



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO
PARA CUANTIFICAR KETOCONAZOL EN TABLETAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A:

ADRIANA LUCERO GONZALEZ GONZALEZ

**ASESORES DE TESIS: Q.F.B. MARIA GUADALUPE REBOLLAR BARRERA
pM.C. JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS**



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.

DEDICATORIA.

Dedico especialmente este trabajo a mi mamá, la Sra.

OFELIA GONZÁLEZ GONZÁLEZ.

Le doy gracias a DIOS por concederme una madre como tú, estoy muy orgullosa de ti. Te amo profundamente, te admiro y te respeto.

Eres una mujer excepcional, con mucha fortaleza, carácter, constancia y decisión. Un ejemplo a seguir.

Te doy las gracias por tu apoyo y porque me has proporcionado la mejor herencia que una madre le puede dar a una hija, una carrera universitaria.

TE AMO.

AGRADECIMIENTOS.

A DIOS:

**Gracias Señor por permitirme concluir esta etapa en mi vida.
Te ruego Señor ilumines mi camino. Bendíceme para que cada
día sea mejor profesionista, hija y persona.**

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (LA MÁXIMA CASA DE ESTUDIOS). A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN:

Por proporcionarme una formación académica de alto nivel.

A MIS ASESORES:

**Un especial agradecimiento a la Q.F.B. Ma. Guadalupe Rebollar
Barrera, por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.
Por su confianza y su amistad presentes en los buenos momentos
así como en las circunstancias difíciles.**

**Al Q.F.B. José Antonio Garduño Rosas por el apoyo otorgado
para la realización de este trabajo. Por fomentar en mí una
actitud más crítica. Por su amistad y su confianza.**

A LOS SINODALES:

Q.F.B. Elia Granados Enriquez.

Dra. Raquel López Arellano.

Q.F.B. Ma. Guadalupe Rebollar Barrera.

MC. Efrén Hernández Baltazar.

Q.F.B. Lidia Rangel Trujano.

**Por sus valiosas contribuciones para mejorar el presente
trabajo.**

**A LOS PROFESORES DE LA FACULTAD DE
ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN:**

Porque contribuyeron a mi formación académica.

**AL LABORATORIO FARMACÉUTICO LIOMONT S.A
DE C.V.**

Por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

A LAS SIGUIENTES PERSONAS:

Q.B.P. Martha Elena García Corrales.

Teresa Guzmán Hernández.

Dra. Eva María Molina Trinidad.

Q.F.B. Martha Patricia Campos Peón.

Dr. Francisco López Mejía.

I.Q.M. Rafael Sampere.

Cinthia Flores Rebollar.

Gabriela Ugalde Rebollar.

Por su confianza, amistad y consejos.

**Siembra un pensamiento
y cosecharás un acto,
siembra un acto
y cosecharás un hábito,
siembra un hábito
y cosecharas un carácter
siembra un carácter
y cosecharás un destino.**

ÍNDICE GENERAL

	Página
Abreviaturas.	i
Índice de figuras.	iv
Índice de tablas.	v
Índice de gráficos.	ix
I. Objetivo general.	x
II. Objetivos particulares.	xi
III. Marco teórico.	
1. Definición del problema analítico.	1
2. Planificación del proceso de toma de la muestra.	4
2.1 El proceso de toma de muestra.	4
2.2 Requisitos básicos del muestreo.	6
2.3 Plan de muestreo.	6
3. Selección del método de análisis.	10
3.1 Factores a examinar en la selección del método analítico.	10
4. Validación de métodos analíticos.	15
4.1 Características analíticas.	17
4.2 Criterios de aceptación para métodos espectrofotométricos.	18
5. Normas generales para la redacción de métodos analíticos.	20
6. Espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS).	
6.1 Absorción de la radiación.	22
6.2 Ley de Lambert-Beer.	23
6.3 Desviaciones de la ley de Lambert-Beer.	23
6.4 Espectro de absorción en las regiones UV-VIS.	26
6.5 Errores en espectrofotometría.	26
6.6 Pruebas generales para evaluar el funcionamiento de espectrofotómetros UV-VIS.	27
6.7 Espectrofotometría indirecta.	36

ÍNDICE GENERAL

	Página
7. Generalidades del Ketoconazol.	
7.1 Propiedades físicoquímicas.	39
7.2 Propiedades farmacológicas.	40
7.3 Características farmacocinéticas.	41
7.4 Indicaciones terapéuticas.	43
7.5 Contraindicaciones.	43
7.6 Reacciones adversas.	43
7.7 Interacciones farmacológicas.	44
7.8 Vía de administración y dosis.	44
7.9 Presentaciones farmacéuticas.	45
IV. Desarrollo del método analítico.	
1. Instrumentos, equipos, material, reactivos, soluciones y sustancia de referencia (S.R.).	47
2. Antecedentes.	49
3. Fundamento del método desarrollado.	49
4. Desarrollo del método analítico.	49
5. Optimización del método analítico.	64
6. Estudios de estabilidad.	78
7. Evaluación de interferencias.	80
V. Validación del método analítico.	
1. Plan de validación.	82
2. Instrumentos, equipos, material, reactivos, soluciones y sustancia de referencia (S.R.).	83
3. Evaluación del funcionamiento del espectrofotómetro UV-VIS.	84
4. Validación del sistema.	
4.1 Linealidad del sistema.	84

ÍNDICE GENERAL

	Página
5. Validación del método.	
5.1 Linealidad del método.	87
5.2 Reproducibilidad.	91
5.3 Exactitud y precisión del método.	92
VI. Conclusiones.	96
Anexo 1. Calificación de operación del espectrofotómetro UV-VIS Varian.	
Etapa 1. Calificación de operación del instrumento en la etapa de desarrollo del método analítico.	97
Etapa 2. Calificación de operación del instrumento en la fase de validación del método analítico.	102
VII. Glosario.	104
VIII. Referencias bibliográficas y hemerográficas.	xii

ABREVIATURAS

%:	Porcentaje.
λ:	Longitud de onda.
\leq:	Menor o igual que.
$^{\circ}\text{C}$:	Grados centígrados.
μg:	Microgramos.
A:	Absorbancia.
ABF:	Azul de bromofenol.
Abs.:	Absorbancia.
Adic.:	Adicionado.
ASTM:	Sociedad americana de verificación de materiales.
b:	Ordenada al origen.
Bco.:	Blanco.
BOE:	Boletín oficial del estado.
c.b.p.:	Cuanto baste para.....
c.v.:	Coefficiente de variación.
cm:	Centímetro.
Coef. de var.:	Coefficiente de variación.
Conc.:	Concentración.
Desv. Std.:	Desviación estándar.
EPA:	Agencia de protección del medio ambiente de Estados Unidos.
Etc.:	Etcétera.
F:	Prueba de Fisher.
fig.:	Figura.
fil.:	Filtrado.
g:	Gramos.
h:	Horas.
ISO:	Organización internacional para la estandarización.
IUPAC:	Unión internacional de química pura y aplicada.
Ket:	Ketoconazol.

ABREVIATURAS. (CONTINUACIÓN)

Kg:	Kilogramos.
L:	Litro.
L-L:	Líquido-líquido.
L-S:	Líquido-sólido.
m:	Pendiente.
M:	Molaridad.
mg:	Miligramos.
Min:	Minutos.
ml:	Mililitros.
Mod.:	Modificación.
Mtra.:	Muestra.
N:	Normalidad.
nm:	Nanómetros.
No.:	Número.
Pp.:	Páginas.
Q.F.B.:	Químico Farmacéutico Biólogo.
r:	Coefficiente de correlación.
r²:	Coefficiente de determinación.
Recup:	Recuperado.
s:	Desviación estándar.
S.R.:	Sustancia de referencia.
s²:	Varianza.
S-L:	Sólido-líquido.
Std.:	Estándar.
t:	Prueba de student.
U.N.A.M.:	Universidad Nacional Autónoma de México.
UNE:	Norma española unificada.
USA:	Estados Unidos de América.
USP:	Farmacopea de los Estados Unidos de América.

ABREVIATURAS. (CONTINUACIÓN)

UV-VIS:	Ultravioleta – visible.
Vol.:	Volumétrico.
W:	Peso.
\bar{x} :	Media aritmética o promedio.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 Definición del problema analítico.	1
Figura 1.2 Proceso analítico global.	3
Figura 2.1 Esquema general del proceso de toma de muestra.	5
Figura 2.2 Representación esquemática del contenido de un plan de muestreo.	9
Figura 3.1 Influencia de la muestra en el planteamiento del método de análisis.	12
Figura 3.2 Selección del método.	14
Figura 6.1 Efecto de algunos factores en los gráficos de absorbancia vs. concentración del analito.	25
Figura 6.2 Efecto de la disociación del complejo absorbente a diferentes concentraciones del reactivo.	25
Figura 6.3 Espectro de emisión del arco de mercurio en las regiones ultravioleta y visible (longitudes de onda de referencia).	32
Figura 6.4 Espectro del filtro de Óxido de Holmio (Corning No.3130) (longitudes de referencia).	33
Figura 6.5 Espectro de una solución de Óxido de Holmio al 4 % en Ácido perclórico 1.4 M (Longitudes de referencia).	34
Figura 6.6 Espectro del vapor de Benceno en la región ultravioleta (Longitudes de onda de referencia seleccionadas).	35
Figura 6.7 Curvas de calibración indirecta para el compuesto X cuando Y da la propiedad. (a) A vs. [x], (b) $\Delta A = A_o - A$ vs. [x].	38

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
III. Marco teórico.	
4. Validación de métodos analíticos.	
Tabla 4.1 Características analíticas a evaluar según la aplicación del método.	16
Tabla 4.2 Criterios de aceptación.	19
6. Espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis).	
Tabla 6.1 Diferentes tipos de errores espectrofotométricos.	27
Tabla 6.2 Pruebas de funcionamiento.	28
Tabla 6.3 Datos de referencia para evaluar la exactitud fotométrica en la región ultravioleta.	30
Tabla 6.4 Soluciones obturadoras.	36
7. Generalidades del Ketoconazol.	
Tabla 7.1 Actividad in vitro del Ketoconazol.	42
Tabla 7.2 Presentaciones farmacéuticas.	45
IV. Desarrollo del método.	
Tabla 1. Evaluación del disolvente para solubilizar el ABF.	51
Tabla 2. Normalización de los datos.	53
Tabla 3. Análisis de regresión.	54
Tabla 4. Proporción molar de Ketoconazol S.R. y ABF.	56
Tabla 5. Evaluación de la proporción molar de Ketoconazol S.R. y ABF.	57
Tabla 6. Modificaciones realizadas al procedimiento analítico propuesto inicialmente.	62
Tabla 7. Tiempo de agitación de la muestra en HCl 0.1 N.	64
Tabla 8. Análisis de varianza de un factor.	65
Tabla 9. Evaluación del proceso de filtración de la muestra en HCl 0.1 N.	65
Tabla 10. Comparación de medias.	66

ÍNDICE DE TABLAS. (CONTINUACIÓN)

	Página
Tabla 11. Agitación manual de los tubos de ensaye que contienen ABF-HCl, ABF-std y ABF-mtra.	67
Tabla 12. Análisis de varianza de un factor.	67
Tabla 13. Agitación en vortex de los tubos de ensaye que contienen ABF-HCl, ABF- std y ABF-mtra.	67
Tabla 14. Análisis de varianza de un factor.	68
Tabla 15. Influencia de la temperatura sobre la cuantificación de Ketoconazol en las tabletas.	69
Tabla 16. Comparación de medias.	69
Tabla 17. Efecto de la concentración de la muestra sobre la cuantificación del principio activo.	70
Tabla 18. Comparación de medias.	70
Tabla 19. Cuantificación del Ketoconazol en mezclas físicas.	71
Tabla 20. Optimización de la concentración de ABF en la mezcla física correspondiente al 80 % de Ket.	72
Tabla 21. Optimización de la concentración de ABF en la mezcla física correspondiente al 95 % de Ket.	72
Tabla 22. Optimización de la concentración de ABF en la mezcla física correspondiente al 110 % de Ket.	73
Tabla 23. Proporción molar de Ketoconazol S.R. y ABF.	74
Tabla 24. Evaluación de la estabilidad del Ketoconazol S.R. en solución Búfer pH=2.	78
Tabla 25. Estudio de la estabilidad del blanco (solución diluida).	79
Tabla 26. Respuestas analíticas obtenidas en la evaluación de la estabilidad del Azul de bromofenol total y residual en las soluciones A y C.	80

ÍNDICE DE TABLAS. (CONTINUACIÓN)

	Página
Tabla 27. Evaluación de la estabilidad del ABF total y residual en las soluciones B y D, a partir de las cero horas de ser preparadas las soluciones A y C.	81
Tabla 28. Evaluación de la estabilidad del ABF total y residual en las soluciones B y D, a partir de la primera hora de ser preparadas las soluciones A y C.	81
Tabla 29. Evaluación de la estabilidad del ABF total y residual en las soluciones B y D, a partir de la segunda hora de ser preparadas las soluciones A y C.	81
Tabla 30. Evaluación de la estabilidad del ABF total y residual en las soluciones B y D, a partir de la tercera hora de ser preparadas las soluciones A y C.	81
Tabla 31. Influencia de los excipientes en la cuantificación de Ketoconazol en las tabletas.	80
 V. Validación del método analítico.	
Tabla 32. Preparación de la curva de calibración para evaluar la linealidad del sistema.	85
Tabla 33. Evaluación de la linealidad del sistema.	85
Tabla 34. Parámetros de la regresión lineal.	86
Tabla 35. Evaluación de la linealidad del método.	88
Tabla 36. Parámetros de la regresión lineal.	88
Tabla 37. Porcentajes de recuperación de Ketoconazol.	90
Tabla 38. Parámetros estadísticos.	90
Tabla 39. Porcentajes de recuperación de Ketoconazol.	91
Tabla 40. Análisis de variancia $\alpha=0.05$.	92
Tabla 41. Evaluación de la exactitud y precisión del método.	93

ÍNDICE DE TABLAS. (CONTINUACIÓN)

	Página
Tabla 42. Parámetros estadísticos.	95
Anexo 1. Calificación de operación del espectrofotómetro UV-VIS Varian.	
Etapla 1.	
Tabla 43. Evaluación del nivel de la línea base.	97
Tabla 44. Evaluación de la estabilidad fotométrica a largo plazo.	98
Tabla 45. Evaluación de la exactitud fotométrica.	98
Tabla 46. Evaluación de la reproducibilidad fotométrica empleando una solución de Dicromato de potasio 0.03077 mg/ml.	98
Tabla 47. Evaluación de la reproducibilidad fotométrica empleando una solución de Dicromato de potasio 0.01592 mg/ml.	99
Tabla 48. Normalización de los datos.	99
Tabla 49. Parámetros estadísticos.	100
Tabla 50. Parámetros de la regresión lineal.	100
Tabla 51. Evaluación de la exactitud de la longitud de onda.	101
Tabla 52. Evaluación de la reproducibilidad de la longitud de onda.	101
Etapla 2.	
Tabla 53. Evaluación de la exactitud de la longitud de onda.	103
Tabla 54. Evaluación de la reproducibilidad de la longitud de onda.	103
Tabla 55. Evaluación del ruido fotométrico.	103
Tabla 56. Evaluación de la línea base.	103

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Respuestas analíticas correspondientes al ABF total y residual.	50
Gráfico 2. Selección de la longitud de onda para la cuantificación de Ketoconazol en tabletas.	52
Gráfico 3. Evaluación de la especificidad de la respuesta analítica del ABF residual.	53
Gráfico 4. Curva de calibración del ABF.	55
Gráfico 5. Análisis de residuales.	55
Gráfico 6. Evaluación de la proporción molar entre el Ket. S.R. y el ABF.	56
Gráfico 7. Evaluación de las respuestas analíticas en un intervalo del 0 a 0.40 de la fracción de Ket. S.R.	57
Gráfico 8. Evaluación de la fracción de Ketoconazol en tabletas.	58
Gráfico 9. Evaluación de la proporción molar entre el Ket. S.R. y ABF.	74
Gráfico 10. Estudio de la estabilidad del blanco (solución diluida).	79
Gráfico 11. Evaluación de la linealidad del sistema.	86
Gráfico 12. Análisis de residuales.	87
Gráfico 13. Evaluación de la linealidad del método.	89
Gráfico 14. Análisis de residuales de la linealidad del método.	89
Gráfico 15. Evaluación de la linealidad fotométrica.	101



I. OBJETIVO GENERAL.

-
-
- 1.1** Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar Ketoconazol en tabletas.



II. OBJETIVOS PARTICULARES.

-
-
- 2.1 Seleccionar las condiciones experimentales del método analítico para cuantificar Ketoconazol en tabletas.
 - 2.2 Optimizar las condiciones experimentales del método analítico desarrollado.
 - 2.3 Efectuar la calificación de operación del instrumento.
 - 2.4 Validar el método analítico:
 - Linealidad del sistema.
 - Linealidad del método.
 - Precisión del método.
 - Repetibilidad.
 - Reproducibilidad entre días.
 - Reproducibilidad entre analistas.
 - Exactitud del método.



III. MARCO TEÓRICO.

1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA ANALÍTICO. ⁽¹⁾

Uno de los aspectos más importantes para establecer un procedimiento analítico es determinar con claridad los objetivos.

Es decir, debemos preguntarnos ¿qué hay que determinar y por qué?, ¿dónde?, ¿quién tomará la muestra?, ¿a qué nivel de concentración se encuentra el analito o analitos?, ¿qué implicaciones tendrán los resultados?, etc. La respuesta a la mayoría de estas preguntas sólo es posible si se ha definido el problema a resolver. Una definición no adecuada de los objetivos daría lugar a la generación de una cantidad de trabajo no justificable, que llevaría a la obtención de datos con carencia total de significado.

En la figura 1.1 se establecen los aspectos más relevantes a considerar al momento de definir un problema analítico.

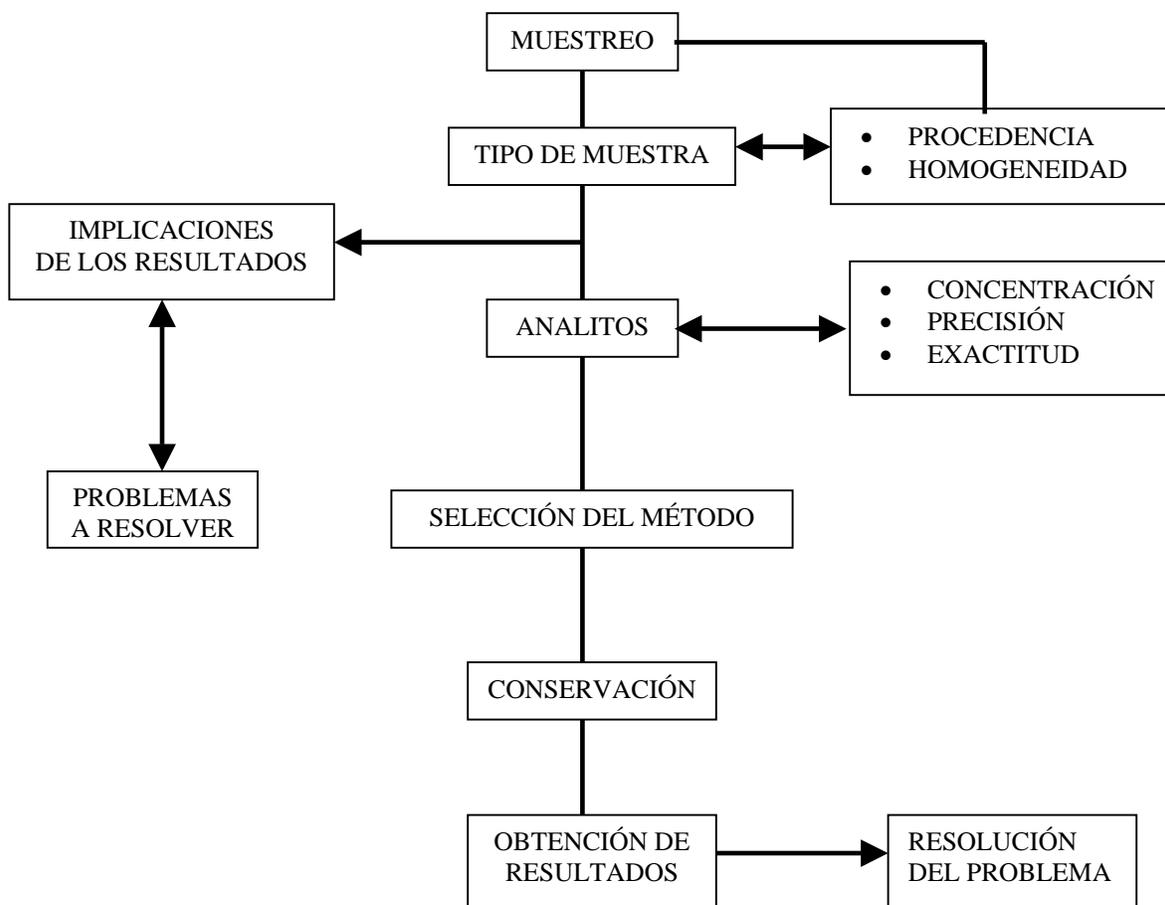


Figura 1.1 Definición del problema analítico. ⁽¹⁾

En un inicio la información química requerida se planteará en función de la demanda social del problema. La definición en términos analíticos debe hacerse conjuntamente con el demandante que plantea el problema. El analista debe colaborar activamente para plantear posibles alternativas.

A continuación se mencionan los factores que deben tenerse en consideración para la resolución de un problema analítico.

- 1. Información requerida:** se debe determinar qué tipo de información se requiere, cualitativa (composición elemental, componentes mayoritarios o minoritarios, estados de oxidación, identificación de especies, ausencia de determinados componentes, etc.) o cuantitativa (indicándose el intervalo de concentración, así como la precisión y exactitud requerida).
- 2. Tipo de análisis:** cualitativo, cuantitativo, estructural, elemental, molecular, de superficie, en un punto concreto de la muestra o en análisis continuo, etc.
- 3. Restricciones por la naturaleza de la muestra:** deben considerarse las características especiales tanto de la muestra en su conjunto como de los analitos a determinar.
- 4. Exactitud y precisión requerida.**
- 5. Tiempo disponible:** delimitado en función de la urgencia o implicaciones de los resultados.
- 6. Instrumentación disponible y potencial humano.**
- 7. Información bibliográfica.**
- 8. Costos.**

En la figura 1.2 se puede observar que el proceso analítico está integrado por una serie de etapas totalmente relacionadas entre sí.

Está claro que en función del problema se ha de establecer la estrategia del muestreo.

El analista debe estar en condiciones de poder seleccionar entre todos los métodos disponibles (tanto de muestreo como de análisis), aquellos que garanticen la solución óptima, rápida, barata y segura del problema planteado.

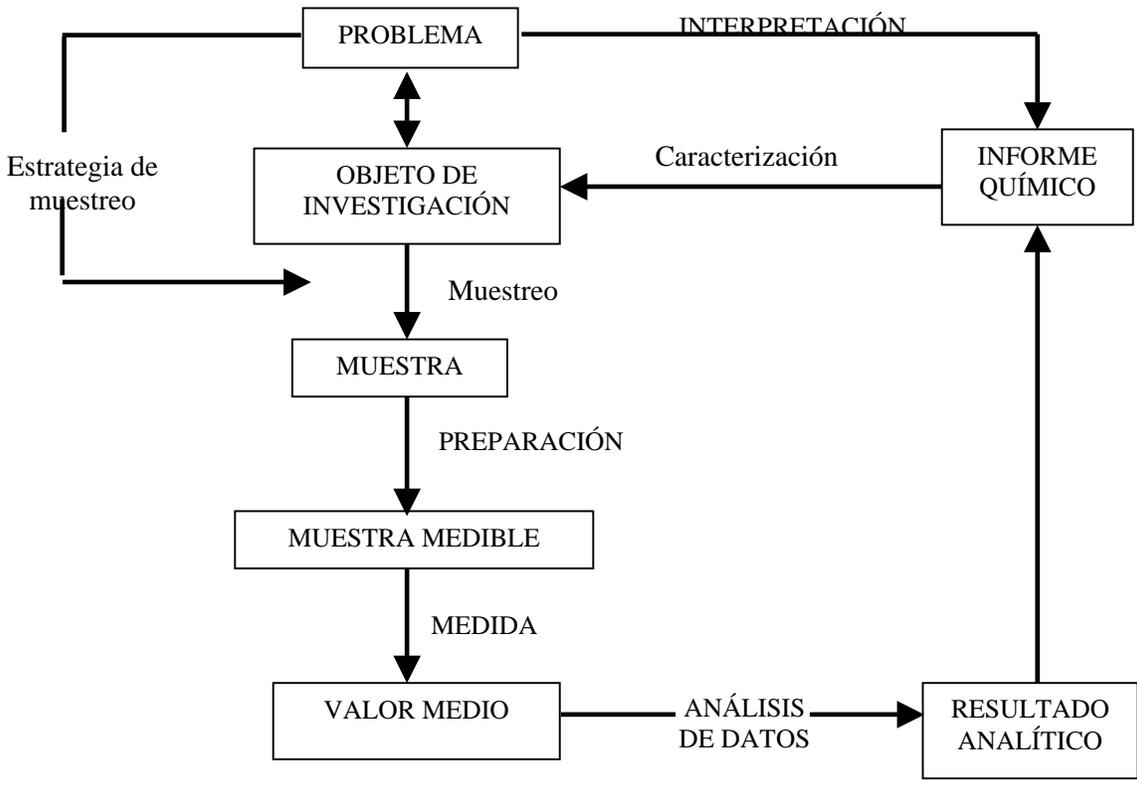


Figura 1.2 Proceso analítico global. ⁽¹⁾

2. PLANIFICACIÓN DEL PROCESO DE TOMA DE LA MUESTRA. ^(1, 2, 3)

La toma de muestra o muestreo se define como el proceso de obtención de una fracción de un material con objeto de que represente o proporcione información de una cantidad mayor del mismo. La muestra es precisamente la fracción obtenida en dicho proceso. Y esta debe tomarse de acuerdo con un plan de muestreo perfectamente establecido.

La toma de muestra es una etapa inevitable y generalmente compleja en todos los procesos analíticos. La complejidad se debe en muchas ocasiones a la heterogeneidad de las propiedades físicas y/o de la composición química del material del cual debe tomarse la muestra.

Es importante considerar que un aseguramiento de la calidad del muestreo no sólo implica el hecho de que la muestra haya sido obtenida de forma adecuada, sino que el proceso de subdivisión sea llevado a cabo con rigor y que el contenedor y los procedimientos de transporte y de conservación empleados aseguren la “no alteración de la muestra”, de modo que no se modifique la presencia y/o concentración de los analitos a determinar.

Una vez que la muestra llega al laboratorio debe conservar su integridad.

2.1 El proceso de toma de muestra.

En la figura 2.1 se muestra un esquema general del proceso de toma de muestra. El material del cual se toman las muestras se ha representado en forma de un material a granel.

Los recuadros con fondo blanco se refieren a las etapas que tienen lugar fuera del laboratorio, mientras que los de fondo gris a etapas que tienen lugar en el laboratorio.

Algunas veces estas dos fases se designan como muestreo primario y muestreo secundario, respectivamente.

Como se indica en la figura 2.1 en algunas ocasiones, en el momento de la obtención de los incrementos a partir del lote de material, es preciso llevar a cabo medidas in situ de algunos parámetros físicos o químicos como por ejemplo la temperatura, el pH, el potencial redox, etc.

Dependiendo de las características del material, el proceso de reducción de la cantidad de muestra y, si es necesario, del tamaño de las partículas para transformar la

muestra primaria en la muestra de laboratorio puede requerir diversas etapas que supondrán la obtención de sucesivas submuestras.

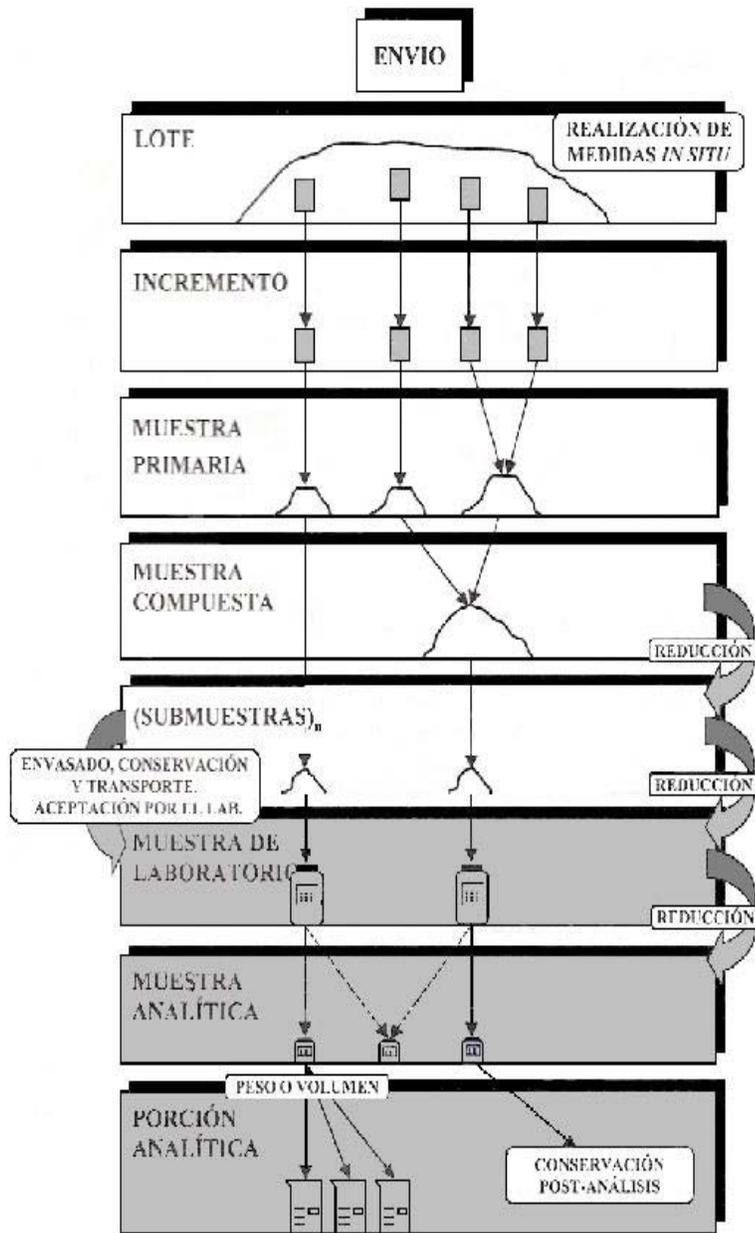


Figura 2.1 Esquema general del proceso de toma de muestra. ⁽²⁾

El paso del muestreo primario al secundario supone el envasado y el transporte de la muestra hasta el laboratorio en condiciones que garanticen su integridad y conservación.

Por otra parte, el laboratorio debe disponer de criterios claros de aceptación de muestras. Una vez que la muestra haya sido aceptada, el laboratorio procederá a su identificación y a su conservación en condiciones apropiadas. Dependiendo de su tamaño, la muestra de laboratorio puede requerir la reducción hasta la muestra analítica, a partir de la cual se tomarán las porciones analíticas. Una vez realizado el análisis, las muestras deben conservarse durante un cierto período de tiempo para analizarlas de nuevo en caso de ser necesario. Algunas muestras ya analizadas podrán utilizarse también como muestras de control.

2.2 Requisitos básicos del muestreo.

En cualquier caso, tanto la muestra como submuestras deben cumplir los siguientes requisitos:

1. La composición de la muestra que llega al laboratorio y la que se utiliza para realizar los análisis debe ser en principio igual a la de la muestra inicial (composición media representativa).
2. La varianza de los niveles de concentración de las muestras analíticas analizadas en el laboratorio debe ser igual a la varianza de la muestra original (varianza representativa).
3. El error total introducido en todo el proceso de muestreo debe ser menor, o al menos del mismo orden de magnitud, que el error en el subsecuente procedimiento analítico.

2.3 Plan de muestreo.

La IUPAC define el plan de muestreo como un procedimiento preestablecido para seleccionar, extraer, conservar, transportar y preparar las porciones que se separan de la población en calidad de muestras.

A continuación se indican los apartados que necesariamente deben considerarse en el momento de proceder a la elaboración del plan de muestreo:

- a) **Título.**
- b) **Objeto y campo de aplicación.** En este apartado deben especificarse los materiales objeto del muestreo, los analitos o las propiedades y los niveles de concentración que van a medirse en las muestras obtenidas. Si ello es relevante, se especificarán también los métodos de medida que se aplicarán. Obviamente todo ello deberá estar de acuerdo con los objetivos de los análisis que van a realizarse sobre las muestras y que se habrán definido en la fase del proceso analítico que denominamos el planteamiento del problema.
- c) **Definiciones.** Aquí solamente se van a definir aquellos conceptos cuyo desconocimiento por parte de los destinatarios del documento pueda dificultar la comprensión y la aplicación correcta del mismo.
- d) **Principio del método de toma de muestra.** En este apartado se explicará de forma resumida el fundamento estadístico o de otro tipo del proceso de obtención de las muestras.
- e) **Personal.** Cuando el muestreo sea responsabilidad del laboratorio, el plan de muestreo debe especificar la formación y la experiencia que debe poseer el personal encargado de llevarla a cabo.
- f) **Seguridad.** Las precauciones que haya que tomar en relación con los materiales muestreados o con los emplazamientos donde se efectúa la operación deben figurar en un apartado específico.
- g) **Inspección del lote antes de la toma de muestra.** En este punto se indicarán las características del lote que es necesario verificar antes de llevar a cabo la toma de muestra y que se incluirán en el informe de muestreo. En aquellos casos en que sea pertinente se hará referencia a las condiciones meteorológicas y ambientales del momento del muestreo.
- h) **Equipo de toma de muestra.** Se incluirán las instrucciones para la utilización de los equipos de muestreo. Si se trata de equipos complejos cuya utilización requiera instrucciones extensas, éstas figurarán en documentos independientes cuya referencia se incluirá aquí.
- i) **Medidas in situ.** Se indicarán las medidas que deban realizarse en el momento de la toma de muestra, las instrucciones para realizarlas o referencia a las mismas.

- j) **Obtención de las muestras.** Especificación de la magnitud, el número y la localización de los incrementos. Instrucciones o referencia a las mismas, para la obtención de los incrementos, la preparación de muestras compuestas y la reducción de la cantidad de la muestra y la magnitud de las partículas.
- k) **Envasado, identificación, conservación y transporte de las muestras hasta el laboratorio.** Se incluirán las instrucciones para llevar a cabo estas operaciones o se hará referencia a procedimientos específicos.
- l) **Informe de la toma de muestra.** Si se dispone de un formulario para la realización de dicho informe, bastará que el mismo figure en un anexo del plan de muestreo.
- m) **Referencias.** Se incluirán las referencias a los documentos utilizados en la elaboración del plan de muestreo y que pueden ser documentos técnicos, normativos o legales.
- n) **Anexos.** Como anexos pueden figurar los modelos de etiquetas identificativas de las muestras y los formularios utilizados en el proceso de toma de muestra.

La figura 2.2 muestra de forma esquemática el contenido del plan de muestreo.

Las principales razones que justifican la necesidad de disponer del procedimiento de muestreo por escrito son las siguientes:

- a. El escribir un plan de muestreo obliga a pensar más detalladamente sobre todos los pasos a seguir en el proceso.
- b. Si el plan es claro y libre de ambigüedades se evitan errores de interpretación.
- c. El seguir el personal muestreador un plan de muestreo por escrito proporciona una garantía de que el proceso se ha realizado siguiendo el procedimiento deseado.
- d. El plan escrito de muestreo ayuda a asegurar la garantía de la calidad de los resultados.

En un programa escrito de muestreo es aconsejable visualizar claramente los requisitos que deben cumplirse y constatar claramente que constituye la etapa básica de los análisis. Los requisitos básicos a considerar son: a) Información sobre la muestra a analizar incluyendo la naturaleza de la muestra, composición química probable de la matriz, etc., b) Tipo de instrumentación a utilizar en el muestreo, c) Grado de homogeneidad probable y si

es necesario realizar ensayos de homogeneidad, d) Número de submuestras que se necesitan tomar al azar para obtener una exactitud determinada en el resultado analítico, e) Consideraciones especiales para tipos de muestras, f) Esquema sobre precauciones a seguir en la preparación de la muestra. Una evaluación detallada de todos estos aspectos antes de la toma de la muestra ayuda favorablemente a obtener la cantidad de muestra adecuada.

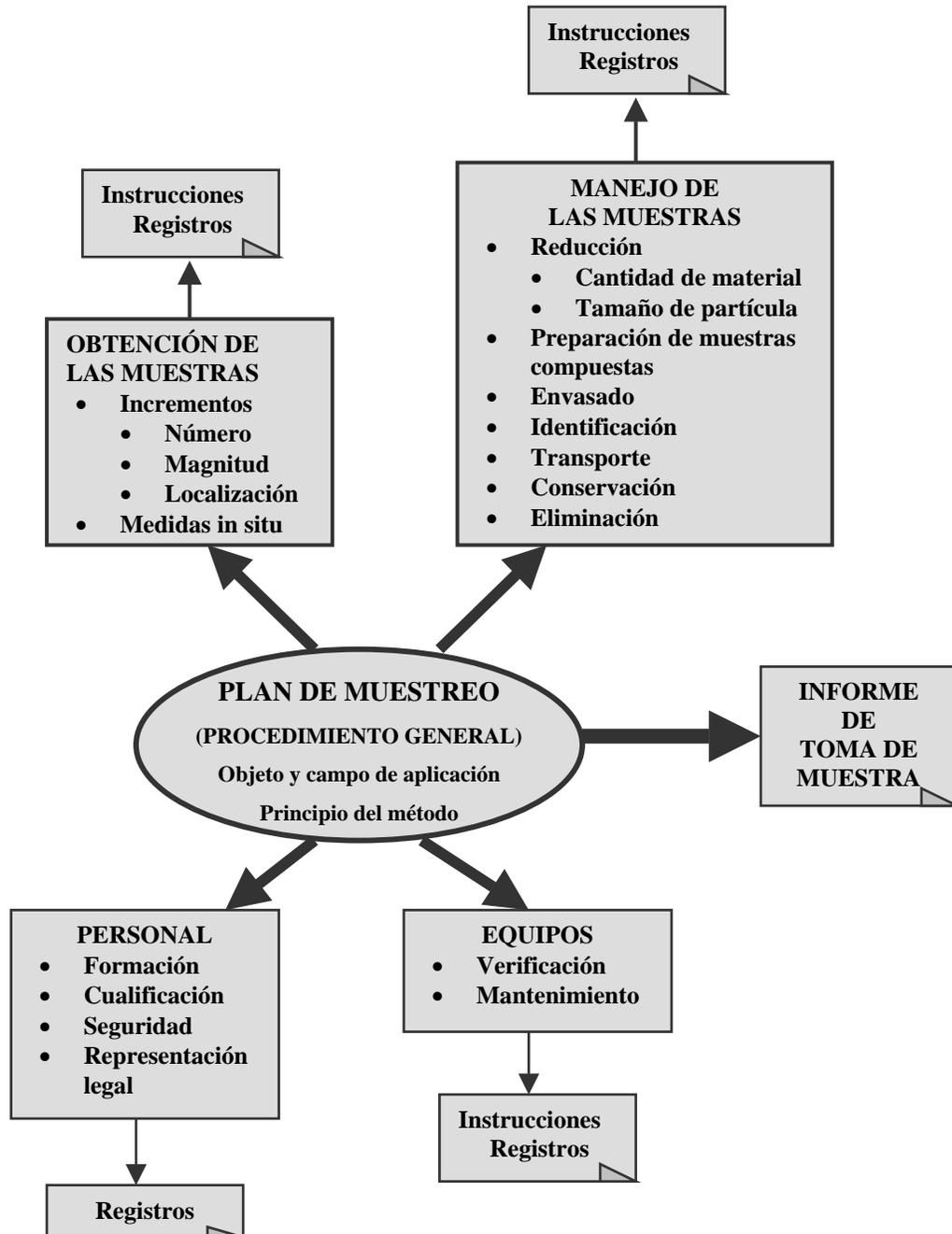


Figura 2.2 Representación esquemática del contenido de un plan de muestreo. ⁽²⁾

3. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS. ^(1, 2)

La selección del método de análisis constituye una etapa crucial en la resolución de un problema analítico. En esta etapa se debe decidir el diseño y planificación del proceso más adecuado para alcanzar los objetivos propuestos.

Antes de iniciar el análisis de una muestra, es necesario elaborar un perfil del problema, para lo cual habrá que responder a una serie de cuestiones como las siguientes:

¿Por qué y para qué se realizan los análisis?

¿Hacia dónde se dirigen los resultados?

¿Cuál es su repercusión?

¿Qué medidas se tomarán a la vista de los resultados obtenidos?

Éstas son algunas preguntas representativas que deben formularse los analistas para elaborar el informe inicial. Pero para disponer de toda esta información, el analista debe salir del laboratorio y contactar y dialogar directamente con la persona u organismo (“cliente”) que plantea el problema analítico; sólo de esta manera podrá planificar y diseñar la forma de trabajo adecuada.

Los objetivos del análisis como la repercusión de los resultados tienen una influencia decisiva al momento de seleccionar el “método”, es decir, aquel que mejor se adecue al propósito de la medida.

3.1 Factores a examinar en la selección del método de análisis.

Los factores que influyen en el diseño de la metodología específica a seguir para resolver un determinado problema analítico y, por lo tanto, que el analista está obligado a investigar se exponen a continuación.

A) Información requerida.

El analista debe conocer con exactitud el tipo de información que requiere el cliente. Sólo de esta forma podrá planificar adecuadamente los procedimientos analíticos.

Es fácil de entender que el planteamiento será sustancialmente diferente:

- Si únicamente se necesita dar un informe cualitativo sobre una determinada muestra o, por el contrario, se necesita que sea cuantitativo.
- Si se requiere que la información sea generalizada (contenido total) o que sea discriminada (determinación de especies).
- No es lo mismo que los resultados deban entregarse rápidamente, o incluso que se deban conocer en tiempo real, o que el tiempo no sea un factor decisivo.
- Si se requiere una gran exactitud en los resultados o bien sólo se exige que estén por debajo de un determinado valor.

Respondidas estas preguntas (u otras muchas, puesto que esta discusión no responde a un planteamiento exhaustivo del problema), el analista podrá empezar a perfilar el trabajo que se le ha solicitado.

B) Muestra.

El conocimiento de la muestra resulta un punto clave a la hora de planificar la metodología a seguir; se debe conocer:

- El estado físico de la muestra: sólido, líquido o gas.
- Si es una muestra estable o no lo es.
- Si es homogénea o, por lo contrario, presenta una alta heterogeneidad.
- Si se dispone de una gran cantidad o, por el contrario, es muy poco asequible.
- Si se presenta una matriz sencilla o bien es compleja.

Conociendo este tipo de información el analista se encuentra en condiciones de diseñar diferentes etapas dentro de la metodología general del análisis, como son:

- Forma de almacenar y conservar la muestra.
- Tamaño de la muestra a analizar.
- Puesta en disolución de la misma.
- Necesidad de etapas de separación o de limpieza.

Todo ello se encuentra resumido en la figura 3.1.

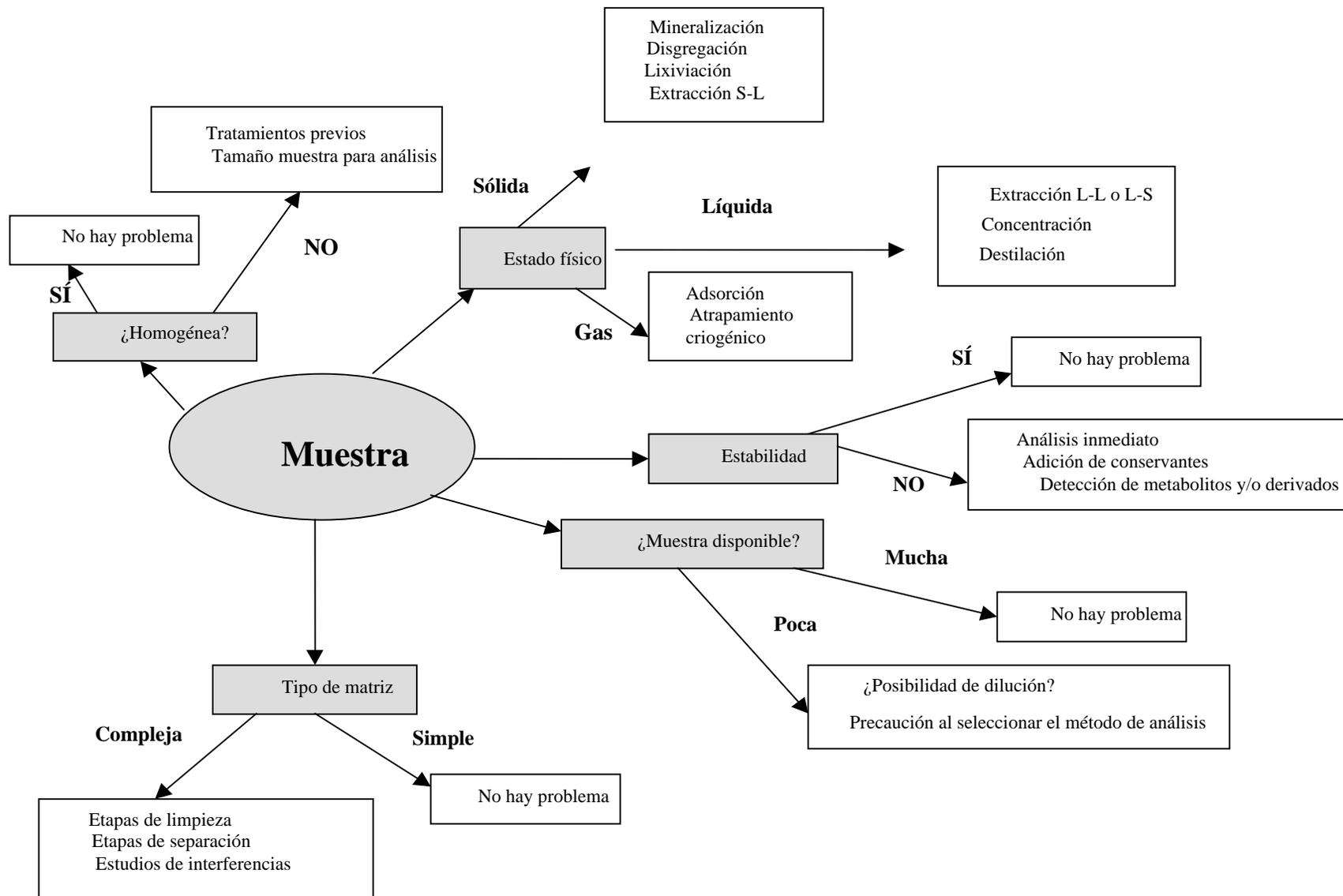


Figura 3.1 Influencia de la muestra en el planteamiento del método de análisis⁽¹⁾

C) Analitos.

Es preciso definir los compuestos cuya presencia o concentración debe conocerse.

Los analitos pueden ser uno o por el contrario muchos; pueden tener naturaleza inorgánica u orgánica; pueden ser macroconstituyentes, microconstituyentes o trazas.

No hace falta incidir en que este factor es básico para el diseño del método, implicará emplear técnicas de medida clásicas o instrumentales, procedimientos de extracción y separación de especies, procesos de preconcentración o bien de dilución, en fin tantas y tantas modificaciones que puede introducir el analista en función de las características de la muestra.

D) Recursos instrumentales y humanos.

El material instrumental, así como el personal del que dispone el laboratorio donde se va a realizar el análisis constituye otro de los factores importantes, que muchas veces es decisivo a la hora de seleccionar un determinado método. No se puede trabajar con lo que no se tiene por ello habrá que hacerlo con los medios disponibles o si no ser consciente de ello y no comprometerse en la resolución de un determinado problema analítico.

E) Costo.

Hay que tener en cuenta el precio que está dispuesto a pagar el “cliente” con el fin de ajustar los medios, esfuerzo y tiempo a los precios convenidos.

Una vez reunida toda la información, ¿cómo debe actuar un analista? Deberá recordar si anteriormente se ha llevado a cabo en el laboratorio un análisis similar al requerido; si la respuesta es negativa, entonces se sugiere realizar una búsqueda bibliográfica para seleccionar el/los método/s que mejor se adapte/n a la resolución de su problema.

Una búsqueda por la literatura científica nos llevará a seleccionar uno de los siguientes métodos:

- a) Métodos Oficiales de Análisis: son métodos establecidos por regulaciones de naturaleza estatutaria (Directivas Europeas, BOE, EPA...).
- b) Métodos Normalizados de Análisis o Estándar: son métodos que han sido estudiados por diferentes organizaciones y utilizan estudios interlaboratorio para validarlos (ISO, UNE, ASTM).

- c) Métodos recomendados por una serie de expertos que son el resultado de trabajos de investigación originales y se encuentran en la literatura científica específica, tales como las revistas The Analyst, Analytica Chimica Acta, Química Analítica.
- d) Métodos desarrollados en el laboratorio para cubrir unas necesidades concretas. Generalmente estos métodos son estándar u oficiales que han sufrido ligeras o profundas modificaciones con el fin de adaptarlos a las necesidades actuales o a otro tipo de muestras diferentes a las que dieron lugar al método inicial.

Siempre que sea posible debemos utilizar un método oficial o normalizado, si bien esto sólo será factible si tanto los analitos a determinar como la muestra son los mismos a los que refiere el método oficial. En caso contrario, será necesario introducir modificaciones que darán lugar a un nuevo método de análisis. Obviamente habrá que demostrar que el nuevo método proporciona resultados trazables, es decir, exactos. En otros casos la situación es todavía menos favorable, al no encontrar ningún método apropiado se hace necesario iniciar el desarrollo de un nuevo método (ver figura 3.2).

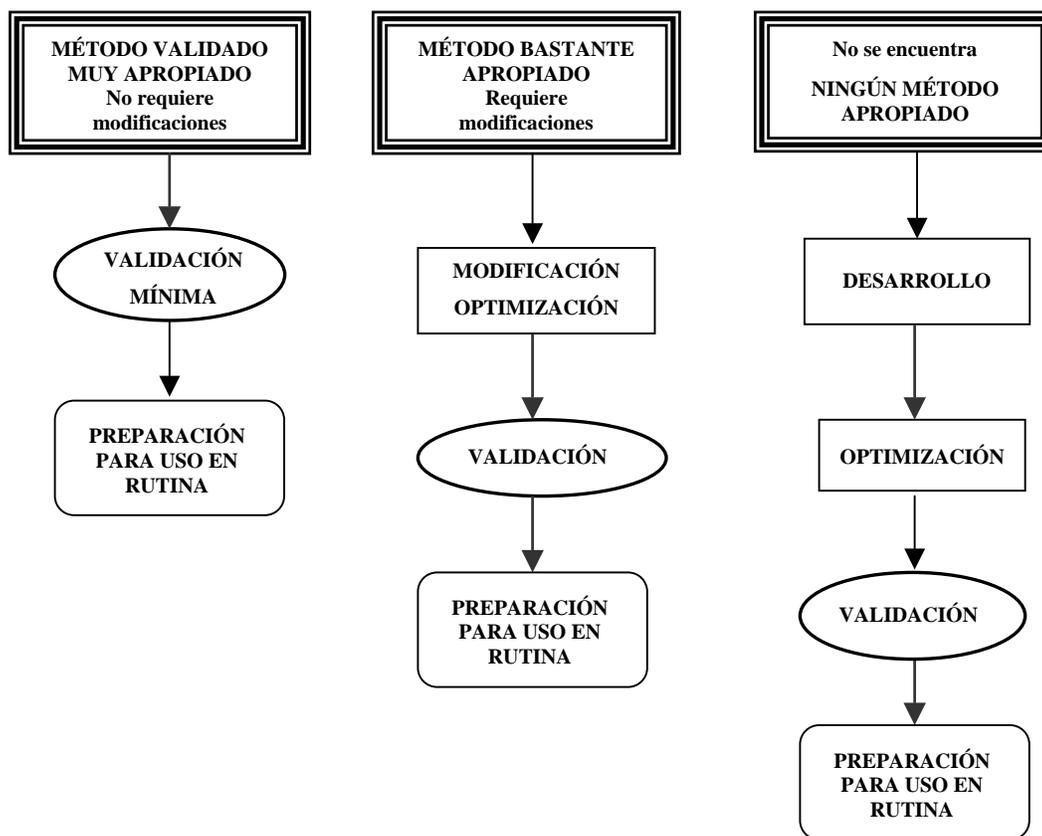


Figura 3.2 Selección del método. ⁽²⁾

4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. ^(4, 5, 6)

Una vez desarrollado el método analítico, claramente definido en cada uno de los pasos que lo conforman, es conveniente realizar un estudio de validación con la finalidad de demostrar que el método es confiable y cumple con el objetivo para el cual ha sido creado.

La validación de un método analítico se define, como un conjunto de evidencias que establecen la capacidad del método y la medida en que éste satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas que se deseen.

Aún existe polémica al tratar de establecer de forma homogénea los procedimientos para llevar a cabo la validación de los métodos. De acuerdo a la naturaleza del método, los criterios de aceptación de las características analíticas a validar varían; así mismo, la elección de las cualidades depende de la aplicación del método (tabla 4.1), la experiencia y el criterio del analista.

Son varias las razones por las cuales se debe validar un método analítico:

- ✓ Es una parte integral del sistema de control de calidad.
- ✓ Se cumple con las regulaciones establecidas (Buenas prácticas de manufactura, GMP's).
- ✓ Desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.
- ✓ Desarrollo de nuevos métodos analíticos.
- ✓ Cambios en la formulación.
- ✓ Cambios en el proceso de manufactura.
- ✓ Economía.
- ✓ Confiabilidad.

La validación de los métodos analíticos puede abordarse de diferente manera:

Prospectiva: Se establece la evidencia documental de que un método analítico realiza las funciones para el cual fue diseñado, basándose en un protocolo previamente elaborado.

Tabla 4.1 Características analíticas a evaluar según la aplicación del método.

CARACTERÍSTICA ANALÍTICA	CONTROL DE CALIDAD	INDICADORES DE ESTABILIDAD		BIODISPONIBILIDAD	REVALIDACIÓN DEL MÉTODO	
		BAJAS CONCENTRACIONES	ALTAS CONCENTRACIONES		SIN CAMBIO EN CONDICIONES DE OPERACIÓN	CON CAMBIO EN CONDICIONES DE OPERACIÓN
Linealidad y precisión del sistema	X	X	X	X	X	X
Límite de detección		X		X		
Límite de cuantificación		X		X		
Exactitud y repetibilidad al 100%	X	X	X	X	X	X
Linealidad del método	X	X	X	X	X	X
Precisión (reproducibilidad)	X	X	X	X		X
Especificidad (control de calidad)	X	X	X	X	X	X
Especificidad (Estabilidad)		X	X			
Tolerancia del sistema		X	X	X		X
Estabilidad de la muestra	X	X	X	X		

Introspectiva: Conocida como la validación en fase de desarrollo, es el establecimiento de la evidencia documental de que un método analítico cumple con los requerimientos, apoyándose en información generada durante el desarrollo del método.

Retrospectiva: Se genera la evidencia documental para demostrar que un método analítico cumple con la finalidad de su diseño basándose en la revisión y el análisis de información histórica.

4.1 Características analíticas. ^(5, 6)

La capacidad de un método analítico queda expresado en términos de sus características analíticas a validar, tales como:

Linealidad del sistema: Es la capacidad del mismo para asegurar que las respuestas analíticas son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado de concentraciones.

Linealidad del método: Es la capacidad del mismo para asegurar que la relación establecida entre la cantidad de activo adicionada y la cantidad de activo determinada sea directamente proporcional en un intervalo determinado.

Exactitud: Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia (estándar).

Precisión: La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, expresándose en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

- a) **Repetibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, instrumento, laboratorio, etc.)

- b) **Reproducibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes días, diferentes analistas).

Especificidad: Es la capacidad del método analítico para obtener una respuesta analítica debida únicamente a la sustancia de interés y no a otro componentes de la muestra.

Tolerancia: Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como: diferente temperatura, lote de reactivos, condiciones ambientales, instrumento, etc.

Límite de detección: Es la concentración más baja de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, aunque no necesariamente cuantificada, bajo condiciones de operación establecidas.

Límite de cuantificación: Es la concentración más baja de una sustancia en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

Estabilidad de la muestra analítica: Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

4.2 Criterios de aceptación para métodos espectrofotométricos. ⁽⁶⁾

En la tabla 4.2 se muestran los parámetros estadísticos de validación para determinar la confiabilidad de un método espectrofotométrico así como los criterios de aceptación.

Tabla 4.2 Criterios de aceptación. ⁽⁶⁾

Característica analítica	Parámetro	Especificación
Linealidad del sistema	Intervalo de confianza para la pendiente	No debe incluir el cero
	Coefficiente de correlación (r)	≥ 0.99
	Coefficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98
Precisión del sistema	Coefficiente de variación (c.v)	$\leq 1.5\%$
Linealidad del método	Porcentaje de recuperación (\bar{x})	97-103%
	Coefficiente de variación (c.v)	$\leq 3\%$
	Pendiente (m)	≈ 1
	Ordenada al origen (b)	≈ 0
	Coefficiente de correlación (r)	≥ 0.99
	Coefficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98
Precisión del método	Coefficiente de variación (c.v)	$\leq 3\%$
Repetibilidad	Coefficiente de variación (c.v)	$\leq 3\%$
Reproducibilidad entre días	Prueba de F	$F_{\text{días calculada}} \leq F_{\text{días crítica}}$
Reproducibilidad entre analistas	Prueba de F	$F_{\text{analistas calculada}} \leq F_{\text{analistas crítica}}$
Exactitud	Porcentaje de recuperación (\bar{x})	97-103%
	Coefficiente de variación (c.v)	$\leq 3\%$
	Prueba de t (student)	$T_{\text{calculada}} \leq t_{\text{crítica}}$
Especificidad	Cuantificar la sustancia de interés	No exista interferencia de otras sustancias presentes.
Estabilidad de la muestra analítica	Media aritmética del análisis inicial y de cada condición de almacenaje. La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial. (di)	$ di \leq 3\%$
Tolerancia	Coefficiente de variación (c.v.)	$\leq 3\%$

5. NORMAS GENERALES PARA LA REDACCIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. ⁽³⁾

En un programa de calidad los métodos analíticos empleados en un laboratorio deben estar escritos.

Las normas generales a seguir para la redacción correcta de los métodos pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Hay que seguir una secuencia estricta, para que el analista no tenga que volver atrás en el proceso analítico.
2. Hay que evitar las abreviaturas y los nombres y expresiones vulgares, que se presupone todo el mundo conoce. En caso de necesidad, las abreviaturas se definen al principio.
3. Debe ser específico y sin ambigüedades.
4. Se indicarán las etapas críticas en el análisis y las consecuencias si no se adopta el cuidado necesario.
5. Conviene emplear frases cortas y claramente redactadas.

Existen diferentes formatos para la redacción dichos métodos, sin embargo se recomienda el siguiente:

- **Número de método.** Se asigna un número a todos los métodos autorizados para facilitar la trazabilidad. Este número se anotará en el cuaderno de laboratorio del analista y en el informe que el mismo emita.
- **Título.** Debe ser breve y contener tanto el nombre del analito como el de la matriz. Conviene también incluir la técnica analítica en que se basa.
- **Referencias.** Ha de incluirse la cita bibliográfica de la que se ha extraído el método o, en su defecto, la documentación sobre los estudios de validación llevados a cabo.
- **Ámbito de aplicación.** Incluye el intervalo de concentraciones del analito que se pueden determinar, tipo y naturaleza de la matriz sobre la que se aplicará, tiempo estimado que requiere su aplicación y sustancias interferentes.

- **Principios básicos.** Se describen los principios físicos, químicos y biológicos en los que el método se basa. Se indican las reacciones químicas implicadas.
- **Aparatos y reactivos.** Describe los instrumentos y aparatos que se precisan, material volumétrico y descripción de los reactivos (nombre químico, pureza y estabilidad de las disoluciones).
- **Precauciones de seguridad.** Indica si hay que adoptar especiales normas de seguridad así como evitar reacciones peligrosas.
- **Procedimiento.** Redacción siguiendo las instrucciones generales mencionadas anteriormente.
- **Cálculos.** Se incluye la expresión necesaria para obtener el resultado del análisis, así como las unidades de todas las variables y del resultado final.
- **Tratamiento estadístico.** Se indicará la información necesaria para evaluar la exactitud y precisión del método. Si el método ha sido validado en el laboratorio se hará referencia a estos estudios.
- **Garantía de calidad.** Se refiere a qué muestras o materiales de referencia existen para evaluar el método. Los requerimientos de calibrado de instrumentos y aparatos.
- **Comentarios.** En esta parte se incluirá cualquier comentario, nota u observación que ayude a la mejor comprensión del método o interpretación de los resultados.

6. ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-VIS).

6.1 Absorción de la radiación. ^(7, 8)

Los métodos espectrofotométricos se basan en la medición de la radiación electromagnética emitida o absorbida por la materia. Incluyen estudios no solamente en la región visible sino también en otras regiones del espectro electromagnético (rayos X, ultravioleta, infrarrojo, microondas y radiofrecuencia).

La radiación electromagnética es descrita en función de dos modelos: el ondulatorio y el corpuscular. El primero describe a la radiación como ondas que viajan a la velocidad de la luz, mientras que el segundo considera a la radiación como un flujo de partículas discretas o paquetes de energía llamados fotones o cuantos.

La absorción se determina mediante la disminución de la potencia experimentada por un haz de radiación como resultado de las interacciones con las especies absorbentes situadas en la trayectoria de dicho haz.

Cuando las moléculas o iones solvatados absorben la radiación entre longitudes de onda de 200 a 800 nm, los principales cambios ocurren a niveles electrónicos pero pueden ser acompañados por cambios en los niveles vibracionales de los grupos atómicos que comprende la molécula. El resultado de todas las interacciones de la molécula con la radiación absorbida da origen al espectro de absorción.

En espectrofotometría existen varios términos que están muy relacionados con la absorción de la radiación, solamente se mencionarán aquí dos términos los cuales son frecuentemente utilizados: La *transmitancia* (T) y la *absorbancia* (A).

La transmitancia se define como la fracción de la radiación incidente transmitida por la solución.

$$T = \frac{P}{P_o} \quad (6.1)$$

Donde:

P, es la potencia transmitida.

P_o, es la potencia incidente

La absorbancia se define como el logaritmo de la relación entre la potencia incidente y la potencia transmitida.

$$A = -\log T = -\log \frac{P}{P_o} \quad (6.2)$$

6.2 Ley de Lambert-Beer. ⁽⁹⁾

La ley de Lambert-Beer establece que la absorbancia (**A**) de una muestra homogénea, es directamente proporcional a la concentración (**c**) de las moléculas en solución para una longitud de onda determinada.

$$A = abc \quad (6.3)$$

Donde:

a, es una constante de proporcionalidad denominada absorptividad.

b, es la longitud del camino óptico expresada en centímetros (cm).

Cuando **c** se expresa en gramos por litro, la absorptividad tiene unidades de $L g^{-1} cm^{-1}$. Si **c** es una concentración molar, la absorptividad recibe el nombre de absorptividad molar y se representa por ϵ

$$A = \epsilon bc \quad (6.4)$$

Donde:

ϵ , tiene unidades de $L mol^{-1} cm^{-1}$.

La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas del analito al utilizar una radiación monocromática y un medio ópticamente homogéneo. Igualmente se cumple en soluciones que contienen más de una especie absorbente, siempre que no haya interacción entre dichas sustancias.

6.3. Desviaciones de la ley de Lambert-Beer. ⁽⁸⁾

La representación gráfica de la absorbancia en función de la concentración es lineal, pero en algunas ocasiones se observa una curvatura en dicha representación, esto indica que existe una desviación. A continuación se mencionan algunos factores causantes de tal desviación.

A) Deficiencia de la monocromasia de la radiación. La monocromasia de la radiación incidente depende del ancho de la rendija de la salida del monocromador. Para pasos de banda mayores, la absorbancia medida en el máximo de la curva de absorción es

menor con respecto al valor real, ocasionando una desviación negativa de la gráfica de A vs. concentración del analito (*fig. 6.1*). Por otro lado, si la absorbancia medida es mayor que la real, esto causa una desviación positiva de la gráfica de A vs. concentración del analito.

Estas desviaciones aumentan con el incremento de las concentraciones del analito, especialmente para picos estrechos de absorción.

B) Efecto de la desviación de la radiación. La luz de otras longitudes de onda que se superponen a la banda de luz utilizada ocasionan una luz desviada.

La absorbancia medida disminuye en presencia de este efecto, observándose desviaciones negativas de la ley de Lambert-Beer (*fig. 6.1*).

C) Efecto de la dispersión de la radiación por partículas coloidales. El coeficiente de absortividad molar condicional (ϵ') disminuye con respecto al real cuando se incrementa la concentración del analito coloidal, mostrando una función lineal decreciente.

D) Efecto de la fluorescencia. Si la solución del analito absorbente muestra fluorescencia, la radiación secundaria emitida choca sobre el detector produciendo una mayor transmitancia, esto da lugar a la obtención de absorbancias menores con respecto a la real, observándose desviaciones negativas de la ley de Lambert-Beer (*fig. 6.1*).

E) Efecto de algunos factores instrumentales. (1) Respuesta no lineal del detector; (2) Efecto del ancho de la salida de la rendija del monocromador, (3) Reflexión repetida de la radiación en el límite de la celda y (4) Inestabilidad del voltaje.

F) Cambios en el índice de refracción. El coeficiente de absortividad molar aumenta con el incremento en el índice de refracción, η , de soluciones concentradas de especies absorbentes.

G) Cambios en el equilibrio químico ^(8, 10). Las desviaciones de la ley de Lambert-Beer se presentan cuando las especies absorbentes experimentan asociación, disociación o reaccionan con el disolvente formando productos que tienen una absorción distinta de la del analito (*fig 6.1*). La magnitud de estas desviaciones se puede predecir conociendo las absortividades molares de las especies absorbentes y las constantes de equilibrio de las reacciones.

Las reacciones químicas que dan origen a este efecto incluyen a los equilibrios entre monómeros y dímeros, los que forman complejos metálicos con más de un tipo de

complejos, los equilibrios ácido-base y los que llevan a asociaciones del disolvente y del analito.

Estas interacciones son dependientes de las condiciones de la reacción y de la concentración analítica de las especies absorbentes.

Para el caso de la disociación de un complejo absorbente, éste depende de las concentraciones de los componentes y del pH. Los valores de los coeficientes de absorptividad molar condicional son bajos con respecto al real (*fig 6.2*).

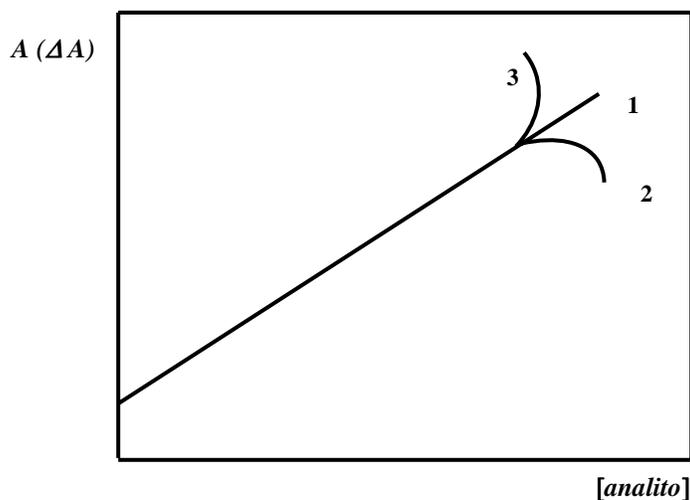


Fig. 6.1 Efecto de algunos factores en los gráficos de absorbancia vs. concentración del analito ⁽⁸⁾. 1: No existe ninguna influencia sobre el valor del coeficiente de absorptividad molar; 2: Efecto de la dispersión de la radiación, desviación de la radiación, fluorescencia, asociación o polimerización de las especies adsorbentes; 3: Efecto de una deficiente monocromasia (medida a una λ máx.) con algunas variantes de la espectrofotometría diferencial.

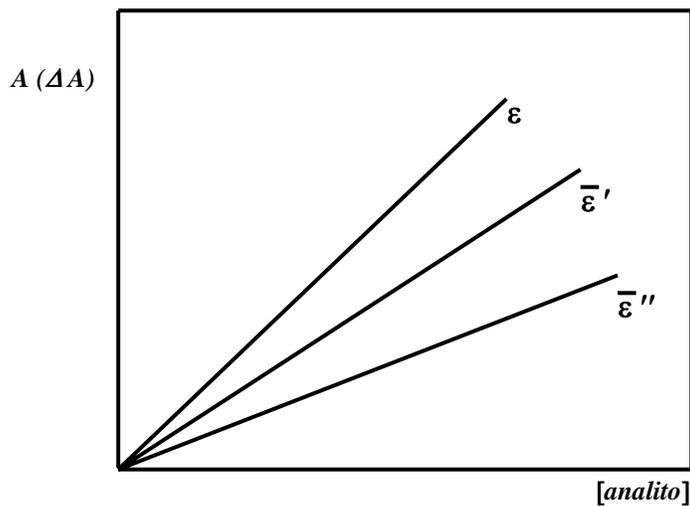


Fig. 6.2 Efecto de la disociación del complejo absorbente a diferentes concentraciones del reactivo ⁽⁸⁾.

6.4 Espectro de absorción en las regiones UV-VIS. ^(8, 11)

Una gráfica de la magnitud de la absorción de la radiación en función de la longitud de onda (λ), número de onda ($\bar{\nu}$) o frecuencia (ν) es un espectro de absorción. Las transiciones electrónicas que ocurren en una molécula se caracterizan por presentar picos de absorción de forma Gaussiana.

La selección de la longitud de onda para la determinación de la absorptividad se basa en los siguientes aspectos: (1) la sensibilidad máxima se obtiene en el máximo del espectro de absorción, (2) la variación de la absorbancia para pequeños cambios de la longitud de onda es mínima en el máximo del espectro de absorción (a menos que el espectro de absorción sea extremadamente pronunciado) por consiguiente; los inevitables pequeños errores en la fijación del selector de longitud de onda del instrumento no serán causa de grandes errores en la medición de la absorbancia.

La presencia de dos o más máximos de absorción en el espectro indica que hay más de una transición electrónica de las especies absorbentes.

Entre las variables más comunes que influyen en el espectro de absorción de una sustancia se encuentran la naturaleza del disolvente, pH de la solución, temperatura, concentraciones elevadas de electrolitos y presencia de sustancias interferentes.

6.5 Errores en espectrofotometría. ⁽⁸⁾

La exactitud y la precisión espectrofotométrica se ven afectadas por diversos factores que influyen sobre la medición de la absorbancia, el instrumento y sus accesorios, el operador y las reacciones químicas. Los errores aleatorios son atribuidos a acciones inadecuadas del operador y a las fluctuaciones instrumentales, limitando así la precisión o la reproducibilidad de las mediciones.

Una calibración incorrecta del espectrofotómetro, el funcionamiento inadecuado de los módulos, el empleo de celdas de baja calidad, la desviación y dispersión de la luz influyen en la exactitud de las mediciones. En la *tabla 6.1* se muestra los distintos tipos de errores.

Tabla 6.1 Diferentes tipos de errores espectrofotométricos. ⁽⁸⁾

Originadas por el operador	Originadas por el instrumento	Originadas por reacciones químicas
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Manejo inadecuado de la muestra. ▪ Celdas de baja calidad. ▪ Lectura incorrecta de la absorbancia. ▪ Limpieza inadecuada de las celdas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inestabilidad, fluctuación y ajuste inadecuado de la fuente. ▪ Amplificación incorrecta de la señal y del proceso. ▪ Fluctuaciones en el circuito eléctrico (inestabilidad de los sistemas). ▪ Baja proporción de la señal-ruido; nivel de ruido electrónico elevado. ▪ Calibración incorrecta de la longitud de onda y de las escalas de absorbancia/transmitancia. ▪ Generación de la desviación de la luz causante de señales falsas. ▪ Inadecuada anchura de la rendija del monocromador 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Propiedades ópticas, cinéticas y termodinámicas inadecuadas de la especie absorbente seleccionada. ▪ Equilibrio de competencia en las soluciones. ▪ Presencia de sustancias interferentes en la solución. ▪ Dispersión de la radiación y fluorescencia.

6.6 Pruebas generales para evaluar el funcionamiento de espectrofotómetros UV-VIS. ^(1, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17)

Los instrumentos deben de ser mantenidos por el usuario en excelentes condiciones con el fin de alcanzar un rendimiento óptimo y evitar que se deterioren rápidamente.

El grado de mantenimiento que requiere cada instrumento difiere de unos a otros, tanto en complejidad como en costo. Otro aspecto importante es su calibración.

La calibración de un instrumento significa verificar su respuesta frente a un patrón de propiedades conocidas, con el fin de obtener siempre la misma respuesta. La frecuencia con que se debe realizar la calibración depende de:

1. Tipo de instrumento.
2. Frecuencia de uso.
3. Ubicación e instalación.
4. Requerimientos de la metodología analítica empleada.

Para el desarrollo de métodos espectrofotométricos es importante conocer bajo que condiciones funciona el instrumento en el cual se llevará a cabo el análisis; para ello se requiere evaluar algunos parámetros instrumentales utilizando materiales (filtros) y soluciones estándares de propiedades espectrales conocidas, de esta forma se puede determinar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

En la *tabla 6.2* se indica los parámetros recomendados por el fabricante para evaluar el funcionamiento de un espectrofotómetro.

Tabla 6.2 Pruebas de funcionamiento (14, 15)

NOMBRE DE LA PRUEBA	FILTRO O SOLUCIÓN ESTÁNDAR SUGERIDO	PRINCIPALES LONGITUDES DE ONDA (nm) A LA CUÁL SE REALIZA LA PRUEBA.	ESPECIFICACIONES DEL FABRICANTE
Nivel de la línea base	-----	200 a 850	± 0.001 Abs.
Estabilidad fotométrica	-----	500	< 0.0003 Abs.
Exactitud fotométrica	Prueba con K ₂ Cr ₂ O ₇	373	0.66 ± 0.01 Abs.
Reproducibilidad fotométrica	Prueba con K ₂ Cr ₂ O ₇ a dos conc. diferentes	373	Desv. Std. < 0.0008 Abs. para 10 mediciones
Ruido fotométrico	Prueba con KMnO ₄	500	0.3%
Dispersión de la luz	Prueba con NaI	220	< 0.02 % Abs. a 220 nm < 0.005 % Abs. a 370 nm
	Prueba con NaNO ₂	370	
	Prueba con KCl	200	
	Prueba con K ₂ Cr ₂ O ₇	370	
Linealidad fotométrica	Prueba con KMnO ₄	506	C.V. = ≤ 1.5 % r = ≥ 0.99 r ² = ≥ 0.98
Exactitud de la longitud de onda	Prueba con la línea de emisión de D ₂	656.100, 485.999, 433.928, 410.062, 396.899, 388.799, 383.435, 379.687, 376.962, 374.915.	± 0.2 nm UV-Vis.
	Prueba con el filtro de óxido de Holmio	241, 279, 287, 361, 453, 536.	
	Prueba con el filtro de Didimio	573, 586, 741, 803, 684, 740, 748, 808, 880.	
	Prueba con vapores de Benceno	Picos de absorción sobresalientes entre 225 y 275, 236.3, 241.6, 247.1, 252.9, 258.9.	
Reproducibilidad de la longitud de onda	Prueba con la línea de emisión de D ₂ .	656.100, 485.999, 433.928, 410.062, 396.899, 388.799, 383.435, 379.687, 376.962, 374.915.	Desv. Std. = < 0.02 nm para 10 mediciones.

La evaluación de estos parámetros debe realizarse una vez que el instrumento ha sido instalado, después de una reparación o en la verificación de su funcionamiento. En este último punto la verificación debe hacerse periódicamente. La frecuencia con la cual se

efectúe dependerá del medio ambiente que lo rodea, de las condiciones adversas de trabajo (exposición al polvo, vapores químicos, vibraciones, etc.) y del uso continuo.

El analista comparará los resultados obtenidos contra las especificaciones establecidas por el fabricante lo cual le permitirá concluir si el instrumento está en condiciones óptimas de funcionamiento. Los resultados que no cumplan con las especificaciones son atribuidos a alguna falla del instrumento o su uso inadecuado.

Los resultados que se obtengan se documentan con la finalidad de llevar un control minucioso de la información. La documentación permite tener el conocimiento de las condiciones experimentales para un método analítico y se puede generar una recopilación de calibraciones realizadas anteriormente.

A continuación se describen los parámetros más importantes para calificar el funcionamiento de espectrofotómetros UV-VIS.

Exactitud y precisión de la longitud de onda.

La exactitud de la longitud de onda es el grado de concordancia entre el valor de la longitud de onda experimental (el promedio de las lecturas) de una banda de absorción o emisión y el valor de la longitud de onda de referencia de la banda.

La precisión de la longitud de onda es el grado de concordancia entre las longitudes de onda experimentales. Es una medida de la capacidad del espectrofotómetro para regresar a la misma posición espectral, cuando se reinicia el instrumento o se lee a una longitud de onda conocida. La precisión se expresa en términos de la desviación estándar.

Para calibrar la longitud de onda en la región ultravioleta se sugieren varios materiales de referencia como alternativa, se puede emplear: el espectro de emisión del arco de mercurio a baja presión (*fig. 6.3*), espectro de absorción del filtro de óxido de holmio (*fig.6.4*), solución de óxido de holmio (*fig. 6.5*) y vapores de Benceno (*fig. 6.6*). La exactitud de la longitud de onda en la región visible es evaluada a partir del espectro de emisión de mercurio, espectro de absorción del filtro de óxido de holmio, espectro de absorción de óxido de holmio en ácido perclórico y el espectro de absorción del filtro de didimio. Si el arco de deuterio o hidrógeno está disponible, las líneas de emisión a 656.3 y 486.1 ó 656.1 y 486.0 pueden ser utilizados como referencia.

La exactitud de la longitud de onda es calculada mediante la diferencia entre la longitud de onda de referencia y el promedio de las longitudes de onda observadas. Y la precisión de cada longitud de onda observada se calcula a través de la desviación estándar.

Si la escala de la longitud de onda no cumple con la tolerancia establecida en las especificaciones del fabricante, se solicitará la intervención de personal de servicio calificado.

Exactitud y precisión fotométrica.

En algunas aplicaciones analíticas, la exactitud fotométrica no es tan importante mientras las lecturas sean precisas y conserven una relación lineal sobre el intervalo de trabajo. Sin embargo, en otras aplicaciones en donde es necesario comparar las mediciones obtenidas de diferentes instrumentos, se considera importante este parámetro.

La exactitud fotométrica se define como el grado de concordancia entre el valor de la absorción experimental y el valor de la absorbancia de referencia.

La evaluación de la exactitud fotométrica se realiza utilizando Dicromato de potasio en solución de Ácido perclórico (tabla 6.3).

Tabla 6.3 Datos de referencia para evaluar la exactitud fotométrica en la región ultravioleta. ⁽¹³⁾

Longitud de onda (λ) nm	Ancho de la banda espectral (SBW)
235	1.2
257	0.8
313	0.8
345	0.8
350	0.8

Los datos obtenidos durante la calibración fotométrica en las regiones UV-VIS pueden ser utilizados para construir curvas de corrección de la escala de absorbancia.

La tolerancia recomendada para la aceptabilidad de los resultados en la exactitud fotométrica es del $\pm 1.5\%$. Este porcentaje incluye los errores aleatorios inherentes a la preparación y uso de los estándares.

La exactitud fotométrica se calcula por la diferencia entre la absorbancia de referencia y el promedio de las absorbancias observadas.

Si las absorbancias están fuera de las especificaciones, debe solicitarse un servicio correctivo con el fabricante.

Por otra parte, la precisión fotométrica es el grado de concordancia entre las absorbancias experimentales. La precisión de los datos fotométricos representa la capacidad del sistema fotométrico para reproducir el mismo valor en determinaciones sucesivas, y está expresada en términos de la desviación estándar.

Linealidad fotométrica.

Como parte fundamental de la verificación es imprescindible evaluar la linealidad fotométrica, ya que por medio de este parámetro podemos garantizar que las absorbancias obtenidas son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado.

Para llevar a cabo esta prueba existen diversas soluciones de referencia: Dicromato de potasio, Cloruro de cobalto, Permanganato de potasio y Sulfato de cobre, entre otras. El analista elegirá aquella que encuentre disponible en el laboratorio.

Nivel de la línea base.

La línea base en un espectro de absorción representa la medición de la absorbancia a un valor de cero.

La lectura de la absorbancia debe ser cero para todas las longitudes de onda del intervalo seleccionado y debe permanecer prácticamente constante durante un período de tiempo largo.

La medida del error máximo del nivel de la línea base puede ser expresada como el límite de la incertidumbre y posee un valor de $\pm 0.003 A$.

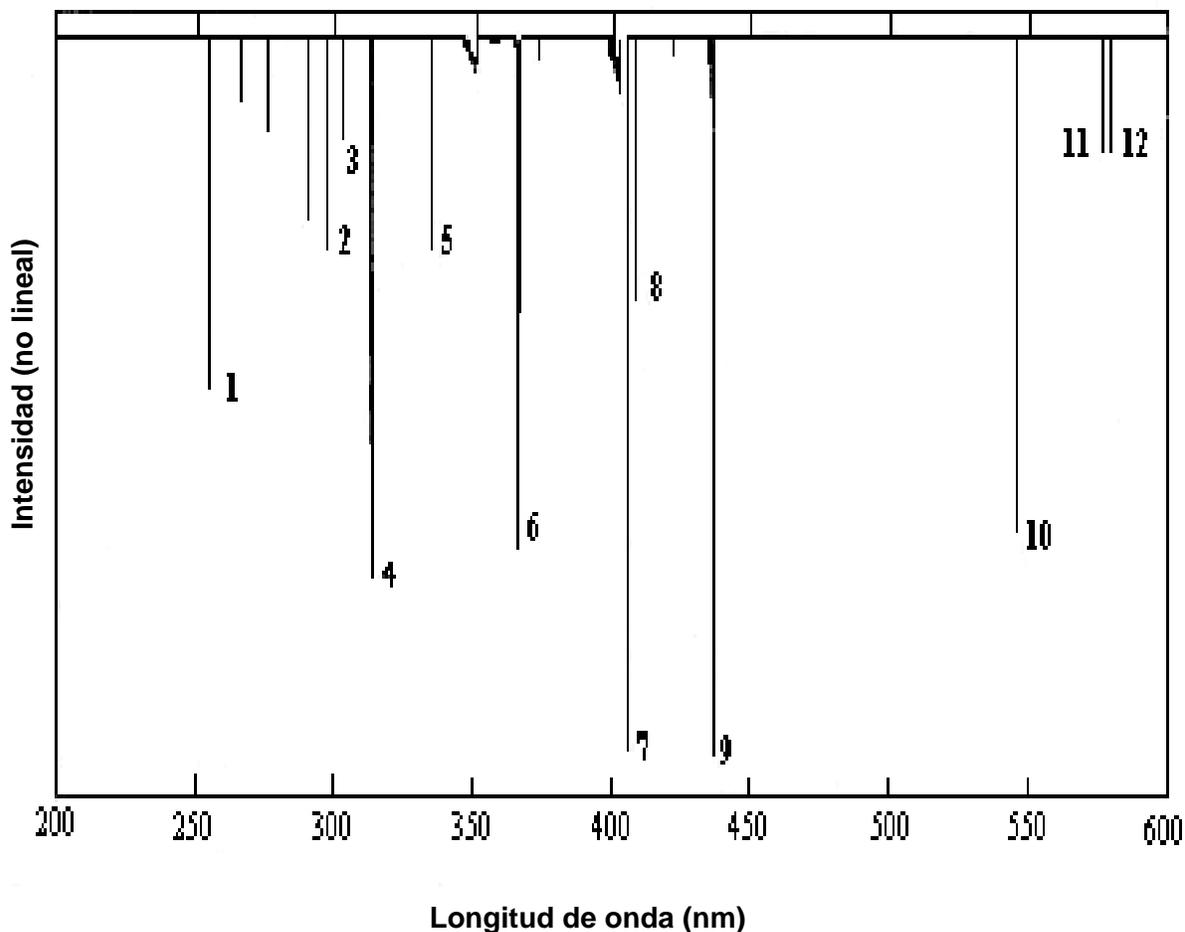
Ruido fotométrico.

Corresponde a las fluctuaciones aleatorias que ocurren en la señal del detector causada por variaciones inherentes en el proceso de generación de la señal.

La inestabilidad de los sistemas eléctricos y electrónicos del instrumento incrementa el error de las mediciones y altera el límite de detección.

Estabilidad fotométrica.

Es un indicativo de la estabilidad de los resultados fotométricos con respecto al tiempo.

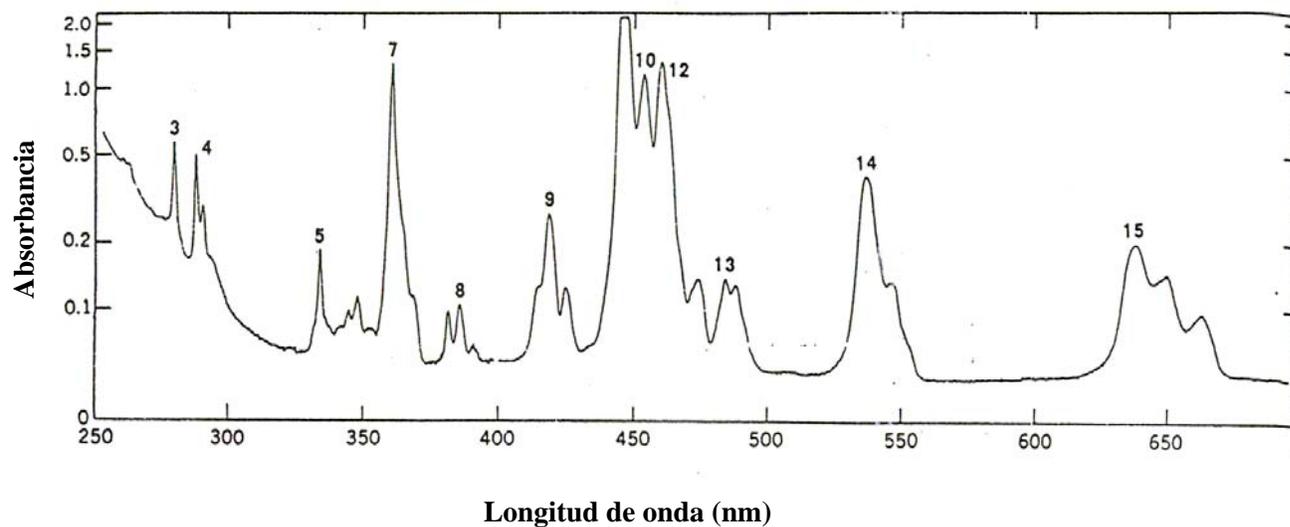


Número de línea	Longitud de onda (nm)	Número de línea	Longitud de onda (nm)	Número de línea	Longitud de onda (nm)	Número de línea	Longitud de onda (nm)
1	253.65	4	313.16	7	404.66	10	546.07
2	296.73	5	334.15	8	407.78	11	576.96
3	302.15	6	365.01	9	435.84	12	579.07

Instrumento: Cary Modelo 14
 Velocidad de exploración: 2.5 A/s

Ancho de la rendija: 0.03 mm
 Ancho de la rendija espectral: 0.10 a 0.15 nm

Fig. 6.3. Espectro de emisión del arco de mercurio en las regiones ultravioleta y visible (longitudes de referencia).⁽¹⁶⁾

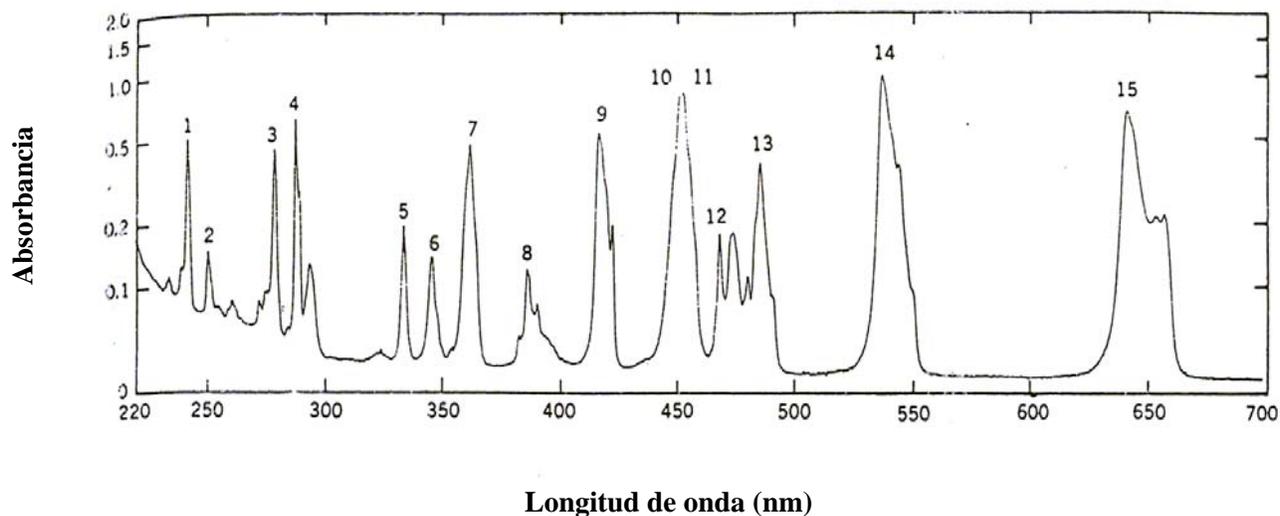


Número de banda	Longitud de onda (nm)	Número de banda	Longitud de onda (nm)	Número de banda	Longitud de onda (nm)	Número de banda	Longitud de onda (nm)
3	279.4	7	360.9	10	453.2	14	536.2
4	287.5	8	385.9	12	460.0	15	637.5
5	333.7	9	418.7	13	484.5		

Instrumento: Cary Modelo 14
 Velocidad de exploración: 10 A/s
 Ancho de la rendija: 0.025 a 0.105 mm

Ancho de la rendija espectral: 0.10 a 0.40 nm
 Espesor de la muestra: 2.6 mm

Fig. 6.4. Espectro del filtro de Óxido de Holmio (Corning No. 3130) (longitudes de referencia).⁽¹⁶⁾

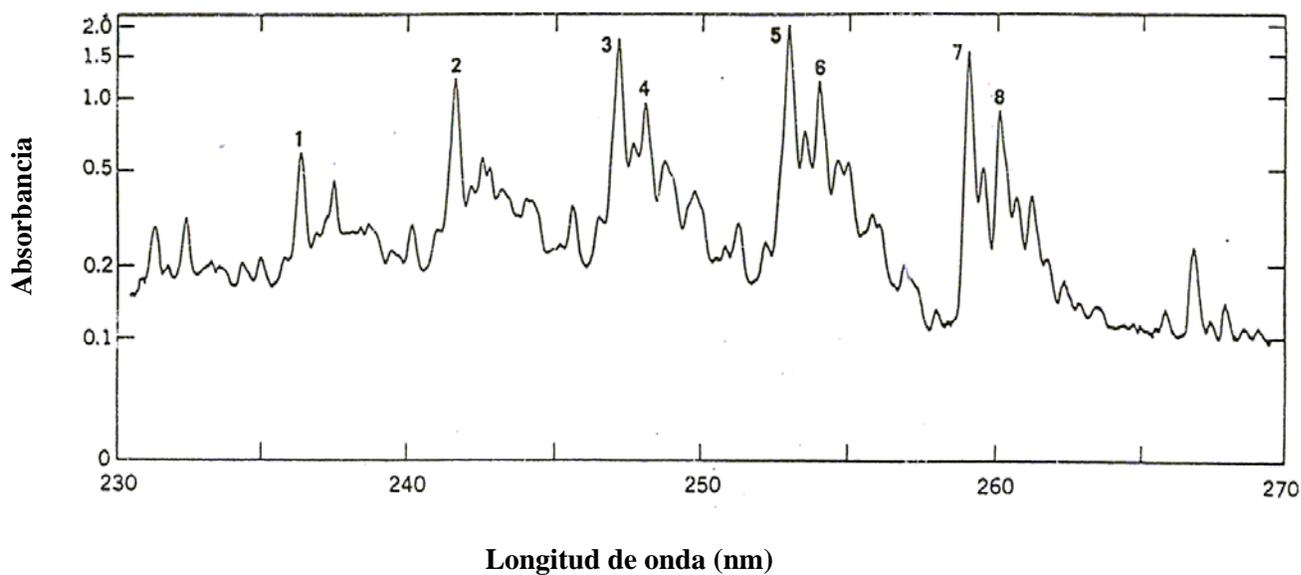


Número de banda	Longitud de onda (nm)	Número de banda	Longitud de onda (nm)	Número de banda	Longitud de onda (nm)	Número de banda	Longitud de onda (nm)
1	241.1	5	333.4	9	416.3	13	485.8
2	249.7	6	345.5	10	450.8	14	536.4
3	278.7	7	361.5	11	452.3	15	641.1
4	287.1	8	385.4	12	467.6		

Instrumento: Cary Modelo 14
 Velocidad de exploración: 10 Å/s
 Ancho de la rendija (Visible): 0.02 a 0.10 m

Ancho de la rendija espectral (Visible): 0.1 a 0.4 nm
 (Ultravioleta): 0.3 a 0.7 nm
 Referencia: Ácido perclórico 1.4 M en una celda de un 1 cm

Fig. 6.5 Espectro de una solución de Óxido de Holmio al 4% en Ácido perclórico 1.4 M (celda de un 1 cm) (Longitudes de referencia).⁽¹⁶⁾



Número de banda	Longitud de onda (nm)	Número de banda	Longitud de onda (nm)	Número de banda	Longitud de onda (nm)	Número de banda	Longitud de onda (nm)
1	236.35	3	247.10	5	252.86	7	258.90
2	241.59	4	248.08	6	253.90	8	259.98

Instrumento: Cary Modelo 14
 Velocidad de exploración: 0.5 A/s
 Ancho de la rendija: 0.07 mm

Ancho de la rendija espectral: 0.17 nm
 Longitud de la celda: 1 cm

Fig. 6.6 Espectro del vapor de Benceno en la región ultravioleta (Longitudes de onda de referencia seleccionadas).⁽¹⁶⁾

Dispersión de la radiación.

Es la radiación que llega al detector de una longitud de onda diferente de aquella seleccionada por el monocromador. La dispersión se mide utilizando soluciones que tienen la función de un filtro obturador (*ver la tabla 6.4*). Cualquier transmitancia observada es equivalente a la dispersión de la radiación.

Tabla 6.4 Soluciones obturadoras. ⁽¹³⁾

Solución	Longitud de onda (nm)
KI, 1.0 g/l en H ₂ O	220
K ₂ Cr ₂ O ₇	370

Este fenómeno se origina de las reflexiones de la superficie, imperfecciones en el sistema óptico y efectos de difracción. Con el transcurso del tiempo, la dispersión aumenta debido al deterioro gradual del sistema óptico del espectrofotómetro, lo que produce una fuente de error significativo en las mediciones espectrofotométricas, afectando así la sensibilidad y la precisión.

Cuando los valores obtenidos en este parámetro exceden la especificación del fabricante, es necesario solicitar un servicio de mantenimiento.

6.7 Espectrofotetría indirecta.

^(8, 18, 19)

Es una variante de la espectrofotetría ordinaria, en la cuál los compuestos que no pueden ser cuantificados directamente en el método analítico desarrollado requieren de una reacción química cuantitativa, para así obtener una propiedad medible que sea relacionada directamente con la concentración de dicho compuesto.

Las diferentes variantes en este tipo de espectrofotetría se dan dependiendo de cual de las sustancias (analito, reactivo, producto) es la que presenta la propiedad a medir.

A continuación se indican los diferentes casos que involucra la espectrofotetría indirecta:

1. El analito reacciona con un reactivo para dar un producto colorido. Casi siempre se trata de un producto oxidado o reducido.

2. El analito reacciona con un reactivo colorido para formar un producto de una coloración diferente. La magnitud del cambio de la coloración es un indicativo de la cantidad del analito presente.
3. El analito reacciona con un reactivo para dar un precipitado insoluble, el cuál es separado por filtración, al filtrado obtenido se le adiciona otro reactivo para desarrollar color y a esta solución se le mide la absorbancia.
4. El analito reacciona con un reactivo colorido, el cuál es adicionado en exceso para dar un precipitado insoluble, que es separado por filtración. El filtrado obtenido contiene la cantidad residual del reactivo y a esta solución se le mide la absorbancia.

Consideremos la siguiente reacción química:



Donde el compuesto **X** de interés se hace reaccionar con un reactivo **Y** (éste debe encontrarse siempre en exceso) dando como producto a **Z**. La cantidad que reacciona del reactivo **Y** esta en función de la relación estequiométrica de la reacción, es decir para “**a**” moléculas de **X** se necesitan “**b**” moléculas de **Y**.

Suponiendo que la reacción se lleve a cabo al 100%. Las **n** moléculas de **Y** que reaccionan con las **f** moléculas de **X**, en el equilibrio tendremos lo siguiente: **n moléculas de Y – b/a (f moléculas de X)**, esto último puede ser cuantificado siempre y cuando proporcione una respuesta analítica.

Para conocer la cantidad de **X** que participó en la reacción es necesario preparar un blanco el cuál contiene la cantidad total de moléculas de **Y**. Por lo tanto al relacionar la respuesta analítica del blanco y la respuesta del exceso de reactivo **Y**, mediante la diferencia podemos conocer las moléculas de **Y** que reaccionaron y asociarlas de manera indirecta a las moléculas de **X** (fig. 6.7). Como dependemos estrictamente de estas respuestas analíticas es importante garantizar su especificidad.

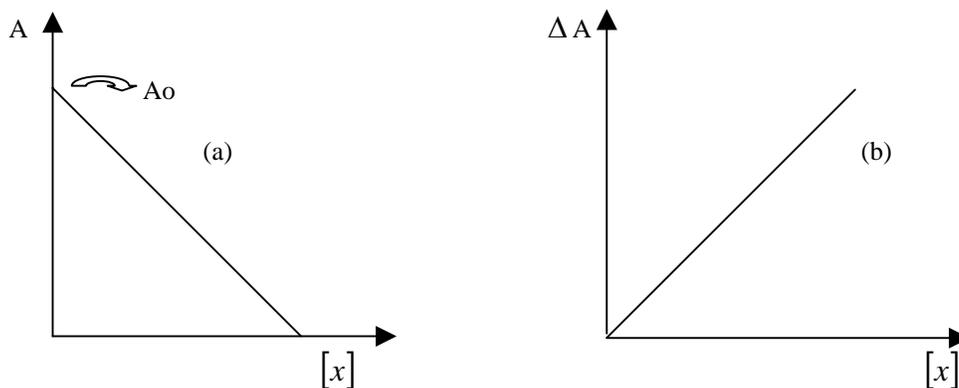


Fig. 6.7 Curvas de calibración indirecta para el compuesto X cuando Y da la propiedad. (a) A vs. $[x]$,
(b) $\Delta A = A_0 - A$ vs. $[x]$.

Para el desarrollo de un método indirecto hay que tener en cuenta la influencia de algunos factores cuyo conocimiento permite seleccionar las condiciones óptimas del análisis:

- Selección de la longitud de onda.
- Estabilidad de la especie absorbente.
- Efecto del pH.
- Influencia de la temperatura.
- Orden de adición de los reactivos.
- Concentración de los reactivos.
- Fuerza iónica.
- Conformidad del sistema con la ley de Lambert-Beer.
- Presencia de compuestos de degradación.
- Solubilidad de los reactivos.
- Estabilidad química de los reactivos.
- Reacción química cuantitativa.

7. GENERALIDADES DEL KETOCONAZOL.

7.1 Propiedades físicoquímicas. ^(20, 21, 22, 23, 24)

Nombre común:

Ketoconazol.

Nombre químico:

Cis-1-Acetil-4{4-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil-1,3-dioxolano-4-il)metoxi]fenil}piperazina.

Fórmula condensada:

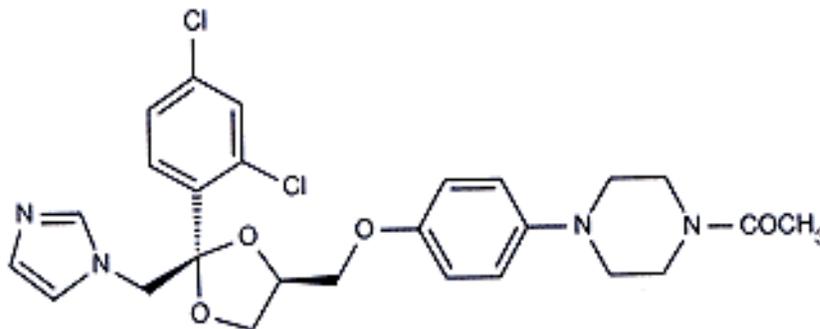
$C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$.

Composición molecular:

C: 58.76 %, H: 5.31 %, Cl: 13.34 %, N: 10.54 % y O: 12.04 %.

Peso molecular:

531.44 g/mol.

Estructura química:**Aspecto:**

Polvo blanco o ligeramente crema.

pKa's:

6.51 y 2.94.

Coefficiente de partición Octanol/Agua:

5400 (pH 11.8).

Solubilidad:

Es prácticamente insoluble en agua, soluble 1 en 54 de etanol, 1 en alrededor de 2 de cloroformo, 1 en 9 de metanol, en ácido clorhídrico diluido y escasamente soluble en éter.

Punto de fusión:

Funde a los 146° C.

Rotación específica:

Entre -1° y +1°, determinada a 20°C en una solución que contiene 400 mg de la muestra calculada en la sustancia seca por cada 10 ml de metanol.

Espectro en el ultravioleta:

Presenta un máximo a 269 nm en medio ácido, 287 nm en medio alcalino y en metanol presenta dos máximos a 244 nm y 296 nm.

Espectro en el infrarrojo:

El espectro en el infrarrojo de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio exhibe máximos a las siguientes longitudes de onda: 1507, 1640, 1240, 1258, 1200 y 1221 nm.

7.2 Propiedades farmacológicas.**Antecedentes:** ⁽²⁵⁾

Con el advenimiento de la Griseofulvina en 1938 como primer antimicótico oral, empieza la búsqueda de nuevos productos. A finales de la década de los 50's aparece la Nistatina y la Anfotericina B. A pesar de que estos poseen gran efectividad y un amplio espectro, presentan muchos efectos colaterales y una absorción deficiente.

Se han generado investigaciones para desarrollar nuevos antimicóticos que tengan amplio espectro, buena absorción, pocos efectos colaterales y bajo costo. Aunque esto parece ser difícil, con frecuencia observamos antimicóticos que cumplen con la mayoría de los requerimientos antes mencionados. Un ejemplo de ello es el Ketoconazol, un

antimicótico derivado de los imidazoles, sintetizado desde 1977 y considerado el ideal para el tratamiento de micosis superficiales.

Farmacología clínica. ^(21, 23, 26)

Efecto antimicótico. El Ketoconazol es fungistático a concentraciones bajas y a concentraciones altas se comporta como un fungicida. Altera la permeabilidad de la membrana celular de los hongos y levaduras, inhibiendo la biosíntesis de ergosterol, el principal esteroide de estas membranas celulares que es acompañado por la acumulación de 14 α -metil-esteroide.

Efecto endocrino. El Ketoconazol inhibe la síntesis de testosterona y esteroides adrenales in vitro e in vivo. Esta inhibición ocurre por el bloqueo de varios sistemas enzimáticos dependientes del citocromo P450 (e.g., 11 β -hidroxilasa, C-17,20-liasa). El Ketoconazol por otra parte inhibe la síntesis de cortisol de una manera dosis dependiente en individuos con una función adrenocortical normal.

Espectro de actividad. ⁽²³⁾

El Ketoconazol es un antimicótico de amplio espectro, tiene actividad in vitro contra algunas bacterias gram positivas, incluyendo a *Staphylococcus aureus*, *S. Epidermidis*, *Enterococci*, *Nocardia* y *Actinomyces*.

En la tabla 7.1 se indica la actividad in vitro del Ketoconazol sobre algunos hongos.

7.3 Características farmacocinéticas. ^(23, 26)

Absorción, distribución y eliminación.

El Ketoconazol se absorbe en el tracto gastrointestinal y se disuelve en las secreciones gástricas. La biodisponibilidad del Ketoconazol depende del pH del contenido gástrico en el estómago; un incremento en el pH causa una disminución en la absorción del fármaco.

Se alcanzan niveles plasmáticos medios de 3.5 μ g/ml en la primera o segunda hora después de la administración oral de una dosis de 200 mg de Ketoconazol.

Tabla 7.1 Actividad in vitro del Ketoconazol. ⁽²³⁾

Concentración (µg/ml)	Hongo
0.002 – 0.1	Paracoccidioides brasiliensis.
0.1 - 2	Blastomyces dermatitidis. Coccidioides immitis. Cryptococcus neoformans. Epidermophyton floccosum. Histoplasma capsulatum. Malassezia furfur. Microsporum canis. Microsporum gypseum. Trichophyton mentagrophytes. Trichophyton rubrum. Trichophyton tonsurans.
1 - 16	Candida albicans. Candida parapsilosis. Candida tropicalis.
1 - 25	Actinomadura madurae. Aspergillus flavus. Aspergillus fumigatus. Nocardia. Petriellidium boydii. Sporothrix schenckii. Torulopsis glabata.

Se distribuye en líquidos y tejidos, encontrándose concentraciones detectables en orina, bilis, saliva, cerumen y líquido sinovial.

El Ketoconazol se une a proteínas plasmáticas en un 84-99%. Las concentraciones plasmáticas decrecen de una forma bifásica con una vida media de dos horas en la fase inicial y de ocho horas en la fase terminal.

El fármaco se biotransforma en el hígado. Las principales reacciones de biotransformación en el humano son las siguientes:

- ❖ Oxidación y degradación de los anillos de imidazol y piperazina.
- ❖ O-dealquilación oxidativa.
- ❖ Hidroxilación aromática.

La principal ruta de eliminación es vía biliar.

7.4 Indicaciones terapéuticas. ^(23,27)

El Ketoconazol está indicado para el tratamiento de diversas dermatofitosis: t. capitis, t. corporis, t. cruris, t. pedis, t. manus y t. unguium (onicomicosis), causadas por Trichophyton, Microsporum o Epidermophyton. También es utilizado para el tratamiento de dermatitis seborreica, pitiriasis versicolor, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis, histoplasmosis, cromomicosis, blastomicosis, candidiasis (oral y/o esofageal) y candidiasis mucocutánea crónica. Por otra parte, el Ketoconazol es recomendado para tratar infecciones oportunistas en pacientes con SIDA.

Es considerado como un agente quimioterapéutico útil para tratar el cáncer en próstata debido a sus efectos inhibitorios en el metabolismo oxidativo.

7.5 Contraindicaciones.

Contraindicado en:

- Embarazo.
- Lactancia.
- Hipersensibilidad a medicamentos derivados de los imidazoles.
- Hepatopatía severa.

7.6 Reacciones adversas. ⁽²³⁾

Efectos gastrointestinales. Las reacciones adversas más frecuentes son náuseas y/o vómito, dolor abdominal, estreñimiento, hemorragia gastrointestinal y diarrea.

Efectos hepáticos. Se observa un incremento transitorio en las concentraciones séricas de Aspartato aminotransferasa (AST), Alanin aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina.

Efectos endocrinos. Inhibe transitoriamente la síntesis de testosterona observándose ginecomastia, disminución del líbido, oligospermia e impotencia.

Otros efectos adversos. Prurito, salpullido, urticaria, dolor de cabeza, mareos, somnolencia, letargo, nerviosismo, insomnio, fiebre, escalofríos, anemia hemolítica, trombocitopenia, leucopenia y fotofobia.

7.7 Interacciones farmacológicas. ⁽²³⁾

Medicamentos que afectan la acidez gástrica. La acidez gástrica es necesaria para la disolución y absorción del Ketoconazol, la administración de medicamentos que disminuyen la producción de ácido gástrico (antiácidos, ranitidina, cimetidina) afectan la absorción del antimicótico.

Medicamentos hepatotóxicos. El Ketoconazol puede causar hepatotoxicidad severa debido a una administración prolongada. Los pacientes que reciben medicamentos potencialmente hepatotóxicos junto con este antimicótico deberán ser monitoreados cuidadosamente.

Quinolonas: El Norfloxacin aumenta la actividad antimicótica del Ketoconazol.

Anticoagulantes. El Ketoconazol aumenta el efecto anticoagulante de los medicamentos cumarínicos.

Ciclosporina. La administración de Ketoconazol y ciclosporinas ocasiona un incremento en las concentraciones plasmáticas de las ciclosporinas y de la creatinina sérica.

El Ketoconazol interfiere con el metabolismo de la ciclosporina vía la inhibición enzimática microsomal hepática.

Teofilina: La administración de Ketoconazol y teofilina disminuye las concentraciones séricas de teofilina.

7.8 Vía de administración y dosis. ⁽²⁸⁾

El Ketoconazol es administrado vía oral o tópica.

Tabletas: Para las dermatomicosis, se administran 200 mg de Ketoconazol una vez al día. Si la infección es severa o no se obtiene una respuesta clínica adecuada con esta dosis, la dosificación se aumenta a 400 mg de Ketoconazol al día.

En infecciones urinarias, pulmonares o sistémicas; se recomienda administrar 400 mg de Ketoconazol al día, durante 4 a 8 semanas.

En la candidiasis vulvovaginal, se administra de 200 a 400 mg de Ketoconazol al día, durante 5 días.

La dosis para niños mayores de 2 años es de 3.3 a 6.6 mg/Kg de peso/día.

La dosificación deberá continuarse sin interrupción, al menos una semana después de que los síntomas desaparezcan.

Crema: Se recomienda en las dermatomicosis, candidiasis cutánea, vulvitis y pitiriasis versicolor, aplicar la crema una vez al día en la zona afectada y el área circundante a ésta.

En dermatitis seborreica, la crema debe ser aplicada una o dos veces al día, en la zona afectada.

La duración del tratamiento es de 2 a 4 semanas y deberá continuarse aún desaparecidos los síntomas por unos días más.

Óvulos: Aplicar un óvulo antes de dormir durante 5 días.

7.9 Presentaciones farmacéuticas. ⁽²⁸⁾

A continuación se muestra en la tabla 7.2 las diversas presentaciones farmacéuticas, así como las marcas comerciales existentes.

Tabla 7.2 Presentaciones farmacéuticas.

PRESENTACIÓN FARMACÉUTICA	FORMULACIÓN	MARCAS COMERCIALES
Tabletas	Cada tableta contiene: 200 mg de Ketoconazol.	Akorazol ® Collins Conazol ® Liomont Mycodib ® Diba Onofin-K ® Rayere Termizol ® IVAX Konaturil ® IQFA Micozol ® Hexal Tomiko ® Wermar

Tabla 7.2 Presentaciones farmacéuticas. (continuación)

PRESENTACIÓN FARMACÉUTICA	FORMULACIÓN	MARCAS COMERCIALES
Crema	Cada 100 g de crema contiene: 2 g de Ketoconazol.	Conazol ® Liomont Onofin-K ® Rayere Termizol ® IVAX Mycodib ® Diba Tiniazol ® Liferpal Remecon ® Rep. Mex-América
Óvulos	Cada óvulo contiene: 400 mg de Ketoconazol.	Onofin K ® Rayere Tiniazol ® Liferpal



IV. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.



1. INSTRUMENTOS, EQUIPOS, MATERIAL, REACTIVOS, SOLUCIONES Y SUSTANCIA DE REFERENCIA (S.R.).

☞ Instrumentos:

- Balanza analítica OHAUS. Modelo: AP250D-0. No. de serie: 1116032209.
- Espectrofotómetro UV-Vis. Marca Varian. Modelo Cary 1 E. Número de serie: 95031303.
- pHmetro con sensor de temperatura. Marca Oakton. Serie Acorn OKPH501. #35613-01.

☞ Equipos:

- Vortex. Marca Genie. Modelo K-550-G. No. de serie: 29883.
- Estufa con vacío. GCA-Precision Scientific. Thelco. Modelo 19. Número de serie: 26-AH-3.

☞ Material:

- Matraces volumétricos de 10, 25, 50, 100 y 2000 ml.
- Pipetas volumétricas de 1, 2 y 10 ml.
- Probeta de 25 ml.
- Mortero.
- Tubos de ensaye.
- Embudos de vidrio para filtración por gravedad.
- Vasos de precipitado de 250 ml.
- Cronómetro.
- Un par de celdas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico.
- Papel Whatman No. 1.
- Papel Whatman No. 42 sin cenizas.

☞ Reactivos:

- Búfer de referencia pH=4. Marca Baker.
- Búfer de referencia pH=7. Marca Baker.





☞ **Reactivos** (continuación) :

- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ absoluto anhidro. Grado reactivo. Marca Baker.
- CH_3OH . Grado reactivo. Marca Baker.
- KCl . Grado reactivo. Marca Merck.
- NaOH . Grado reactivo. Marca Baker.
- Ampolletas de HCl 0.5 M. Grado reactivo. Marca J.T. Baker.
- Azul de bromofenol. Marca Baker.
- Agua destilada.

☞ **Soluciones:**

- HCl 0.1 N
- HCl 1 M.
- NaOH 0.1 N.
- KCl 1 M.
- Búfer de KCl 0.2 M - HCl 0.2 M a $\text{pH}=2$.
- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ al 96%.
- Azul de bromofenol al 0.060, 0.0615, 0.063, 0.064, 0.065 y 0.2 %.

☞ **Sustancia de referencia:**

- Ketoconazol S.R. Pureza del 100 % en base seca. Allpharma Research S.L. No. de lote: A-20000507. Fecha de caducidad: Mayo del 2005.

☞ **Tabletas:**

- Marca: Conazol. Laboratorio farmacéutico: Liomont S. A. de C. V.
Cada tableta contiene: 200 mg de Ketoconazol.
Excipiente, c.b.p. 1 tableta.



2. Antecedentes. ⁽²⁹⁾

Durante la investigación hemerográfica se localizó un artículo, en el cuál se reporta que el Ketoconazol forma pares iónicos con diversos indicadores tales como el verde de bromocresol, violeta de bromocresol, azul de bromofenol y rojo de bromofenol en condiciones ácidas (pH's 2 y 2.4). El par iónico formado se extrae y la detección se realiza a 420 nm. La cuantificación del principio activo se lleva a cabo de manera indirecta.

3. Fundamento del método desarrollado.

El Ketoconazol forma un complejo con un exceso de Azul de bromofenol (ABF) al 0.064 %. Éste sistema está amortiguado por un búfer de KCl 0.2 M - HCl 0.2 M a pH= 2, bajo estas condiciones el complejo precipita y es separado por filtración a gravedad.

Por otra parte se prepara una solución de referencia de ABF, a la cuál se etiqueta como "blanco".

Las soluciones obtenidas (blanco y filtrado) se diluyen con el búfer antes mencionado y se les realiza un barrido espectrofotométrico de 400 a 650 nm, el máximo de absorción se presenta a una longitud de onda de 436 nm.

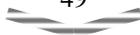
El resultado del análisis espectrofotométrico indica que el filtrado contiene el ABF que queda libre en la reacción y el blanco posee la cantidad total de ABF (ver gráfico 1); por lo tanto al relacionar la lectura de absorbancia del blanco y del filtrado por medio de una diferencia se puede determinar la cantidad de ABF que reaccionó y asociarlo de forma indirecta a la cantidad de Ketoconazol que participó en la reacción.

De esta manera se puede llevar a cabo la cuantificación del principio activo en las tabletas.

4. Desarrollo del método analítico.

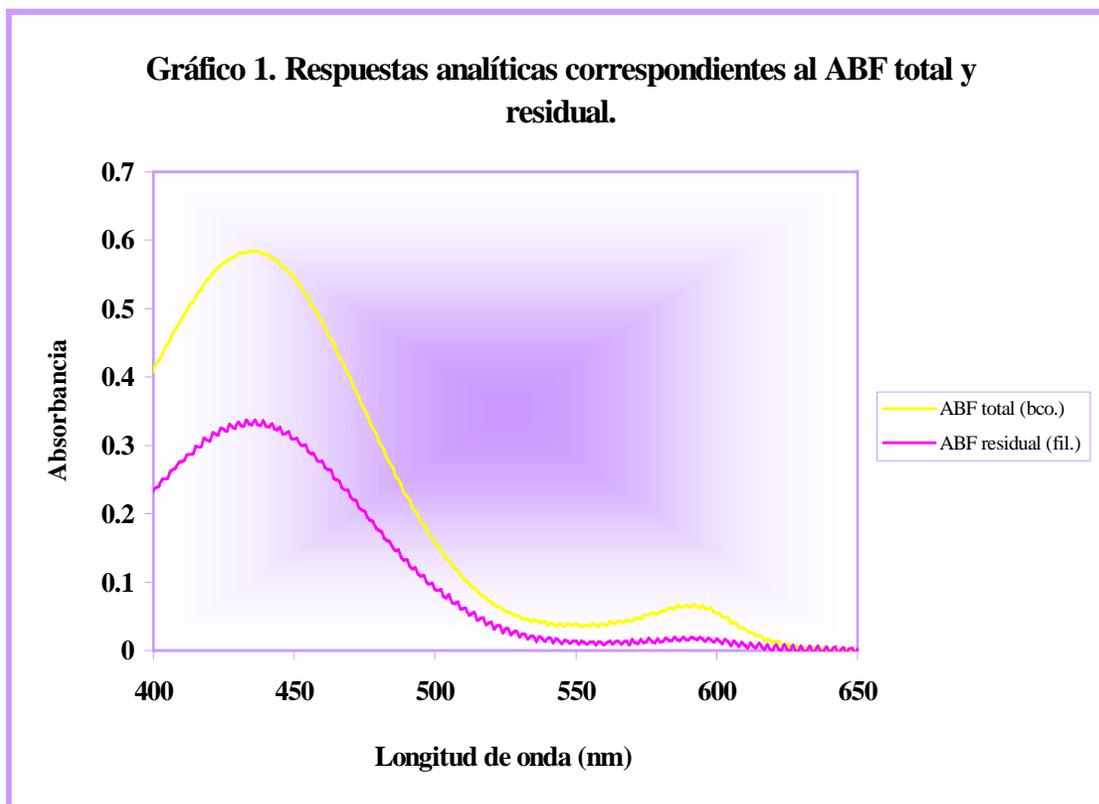
Se revisaron las propiedades físicoquímicas del Ketoconazol; así como los métodos analíticos reportados para su cuantificación en tabletas.

La información recopilada sirvió como base para plantear las condiciones iniciales de nuestro método.





El primer aspecto importante que se debe atender para empezar a desarrollar el método, es la solubilidad del principio activo.



De acuerdo a la bibliografía el Ketoconazol es soluble en metanol, cloroformo, etanol y ácido clorhídrico diluido. Se seleccionó éste último para incorporarlo al procedimiento analítico preparándolo a una concentración 0.1 N, debido a que es más económico y menos tóxico con respecto a los demás.

Con respecto al ABF se realizó un ensayo con la finalidad de seleccionar el disolvente más apropiado para solubilizarlo. En la tabla 1 se muestran los resultados.

Se estableció solubilizar el ABF en 2 ml de etanol y posteriormente utilizar un búfer de KCl 0.2 M – HCl 0.2 M a pH=2.

Después se llevó a cabo la reacción entre el Ketoconazol S.R. y un exceso de ABF. Se observó la formación de un precipitado de color naranja, el cuál fue separado por filtración a gravedad empleando papel filtro Whatman No. 1, el sólido retenido contiene el complejo Ketoconazol-ABF. Se observó que el filtrado obtenido conservaba aún la coloración del ABF pero en menor intensidad. Al mismo tiempo se preparó un blanco.



Tabla 1. Evaluación del disolvente para solubilizar el ABF.

Disolvente	ml	mg de ABF	Capacidad de solubilización
Etanol	2	200	Muy rápida
Hidróxido de sodio 0.1 N	2	200	Rápida
Ácido clorhídrico 0.1 N	2	200	Nula
Agua	2	200	Nula

A continuación se realizó un barrido espectrofotométrico en un intervalo de longitud de onda de 400 a 650 nm a ambas soluciones (filtrado y blanco), ajustando previamente el instrumento con una solución búfer de KCl 0.2 M – HCl 0.2 M a pH=2.

No fue posible obtener una lectura de absorbancia apropiada debido a la deformación del máximo de la banda de absorción, por tal motivo fue necesario diluir el blanco y el filtrado (1/10).

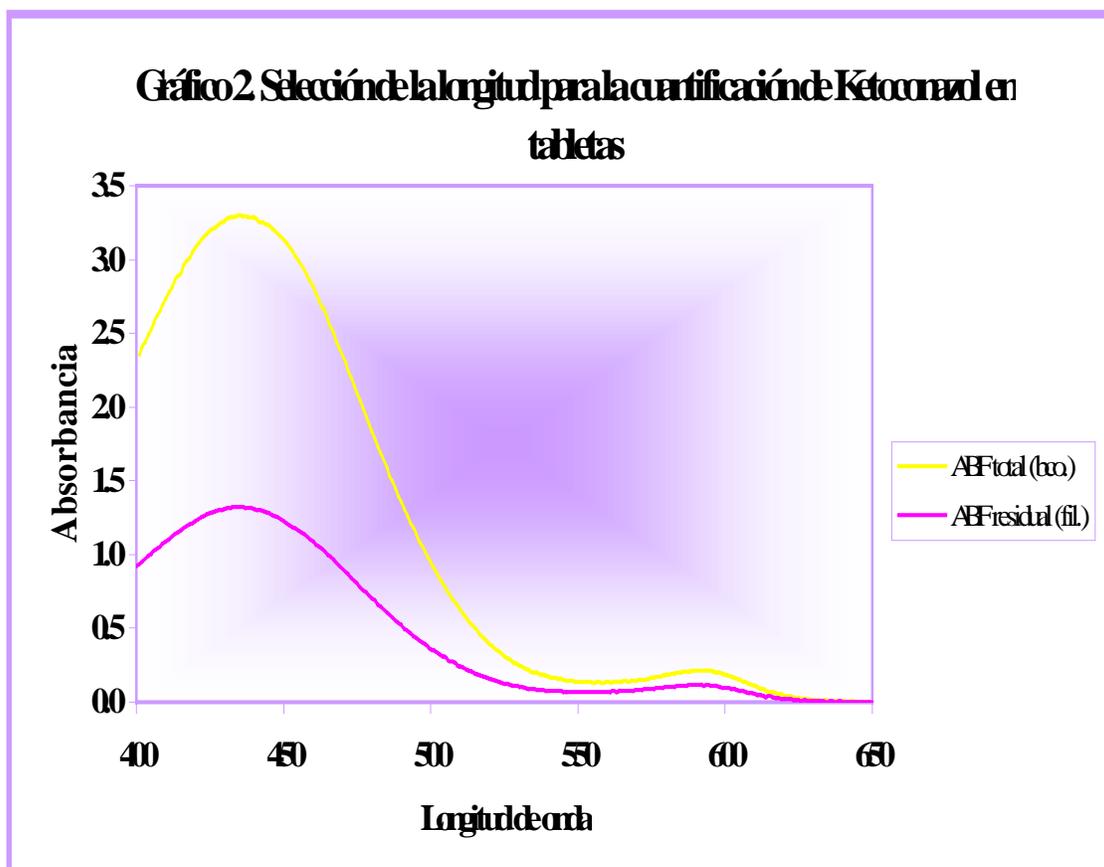
Se realizó nuevamente el barrido a estas soluciones en el intervalo de longitud de onda antes mencionado, el máximo de absorción se presentó a 436 nm (ver gráfico 2). Las respuestas analíticas indican que el filtrado contiene el ABF que queda libre en la reacción y el blanco posee el ABF total.

La reacción química llevada a cabo entre el Ket. y ABF en medio ácido es la siguiente:



Al relacionar la lectura de absorbancia del blanco y del filtrado mediante una diferencia se puede conocer la cantidad de ABF que reaccionó y asociarlo de manera indirecta a la cantidad de Ketoconazol que interviene en la reacción. Esto se muestra en los siguientes puntos:

1. Abs. ABF (bco.) – Abs. ABF residual (std.) = Abs. ABF reaccionó (std.).
2. Abs. ABF (bco.) – Abs. ABF residual (mtra.) = Abs. ABF reaccionó (mtra.).
3. Abs. ABF (mtra.) / Abs. ABF (std.) * W std. / W mtra. * W prom. de las tabletas. = mg de Ketoconazol / tableta.

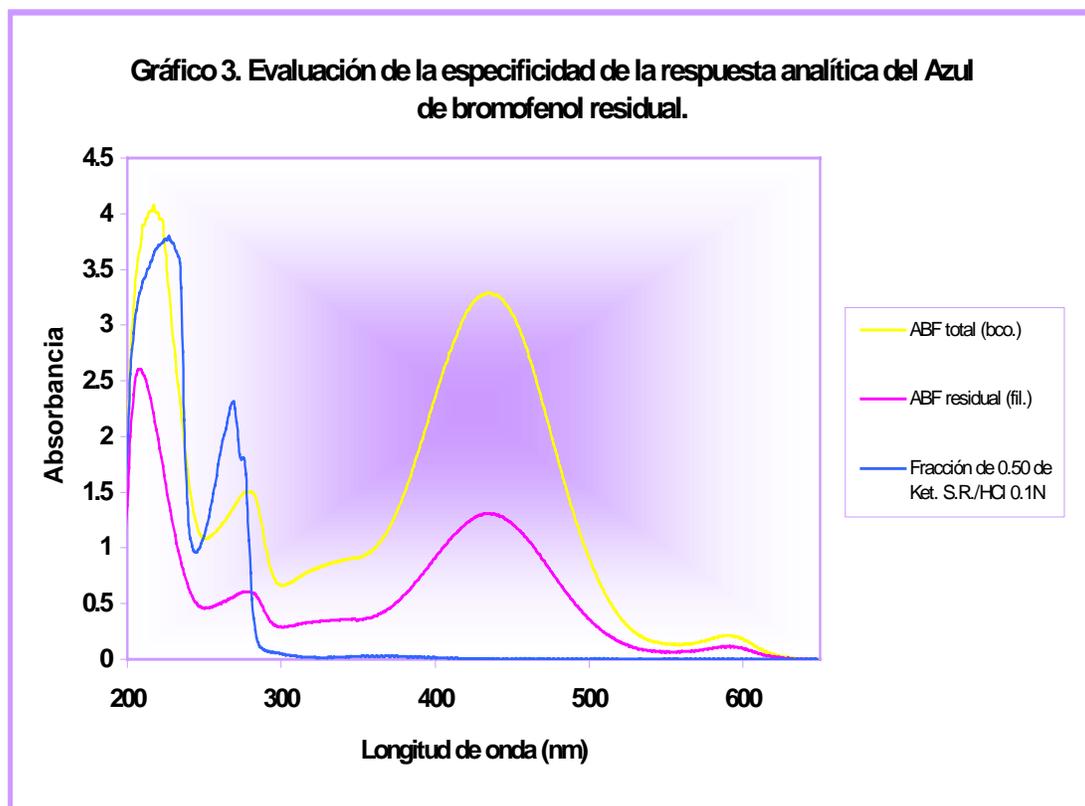


Posteriormente se evaluó la especificidad de la respuesta analítica del ABF residual y para ello se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución que contiene la fracción de 0.50 de Ketoconazol S.R. en HCl 0.1 N correspondiente a una concentración de 1.328 mg/ml.
- Solución blanco (dilución 1/10) que contiene el ABF total.
- Filtrado (dilución 1/10) correspondiente a la fracción de 0.50 de Ketoconazol S.R.

A estas soluciones se les realizó un barrido espectrofotométrico de 200 a 650 nm. El perfil de la respuesta analítica del filtrado que representa la fracción 0.50 de Ketoconazol S.R. y el blanco es igual, mientras que la banda de absorción de la solución de Ketoconazol en HCl 0.1 N presenta un máximo de absorción a 269 nm.

Esto prueba que no existe interferencia por parte del Ketoconazol a la longitud de onda seleccionada (436 nm) y se asegura que la respuesta analítica es adjudicada específicamente al ABF residual (ver gráfico 3).



Como se depende estrictamente de la respuesta analítica del ABF residual, es importante verificar la linealidad para asegurar que no se origine una desviación en la ley de Lambert-Beer, lo cuál pueda afectar la cuantificación. Por consiguiente se realizó una curva de calibración del ABF en un intervalo de concentración de 12 a 60 $\mu\text{g/ml}$ para demostrar que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración. En la tabla 2 se muestra la normalización de los datos así como los parámetros estadísticos obtenidos.

Tabla 2. Normalización de los datos.

Conc. de ABF ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia (Abs.)	Abs/Conc.
12.13	0.4683	0.03861
12.13	0.4708	0.03881
12.13	0.4713	0.03885
24.26	0.9396	0.03873
24.26	0.9351	0.03854
24.26	0.9406	0.03877


Tabla 2. Normalización de los datos (continuación)•

Conc. de ABF ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia (Abs.)	Abs/Conc.
36.39	1.4081	0.03869
36.39	1.4161	0.03891
36.39	1.3984	0.03842
48.52	1.864	0.03841
48.52	1.865	0.03844
48.52	1.8697	0.03853
60.65	2.3175	0.03821
60.65	2.3368	0.03853
60.65	2.3316	0.03844
	Promedio (\bar{x})=	0.03859
	Desv. Std. (s)=	0.00020
	Coef. de var. (c.v.)=	0.50949

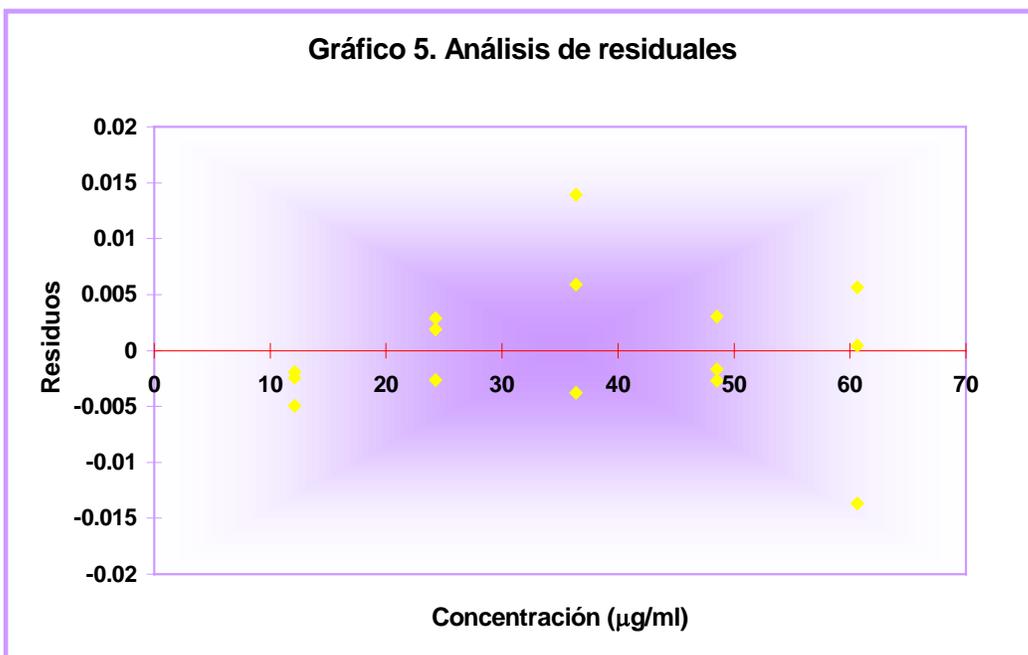
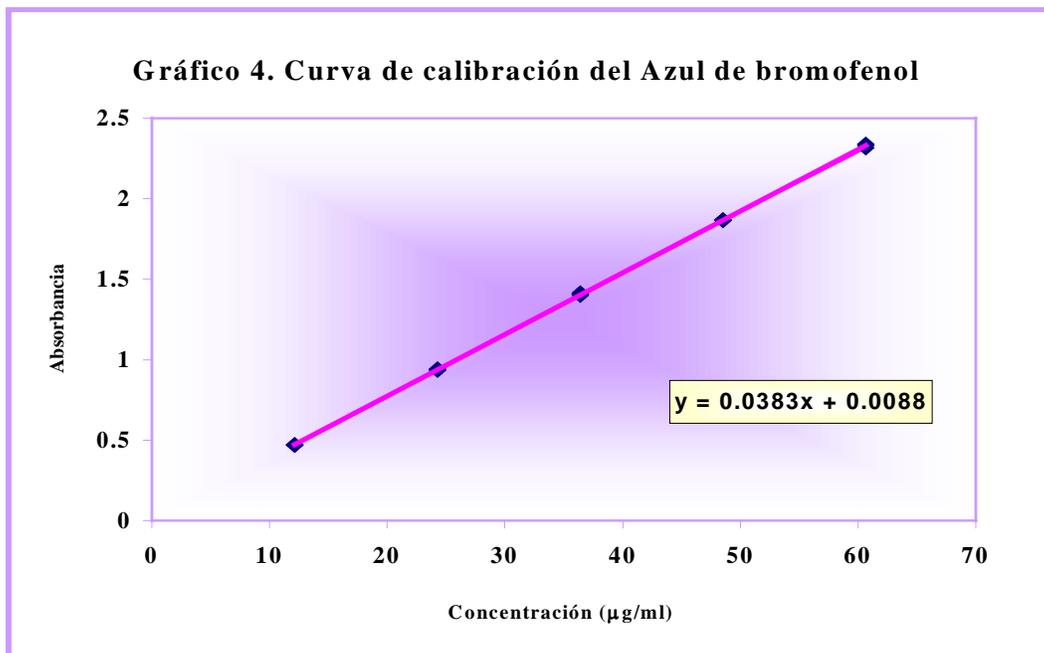
En el análisis de regresión se obtuvo los siguientes resultados (ver tabla 3).

Tabla 3. Análisis de regresión

Parámetro	Resultado
Pendiente (m)=	0.03829
Intercepto (b)=	0.00875
Coef. de correlación (r)=	0.99995
Coef. de determinación (r^2)=	0.99992
r^2 ajustada=	0.99991
Desv. Std. de la pendiente=	9.63761E-05
Desv. Std. del intercepto=	0.00039
Intervalo de confianza al 95% (m)=	0.03808-0.03850
Intervalo de confianza al 95% (b)=	0.00038-0.01713

Los resultados del análisis de regresión indican que el ABF tiene una tendencia lineal en el intervalo de concentración propuesto (ver gráfico 4).

En el gráfico 5 se observa que los puntos están dispersos de una manera aleatoria alrededor del valor de cero, esto indica que la relación entre la concentración y absorbancia es lineal.

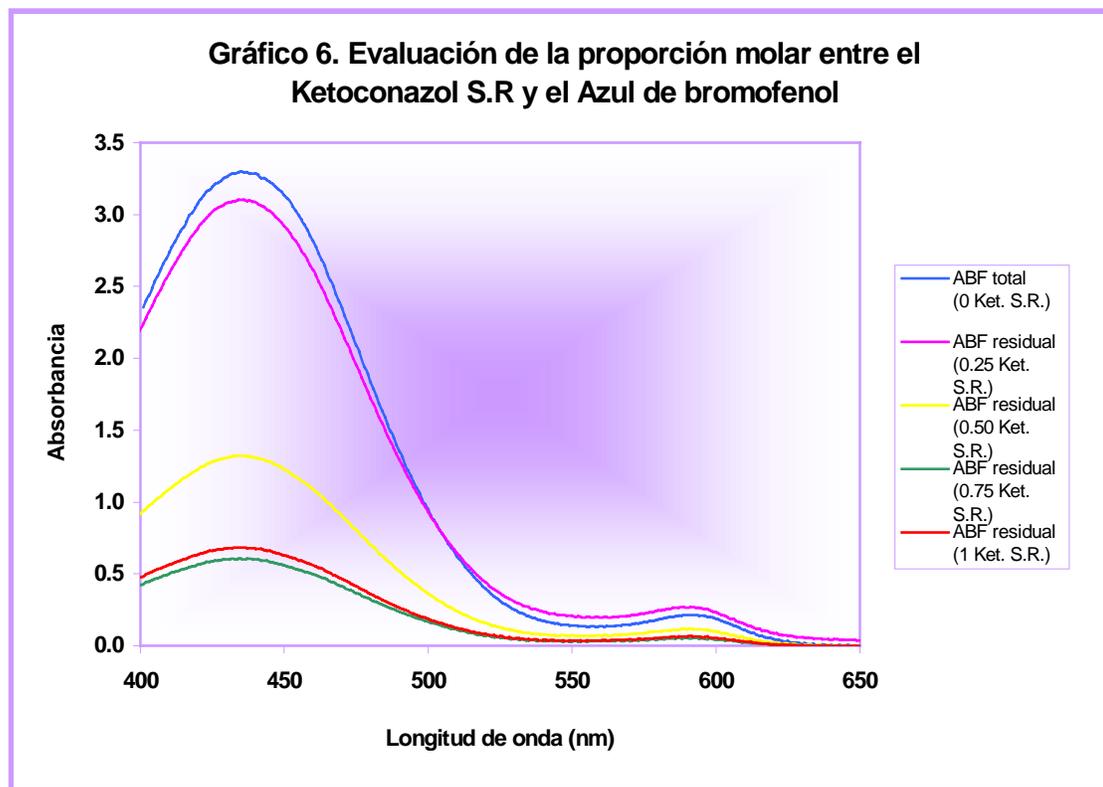


Posteriormente se determinó la fracción de Ketoconazol necesaria para que reaccione estequiométricamente con el ABF, se aplicó el método de proporción molar que consiste en preparar un sistema que contiene una serie de soluciones en las cuales se mantiene constante el número de mmoles de ABF mientras que las correspondientes al Ketoconazol S.R. varían (ver tabla 4).

Tabla 4. Proporción molar de Ketoconazol S.R. y ABF.

Fracción de Ket. S.R.	Mmoles de Ket. S.R.	M de Ket.	Mmoles de ABF	M de ABF
0	0	0	0.01500	0.003
0.25	0.00375	0.00125	0.01500	0.003
0.50	0.00750	0.00250	0.01500	0.003
0.75	0.01125	0.00375	0.01500	0.003
1	0.01500	0.00500	0.01500	0.003

Las respuestas analíticas fueron proporcionales hasta la fracción de 0.50 de Ketoconazol S.R. en un intervalo de 400 a 650 nm. Posterior a ésta fracción se origina un cambio en la estequiometría de la reacción (ver gráfico 6).

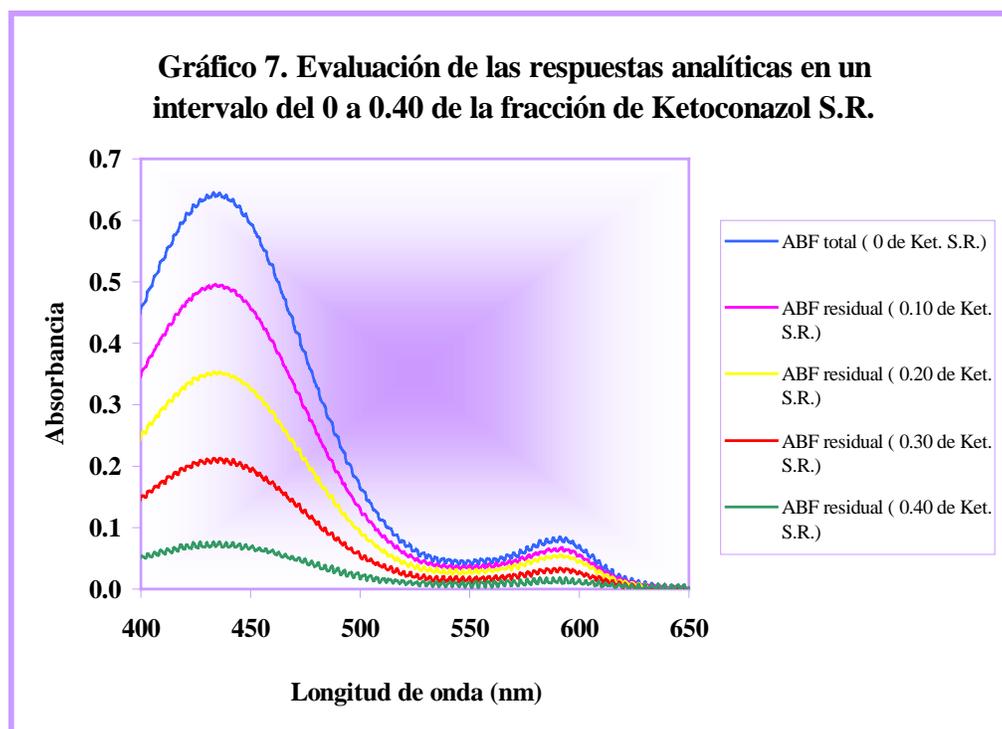


De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo anterior se decide estudiar el intervalo de 0 a 0.40 de la fracción de Ketoconazol S.R. para determinar si en esta región la estequiometría de la reacción es la misma (ver tabla 5).

Tabla 5. Evaluación de la proporción molar de Ketoconazol S.R. y ABF.

Fracción de Ket. S.R.	Mmoles de Ket. S.R.	M de Ket.	Mmoles de ABF	M de ABF
0	0	0	0.015	0.003
0.10	0.003	0.003	0.015	0.003
0.20	0.006	0.006	0.015	0.003
0.30	0.009	0.009	0.015	0.003
0.40	0.012	0.012	0.015	0.003

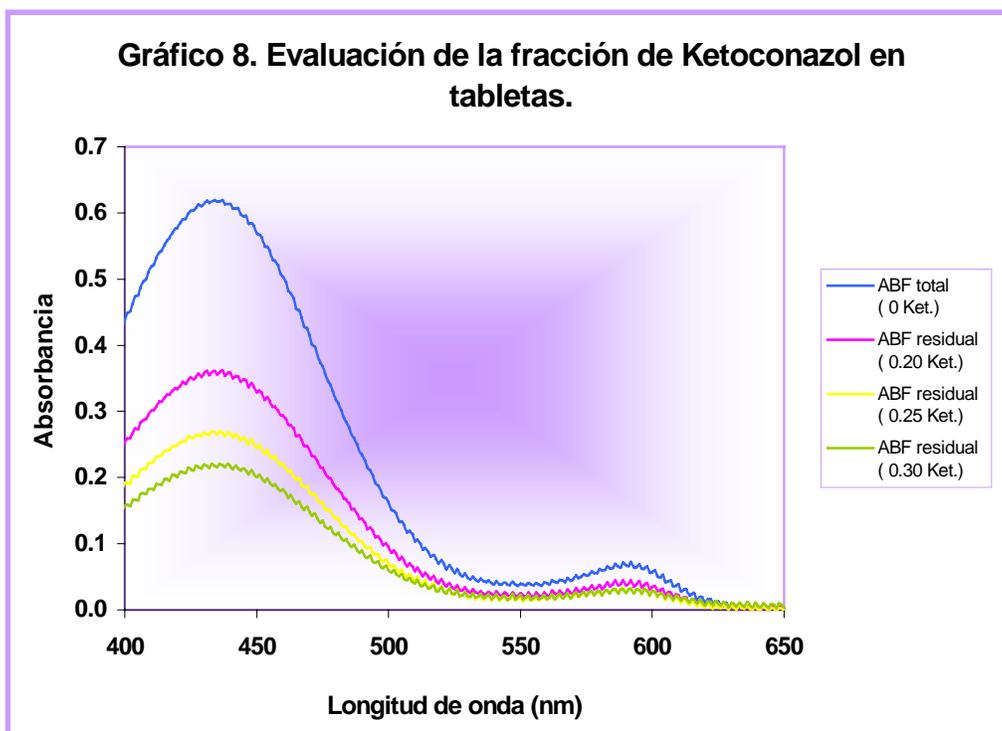
Las respuestas analíticas fueron proporcionales a la fracción de Ketoconazol S.R. en el intervalo propuesto y se determina que en esta zona la estequiometría de la reacción es la misma (ver gráfico 7).



Una vez establecida la región en donde la estequiometría de la reacción es la misma, se procedió a realizar un ensayo considerando el intervalo de 0 a 0.40 de la fracción de Ketoconazol ahora en tabletas con la finalidad de demostrar que la presencia de los



excipientes contenidos en la formulación no influyen sobre la proporcionalidad entre la respuesta analítica y la fracción del principio activo (ver gráfico 8).



De acuerdo a la determinación anterior se seleccionó la fracción de 0.25, la cuál corresponde a 40 mg de Ketoconazol ya que se consideró que la cantidad de ABF residual proporciona una respuesta analítica adecuada.

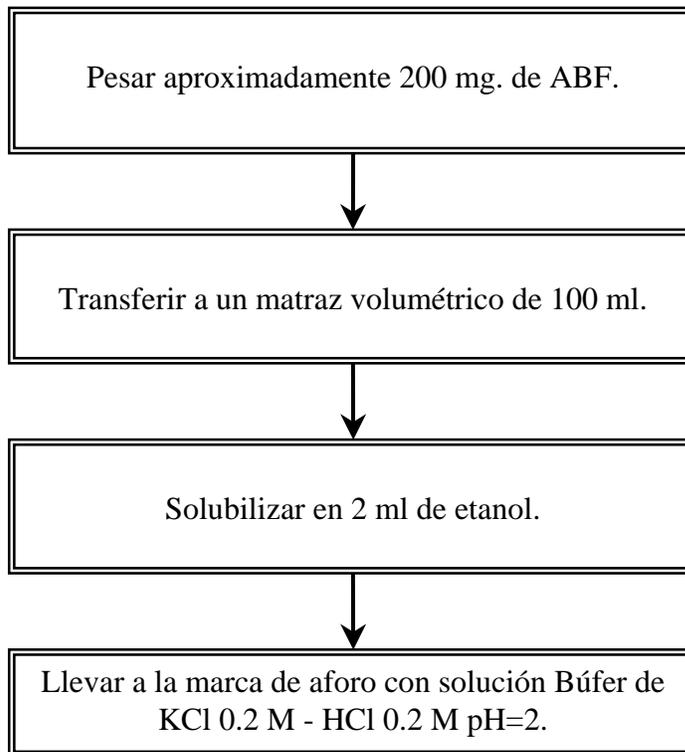
Una vez establecida la fracción de Ketoconazol, se llevó a cabo su cuantificación en las tabletas por triplicado. Se evaluaron los siguientes parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar y coeficiente de variación con la finalidad de determinar si las condiciones propuestas en el procedimiento analítico son las adecuadas (ver diagrama 1).

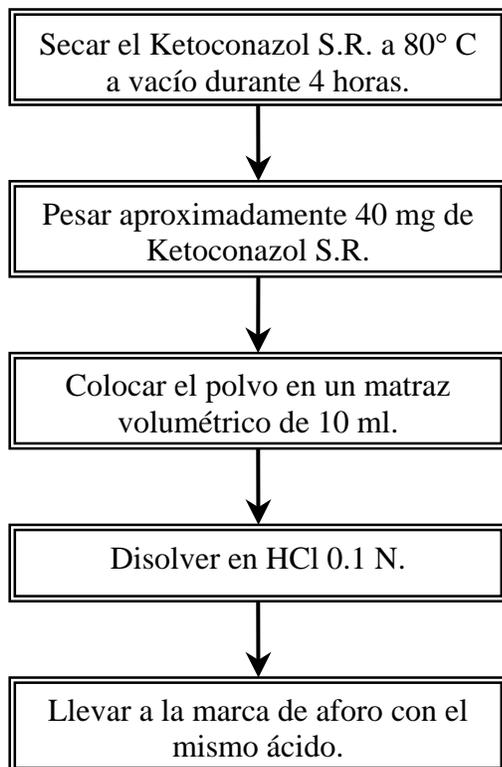
Se recuperó en promedio 187.58 mg de Ketoconazol/tableta que corresponden al 93.79 %. El resultado analítico obtenido está dentro de la especificación de la USP 26 (del 90 al 110 % de principio activo). El coeficiente de variación para esta determinación fue del 4.27 %. Este valor no cumple con la especificación establecida para los métodos espectrofotométricos (≤ 2 %).

Ante tal situación se modifican algunas condiciones en el procedimiento analítico propuesto (ver tabla 6).

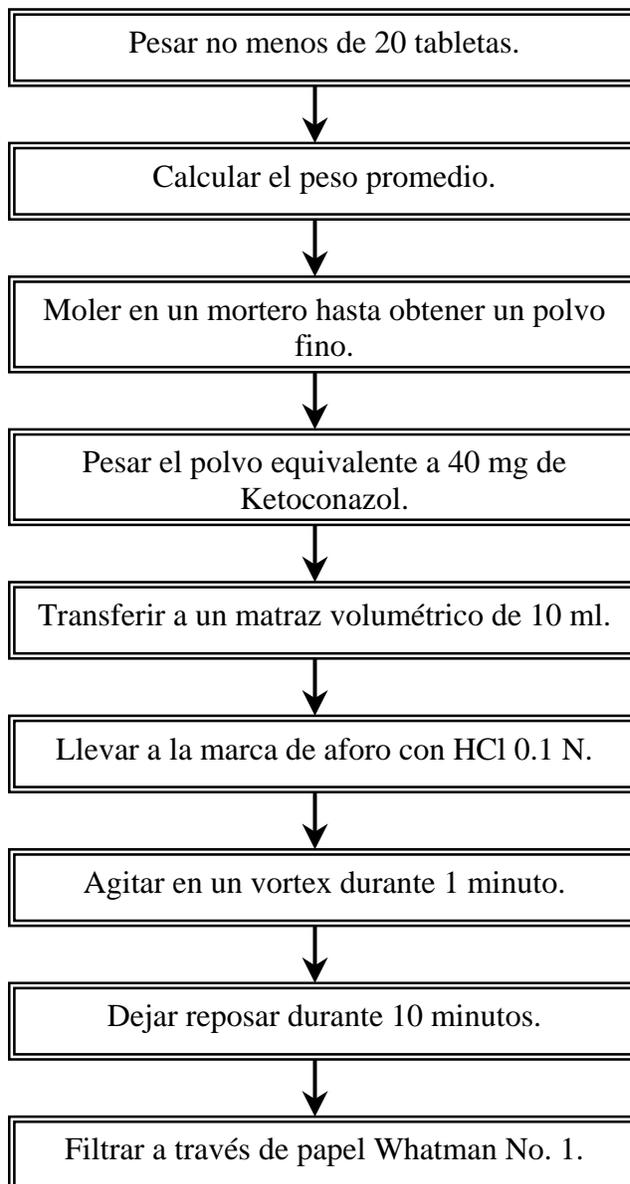
DIAGRAMA 1. MÉTODO INICIAL.

1. Preparación del Azul de bromofenol al 0.2 % (pH=2).



**DIAGRAMA 1. MÉTODO INICIAL (continuación).****2. Preparación de la solución del estándar de Ketoconazol.**

Concentración final: 4 mg/ ml de Ket.

3. Preparación de la muestra.

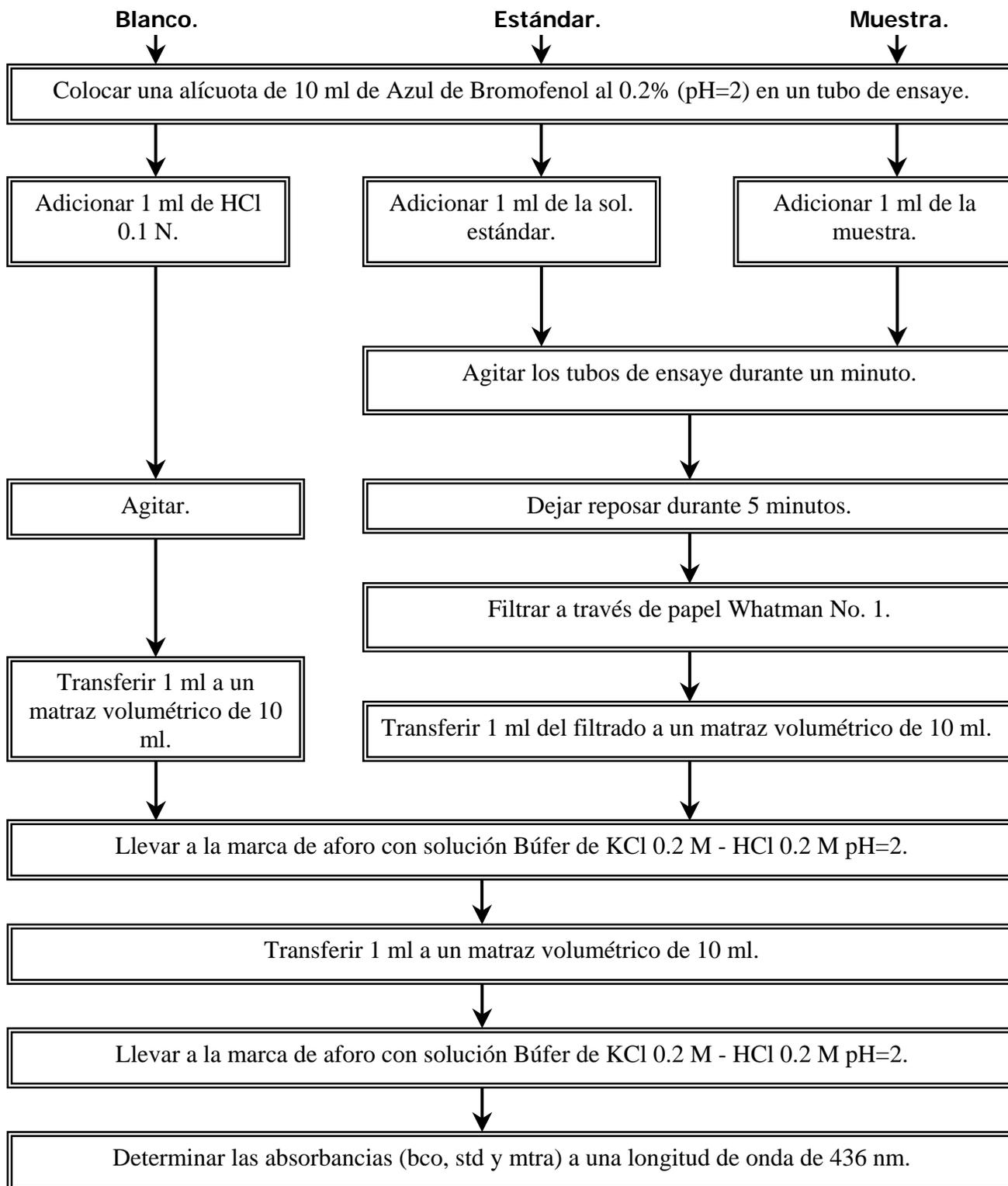
**DIAGRAMA 1. MÉTODO INICIAL (continuación).****4. Cuantificación de Ketoconazol en tabletas.**



Tabla 6. Modificaciones realizadas al procedimiento analítico propuesto inicialmente (ver diagrama 1).

Mod.	Preparación del ABF	Preparación de la solución estándar	Preparación de la muestra	Cuantificación de Ketoconazol en tabletas.
1	_____	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar aprox. 50 mg de Ket. S.R. • Colocar el polvo en un matraz vol. de 25 ml. • Adicionar 2 ml de etanol. • Dejar reposar durante 3 minutos. • Adicionar 20 ml de HCl 0.1 N. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar el polvo equivalente a 50 mg de Ket. • Transferir a un matraz vol. de 25 ml. • Adicionar 2 ml de etanol. • Dejar reposar durante 3 minutos. • Adicionar 20 ml de HCl 0.1 N. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 2 ml de HCl 0.1 N, 2 ml de la sol. std de Ket. y 2 ml de la mtra a los tubos de ensaye etiquetados como bco, std y mtra respectivamente, los cuales contienen previamente ABF. • Después de agitar los tubos de ensaye, dejar reposar durante 3 minutos.
2	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar aprox. 100 mg de ABF. 	_____	_____	<ul style="list-style-type: none"> • Colocar una alícuota de 10 ml de ABF al 0.1 % (pH=2) en un tubo de ensaye. • Filtrar a través de papel Whatman No. 42. • Transferir una alícuota de 2 ml de la sol. que contiene ABF-HCl 0.1 N así como 2 ml del filtrado perteneciente al std y la mtra a matraces volumétricos de 25 ml etiquetados como bco, std y mtra respectivamente.
3	_____	<ul style="list-style-type: none"> • Colocar el polvo en un matraz vol. de 50 ml. 	<ul style="list-style-type: none"> • Transferir el polvo a un matraz vol. de 50 ml. 	<ul style="list-style-type: none"> • Transferir una alícuota de 2 ml de la sol. que contiene ABF-HCl 0.1 N así como 2 ml del filtrado perteneciente al std y la mtra a matraces vol. de 50 ml etiquetados como bco, std y mtra respectivamente.



Tabla 6. Modificaciones realizadas al procedimiento analítico propuesto inicialmente (ver diagrama 1). continuación

Mod.	Comentarios	Resultados
1	<ul style="list-style-type: none"> • La integración de estos pasos al procedimiento analítico permite asegurar que el Ketoconazol está completamente disuelto. • Se mantiene constante la proporción molar establecida en la reacción. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se recuperó en promedio 198.15 mg de Ketoconazol/tableta, con un coeficiente de variación de 4.84 %. Este último indica una elevada dispersión entre los resultados analíticos, sin embargo con los cambios que se realizaron al procedimiento se logró recuperar mayor cantidad del principio activo contenido en las tabletas con respecto al ensayo anterior (187.58 mg de Ketoconazol/tableta).
2	<ul style="list-style-type: none"> • Debido a que el coeficiente de variación obtenido en el ensayo anterior no está dentro de la especificación establecida para métodos espectrofotométricos, se decide cambiar el procedimiento específicamente en la parte correspondiente a la formación del precipitado. • En la parte de la cuantificación de Ket. en tabletas se aumenta el volumen final de aforo y se elimina la última dilución para disminuir los errores aleatorios presentes durante esta etapa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Considerando las nuevas condiciones experimentales se realizó un ensayo, en el cual se recuperó en promedio 198.72 mg de Ketoconazol/tableta, con un coeficiente de variación de 3.51 %. • El principio activo recuperado en este análisis presenta una mínima variación con respecto a la última determinación, esto indica que los cambios realizados al procedimiento analítico no influyen drásticamente sobre la recuperación del Ketoconazol en las tabletas. • Por otra parte el coeficiente de variación disminuye en 1.33 % (del 4.84 a 3.51 %).
3	<ul style="list-style-type: none"> • Se realizaron algunas modificaciones al método con el objeto de minimizar los errores aleatorios presentes al momento de llevar a cabo las diluciones. 	<ul style="list-style-type: none"> • Con estas modificaciones se logro recuperar 200.99 mg de Ketoconazol/tableta en promedio y se obtuvo un coeficiente de variación del 3.42 %, este último aún no cumple con la especificación establecida para los métodos espectrofotométricos.



Debido a la alta variabilidad de los resultados analíticos se decide optimizar el procedimiento propuesto para minimizar los errores aleatorios presentes durante la determinación, cabe mencionar que se estudió el efecto de cada variable a la vez.

5. Optimización del método analítico.

A continuación se listan los factores que fueron evaluados:

- Tiempo de agitación de la muestra que contiene el principio activo y los excipientes en HCl 0.1 N.
- Proceso de filtración de la muestra que contiene el principio activo y los excipientes en HCl 0.1 N.
- Forma de agitación de los tubos de ensaye que contienen el ABF-HCl, ABF-std y ABF-mtra.
- Tiempo de reposo del precipitado.
- Temperatura de formación del precipitado.
- Concentración de la muestra a analizar.
- Amortiguamiento del sistema con un búfer de KCl 0.2 M - HCl 0.2 M pH=2.
- Concentración del Azul de bromofenol.

El primer factor estudiado fue el tiempo de agitación de la muestra que contiene el principio activo y los excipientes; debido a esta cualidad es importante asegurar que el Ketoconazol esté completamente disuelto en el HCl 0.1 N (ver tabla 7).

Tabla 7. Tiempo de agitación de la muestra en HCl 0.1 N.

Tiempo de agitación	1 min.	3 min.	5 min.
Muestra	mg. de Ket./tableta	mg de Ket./tableta	mg de Ket./tableta
1	191.90	204.19	198.07
2	192.68	189.59	199.33
3	200.64	198.18	185.09
Promedio (\bar{x})=	195.07	197.32	194.16
Desv. Std (s)=	4.84	7.34	7.88
Varianza (s^2)=	23.39	53.84	62.14
Coef. de var.=	2.48 %	3.72 %	4.06 %


Tabla 8. Análisis de varianza de un factor

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	15.8401	2	7.9201	0.1705	0.8472	5.1432
Dentro de los grupos	278.7571	6	46.4595			
Total	294.5973	8				

Conforme a los resultados obtenidos en la tabla 7, se puede observar que cuando se agita la muestra preparada en HCl 0.1 N durante tres minutos se recupera más cantidad del principio activo con respecto a los otros tiempos.

Para determinar si existe una diferencia significativa entre los promedios obtenidos, se realizó un análisis de varianza de un factor ⁽³⁰⁾ (ver tabla 8). El valor de la F crítica (5.1432) es mayor que la F calculada (0.1705), lo cuál indica que no existe diferencia entre las medias correspondientes a los diferentes tiempos de agitación.

Por lo tanto se considera establecer en el procedimiento analítico agitar la muestra en HCl 0.1 N durante tres minutos.

El segundo factor evaluado es el proceso de filtración de la muestra que contiene el principio activo y los excipientes en HCl 0.1 N.

La relación entre los resultados analíticos mejoró notablemente cuando se utiliza la muestra sin filtrar, lo cual se refleja en el coeficiente de variación obtenido (ver tabla 9).

Tabla 9. Evaluación del proceso de filtración de la muestra en HCl 0.1 N.

Muestra	Sin filtrar (mg de Ket./tableta)	Filtrada (mg de Ket./tableta)
1	210.56	224.69
2	201.68	209.63
3	203.90	219.54
Promedio (\bar{x})=	205.38	217.95
Desv. Std (s)=	4.62	7.65
Coef. de var.=	2.25 %	3.51 %



Por otro lado se llevó a cabo un análisis de comparación de medias aplicado a dos condiciones experimentales ⁽³⁰⁾, el resultado indica que no hay diferencia entre ellas ya que el valor crítico de t (2.7765) es mayor que la t calculada (-2.4356) (ver tabla 10).

Tabla 10. Comparación de medias.

Parámetros estadísticos	Mtra. s/filtrar	Mtra. filtrada
Media	205.38	217.95
Varianza	21.3564	58.5890
Observaciones	3	
Varianza agrupada	39.9727	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-2.4356	
P (T<=t) dos colas	0.0715	
Valor crítico de t (dos colas)	2.7765	

De acuerdo a lo antes mencionado, se establece emplear la muestra directamente sin necesidad de filtrar previamente.

Para definir la forma de agitación de los tubos de ensaye etiquetados como bco, std y mtra, los cuales contienen respectivamente ABF-HCl, ABF-std y ABF-mtra, se analizaron dos maneras: la agitación manual y en vortex. Al mismo tiempo se evaluaron los siguientes tiempos de reposo para el precipitado resultante: 3, 5 y 10 minutos para cada modo de agitación.

En la tabla 11 y 12 se muestran los resultados analíticos obtenidos al agitar manualmente los tubos de ensaye así como el análisis de varianza de un factor realizado respectivamente.

Por otra parte en la tabla 13 y 14 aparecen los resultados analíticos correspondientes a la agitación en vortex, asimismo se presenta el análisis de varianza de un factor.

En la agitación manual se obtiene una F crítica de 5.1432, este valor es mayor con respecto a la F calculada (1.1082), mientras que para la agitación en vortex se tiene una F crítica de 5.1432, dicho valor es mayor que la F calculada (0.3325). En ambas condiciones el análisis estadístico indica que no existe diferencia entre las medias obtenidas para cada tiempo de reposo.



Tabla 11. Agitación manual de los tubos de ensaye que contienen ABF-HCl, ABF-std y ABF-mtra.

Tiempo de reposo	3 minutos.	5 minutos.	10 minutos.
Muestra	mg de Ket./tableta	mg de Ket./tableta	mg de Ket./tableta
1	184.03	181.17	189.65
2	196.97	190.45	201.85
3	195.38	195.50	201.02
Promedio (\bar{x})=	192.13	189.04	197.50
Desv. Std. (s)=	7.06	7.27	6.82
Varianza (s^2)=	49.80	52.83	46.47
Coef. de var.=	3.67 %	3.84 %	3.45 %

Tabla12. Análisis de varianza de un factor

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	110.1563	2	55.0782	1.1082	0.3894	5.1432
Dentro de los grupos	298.1899	6	49.6983			
Total	408.3463	8				

Tabla 13. Agitación en vortex de los tubos de ensaye que contienen ABF-HCl, ABF-std y ABF-mtra.

Tiempo de reposo	3 minutos.	5 minutos.	10 minutos.
Muestra	mg de Ket./tableta	mg de Ket./tableta	mg de Ket./tableta
1	190.68	187.42	178.48
2	189.19	195.02	194.64
3	196.95	193.45	192.74
Promedio (\bar{x})=	192.27	191.96	188.62
Desv. Std. (s)=	4.11	4.01	8.83
Varianza (s^2)=	16.96	16.09	78.02
Coef. de var.=	2.14 %	2.09 %	4.68 %



Tabla 14. Análisis de varianza de un factor

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	24.6208	2	12.3104	0.3325	0.7295	5.1432
Dentro de los grupos	222.1465	6	37.0244			
Total	246.7673	8				

Con relación a la agitación manual los coeficientes de variación para los tres tiempos de reposo están elevados en comparación con los obtenidos en la agitación en vortex, por lo tanto se descarta esta forma de agitación para ser incorporada en el procedimiento analítico.

Debido a que no hay diferencias significativas entre los promedios de Ketoconazol recuperado por tableta al utilizar el vortex para los diferentes tiempos, se establece dejar reposar el precipitado formado durante cinco minutos ya que presenta un coeficiente de variación menor con respecto a los demás.

La temperatura es una variable experimental que influye sobre el tamaño de las partículas de los sólidos formados durante la precipitación. Por tal motivo se analiza el efecto que esta pueda ejercer sobre la cuantificación de Ketoconazol en las tabletas. La formación del precipitado se lleva a cabo a temperatura ambiente y en un baño de hielo, cada aspecto se evaluó por sextuplicado.

Conforme a los resultados presentados en la tabla 15 y 16, se establece formar el precipitado a temperatura ambiente debido a que en el análisis de comparación de medias se obtuvo un valor crítico de t de 2.2281, el cuál es mayor con respecto a la t calculada (0.1946), lo cuál indica que la temperatura no influye sobre la recuperación del principio activo y los coeficientes de variación entre las dos condiciones cumplen con la especificación reportada para métodos espectrofotométricos.

A continuación se decide evaluar el efecto de la concentración del Ketoconazol sobre la cuantificación. Se prepararon dos soluciones de concentraciones de 0.74 y 1 mg/ml del principio activo respectivamente (ver tabla 17).

Tabla 15. Influencia de la temperatura sobre la cuantificación de Ketoconazol en las tabletas.

Temperatura	Ambiente (25 °C)	Baño de hielo (4 °C)
Muestra	mg de Ket./tableta	mg de Ket./tableta
1	200.48	196.96
2	199.94	200.28
3	191.85	197.33
4	197.00	199.51
5	202.18	200.78
6	200.42	194.93
Promedio (\bar{x})=	198.64	198.30
Desv. Std. (s)=	3.73	2.26
Varianza (s^2)=	13.91	5.12
Coef. de var.=	1.88 %	1.14 %

Tabla 16. Comparación de medias.

Parámetros estadísticos	Ambiente (25 °C)	Baño de hielo (4 °C)
Media	198.64	198.30
Varianza	13.9138	5.1256
Observaciones	6	6
Varianza agrupada	9.5197	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	0.1946	
P (T<=t) dos colas	0.8496	
Valor crítico de t (dos colas)	2.2281	



Tabla 17. Efecto de la concentración de la muestra sobre la cuantificación del principio activo.

Conc. de Ket.	0.74 mg/ml	1 mg/ml
Muestra	mg de Ket./tableta	mg de Ket./tableta
1	203.30	197.22
2	201.04	202.67
3	205.65	201.10
Promedio (\bar{x})=	203.33	200.33
Desv. Std. (s)=	2.30	2.81
Coef. de var.=	1.13 %	1.40 %

Conjuntamente se llevó a cabo un análisis de comparación de medias aplicando la prueba de t (ver tabla 18).

Tabla 18. Comparación de medias.

Parámetros estadísticos	Conc. (0.74 mg/ml)	Conc. (1 mg/ml)
Media	203.33	200.33
Varianza	5.3137	7.8703
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	6.592	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1.4311	
P (T<=t) dos colas	0.2256	
Valor crítico de t (dos colas)	2.7764	

De acuerdo a la tabla 17 se observó que cuando se modifica la concentración del principio activo a 0.74 mg/ml se recupera más Ketoconazol (203.33 mg), debido a que la cantidad de ABF libre en la reacción es mayor.

En el análisis de comparación de medias, el valor de t calculada (1.4311) es menor con respecto al valor crítico de t (2.7764), por lo tanto no hay efecto de la concentración sobre la recuperación del principio activo en las tabletas. De tal forma que se decidió establecer



en el procedimiento analítico preparar el estándar y la muestra a una concentración de 0.74 mg/ml de Ketoconazol.

Hasta aquí se utilizaron las tabletas proporcionadas por un laboratorio farmacéutico. Se desconoce la cantidad exacta de principio activo que adicionaron para su fabricación, para controlar esta variable se decidió elaborar mezclas físicas. La preparación de éstas se llevó a cabo conforme a lo establecido en la formulación considerando las cantidades establecidas tanto de principio activo como de excipientes. De acuerdo a esto se varió la cantidad de Ketoconazol (160, 180, 190, 200 y 220 mg) para dar origen a mezclas físicas correspondientes al 80, 90, 95, 100 y 110 % de contenido de principio activo guardando la relación entre los excipientes para obtener un peso final de una tableta de 350 mg.

Una vez elaboradas las mezclas físicas se realizó una determinación para cuantificar el Ketoconazol presente en ellas, se decide amortiguar todo el sistema mediante el empleo de un buffer de KCl 0.2 M – HCl 0.2 M pH=2 con la finalidad de garantizar que la especie de Ketoconazol que interviene en la reacción siempre sea la misma (H_2Ket^+).

Tabla 19. Cuantificación de Ketoconazol en mezclas físicas.

Mezcla física (%)	Ensayo	Ketoconazol adicionado (mg)	Ketoconazol recuperado (mg)	Parámetros estadísticos
80	1	160.01	160.74	$\bar{x} = 160.37$ s = 0.45 c.v. = 0.28 %
	2		160.49	
	3		159.87	
95	1	189.99	190.09	$\bar{x} = 191.17$ s = 1.27 c.v. = 0.67 %
	2		190.86	
	3		192.57	
100	1	200.09	197.85	$\bar{x} = 196.87$ s = 0.99 c.v. = 0.50 %
	2		195.86	
	3		196.90	
110	1	220.49	217.00	$\bar{x} = 216.48$ s = 1.04 c.v. = 0.48 %
	2		215.29	
	3		217.16	



En la tabla 19 se muestran los resultados analíticos obtenidos, el Ketoconazol recuperado en las mezclas físicas en promedio es similar a la cantidad adicionada.

Se establece utilizar el Búfer de KCl 0.2 M - HCl 0.2 M a pH= 2 para preparar el estándar y la muestra de Ketoconazol.

Se considera que hasta aquí la elección de las condiciones experimentales son las adecuadas y solamente queda por optimizar la concentración del Azul de bromofenol debido a que se modificó la concentración del Ketoconazol participante en la reacción.

Para llevar a cabo la optimización se utilizó mezclas físicas que contienen el 80, 95 y 110 % de Ketoconazol empleando diferentes concentraciones de ABF: 0.060, 0.0615, 0.063, 0.064 y 0.065 %, los resultados analíticos se muestran en las tablas 20, 21 y 22.

Tabla 20. Optimización de la concentración de ABF en la mezcla física correspondiente al 80 % de Ket.

Conc. de ABF (%)	mg de Ket. adic.	mg. de Ket. recup.	Parámetros estadísticos
0.060	160.01	159.65	$\bar{x} = 159.28$ $s = 0.90$ c.v. = 0.56 %
		159.94	
		158.26	
0.0615	160.01	158.38	$\bar{x} = 158.97$ $s = 0.74$ c.v. = 0.47 %
		159.81	
		158.74	
0.063	160.01	161.89	$\bar{x} = 163.11$ $s = 2.18$ c.v. = 1.34 %
		161.81	
		165.63	
0.064	160.01	163.56	$\bar{x} = 163.95$ $s = 1.45$ c.v. = 0.88 %
		162.74	
		165.56	
0.065	160.01	161.53	$\bar{x} = 162.42$ $s = 0.79$ c.v. = 0.48 %
		162.70	
		163.03	

Tabla 21. Optimización de la concentración de ABF en la mezcla física correspondiente al 95 % de Ket.

Conc. de ABF (%)	mg de Ket. adic.	mg. de Ket. recup.	Parámetros estadísticos
0.060	189.99	189.72	$\bar{x} = 189.19$ $s = 0.57$ c.v. = 0.30 %
		188.58	
		189.26	



Tabla 21. Optimización de la concentración de ABF en la mezcla física correspondiente al 95 % de Ket (continuación).

Conc. de ABF (%)	mg de Ket. adic.	mg. de Ket. recup.	Parámetros estadísticos
0.0615	189.99	188.66	$\bar{x} = 188.52$
		188.50	$s = 0.13$
		188.39	c.v. = 0.07 %
0.063	189.99	193.92	$\bar{x} = 195.37$
		195.71	$s = 1.31$
		196.48	c.v. = 0.67 %
0.064	189.99	197.75	$\bar{x} = 197.05$
		196.06	$s = 0.88$
		197.34	c.v. = 0.45 %
0.065	189.99	192.94	$\bar{x} = 193.00$
		192.53	$s = 0.49$
		193.51	c.v. = 0.25 %

Tabla 22. Optimización de la concentración de ABF en la mezcla física correspondiente al 110 % de Ket.

Conc. de ABF (%)	mg de Ket. adic.	mg. de Ket. recup.	Parámetros estadísticos
0.060	220.49	214.65	$\bar{x} = 214.36$
		214.36	$s = 0.28$
		214.08	c.v. = 0.13 %
0.0615	220.49	213.42	$\bar{x} = 213.30$
		213.16	$s = 0.13$
		213.33	c.v. = 0.06 %
0.063	220.49	221.60	$\bar{x} = 221.39$
		221.69	$s = 0.44$
		220.89	c.v. = 0.20 %
0.064	220.49	222.32	$\bar{x} = 222.34$
		222.67	$s = 0.32$
		222.02	c.v. = 0.15 %
0.065	220.49	216.34	$\bar{x} = 218.65$
		218.84	$s = 2.22$
		220.78	c.v. = 1.02 %

Se elige la concentración de ABF al 0.064 % debido a que la dispersión entre los resultados analíticos es mínima en las tres diferentes mezclas físicas utilizadas.

Con respecto al Ketoconazol recuperado en promedio en las mezclas físicas difiere de la cantidad adicionada, no obstante se considera que la concentración de ABF al 0.064 % es la adecuada y que a través de la validación del método analítico se determinará si la diferencia es estadísticamente significativa.



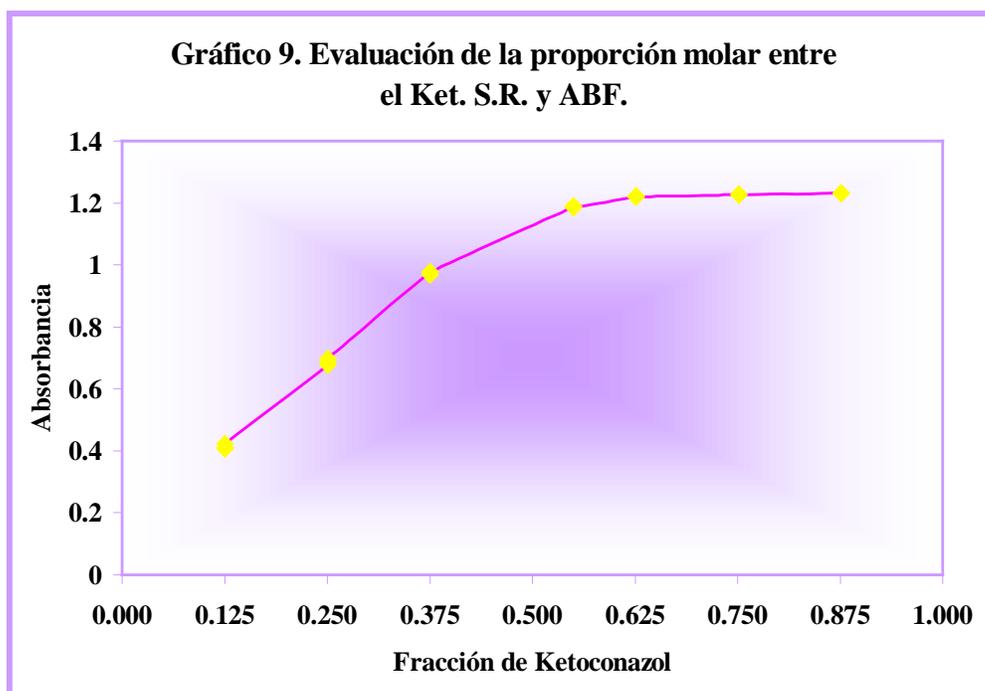
Hasta aquí se han modificado algunas condiciones experimentales, las cuales han sido mencionadas previamente, por tal motivo se requiere verificar nuevamente la estequiometría de la reacción aplicando el método de proporción molar (ver tabla 23).

En el gráfico 9 se puede observar que la estequiometría de la reacción entre el Ketoconazol S.R. y el Azul de bromofenol cambia a partir de la fracción de 0.375.

El análisis anterior confirma los resultados mencionados durante la elección de la fracción óptima de Ketoconazol S.R.

Tabla 23. Proporción molar de Ket. S.R. y ABF.

Fracción de Ket. S.R	Mmoles de Ket. S.R.	Mmoles de ABF	Absorbancia
0.125	0.00187	0.01500	0.4219
0.25	0.00375	0.01500	0.6984
0.375	0.00562	0.01500	0.9781
0.50	0.00750	0.01500	1.1841
0.625	0.00937	0.01500	1.2206
0.75	0.01125	0.01500	1.2271
0.875	0.01312	0.01500	1.2321

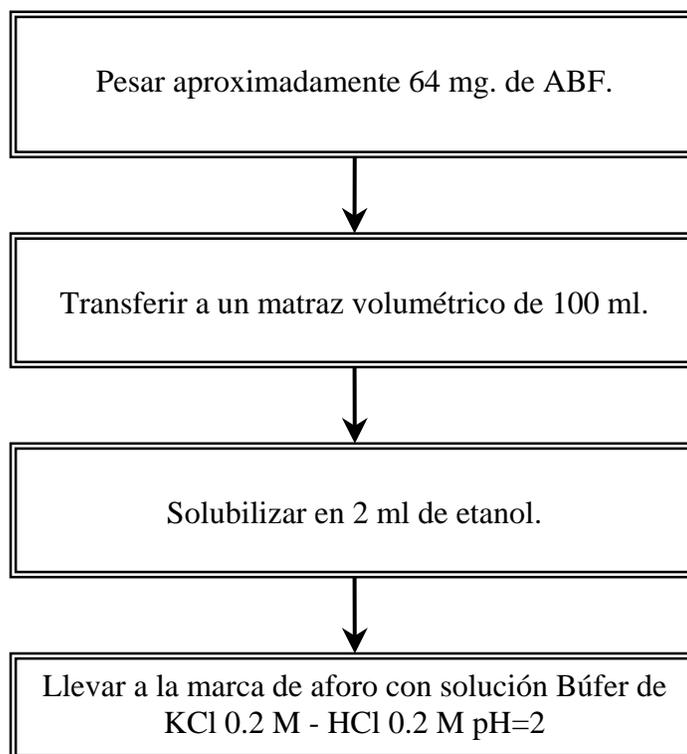


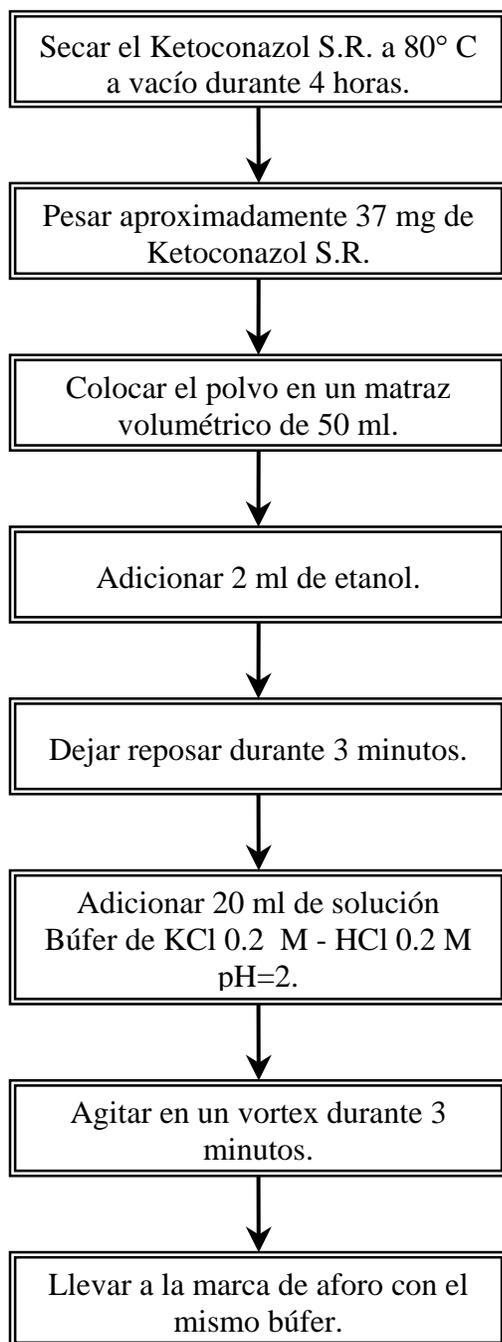


Cabe mencionar que el procedimiento analítico inicialmente desarrollado fue optimizado. Por lo tanto en el diagrama 2 se muestra el procedimiento final.

DIAGRAMA 2. MÉTODO FINAL.

1. Preparación del Azul de bromofenol al 0.064 % (pH=2).



**DIAGRAMA 2. MÉTODO FINAL (continuación).****2. Preparación de la solución del estándar de Ketoconazol.**

Concentración final: 0.74 mg/ml de Ket.

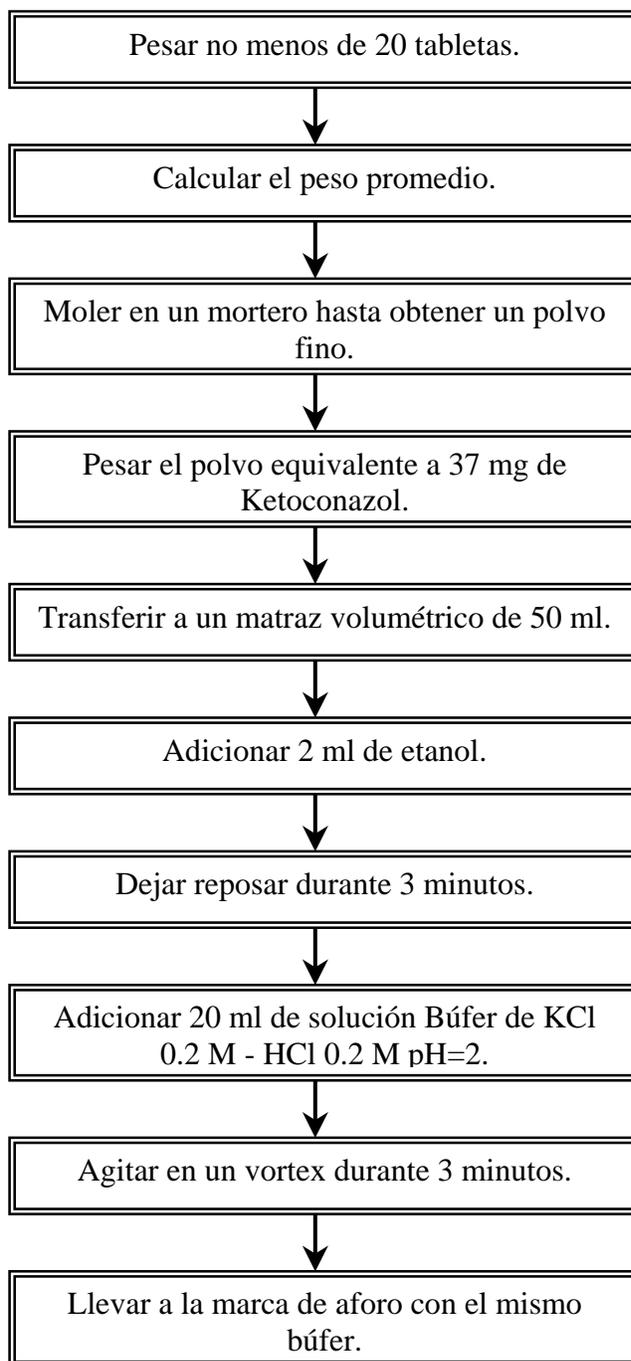
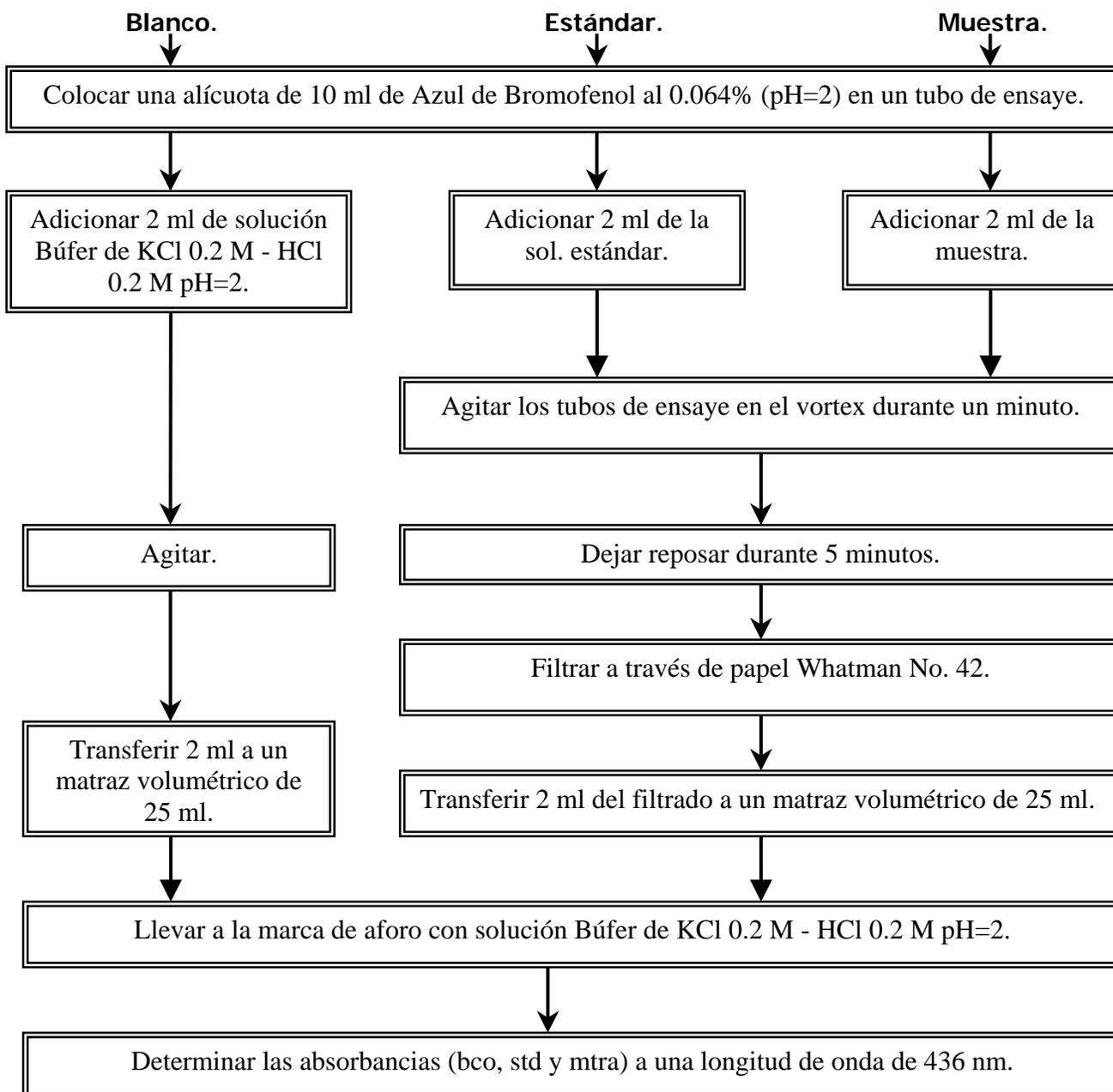
3. Preparación de la muestra.

DIAGRAMA 2. MÉTODO FINAL (continuación).

4. Cuantificación de Ketoconazol en tabletas.





6. Estudios de estabilidad.

Es importante evaluar la estabilidad de la solución del estándar de Ketoconazol preparado en el Búfer de KCl 0.2 M – HCl 0.2 M pH=2, como parte de la tolerancia del método con el objeto de establecer el tiempo en el cuál la solución mantiene su composición química mientras se estén realizando las determinaciones.

Se utilizaron soluciones que contienen el 80, 95 y 110 % de Ketoconazol S. R., bajo las siguientes condiciones experimentales: la determinación fue realizada a temperatura ambiente con exposición a la luz durante cinco horas a una longitud de onda de 269 nm. El seguimiento de las lecturas fue realizado sobre una misma solución correspondiente a cada porcentaje de contenido de principio activo. Por otra parte cabe mencionar que se verificó el pH de dichas soluciones.

De acuerdo a los datos mostrados en la tabla 24, se observa que no hay una diferencia considerable en las respuestas analíticas en el transcurso de dos horas para cada uno de los contenidos porcentuales de Ketoconazol. Con respecto a la medición del pH, la variación fue de 0.1 unidades (2.00 ± 0.1).

Tabla 24. Evaluación de la estabilidad del Ketoconazol S.R. en solución Búfer pH=2.

Tiempo (min.)	0	30	60	120	180	240	300
Ket. S.R. (%)	Abs.						
80	1.5609	1.5607	1.5601	1.5615	1.5577	1.5540	1.5532
95	1.8398	1.8384	1.8407	1.8365	1.8311	1.8318	1.8308
110	2.1105	2.1135	2.1116	2.1099	2.1043	2.1066	2.0972

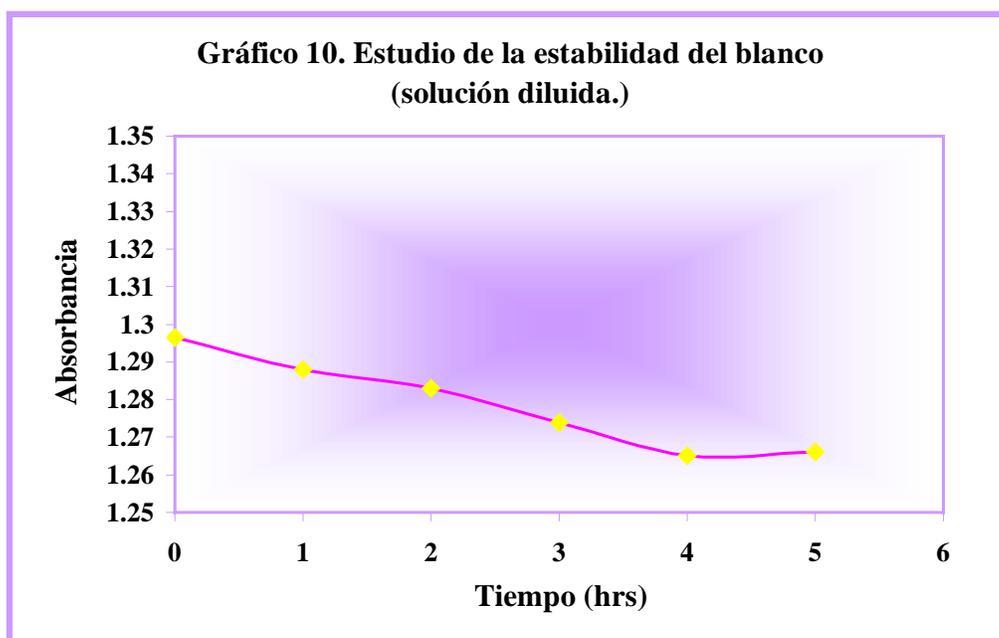
La respuesta analítica del ABF total (blanco) es el parámetro de referencia, el cuál permite conocer de forma indirecta la cantidad de Ketoconazol que participó en la reacción, por tal motivo se decide evaluar su estabilidad a temperatura ambiente con exposición a la luz durante 5 horas cuando la solución está diluida, con la finalidad de garantizar que su composición química se mantenga constante durante la determinación.

La diferencia que hay entre la respuesta analítica registrada en el tiempo 0 y la primera hora es mínima. A partir de las dos horas la variación aumenta (ver tabla 25).

**Tabla 25. Estudio de la estabilidad del blanco (solución diluida).**

Tiempo (hrs)	Absorbancia
0	1.2966
1	1.2880
2	1.2830
3	1.2738
4	1.2652

Se establece registrar la lectura de absorbancia del blanco antes de una hora para evitar variaciones que afecten el resultado analítico (ver gráfico 10).



Posteriormente se analizó la estabilidad del ABF residual, obteniendo el filtrado correspondiente. Se transfiere una alícuota a un matraz volumétrico de 25 ml y se lleva a la marca de aforo con el búfer pH=2. La transferencia de la alícuota (solución A) se realizó a diferentes tiempos: 0, 1, 2 y 3 horas.

A su vez las lecturas de absorbancia del ABF residual fueron registradas a distintos tiempos después de haberse llevado a cabo la dilución (solución B).

Por otra parte se evaluó la estabilidad del blanco (ABF- HCl 0.1 N), a partir de su preparación (solución C). Se procedió a transferir una alícuota en el matraz volumétrico y



se llevó a la marca de aforo con el búfer antes mencionado (solución D). Este análisis se realizó bajo los mismos criterios de tiempo establecidos para el ABF residual. Las soluciones A, B, C y D fueron expuestas a la luz a temperatura ambiente.

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 26 se establece realizar la dilución del ABF total y residual dentro de la primera hora.

Tabla 26. Respuestas analíticas obtenidas en la evaluación de la estabilidad del Azul de bromofenol total y residual en las soluciones A y C.

Tiempo (h)	0	1	2	3
ABF total (bco.)	1.2818	1.2763	1.2777	1.2743
ABF residual	0.6422	0.6411	0.6408	0.6369

Con respecto a las soluciones B y D, la variación que presentan las respuestas analíticas durante la primera hora es hasta del 0.6 % (ver las tablas 27, 28, 29 y 30).

Se establece que las lecturas de absorbancia deberán registrarse dentro de este período de tiempo.

Con estas determinaciones se garantiza que el resultado analítico no cambie significativamente en el transcurso del análisis.

7. Evaluación de Interferencias.

Es imprescindible demostrar que los excipientes presentes en la formulación no interfieren sobre la cuantificación del Ketoconazol en las tabletas. Para ello se prepararon placebos, los cuales fueron analizados bajo el procedimiento analítico desarrollado. Las respuestas analíticas obtenidas indican que no existe interferencia por parte de los excipientes en la determinación del principio activo (ver tabla 31).

Tabla 31. Influencia de los excipientes en la cuantificación de Ketoconazol en las tabletas.

Placebo	Absorbancia
1	0.0023
2	0.0064
3	-0.0008



TABLA 27. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL ABF TOTAL Y RESIDUAL EN LAS SOLUCIONES B Y D, A PARTIR DE LAS CERO HORAS DE SER PREPARADAS LAS SOLUCIONES A Y C.

Tiempo (h)	0	1	2	3	23	24	49
ABF total	1.2818	1.2805	1.2705	1.2693	1.2106	1.2012	1.1522
ABF residual	0.6422	0.6415	0.6385	0.6350	0.6062	0.5951	0.5691

TABLA 28. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL ABF TOTAL Y RESIDUAL EN LAS SOLUCIONES B Y D, A PARTIR DE LA PRIMERA HORA DE SER PREPARADAS LAS SOLUCIONES A Y C.

Tiempo (h)	0	1	2	3	22	23	49
ABF total	1.2763	1.2762	1.2710	1.2657	1.2103	1.1959	1.1477
ABF residual	0.6411	0.6398	0.6348	0.6338	0.6051	0.5933	0.5700

TABLA 29. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL ABF TOTAL Y RESIDUAL EN LAS SOLUCIONES B Y D, A PARTIR DE LA SEGUNDA HORA DE SER PREPARADAS LAS SOLUCIONES A Y C.

Tiempo (h)	0	1	2	21	22	47
ABF total	1.2777	1.2715	1.2684	1.2140	1.2023	1.1528
ABF residual	0.6408	0.6370	0.6345	0.6064	0.5950	0.5741

TABLA 30. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL ABF TOTAL Y RESIDUAL EN LAS SOLUCIONES B Y D, A PARTIR DE LA TERCERA HORA DE SER PREPARADAS LAS SOLUCIONES A Y C.

Tiempo (h)	0	1	20	21	47
ABF total	1.2743	1.2701	1.2191	1.2049	1.1468
ABF residual	0.6369	0.6363	0.6085	0.5961	0.5762



V. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

1. PLAN DE VALIDACIÓN.

VALIDACIÓN DEL SISTEMA.

- Linealidad.



VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

- Linealidad.
- Exactitud.
- Precisión.
- Reproducibilidad.

2. INSTRUMENTOS, EQUIPOS, MATERIAL, REACTIVOS, SOLUCIONES Y SUSTANCIA DE REFERENCIA (S.R.).

☞ Instrumentos:

- Se utilizó los instrumentos mencionados en el desarrollo del método analítico (ver página 47).

☞ Equipos:

- Se usaron los equipos mencionados en el desarrollo del método analítico (ver página 47).

☞ Material:

- Matraces volumétricos de 25, 50, 100 y 2000 ml.
- Pipetas volumétricas de 2 y 10 ml.
- Probeta de 25 ml.
- Tubos de ensaye.
- Embudos de vidrio para filtración por gravedad.
- Vasos de precipitado de 250 ml.
- Cronómetro.
- Un par de celdas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico.
- Papel Whatman No. 42 sin cenizas.

☞ Reactivos:

- Búfer de referencia pH=4. Marca Baker.
- Búfer de referencia pH=7. Marca Baker.
- CH₃CH₂OH absoluto anhidro. Grado reactivo. Marca Baker.
- NaOH. Grado reactivo. Marca Baker.
- Azul de bromofenol. Marca Baker.
- Agua destilada.

☞ Soluciones:

- NaOH 0.1 N.
- Búfer de KCl 0.2 M - HCl 0.2 M a pH=2.
- CH₃CH₂OH al 96%.
- Azul de bromofenol al 0.064%.

☞ Sustancia de referencia:

- Ketoconazol S.R. Pureza del 100 % en base seca. Allpharma Research S.L. No. de lote: A-20000507. Fecha de caducidad: Mayo del 2005.

☞ Mezclas físicas al 80, 90, 95, 100 y 110 % de contenido de Ketoconazol.**3. EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS.**

Durante la etapa de desarrollo y validación del método, se realizó la calificación del instrumento para determinar si funciona adecuadamente y de esta forma asegurar que los resultados analíticos obtenidos sean confiables.

En el Anexo 1 se muestran las pruebas que se llevaron a cabo para evaluar el funcionamiento del instrumento así como los resultados obtenidos.

4. VALIDACIÓN DEL SISTEMA.**4.1 Linealidad del Sistema.**

Se determinó por medio de la preparación de una curva de calibración a partir de tres soluciones stock de Ketoconazol S.R. preparadas en solución Búfer de KCl 0.2 M – HCl 0.2 M (pH=2). A partir de estas soluciones se obtuvieron cinco concentraciones diferentes, incluyendo el 100 % (ver tabla 32). El ensayo fue realizado tres veces para cada una de las concentraciones.

Solución stock No. 1 = 12.44 mg/ml.

Solución stock No. 2 = 9.6 mg/ml

Solución stock No. 3 = 9.1 mg/ml

Tabla 32. Preparación de la curva de calibración para evaluar la linealidad del sistema.

No. de la solución stock	Alícuota (ml)	Volumen de aforo (ml)	Concentración (mg/ml)	Porcentaje (%)
1	5	100	0.6220	84.05
2	7	100	0.6720	90.81
3	4	50	0.7280	98.38
1	3	50	0.7464	100.86
3	9	100	0.8190	110.67
1	7	100	0.8708	117.67

En la tabla 33 se muestran las respuestas analíticas obtenidas al evaluar la linealidad del sistema.

Tabla 33. Evaluación de la linealidad del sistema.

Concentración (mg/ml)	Abs. (436 nm)
0.6225	0.8190
0.6225	0.8367
0.6225	0.8324
0.6728	0.8946
0.6728	0.8972
0.6728	0.8949
0.7285	0.9579
0.7285	0.9539
0.7285	0.9578
0.7470	0.9793
0.7470	0.9750
0.7470	0.9843
0.8196	1.0669
0.8196	1.0619
0.8196	1.0591
0.8715	1.1297
0.8715	1.1364
0.8715	1.1355

Posteriormente se procedió a calcular los parámetros de la regresión lineal (ver tabla 34).

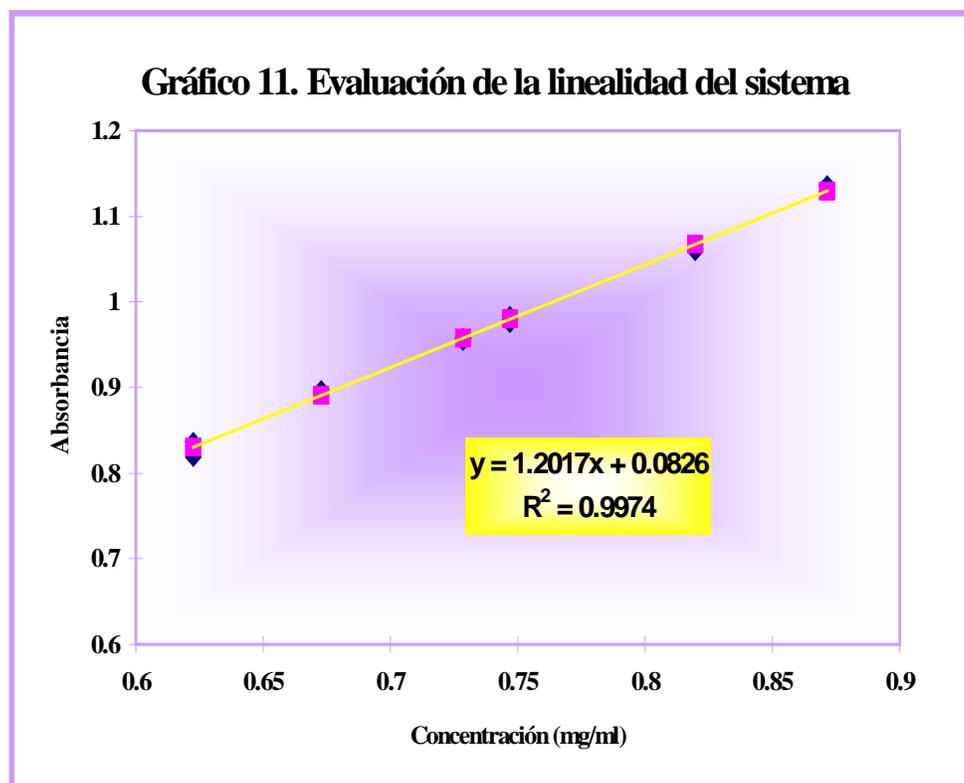
Tabla 34. Parámetros de la regresión lineal.

Ordenada (b)=	0.0826
Pendiente (m)=	1.2017
Coefficiente de correlación (r)=	0.9987
Coefficiente de determinación (r²)=	0.9974
Intervalo de confianza para m al 95%=	1.1691 – 1.2343

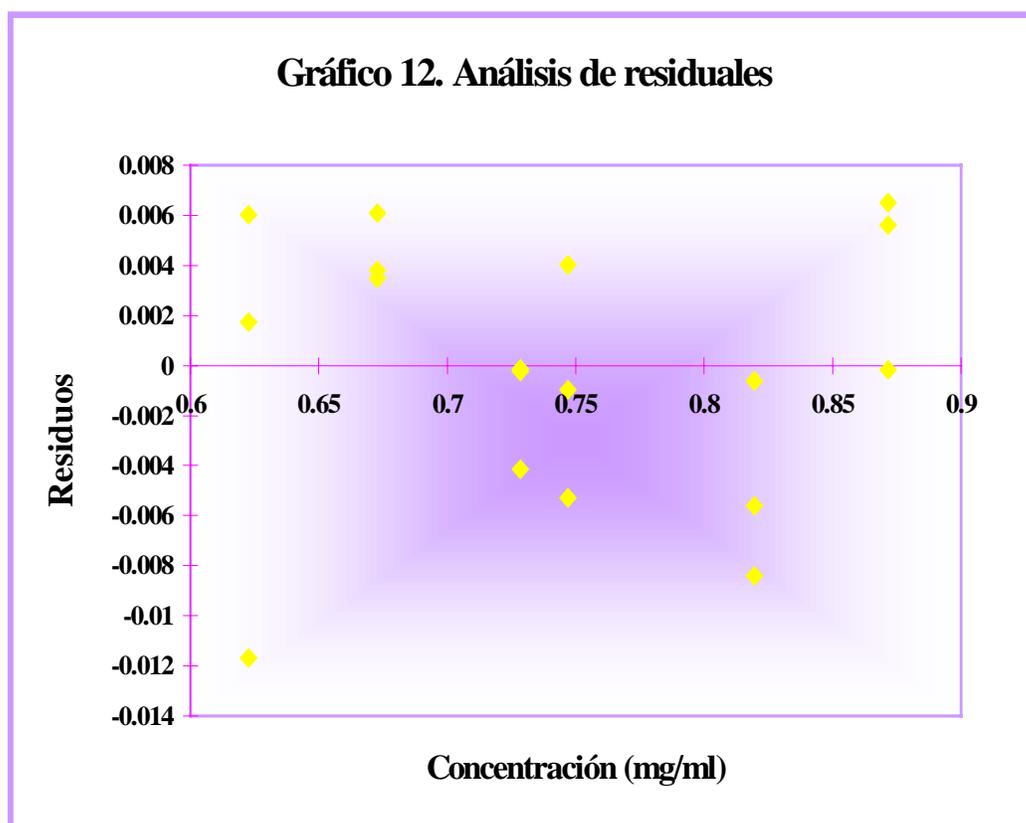
Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9974, lo cuál indica que la relación entre la concentración y la absorbancia es lineal.

Por lo tanto se puede afirmar que todos los parámetros de la regresión lineal están dentro de la especificación establecida para métodos espectrofotométricos.

En el gráfico 11 se observa una tendencia lineal entre la concentración y la absorbancia.



Para verificar la linealidad se llevó a cabo el análisis de residuales (ver gráfico 12). Se observa que los puntos están dispersos de una forma aleatoria alrededor del valor de cero, esto indica que la relación entre la concentración y absorbancia es lineal y que además los residuos obtenidos son homocedásticos.



5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

5.1 Linealidad del Método.

Para evaluar la linealidad del método se prepararon mezclas físicas considerando cinco diferentes porcentajes de contenido de Ketoconazol: 80, 90, 95, 100 y 110 %. Se hicieron tres ensayos para cada uno de los porcentajes.

En la tabla 35 se presentan los resultados analíticos correspondientes a cada porcentaje de contenido de principio activo.

Tabla 35. Evaluación de la linealidad del método.

Contenido porcentual de Ketoconazol (%)	Ketoconazol adicionado (mg)	Absorbancia (436 nm)	Ketoconazol recuperado (mg)
80	160.01	0.7865	163.56
		0.7865	162.74
		0.7922	165.56
90	180.01	0.8758	183.14
		0.8843	183.60
		0.8689	180.26
95	189.99	0.9484	197.75
		0.9478	196.06
		0.9508	197.34
100	200.09	0.9639	201.56
		0.9637	202.51
		0.9664	201.53
110	220.49	1.0634	222.31
		1.0630	222.67
		1.0659	222.02

Nota: La lectura del estándar de Ketoconazol fue de 0.9640.

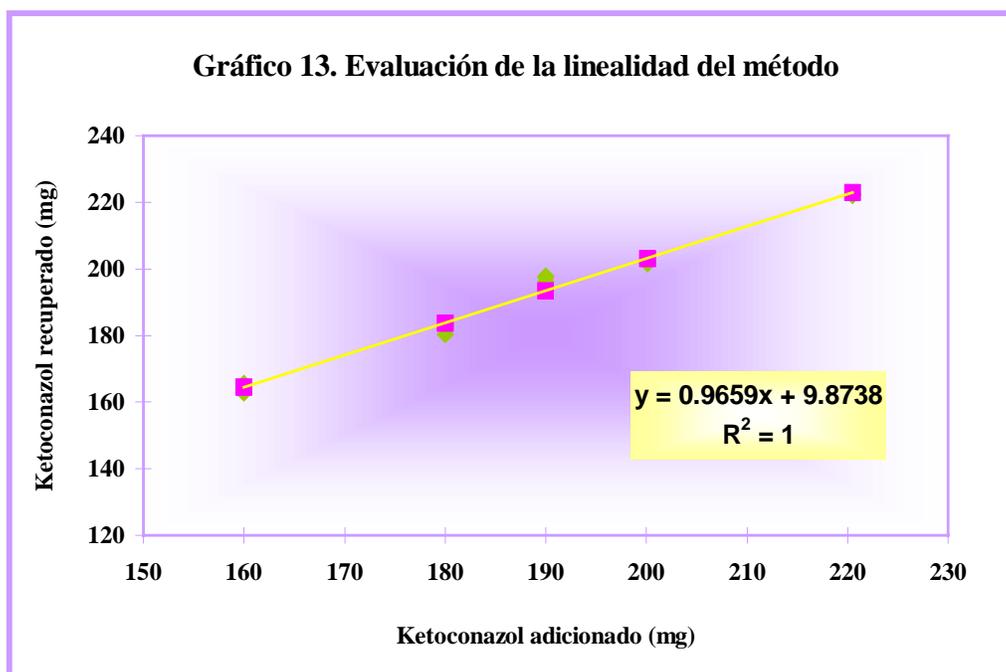
Tabla 36. Parámetros de la regresión lineal.

Ordenada (b)=	9.87
Pendiente (m)=	0.96
Coefficiente de correlación (r)=	0.99
Coefficiente de determinación (r ²)=	0.99
Intervalo de confianza para b al 95%=	-2.02 – 21.77
Intervalo de confianza para m al 95%=	0.90 – 1.02

De acuerdo a los resultados obtenidos en la regresión lineal (ver tabla 36), se observó que el valor de la ordenada en el origen es diferente de cero por consiguiente se evaluó el intervalo de confianza. Los valores obtenidos muestran que el valor de cero está incluido en él.

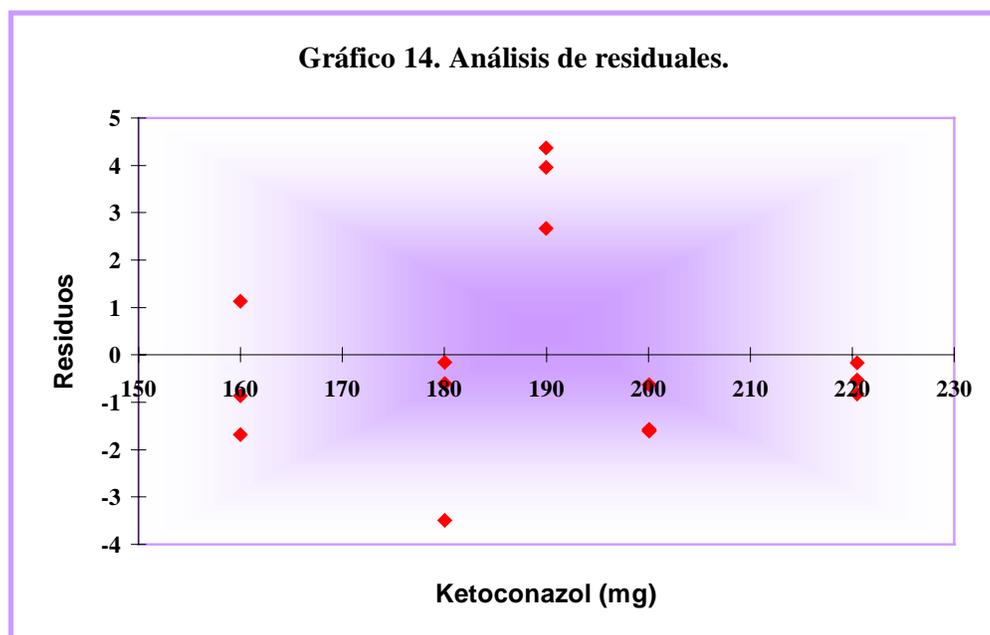
Con respecto a la pendiente fue necesario evaluar el intervalo de confianza y se observa que el valor de uno está incluido.

En el gráfico 13 se observa la relación lineal entre la cantidad de Ketoconazol adicionada y la recuperada.



Todos los parámetros de la regresión lineal cumplen con la especificación reportada para métodos espectrofotométricos.

Se llevó a cabo el análisis de residuales para verificar la linealidad (ver gráfico 14). El gráfico muestra a los residuos dispersos en forma aleatoria alrededor del valor de cero, lo



cuál indica que la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada es lineal.

En la tabla 37 se muestran los porcentajes de recuperación del principio activo.

Tabla 37. Porcentajes de recuperación de Ketoconazol.

Ketoconazol adicionado (mg)	Ketoconazol recuperado (mg)	% recuperado de Ketoconazol
160.01	163.56	102.22
	162.74	101.71
	165.56	103.47
180.01	183.14	101.74
	183.60	101.99
	180.26	100.14
189.99	197.75	104.08
	196.06	103.19
	197.34	103.87
200.09	201.56	100.74
	202.51	101.21
	201.53	100.72
220.49	222.32	100.83
	222.67	100.99
	222.02	100.69

Considerando los porcentajes de recuperación del principio activo se procedió a calcular los parámetros estadísticos (ver tabla 38).

Tabla 38. Parámetros estadísticos.

Promedio (\bar{x})=	101.84
Desviación estándar (s)=	1.27
Coefficiente de variación (c.v.) %=	1.25
Intervalo de confianza para el porcentaje de recobro=	101.20 – 102.48

Los parámetros estadísticos obtenidos están dentro de las especificaciones establecidas para métodos espectrofotométricos.

5.2 Reproducibilidad.

Se evaluó utilizando mezclas físicas que contienen el 80, 95 y 110 % de contenido de Ketoconazol. El análisis se llevó a cabo por dos analistas, en tres días diferentes y por triplicado para cada una de las mezclas.

En la tabla 39 se muestran los porcentajes de recuperación del principio activo.

Tabla 39. Porcentajes de recuperación de Ketoconazol.

Día	Analista 1			Analista 2		
	1	2	3	1	2	3
80% de contenido de Ketoconazol	103.64	100.03	102.01	100.84	100.02	101.87
	102.27	100.97	102.39	101.57	103.44	102.00
	100.61	101.84	100.76	101.59	100.97	103.36
95% de contenido de Ketoconazol	101.42	100.61	101.20	99.60	100.52	101.45
	101.23	100.71	101.61	99.80	100.16	101.97
	100.23	101.35	100.63	100.27	100.78	100.80
110% de contenido de Ketoconazol	98.66	100.16	99.84	99.28	98.60	99.32
	98.97	99.54	100.10	99.22	98.01	100.53
	98.45	100.21	99.73	98.13	98.92	101.61

Para establecer si existe diferencia significativa entre los porcentajes de recuperación obtenidos entre días y analistas se llevó a cabo el análisis de variancia para un diseño experimental jerárquico anidado por factores cruzados ³¹ (ver tabla 40).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de variancia, no existe diferencia significativa entre los porcentajes de Ketoconazol recuperados por diferentes analistas debido a que la F calculada (0.13) es menor que la F crítica (7.71). Por lo tanto el método es reproducible.

Tabla 40. Análisis de variancia $\alpha=0.05$.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo	F crítica.
Contenido porcentual de Ketoconazol: (K)	47.25	2	23.62	30.34	4.46
Analista: (A)	0.38	1	0.38	0.13	7.71
Día (dentro del analista): D(A)	11.45	4	2.86	4.52	2.61
K * A	0.65	2	0.32	0.42	4.46
K * D dentro de (A)	6.23	8	0.78	1.23	2.18
Error	22.77	36	0.63		
Total	88.73	53			

Con respecto al día anidado en el analista, la F calculada (4.52) es mayor que la F crítica (2.61), esto indica que existe una diferencia significativa entre los porcentajes de Ketoconazol recuperados en diferentes días por los analistas, por lo tanto el método no es repetible estadísticamente.

En cuanto a la interacción entre el contenido porcentual de Ketoconazol y el día, la F calculada (0.42) es menor que la F crítica (4.46). No hay diferencia significativa.

5.3 Exactitud y precisión del Método.

Se evaluó la exactitud y la precisión del método preparando mezclas físicas a tres diferentes porcentajes de contenido de Ketoconazol (ver tabla 41). Cabe mencionar que los resultados analíticos obtenidos fueron tomados de la evaluación de la reproducibilidad entre días y entre analistas.

Se calculó el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para el porcentaje de recobro del principio activo a un nivel de significancia de 0.05 (ver tabla 42).

El intervalo de confianza calculado incluye el promedio del porcentaje de recuperación de Ketoconazol, por lo tanto se puede afirmar que el método desarrollado es exacto.

Tabla 41. Evaluación de la exactitud y precisión del método.

Contenido porcentual de Ketoconazol (%)	Cantidad adicionada de Ketoconazol (mg)	Cantidad recuperada de Ketoconazol (mg)	% recuperado
80	160.01	161.35	100.84
80	160.01	162.52	101.57
80	160.01	162.55	101.59
80	160.01	160.04	100.02
80	160.01	165.51	103.44
80	160.01	161.57	100.97
80	160.01	163.00	101.87
80	160.01	163.20	102.00
80	160.01	165.39	103.36
80	160.01	165.83	103.64
80	160.01	163.64	102.27
80	160.01	160.98	100.61
80	160.01	160.06	100.03
80	160.01	161.57	100.97
80	160.01	162.96	101.84
80	160.01	163.23	102.01
80	160.01	163.84	102.39
80	160.01	161.23	100.76
95	189.99	189.23	99.60
95	189.99	189.62	99.80
95	189.99	190.51	100.27
95	189.99	190.98	100.52
95	189.99	190.29	100.16
95	189.99	191.47	100.78
95	189.99	192.75	101.45
95	189.99	193.73	101.97
95	189.99	191.51	100.80
95	189.99	192.69	101.42

Tabla 41. Evaluación de la exactitud y precisión del método. (continuación)

Contenido porcentual de Ketoconazol (%)	Cantidad adicionada de Ketoconazol (mg)	Cantidad recuperada de Ketoconazol (mg)	% recuperado
95	189.99	192.32	101.23
95	189.99	190.43	100.23
95	189.99	191.16	100.61
95	189.99	191.34	100.71
95	189.99	192.55	101.35
95	189.99	192.28	101.20
95	189.99	193.06	101.61
95	189.99	191.19	100.63
110	220.49	218.90	99.28
110	220.49	218.76	99.22
110	220.49	216.37	98.13
110	220.49	217.41	98.60
110	220.49	216.11	98.01
110	220.49	218.12	98.92
110	220.49	219.00	99.33
110	220.49	221.67	100.54
110	220.49	224.04	101.61
110	220.49	217.53	98.66
110	220.49	218.22	98.97
110	220.49	217.07	98.45
110	220.49	220.84	100.16
110	220.49	219.47	99.54
110	220.49	220.95	100.21
110	220.49	220.14	99.84
110	220.49	220.72	100.10
110	220.49	219.90	99.73

Tabla 42. Parámetros estadísticos.

Promedio (\bar{x})=	100.63
Desviación estándar (s)=	1.29
Coefficiente de variación (c.v.) %=	1.28
Intervalo de confianza para el porcentaje de recobro=	100.28 - 100.97

El coeficiente de variación obtenido es menor con respecto al reportado para métodos espectrofotométricos ($\leq 3\%$), por lo tanto el método desarrollado es preciso.



VI. CONCLUSIONES.



Se desarrolló un método analítico para cuantificar Ketoconazol en tabletas aplicando la espectrofotometría indirecta.

Con la optimización de las condiciones experimentales se redujo el tiempo de análisis y disminuyó la variabilidad entre los resultados analíticos.

Las condiciones apropiadas para llevar a cabo la reacción entre el Ketoconazol y Azul de bromofenol son:

- Utilizar el Azul de bromofenol a una concentración de 0.064 %.
- Preparar la muestra a una concentración de 0.74 mg/ml de Ketoconazol.
- Amortiguar todo el sistema con un búfer de KCl 0.2 M – HCl 0.2 M pH=2.

No existe interferencia por parte de los excipientes presentes en la formulación sobre la cuantificación de Ketoconazol en las tabletas.

El método desarrollado para la cuantificación de Ketoconazol en tabletas fue validado y cumple con las siguientes características analíticas: es lineal, exacto, preciso, repetible y reproducible.



ANEXO 1.

Etapa 1. Calificación de operación del instrumento en la etapa de desarrollo del método analítico.

Objetivo:

Calificar la operación del espectrofotómetro UV-VIS Varian modelo Cary 1 E, ubicado en la sala de instrumentos del Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Farmacia.

Procedimiento:

La calificación del instrumento se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el Manual de Operación del Espectrofotómetro UV-VIS Varian, modelo Cary 1E ⁽¹⁵⁾.

Las pruebas que se llevaron a cabo fueron las siguientes:

- Nivel de la línea base.
- Estabilidad fotométrica a largo plazo.
- Exactitud fotométrica.
- Reproducibilidad fotométrica.
- Linealidad fotométrica.
- Exactitud de la longitud de onda.
- Reproducibilidad de la longitud de onda.

Resultados:

Tabla 43. Evaluación del nivel de la línea base.

Especificación (Abs)	Absorbancia mínima obtenida	Absorbancia máxima obtenida	Resultado (Abs)
≤0.002	-0.00033 a 436 nm	0.00006 a 675 nm	-0.00039

Tabla 44. Evaluación de la estabilidad fotométrica a largo plazo.

Especificación	Absorbancia mínima obtenida	Absorbancia máxima obtenida	Resultado (Abs)
< 0.0003 Abs por hora, a 500 nm y con un ancho de banda espectral (SBW) de 2 nm	-0.0002 a 62.816 min.	0.0002 a 195.812 min.	-0.0004

Tabla 45. Evaluación de la exactitud fotométrica.

Especificación	Absorbancias obtenidas	Promedio (Abs)
0.66 ± 0.01Abs	0.6652	0.6650
	0.6651	
	0.6650	
	0.6649	
	0.6650	
	0.6650	

Tabla 46. Evaluación de la reproducibilidad fotométrica empleando una solución de Dicromato de potasio 0.03077 mg/ml.

Especificación (Abs)	Absorbancias obtenidas	Desviación estándar (Abs)
Desviación estándar < 0.00016	0.3303	0.000166
	0.3303	
	0.3305	
	0.3304	
	0.3302	
	0.3300	
	0.3300	
	0.3301	
	0.3301	
	0.3302	

Tabla 47. Evaluación de la reproducibilidad fotométrica empleando una solución de Dicromato de potasio 0.01592 mg/ml.

Especificación (Abs)	Absorbancias obtenidas	Desviación estándar (Abs)
Desviación estándar < 0.0008	0.1996	0.00031
	0.1996	
	0.1992	
	0.1994	
	0.1992	
	0.1991	
	0.1991	
	0.1993	
	0.1985	
	0.1993	

Evaluación de la linealidad fotométrica empleando KMnO₄.

Tabla 48. Normalización de los datos.

Conc. (µg/ml)	Abs.	Abs/conc.
20.3764	0.2360	0.011582
20.3764	0.2355	0.011557
20.3764	0.2349	0.011528
20.3764	0.2338	0.011474
20.3764	0.2353	0.011548
20.3764	0.2364	0.011601
40.7528	0.4700	0.011533
40.7528	0.4715	0.011570
40.7528	0.4694	0.011518
40.7528	0.4710	0.011557
40.7528	0.4728	0.011601
40.7528	0.4707	0.011550

Tabla 48. Normalización de los datos. (continuación)

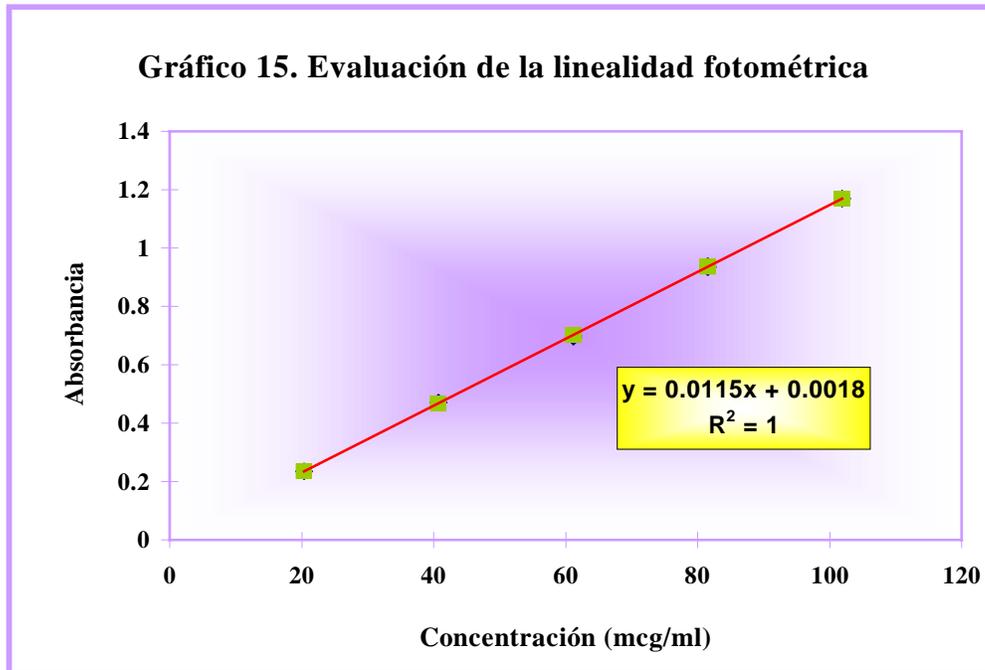
Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Abs.	Abs/conc.
61.1292	0.7005	0.011459
61.1292	0.6951	0.011371
61.1292	0.6997	0.011446
61.1292	0.6956	0.011379
61.1292	0.6943	0.011358
61.1292	0.7012	0.011471
81.5056	0.9345	0.011465
81.5056	0.9321	0.011436
81.5056	0.9371	0.011497
81.5056	0.9336	0.011454
81.5056	0.9359	0.011483
81.5056	0.9403	0.011537
101.882	1.1678	0.011462
101.882	1.1722	0.011505
101.882	1.1707	0.011491
101.882	1.1661	0.011445
101.882	1.1721	0.011504
101.882	1.1690	0.011474

Tabla 49. Parámetros estadísticos.

Promedio (\bar{x})=	0.01149
Desviación estándar (s)=	$6.3495 * 10^{-5}$
Coefficiente de variación (c.v) %=	0.55

Tabla 50. Parámetros de la regresión lineal.

Pendiente (m)=	0.01145
Ordenada (b)=	0.00183
Coefficiente de correlación (r)=	0.99996
Coefficiente de determinación (r^2)=	0.99991



**Tabla 51. Evaluación de la exactitud de la longitud de onda
(Línea de hidrógeno).**

Especificación	Resultado (nm)	Promedio (nm)
656.1 ± 0.1 nm	656.00	656.00
	656.00	
	656.00	
	656.00	
	656.00	
	656.00	

**Tabla 52. Evaluación de la reproducibilidad de la longitud de onda
(Línea de hidrógeno).**

Especificación	Longitudes de onda (nm)	Desviación estándar (nm)
Desviación estándar < 0.02 nm.	656.000	0.0084
	655.980	
	656.000	
	655.980	
	656.000	

**Tabla 52. Evaluación de la reproducibilidad de la longitud de onda
(Línea de hidrógeno) (continuación).**

Especificación	Longitudes de onda (nm)	Desviación estándar (nm)
Desviación estándar < 0.02 nm.	656.000	0.0084
	656.000	
	656.000	
	656.000	
	656.000	

CONCLUSIONES:

De acuerdo a los resultados obtenidos en cada una de las pruebas evaluadas y a las especificaciones establecidas por el fabricante se determina que el instrumento se encuentra en condiciones adecuadas de operación.

**Etapa 2. Calificación de operación del instrumento en la fase de
validación del método analítico.**

Objetivo:

Calificar la operación del espectrofotómetro UV-VIS Varian modelo Cary 1 E, ubicado en la sala de instrumentos del Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Farmacia.

Procedimiento:

La calificación del instrumento se realizó de acuerdo a las siguientes pruebas, las cuales están establecidas en la carpeta de validación del programa Cary.

- Exactitud de la longitud de onda por emisión de Deuterio.
- Reproducibilidad de la longitud de onda por emisión de Deuterio.
- Ruido fotométrico.
- Nivel de la línea base.

Resultados:

**Tabla 53. Evaluación de la exactitud de la longitud de onda
(Emisión de Deuterio).**

Línea de emisión de Deuterio (nm)	Especificación (nm)	Resultado (nm)
0.000	± 0.3000	- 0.300
486	± 0.2000	485.960
656.100	± 0.2000	656.100

**Tabla 54. Evaluación de la reproducibilidad de la longitud de onda
(Emisión de Deuterio).**

Línea de emisión (nm)	Especificación	Resultado (nm)
656.100	Desviación estándar < 0.02 nm	0.0000

Tabla 55. Evaluación del ruido fotométrico.

Especificación (Abs)	Resultado (Abs)
< 0.000085	0.000044

Tabla 56. Evaluación de la línea base

Intervalo de longitud de onda (nm)	Especificación (Abs)	Resultado (Abs)
200 - 850	± 0.0010	- 0.0003 a 0.0003

CONCLUSIONES:

De acuerdo a los resultados obtenidos en cada una de las pruebas evaluadas y a las especificaciones establecidas por el fabricante se determina que el instrumento se encuentra en condiciones adecuadas de operación.



VII. GLOSARIO. ⁽³²⁾



Antimicótico: Cualquier agente útil para tratar infecciones micóticas.

Blastomicosis: Cualquier enfermedad causada por hongos de tipo levadura, en particular especies de Blastomyces.

Candidiasis: Afección producida por un hongo del género Candida, por lo general C. albicans, que afecta diversas partes del cuerpo, como piel, mucosas, uñas, bronquios, pulmones, corazón, vagina y conducto gastrointestinal; rara vez se presenta como septicemia.

Candidiasis oral: Infección de la boca por Candida albicans que ocurre frecuentemente en lactantes.

Coccidioidomicosis: Infección o enfermedad endémica en el sudoeste de Estados Unidos, México y algunas áreas de América del Sur, generalmente adquirida por inhalación de las esporas de Coccidioides immitis.

Cromomicosis: Infección de la piel caracterizada principalmente por el desarrollo de lesiones verrucosas causadas por diversos hongos, incluso Hormodendrum pedrosi, H. dermatitidis, H. compactum, Clasdosporium carrionii y Phialophora verrucosa.

Dermatitis seborreica: Forma aguda, inflamatoria de dermatitis que ocurre usualmente en la piel untuosa, en áreas que tienen grandes glándulas sebáceas. Se caracteriza por escamas secas, húmedas o grasosas, y por placas costrosas amarillentas, por remisiones, exacerbaciones y comezón.

Dermatofitosis: Erupción cutánea que se caracteriza por formación de pequeñas vesículas en manos y pies, en especial entre los dedos, con agrietamiento y descamación. En ocasiones hay infección secundaria. Puede ser causada por cualquier dermatófito.

Dermatomicosis: Cualquier infección micótica de la piel.

Fungicida: Agente que destruye a los hongos.



Fungistático: Inhibición del crecimiento micótico mediante agentes físicos y químicos; debe distinguirse de acción fungicida, que comprende muerte de hongos.

Ginecomastia: Hiperplasia de las glándulas mamarias en el hombre.

Histoplasmosis: Infección en células reticuloendoteliales por el hongo *Histoplasma capsulatum*. Varía desde una leve infección respiratoria hasta una enfermedad grave diseminada, caracterizada por fiebre, anemia, hepatomegalia, esplenomegalia, leucopenia, lesiones pulmonares, ulceraciones gastrointestinales y necrosis suprarrenal.

Paracoccidioidomicosis: Enfermedad crónica granulomatosa de la piel y las mucosas, que puede comprender los ganglios linfáticos y las vísceras. Es causada por *Blastomyces brasiliensis*.

Pitiriasis versicolor: Infección micótica superficial crónica, que por lo general afecta el tronco. Producida por *Malassezia furfur*.



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y HEMEROGRÁFICAS.

1. Cámara Carmen, Fernández Hernando Pilar, Martín Esteban Antonio, Pérez Conde Concepción, Vidal Miquel. Toma y tratamiento de muestras. Síntesis. España. 2003. Pp. 14-34, 38-89, 92, 93, 96.
2. Compañó Beltrán Ramón, Ríos Castro Ángel. Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos. Síntesis. España. 2002. Pp. 176, 177, 180, 181, 184-186, 214-215.
3. Valcárcel M, Ríos A. La calidad en los laboratorios analíticos. Reverté. España. 1992. Pp.110-112, 172-174.
4. Gómez Mirón Margot. Desarrollo de un método espectrofotométrico confiable para cuantificar la cantidad de sulfametazina sódica liberada en el proceso de disolución de bolos de liberación controlada. TESIS: Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán. UNAM. México. 1998. Pp. 6, 29.
5. Robles León María Eufemia. Desarrollo y validación de un método analítico para cuantificar, por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa, Pefloxacino presente en una forma farmacéutica inyectable. TESIS: Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán. UNAM. México. 1998. Pp. 3-8, 23-26, 77.
6. Comisión de validación de métodos analíticos. Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. México. 2002. Pp. 20-40.
7. Skoog Douglas A. Principios de análisis instrumental. McGraw-Hill. Quinta edición. México. 2001. Pp. 322-335.
8. Sommer L. Analytical absorption spectrophotometry in the visible and ultraviolet: The principles. (Studies in analytical chemistry). Elsevier Science Publishers. Hungría. 1989. Pp. 13, 15, 16, 19-26, 29, 36-38, 78-94, 120-138, 150-158.
9. Pradeau Dominique. Análisis químicos farmacéuticos de medicamentos. Limusa, S.A. de C.V. Primera reimpresión. México. 2001. Pp. 575, 576, 580.

10. Skoog Douglas A. Química Analítica. McGraw-Hill. Séptima edición. México. 2001. Pág. 581.
11. Connors Kenneth A. Curso de análisis farmacéutico, (ensayo del medicamento). Editorial Reverté. España. 1981. Pp. 202, 203, 205.
12. Currell Graham. Analytical instrumentation. Performance characteristics and quality. John Wiley & Sons. Inglaterra. 2000. Pp. 75-77, 86, 87.
13. Annual book of American Society for Testing Materials (ASTM) Standards, General Methods and Instrumentation. Standard Practice for the Periodic calibration of Narrow Band-Pass spectrophotometers. Vol. 14.01. USA. 1993. Pp. 275-279.
14. Varian. Catalogue: Cary UV-VIS-NIR spectrophotometers. Publication No. 85 10135300. Australia. 1995. Pp. 16, 17.
15. Varian. Manual de operación del espectrofotómetro UV-VIS. Cary, modelo 1 E. Procedimiento de pruebas. Capítulo 7. Australia. 1994. Pp. 7.1-7.21.
16. Annual Book of American Society for Testing Materials (ASTM) Standards, General Methods and Instrumentation. Standard practice for describing and measuring performance of ultraviolet, visible, and near infrared spectrophotometers. Vol. 14.01. USA. 1993. Pp. 64-74.
17. Annual Book of American Society for Testing Materials (ASTM) Standards, General Methods and Instrumentation. Standard Test Method for estimating stray radiant power ratio of spectrophotometers by the opaque filter method. Vol. 14.01. USA. 1993. Pp. 102-111.
18. Zamora Jiménez Lilia. Optimización y validación de un método espectrofotométrico indirecto para la cuantificación de potasio en comprimidos efervescentes. TESIS: Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán. UNAM. México. 1993. Pp. 15, 16.

19. Sandell E. B. Colorimetric determination of traces of metals. Vol. III. Interscience publishers, inc. New York. Tercera edición. USA. 1959. Pp. 114-115.
20. Moffat A.C. Clarke's isolation and identification of Drug. The pharmaceutical press. Segunda Edición. London. 1986. Pp. 696, 697.
21. Dollery Sir Colin. Therapeutic drugs. Vol. 1. Churchill Livingstone. USA. 1991. Pp. K21-K24.
22. Budavari Susan. The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Merck & Co; Inc. Treceava edición. USA. 2001. Pp. 948-949.
23. Mcevoy Gerald K. American hospital formulary service. Drug information. American society of hospital pharmacists. USA. 1992. Pp. 82-86.
24. The United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP XXVI, NF XXI. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 26^{ed}. USA. 2002. Pp. 1046-1048.
25. Bonifaz Alejandro. Micología médica. Editorial Mendez-Cervantes. Segunda reimpresión. México. 1996. Pág. 419.
26. Arenas Roberto. Micología médica ilustrada. Clínica, laboratorio y terapéutica. Interamericana McGraw- Hill. México. 1993. Pp. 369-371.
27. Whitehouse L. W., et al. Mouse hepatic metabolites of Ketoconazole: isolation and structure elucidation. Journal of pharmaceutical & biomedical analysis. Vol. 12. No. 11. 1994. Pág. 1425.
28. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas-PLM. Ediciones Thomson-PLM. 50^a ed. México. 2004. Pp. 308, 892, 893, 1726, 1727, 1980, 2054, 2055, 2248, 2249, 2250, 2564, 2924, 2925, 2966, 2967, 2984.

29. Sane R. T., et al. An extractive colorimetric method for the determination of Ketoconazole from pharmaceutical preparations. Indian Journal of pharmaceutical sciences. Nov-Dec. 1988. Pp. 347-348.
30. Miller James N, Miller Jane C. Estadística y quimiometría para química analítica. Prentice Hall. España. 2002. Pp. 45-49, 58-62.
31. Montgomery Douglas C. Diseño y análisis de experimentos. Limusa Wiley. Segunda edición. México. 2002. Pp. 557-573.
32. Gennaro Alfonso R. Diccionario enciclopédico de las ciencias médicas. McGraw-Hill. Cuarta edición. México. 1985. Pp. 110, 190, 191, 221, 295, 352, 386, 387, 623, 640, 717, 1399.