.3675	4.46
Error	8	594986287.8533	74373285.9617		

Con este análisis se afirma que el método es reproducible, puesto que $F_{cal} < F_{crítica}$; sin embargo, el método no es repetible, pues existe diferencia significativa del método efectuado en diferentes días (excepto para 3400 ng). Se puede asegurar que errores indeterminados del sistema (variaciones de voltaje en el equipo, temperatura, criterio del analista, etc.) pudieron haber ocasionado un resultado falso en cuanto a la reproducibilidad y a la repetibilidad. Estos resultados también se ven afectados por la presencia de compuestos no deseados en la muestra de análisis, que generalmente son producidos durante la reacción de polimerización y que permanecen en el copolímero. Tales

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

compuestos pueden ser: el catalizador de la reacción, polietilenglicol y polipropilenglicol, residuos de óxido de etileno o de propileno, e impurezas de bajo peso molecular. Aunado a esto, la intensidad y el desarrollo del color dependen del porcentaje de óxido de etileno en la molécula, así como de la tamaño de la mancha, lo cual puede ser causa de variaciones en los resultados.¹⁹

De acuerdo a lo anterior se aprecia que el análisis de variancia no siempre puede resultar confiable, ya que puede causar confusión y provocar que se tome una decisión incorrecta en cuanto a la aceptación del método.

6.4.b. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de detección y de cuantificación se determinaron analizando aplicaciones de la solución madre de poloxamero 407 pero a bajas cantidades y se determinó su ABC correspondiente. En la tabla 27 se muestran las ABC que se obtuvieron.

Tabla 27. Áreas Bajo la Curva obtenidas para aplicaciones a niveles bajos de poloxamero 407 para determinar los límites de detección y cuantificación.

Cantidad (ng)	ABC (mm ²)
550.44	869.6
	867.8
	882.3
	955.1
600.48	960.6
	954.8
	1233.6
700.56	1218.0
	1226.2
	1542.7
800.64	1535.6
	1540.7
	1704.5
900.72	1738.3
	1715.1
	1924.4
1000.80	1946.8
	1943.2

Con los datos de la tabla anterior se realizó un análisis de regresión lineal y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$ABC = 2.9871 \cdot \text{Cantidad de Poloxamero 407} - 2714.1 \quad (\text{Ecuación 8})$$

Esta ecuación se usó para estimar el ABC correspondiente para cada nivel de cantidad aplicada y se les determinó sus respectivos intervalos de confianza (límites de confianza) que son los resultados de la tabla 28.

Tabla 28. Límites de confianza de las aplicaciones de poloxamero 407 a cantidades bajas. (LCI = Límite de confianza inferior, LCS = Límite de confianza superior).

Cantidad (ng)	Promedio ABC (mm ²)	LCI al 95% de la respuesta analítica	LCS al 95% de la respuesta analítica
0.0000		-550.7524	-383.4275
550.44	870.1489	841.8389	898.4589
600.48	991.7161	967.4728	1015.9594
700.56	1234.8505	1216.5432	1253.1577
800.64	1477.9848	1460.2161	1495.7535
900.72	1721.119168	1698.1095	1744.1289
1000.80	1964.25352	1876.5842	2051.9228

El valor de -383.4275, que corresponde al límite de confianza superior para la cantidad 0.00 ng, se interpoló en la curva de regresión que se obtuvo para los datos de la tabla 28 (ABC vs Cantidad de Poloxamero 407). Se estimó la cantidad de 34.4375 ng la cual corresponde al límite de detección.

Para evaluar el límite de cuantificación se propusieron 5 cantidades a aplicar cercanas al límite de detección y se determinaron sus ABC aplicando la ecuación 8. En la tabla 29 se muestran dichos resultados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

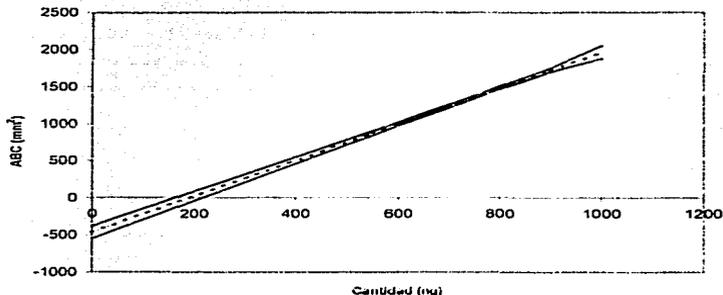
Tabla 29. Límites de confianza para las ABC pronosticadas por la ecuación de regresión.

Cantidad (ng)	ABC estimada (nm^2)	LCI de ABC	LCS de ABC
35	-382.0610	-462.0318	-302.0902
45	-357.7670	-436.6845	-278.8495
50	-345.6200	-424.0111	-267.2289
65	-309.1790	-385.9921	-232.3659
70	-297.0320	-371.3575	-222.7064

La cantidad de 65 ng corresponde al límite de cuantificación, debido a que su límite de confianza inferior (-385.9921) es el que se encuentra más cercano al límite de confianza superior del intercepto (-383.4275).

En la figura 17 se observa el gráfico obtenido con los datos de límites de confianza.

Figura 17. Gráfica de los límites de confianza de las ABC en función de la cantidad aplicada de Poloxamero 407. (.....ABC estimada, — LCI y LCS)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El límite de cuantificación se determinó experimentalmente, con base al intervalo de cantidades bajas de 550 a 1000 ng, mediante la evaluación del coeficiente de variación de los porcentajes de recuperación para cada nivel de cantidad aplicada. En la tabla 30 se observa que el menor coeficiente de variación corresponde a la cantidad de 800.64 ng, teniéndose la mejor precisión, por lo tanto el límite de cuantificación determinado experimentalmente se encuentra en esa cantidad, obteniéndose porcentajes de recuperación aceptables.

Tabla 30. Porcentajes de recuperación a cantidades bajas de poloxamero 407 con sus respectivos coeficientes de variación.

Cantidad (ng)	Recuperación (%)	C.V (%)
550.44	102.2354	1.26110
	99.7301	
	101.3964	
600.48	96.3078	0.34128
	96.8624	
	96.2776	
700.56	99.8987	0.63823
	98.6354	
	99.3562	
800.64	104.3786	0.23778
	103.8982	
	104.2433	
900.72	99.0344	1.00547
	100.9982	
	99.6503	
1000.8	97.9711	0.62064
	99.1114	
	98.9282	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. CONCLUSIONES

- A. El método cromatográfico desarrollado fue adaptado satisfactoriamente a las siguientes condiciones de trabajo: fase estacionaria C18 para ambos poloxameros, fase móvil Cloroformo-Metanol (90:10 para el 188 y 88:12 para el 407), λ de 513 nm para el 188 y de 512 nm para el 407, lámpara de tungsteno para ambos casos, tiempo de lavado de 30 minutos, tiempo de secado después de lavado de 20 minutos, tiempo de secado después de aplicación de 10 minutos, volumen de reactivo revelador de 1 ml.
- B. La confiabilidad del sistema se verificó con los resultados obtenidos encontrándose que es lineal en el intervalo de cantidades aplicadas de 1000 a 4500 ng para poloxamero 188, y de 1750 a 3500 ng para poloxamero 407.
- C. El sistema mostró ser exacto para 188 y para 407, puesto que los porcentajes de recuperación se encontraron dentro de los límites especificados (98-102%) y preciso también para ambos ya que los coeficientes de variación para las cantidades evaluadas, fueron menores a 2%.
- D. La repetibilidad quedó definida de forma adecuada para 188 y no para 407; mientras que la reproducibilidad quedó definida para el 407, pero no para 188.
- E. El límite de detección y el límite de cuantificación de los dos obtenidos gráficamente, difieren de los que se obtuvieron experimentalmente. Los resultados experimentales se consideran más confiables que los datos a partir de la gráfica de límites de confianza.
- F. Las variaciones en la repetibilidad y la reproducibilidad pueden deberse a la presencia de productos indeseables y/o impurezas provenientes de la reacción de polimerización, lo cual es una variable no controlable por el analista, así como el porcentaje de óxido de etileno en la molécula.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- G. Las alteraciones presentes en ciertos resultados se deben a errores indeterminados del sistema, debido a causas comunes de variación (temperatura, humedad, variaciones de voltaje de los equipos, porcentaje de oxido de etileno en la molecula, tamaño de la mancha, etc.).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. PERSPECTIVAS

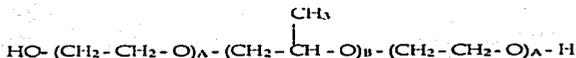
- A. Probar la confiabilidad del método desarrollado con muestras de productos comerciales que contengan alguno o ambos surfactantes; o bien, en perfiles de liberación de fármacos a partir de formas farmacéuticas en las que sean parte de su formulación (p.ej. geles, parches transdérmicos, nanopartículas, etc.).
- B. Efectuar la validación del método de forma completa para lograr su optimización y obtener resultados reproducibles y repetibles.
- C. Comparar el método desarrollado por HPTLC con otro en el cual se cuantifique el Poloxamer por Cromatografía de Exclusión Molecular.

TESIS CON
CALIFICACIÓN DE ORIGEN

ANEXO 1 CARACTERÍSTICAS DE LOS SURFACTANTES

Poloxamero 188

Naturaleza química: Copolímero en bloques de polioxietileno-polioxipropileno de fórmula general:



Donde **A**= 79 aproximadamente y **B**= 28 aproximadamente.

La porción en peso de polioxietileno es aproximadamente 80%.

Descripción: sustancia cerosa blanca o ligeramente amarilla con forma de microperlas; olor débil.

Especificaciones: las especificaciones farmacopeicas se muestran en la tabla 31.

Tabla 31. Especificaciones farmacopeicas para el poloxamero 188

Valor Hidroxilo	11-15
Peso molecular	7680-9510
% de agua	≤ 1,0
pH (2.5% en agua)	6.0-7.5
Óxido de etileno, ppm	≤ 1
Óxido de propileno, ppm	≤ 5
1,4-Dioxano, ppm	≤ 5
% Peso de polioxietileno	79.9-83.7
Insaturación, meq/g	0.018-0.034
Metales pesados, ppm	≤ 10
Punto de fusión, °C	52-57
% de Residuos de sulfato	≤ 4

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Solubilidad: el poloxamero 188 se solubiliza rápidamente en etanol, se disuelve rápidamente en agua para dar una solución opalescente, es insoluble en dietiléter, parafina y ácidos grasos.

La solubilidad de este compuesto en solventes orgánicos se muestra en la Tabla 32.

Tabla 32. Solubilidad del poloxamero 188 en distintos solventes

Solvente	Solubilidad
Cloruro de metileno	Aprox. 35%
Cloroformo	Aprox. 40%
Acetonitrilo	Aprox. 20%
Acetona	Aprox. 2%
Acetato de etilo	Aprox. 1.5%

Aplicaciones: el poloxamero 188 es utilizado como emulsificante y solubilizante, también en aplicaciones parenterales. Su efecto solubilizante no depende de la formación de micelas. Sin embargo, el 188 se usa como agente dispersante y de mojado para la preparación de dispersiones sólidas y para mejorar la solubilidad, absorción y biodisponibilidad de fármacos de baja solubilidad en formas de dosificación orales sólidas. Pueden ser usados con este propósito en granulación por fusión y en granulación por spray. Además éste poloxamero puede ser utilizado como coemulsificante en cremas y emulsiones, como estabilizante de suspensiones y como lubricante de tabletas.

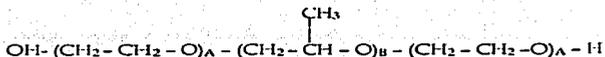
El 188 ha sido utilizado también como agente emulsificante para fluorocarbonos usados en sangre artificial y en la preparación de sistemas dispersos sólidos.

Terapéuticamente, se administra oralmente como agente de mojado y lubricante en el tratamiento de la constipación; se usa generalmente en combinación con un laxante como el dantron.²⁷

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Poloxamero 407

Naturaleza química: polioxietileno-polioxipropileno en bloques con la siguiente fórmula:



Donde $A = 98$ y $B = 57$

La fracción masa de polioxietileno es 73%

Descripción: polvo grueso, blanco, casi inodoro e insípido, con consistencia cerosa

Especificaciones: las especificaciones farmacopeicas se muestran en la tabla 33.

Tabla 33. Especificaciones farmacopeicas para poloxamero 407

Valor de hidroxilo	8-11
Masa molecular calculada a partir del valor hidroxilo	9840-14600
pH (al 2.5% en agua)	5.0-7.5
Metales pesados	20 ppm máx.
Agua (método de Karl Fischer)	1 %
Oxido de etileno libre	1 ppm máx
Punto de fusión, °C	53-57
Fracción masa de polioxietileno (%)	73.2 ± 1.7

Solubilidad: el poloxamero 407 es soluble en agua y mezclas de alcohol y agua, pero es insoluble en dietil éter, cera de parafina y ácidos grasos.

Aplicaciones: el 407 se usa como engrosador, agente gelificante, coemulsificante, agente para dar cuerpo en cremas y emulsiones líquidas. Otra aplicación es como solubilizante de ciertas sustancias activas y aceites esenciales en preparaciones farmacéuticas y cosméticas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El poloxamero 407 es de particular interés debido a que las soluciones concentradas (> 20% p/p) del copolímero se transforman de soluciones transparentes de baja viscosidad a geles sólidos al calentarse con la temperatura corporal. Esta característica peculiar sugiere que cuando se vacían en la piel o son inyectados dentro de una cavidad del cuerpo, la preparación en gel formará una barrera sólida artificial y un depósito de liberación sostenida.^{6,7,8,9} Asimismo, el 407 ha sido reportado como el de menor toxicidad de todos los copolímeros que se encuentran comercialmente disponibles.^{6,7}

Este poloxamero muestra una buena biocompatibilidad y debe ser útil como vehículo de fármacos para sistemas de liberación tópicos.

Los geles termorreversibles de este copolímero han sido investigados como sistemas de liberación de fármacos para formas oftálmicas, rectales, nasales y subcutáneas.^{28,29,30}

En la tabla 34 se presentan las especificaciones farmacopeicas para los dos mencionados arriba.³¹

Tabla 34. Especificaciones farmacopeicas para poloxamero 188 y poloxamero 407 (BP = Britanic Pharmacopeia; USP = United States Pharmacopeia)

Prueba	BP	USP
Claridad y color en solución	+	-
Punto de fusión	52-55 °C	-
Peso molecular promedio		
Para Poloxamero 188	7680-9510	7680-9510
Para Poloxamero 407	-	9840-14 600
Porcentaje en peso de oxietileno		
Para Poloxamero 188	+	81.8 ± 1.9
Para Poloxamero 407	-	73.2 ± 1.7
pH (en solución 1 a 40)	6.0-7.5	5.0-7.5
Insaturación (mEq/g)		
Para Poloxamero 188	-	0.026 ± 0.008
Para Poloxamero 407	-	0.048 ± 0.017
Metales Pesados	≤ 10 ppm	≤ 0.002%
Impurezas orgánicas volátiles	-	+
Agua	≤ 1.0%	-
Oxido de etileno, óxido de propileno y 1,4-dioxano libres	+	≤ 5 ppm

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ANEXO 2 FORMULARIO

LINEALIDAD

Para determinar los parámetros estadísticos de regresión se utilizaron las siguientes ecuaciones:

- pendiente (m)

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum xy - (\sum x)^2}$$

- ordenada al origen (b)

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

- coeficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = \frac{b^2 [\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 / n]}{\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2 / n}$$

- coeficiente de correlación (r)

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

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN.

ESTA TESIS FUE
CANCELADA POR FALTA DE ORIGEN

Para evaluar que la recta pasa por el origen, se establece una hipótesis y se utilizan las siguientes fórmulas:

- Error típico de la regresión ($S_{y/x}$)

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{n-1}{n-2} + (S_y^2 - m^2 S_x^2)}$$

S_x = variancia de x
 S_y = variancia de y
 m = pendiente

- Prueba de "t"

$$t \text{ cal} = \frac{|b - B|}{S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{X^2}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}}}$$

t crítica: $1 - \alpha/2$, g.l. = $n - 2$

Se realiza un análisis de variancia para estudiar las variaciones en la recta, y se construye la siguiente tabla:

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítico ($\alpha = 0.05$)
Desviación de medias debida a la regresión	$r - 1$	q_1	$q_1/(r-1)$	CM_1/CM_2	-----
Desviación debida a la media	$n - r$	q_2	$q_2/(n-r)$		
Desviación total	$n - 1$				

**TESIS CON
 T.A. DE ORIGEN**

Donde:

r = repeticiones
 n = número de datos

$$q = n - g$$

$$n = \sum_{i=1}^m \sum_{k=1}^r X_{ik}^2$$

$$g = g_1 + g_2 + g_3 + \dots + g_r$$

$$q_1 = \frac{g_1^2}{r_1} + \frac{g_2^2}{r_2} + \dots + \frac{g_r^2}{r_n} - g$$

$$q_2 = q - q_1$$

$$CM_1 = q_1 / (r - 1)$$

$$CM_2 = q_2 / (n - r)$$

PRECISIÓN

Para evaluar la precisión se determina el C.V., mediante la siguiente fórmula:

$$C.V. = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Donde:

S = desviación estándar
 \bar{X} = media aritmética

REPETIBILIDAD

Para determinar si existe diferencia entre los resultados obtenidos en diferentes días (repetibilidad), se usaron las siguientes ecuaciones:

Desviaciones totales al cuadrado

Suma de cuadrados de todos los valores

Suma de todos los valores (gran total)

Desviaciones de los puntos con respecto a la recta.

Desviaciones de cada punto con respecto a su propia media.

Cuadrado medio de la regresión.

Cuadrado medio de la media.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$S = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 + n_2) - 2}$$

$$t_{cal} = \frac{(X_1 - X_2)}{S \sqrt{(\frac{1}{n_1}) + (\frac{1}{n_2})}}$$

t crítica: $\alpha = 0.05$, g.l. = $n_T - 1$

Donde:

n_1 = total de datos del día 1.

n_2 = total de datos del día 2.

n_T = número total de datos

X_1 = valor promedio del día 1.

X_2 = valor promedio del día 2.

S_1 = desviación estándar del día 1.

S_2 = desviación estándar del día 2.

S = desviación estándar total.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REPRODUCIBILIDAD

Para la evaluación de la **reproducibilidad**, se emplearon las ecuaciones que a continuación se presentan:

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal	F crítica ($\alpha = 0.05$)
Analista	g_A	SC_A	$SC_A/g_A = CM_A$	CM_A/CM_D	xxxxx
Día	g_D	SC_D	$SC_D/g_D = CM_D$	CM_D/CM_E	xxxxx
Error	g_E	SC_E	$SC_E/g_E = CM_E$		

Los grados de libertad se calcularon de la siguiente manera:

$$A_i \rightarrow a - 1$$

a = Total de analistas

$$D_{(d)} \rightarrow (d - 1)a$$

d = Total de días

$$E_{(k_0)} \rightarrow (r - 1)ab$$

r = Número de repeticiones

La suma de cuadrados se determinó con las siguientes ecuaciones:

$$SC_{A_i} = \frac{\sum Y_i^2}{rd} - \frac{Y^2}{adr} \quad \text{Suma de cuadrados del analista}$$

$$SC_{D_j} = \frac{\sum Y_j^2}{r} - \frac{\sum Y_i^2}{rd} \quad \text{Suma de cuadrados de los días}$$

$$SC_E = Y_{ok}^2 - \frac{\sum Y_{ij}^2}{r} \quad \text{Suma de cuadrados del error}$$

LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN

Para calcular los límites de confianza superior e inferior se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$LCS \text{ y } LCI = \hat{\rho} \pm t_{\left(\frac{\alpha}{2}\right)} S_{y_i} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(X_p - \bar{X})^2}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}}$$

$$S_{y_i} = \sqrt{\frac{n-1}{n-2} + (Sy^2 - m^2 Sx^2)}$$

Donde:

$\hat{\rho}$ = respuesta pronosticada

S_{y_i} = error típico de la regresión

X_p = cantidades (ng) bajas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

\bar{X} = media de la regresión de cantidades bajas

$\sum X$ = sumatoria de X

$\sum X^2$ = sumatoria de X al cuadrado

n = número de datos

t crítica = $1-\alpha/2$, g.l. = n-2

Además el CV:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

TESIS CON
FALLA DE C...

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) O.I. Corrigan, A.M. Healy, Surfactants in Pharmaceutical Products and Systems. In: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Volumen 14. Marcel Dekker, Nueva York, 1996, pp 295-313.
- (2) H.A. Wittoul, B.G. Reuben, Agentes Tensioactivos. In: Productos Químicos Orgánicos Industriales, Tecnología, Formulaciones y Usos. Volumen 2. Limusa, México, 1999, pp 207-234.
- (3) H. Ghebeh, A. Handa-Corrigan, M. Butler, Development of an Assay for the Measurement of the Surfactant Pluronic F68 in Mammalian Cell Culture Medium. Anal. Biochem. 262 (1998) 39-44.
- (4) BASF, Corp. (USA), Technical Bulletin: Pluronic[®] Block Copolymer NF Grade (Poloxamer NF Grades), 1995.
- (5) M.J. Cappel, J. Kreuter, Effect of Nonionic Surfactants on Transdermal Drug Delivery: II. Poloxamer and Poloxamine Surfactants. Int. J. Pharm. 69 (1991) 155-167.
- (6) S. Miyazaki, S. Takeuchi, Ch. Yokouchi, M. Takada, Pluronic F127 gels as a Vehicle for Topical Administration of Anticancer Agents. Chem. Pharm. Bull. 32 (10) (1984) 4205-4208.
- (7) S. Miyazaki, T. Tobiyama, M. Takada, D. Attwood, Percutaneous Absorption of Indomethacin from Pluronic F127 Gels in Rats. J. Pharm. Pharmacol. 47 (1995) 455-457.
- (8) S. Miyazaki, Ch. Yokouchi, T. Nakamura, N. Hashiguchi, W.M. Hou, M. Takada, Pluronic F-127 Gels as a Novel Vehicle for Rectal Administration of Indomethacin. Chem. Pharm. Bull. 34(4) (1986) 1801-1808.
- (9) K. Morikawa, F. Okada, M. Hosokawa, H. Kobayashi, Enhancement of Therapeutic Effects of Recombinant Interleukin 2 on a Transplantable Rat Fibrosarcoma by the Use of a Sustained Release Vehicle, Pluronic Gel. Cancer Research. 47 (1987) 37-41.
- (10) R. H. Ottewill, Effect of Nonionic Surfactants on the Stability of Dispersions. Nonionic Surfactants. In: Nonionic Surfactants. Volumen 1. Marcel Dekker, Nueva York, 1966, pp 627-628, 635-636.

- (11) H.A. Lieberman, M.M. Rieger, G.S. Banker, Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems. Volumen 1. Marcel Dekker, Nueva York, 2ª ed, 1996, pp 40, 71, 112-118.
- (12) A. Martin, J. Swarbrick, Physical Pharmacy. Lea & Febiger, Filadelfia, 3ª ed, 1983, pp 488-489.
- (13) M. Tsubouchi, N. Yamasaki, K. Yanagisawa. Two-lase titration of Poly(oxyethylene) Nonionic Surfactants with Tetrakis (4-fluorophenyl) borate. Anal. Chem. 57 (1985) 783-784.
- (14) A. Szymanski, B. Wyrwas, M. Szymanowska, Z. Lukaszewski. Determination of Short-chained Poly(ethylene glycols) and Ethylene Glycol in Environmental Samples. Wat. Res. 35(15) (2001) 3599-3604.
- (15) <http://www.europa.eu.int> (2001)
- (16) D.A. Skoog, J.J. Leary, Análisis Instrumental. Mc-Graw Hill, Madrid, 4ª ed, 1994, pp 83-86, 125, 143-145, 151-155.
- (17) J. Sherma, Thin Layer Chromatography. In: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Volumen 15. Marcel Dekker, Nueva York, 1997, pp 155-176.
- (18) J.W. Munson, Quantitative Thin-Layer Chromatography. In: Pharmaceutical Analysis. Modern Methods. Volumen 11 Parte B. Marcel Dekker, Nueva York, 1984, pp 81-102.
- (19) M.J. Schick (Ed.), Analysis of Surfactants. Marcel Dekker, Nueva York, 2ª ed, 2001, pp 343, 357-358, 501, 523-524.
- (20) M.C. Olivares Hernández, Validación del método de Trinder para la determinación de salicilatos en plasma, Tesis de licenciatura, No. 1, UNAM FESC-1 (1998).
- (21) A.B. Trujque García, Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de sulfametazina en plasma de cabra por CLAR, Tesis de licenciatura, No. 22, UNAM FESC-1 (1998).
- (22) L. Huber, Good Laboratory Practice. Hewlett Packard, Alemania, 1993, pp 45-62.
- (23) Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2ª ed, México, 2002.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- (24) A.M. Mendoza Angeles, Desarrollo y validación de un método analítico por CLAR para determinar la pureza de sulfametazina sódica, No. 19, UNAM FESC-1 (1998).
- (25) F. Ferreira, P. Monya, S. Soule, A. Vázquez. Rapid Determination of Solanum Glycoalkaloids by Thin-layer Chromatographic Scanning. *J. Chromatogr.* 653 (1993) 380-384.
- (26) B. Simonovska, I. Vovk, High Performance Thin-layer Chromatographic Determination of Potato Glycoalkaloids. *J. Chromatogr.* 903(2000) 219-225.
- (27) BASF, Corp. (USA), Technical Information: Lutrol[®] F68, 1997.
- (28) BASF, Corp. (USA), Technical Information: Lutrol[®] F127, 1997.
- (29) S.D. Desai, J. Blanchard, In Vitro Evaluation of Pluronic F127-Based Controlled-Release Ocular Delivery Systems for Pilocarpine. *J. Pharm. Sci.* 87(2) (1998) 226-230.
- (30) M.D. DiBiase, C.F. Rhodes, Formulation and Evaluation of Epidermal Growth Factor in Pluronic F-127 Gel. *Drug Dev. and Ind. Pharm.* 22 (8) (1996) 823-831.
- (31) M. Guzmán, M. R. Aberturas, F. García, J. Molpeceres, Gelatine Gels and Polyoxiethylene-polyoxipropylene Gels: Comparatives Study of their Properties. *Drug Dev. and Ind. Pharm.* 20(12) (1994) 2041-2048.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**