



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTILÁN**

T E S I S

**“DESARROLLO DE UN METODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO
AZELAICO Y COMPUESTOS RELACIONADOS EN UNA FORMULACIÓN
FARMACÉUTICA MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE GAS (FID-GC)”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN QUÍMICA INDUSTRIAL**

P R E S E N T A:

SONIA JULIÁN DE LA CRUZ

Asesores:

Q. Pablo Hernández Matamoros

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez



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.

POR TI, Y PARA TI
JOSUÉ, MI HIJO.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente el apoyo, de mis padres Carmen y Manuel, a mis hermanos, Manuel, Lourdes, Sergio, Juan Carlos y Laura; por la oportunidad brindarme su amistad, pero sobre todo su cariño y amor.

Doy las gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, muy en especial al Colegio de Ciencias y Humanidades Naucalpan y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por mi formación profesional.

Gracias en especial a la UNAM DGAPA por el proyecto PAPIME PE203405.

Gracias, al profesor Pablo Hernández Matamoros, por su confianza, amistad, paciencia, por creer en mi y sobre todo el apoyo brindado, en la elaboración del presente trabajo.

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez, gracias por compartir sus conocimientos.

Al Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A. C., en especial al departamento de Normalización por la asesoría, en el uso de las normas en la presentación del presente trabajo. Gracias Luís Manuel Mercado Martínez.

A los compañeros de la carrera de química industrial, muy en especial, Lidia Patricia, Angélica, José Tamias, Carmen, Ana Isabel, Arturo, Norma, Luís Alberto, Daniel, Maribel, Marina, Miguel Ángel, Adrián; Juan Francisco, María del Rosario, por sus palabras de aliento, gracias.

A ti Israel Blanco Jiménez, por todo lo bello que has dejado en mi vida.

Contenido

Objetivos	Viii
Objetivo general	Viii
Objetivos particulares.....	Viii
Capítulo 1 – Generalidades	1
1.1 Propiedades terapéuticas del ácido azelaico	1
1.2 Aspectos generales de los ácido dicarboxílicos	2
1.3 Características principales de los ácidos en estudio.....	3
Capítulo 2 – Derivatización.....	7
2.1 Reacciones de derivatización	7
2.2 Reacciones sustractivas	9
2.3 Reacciones no sustractivas	9
2.4 Técnica de derivatización empleada	12
Capítulo 3.- Estándar interno	15
3.1 Utilidad del estándar interno para la cuantificación en CG	15
Capítulo 4.- Desarrollo experimental.....	17
4.1 Desarrollo del método analítico.....	17
4.2 Descripción del equipo	18
4.3 Condiciones empleadas	19
4.4 Reactivos.....	19
4.5 Materiales de vidrio y otros.....	20
4.6 Otros Equipos.....	20
Capítulo 5 – Metodología	21
5.1 Metodología empleada.....	21
5.2 Preparación de la muestra problema	22
Capítulo 6 – Desarrollo del método cromatográfico.....	24
6.1 Análisis cromatográfico	24
6.2 Selección de estándar interno	27
6.3 Análisis de interferencia	32
6.4 Curva de calibración	34
6.5 Curva de calibración sin estándar interno	34
6.6 Curva de calibración con estándar interno	36
6.7 Especificidad	38
6.8 Reproducibilidad	39
6.9 Cuantificación de ácido azelaico en muestras reales	41
6.10 Estudios de caducidad	45
Conclusiones	46
Referencias Bibliográficas	47
Anexo A	49
Anexo B	61

Figuras

Figura 1 — Estructura química del ácido nonanodioico, cuyo nombre común es el ácido azelaico (C9) ...	2
Figura 2 — Esquema general de disociación de los ácidos dicarboxílicos.....	3
Figura 3 — Estructura química del ácido heptanodioico, cuyo nombre común es ácido pimélico (C7).....	3
Figura 4 — Estructura química del ácido octanodioico, cuyo nombre común es ácido subérico (C8).....	4
Figura 5 — Estructura química del ácido nonadioico, su nombre común es ácido azelaico	4
Figura 6 — Estructura química del ácido decanodioico, su nombre común es ácido sebácico (C10).....	5
Figura 7 — Estructura química del ácido undecanodioico (C11).....	5
Figura 8 — Estructura química del ácido butanodioico, su nombre común es ácido succínico	6
Figura 9 — Esquema general de la reacción de sililación	11
Figura 10 — Esquema general de la reacción de esterificación [4].....	12
Figura 11 — Estructura química del derivatizante, N,O-Bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida	13
Figura 12 — Estructura química del derivatizante Trimetilclorosilano	13
Figura 13 — Esquemmatización de la reacción de silación con BSTFA y TMCS [5]	14
Figura 14 — Compuestos homólogos al ácido azelaico, utilizados en la experimentación	14
Figura 15 — Ejemplificación de una curva de calibración, empleando estándar interno	15
Figura 16 — Imagen del Cromatógrafo de gases modelo buck scientific 910.....	18
Figura 17 — Detector de ionización de flama para cromatografía de gases	19
Figura 18 — Estructura química del ácido succínico, o del estándar interno seleccionado	21
Figura 19 — Diagrama de flujo de la metodología empleada	23
Figura 20 — Cromatograma de la mezcla de estándares de los ácidos dicarboxílicos (C7- C11) en forma de su derivado trimetilsilil.....	24
Figura 21 — Cromatograma del Blanco (derivatizante + piridina), ambos derivatizados)	25
Figura 22 — Cromatograma de placebo fortificado con estándar ambos derivatizados	28
Figura 23 — Cromatograma obtenido para la mezcla de ácido succínico y ácido azelaico	29
Figura 24 — Cromatograma de la separación de los derivados de los ácidos dicarboxílicos	30

Figura 25 — Cromatograma de la mezcla de ácidos dicarboxílicos estándar.....	31
Figura 26 — Cromatograma de la muestra problema con estándar interno.....	32
Figura 27 — Cromatograma de una muestra de placebo con estándar interno.....	33
Figura 28 — Cromatograma del placebo fortificado con estándar interno.....	33
Figura 29 — Curva de calibración de (C9), sin estándar interno (C4), para la determinación del ácido azelaico en muestras farmacéuticas, por cromatografía de gases.....	35
Figura 30 — Curva de calibración de (C9), con estándar interno (C4), para la determinación del ácido azelaico en muestras farmacéuticas, por cromatografía de gases.....	37
Figura 31 — Cromatograma de una muestra de placebo fortificado.....	38
Figura 32 — Cromatograma de una muestra del producto comercial (crema).....	39
Figura 33 — Cromatograma de una muestra de materia prima.....	41
Figura 34 — Cromatograma de una muestra crema producto comercial.....	42
Figura A.1 — Cromatograma del ácido pimélico (C7) derivatizado.....	49
Figura A.2 Cromatograma del ácido suberico (C8) derivatizado.....	49
Figura A.3 — Cromatograma del ácido azelaico (C9) derivatizado.....	50
Figura A.4 — Cromatograma del ácido sebacoico (C10) derivatizado.....	50
Figura A.5 — Cromatograma del ácido undecanoico (C11) derivatizado.....	51
Figura A.6 — Cromatograma del ácido láctico derivatizado.....	51
Figura A.7 — Cromatograma del ácido oxálico derivatizado.....	52
Figura A.8 — Cromatograma del ácido succínico derivatizado.....	52
Figura A.9 — Cromatograma del primer sistema de la curva de calibración (sin ácido succínico) derivatizado.....	53
Figura A.10 — Cromatograma del segundo sistema (sin ácido succínico) derivatizado.....	53
Figura A.11 — Cromatograma del tercer sistema (sin ácido succínico) derivatizado.....	54
Figura A.12 — Cromatograma del cuarto sistema (sin ácido succínico) derivatizado, mostrando sus respectivos tr para cada ácido dicarboxílico.....	54
Figura A.13 — Cromatograma del cuarto sistema (sin ácido succínico) derivatizado.....	55
Figura A.14 — Curva de calibración ácido pimelico.....	55

Figura A.15 — Curva de calibración del ácido suberico	56
Figura A.16 — Curva de calibración del ácido sebaco.....	56
Figura A.17 — Curva de calibración del ácido undecanoico.....	57
Figura A.18 — Cromatograma del primer sistema (con ácido succínico).....	57
Figura A.19 — Cromatograma del segundo sistema (con ácido succínico).....	58
Figura A.20 — Cromatograma del tercer sistema (con ácido succínico).....	58
Figura A.21 — Cromatograma del cuarto sistema (con ácido succínico).....	59
Figura A.22 — Cromatograma del quinto sistema (con ácido succínico) derivatizado, mostrando sus respectivos tr para cada ácido dicarboxílico	59
Figura A.23 — Cromatograma del sexto sistema (con ácido succínico) derivatizado, mostrando sus respectivos tr para cada ácido dicarboxílico	60
Figura A.24 — Cromatograma del séptimo sistema (con ácido succínico) derivatizado, mostrando sus respectivos tr para cada ácido dicarboxílico	60
Figura B.1 — Curva de calibración de C7, con estándar interno para la cuantificación de ácido azelaico en productos comerciales.....	61
Figura B.2 — Curva de calibración de C8, con estándar interno para la cuantificación de ácido azelaico en productos comerciales.....	61
Figura B.3 — Curva de calibración de C10, con estándar interno para la cuantificación de ácido sebaco en productos comerciales.....	62
Figura B.4 — Curva de calibración de C11, con estándar interno para la cuantificación de ácido undecanoico en productos comerciales	62

Tablas

Tabla 1 — Reactivos derivatizantes	10
Tabla 2 — Preparación de los sistemas para la curva de calibración	21
Tabla 3 — Preparación de los sistemas para las muestras.....	22
Tabla 4 — Tiempos de retención y parámetros estadísticos de la mezcla de ácidos dicarboxílicos.....	26
Tabla 5 — Ácidos disponibles para emplear como estándar interno	27
Tabla 6 — Tiempos de retención de los ácidos posibles a utilizar como estándar interno.....	27
Tabla 7 — Elaboración de la curva de calibración sin estándar interno	34
Tabla 8 — Resultados de las curvas de calibración sin estándar interno de cada uno los acidos dicarboxílicos	36
Tabla 9 — Resultados de las curvas de calibración con estándar interno de cada uno los acidos dicarboxílicos	36
Tabla 10 — Tiempo de retención, para materia prima y producto farmacéutico.....	38
Tabla 11 — Resultados del tratamiento estadístico aplicado a los cromatogramas	39
Tabla 12 — Resultados de las muestras con estándar interno.....	42
Tabla 13 — Resultados de las muestras sin estándar interno.....	43
Tabla 14 — Resultados de las muestras sin estándar interno	43
Tabla 15 — Resultados de las muestras con estándar interno.....	44
Tabla 16 — Resultados obtenidos de los promedios de las muestras en estudio respecto al % p/p.....	44

Introducción

La técnica de cromatografía de gases es un método de análisis instrumental con gran influencia en la ciencia, pero también en el sector industrial. Se encuentra fundamentada sobre una teoría bien desarrollada y tiene cinco décadas de aplicación, es por esto que la cromatografía de gases es una técnica que no falta en los laboratorios de control químico.

El ácido azelaico es un ácido dicarboxílico el cual se emplea para el tratamiento del melasma que es un desorden hiperpigmentario adquirido facialmente.

El ácido azelaico parece ser una alternativa útil en esta enfermedad, en lugar de la hidroquinona y los rayos láser que se han venido utilizando, ya que el ácido azelaico sólo afecta a los melancitos hiperactivos.

Gracias a las propiedades mencionadas, algunos laboratorios farmacéuticos han elaborado productos que contienen al ácido azelaico, pero hasta el momento no se cuenta con una metodología adecuada para su cuantificación.

En el presente trabajo se desarrolla una metodología analítica, que permite la cuantificación del ácido azelaico, en diversas etapas del proceso de elaboración del producto farmacéutico (materia prima, producto terminado, etc.) aún en presencia de sus compuestos homólogos, a fin de contar con un método analítico para el control de calidad

Objetivos

Objetivo general

Establecer una metodología analítica que permita la determinación de ácido azelaico y compuestos relacionados en una formulación farmacéutica, empleando cromatografía de gases (CG).

Objetivos particulares

- a) establecer las condiciones cromatograficas óptimas de separación del ácido azelaico y sustancias relacionadas por CG.
 - b) establecer las condiciones de derivatización para el ácido azelaico y sus compuestos homólogos.
 - c) seleccionar un estándar interno que permita minimizar los errores debido a la inyección manual, lo que conlleva a cumplir con las especificaciones farmacopeicas de linealidad y por tanto la cuantificación de ácido azelaico.
 - d) determinar el contenido de ácido azelaico en muestras comerciales mediante una curva de calibración y a las condiciones de trabajo seleccionadas.
-

Capítulo 1 – Generalidades

1.1 Propiedades terapéuticas del ácido azelaico

El ácido azelaico (ácido 1,7-heptanodicarboxílico), es un ácido dicarboxílico saturado, se obtiene por la oxidación del ácido oléico con ácido nítrico, y se utiliza en la industria para la formación de materiales poliméricos.

También se puede obtener por medio de la oxidación de ácidos grasos insaturados mediante la acción fermentadora de algunos microorganismos (*Brettanomyces petrophilum*), de aquí se deriva su nombre [1]

Se trata de un producto natural que se encuentra en los alimentos vegetales y animales.

El creciente interés que existe sobre las propiedades biológicas y las aplicaciones terapéuticas de esta sustancia se inició a partir de los estudios de Nazzaro y colaboradores [2] sobre los lípidos de la superficie cutánea y la patogenia de la hipocromia de la pitiriasis versicolor. Las aplicaciones del ácido azelaico son:

- a) puede “frenar y regresar la progresión tumoral en el léntigo maligno. En dicho proceso, la desaparición de los melanocitos anormales y su reemplazamiento por melanocitos con morfología funcional normal” [2], y como resultado se tiene una reconstrucción progresiva normal y organización de la epidermis.
- b) se utiliza para el tratamiento del acné vulgaris, en forma de crema al 20%.

Para el tratamiento del melasma que es un desorden hiperpigmentario adquirido facialmente. El ácido azelaico podría ser una alternativa útil en esta enfermedad, en lugar de la hidroquinona y láser que se han venido utilizando, ya que el ácido azelaico solo afecta a los melancitos hiperactivos [1]

El ácido azelaico pertenece a una clase de compuestos llamados ácidos dicarboxílicos; éste al no ser tóxico para la piel e impedir el crecimiento bacteriano, regenera la epidermis, ejerce una acción terapéutica beneficiosa en desórdenes cutáneos como el melasma.

Se han realizado estudios tanto en Alemania, Italia, Canadá, Estados Unidos, Francia y México, sobre la eficacia para este tipo de desórdenes.

En base a estos estudios tanto clínicos, y con las experiencias clínicas, donde se utilizó una crema que contiene el ácido azelaico entre el 15 al 20 %, se demuestra la eficacia terapéutica del ácido azelaico (Figura 1).

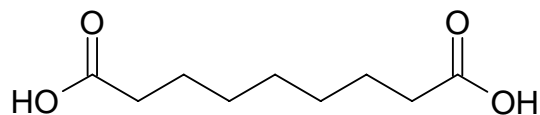


Figura 1 — Estructura química del ácido nonanedioico, cuyo nombre común es el ácido azelaico (C9)

Gracias a los estudios mencionados, algunos laboratorios farmacéuticos en México han elaborado un producto que contiene al ácido azelaico en presentación de crema (20 %).

Actualmente no se cuenta con una metodología adecuada para su cuantificación.

En el presente trabajo se desarrolló una metodología, que permite la cuantificación del ácido azelaico, en sus diversas etapas de proceso de elaboración (materia prima, producto terminado, etc.) aún en presencia de sus compuestos homólogos.

1.2 Aspectos generales de los ácidos dicarboxílicos

La propiedad química más importante de los ácidos dicarboxílicos, es que en comparación a otros compuestos orgánicos, estos ácidos contienen en los extremos de su cadena un grupo carbonilo, esta característica le confiere una acidez la cual es característica de estos ácidos, por otra parte a partir de los ácidos dicarboxílicos se forman numerosos derivados importantes como los ésteres, las amidas, los anhídridos y los halogenuros ácidos.

A los ácidos dicarboxílicos se les conoce como ácidos alcanodioicos, estos según la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), se nombran con la palabra ácido y agregando el sufijo **-dioico** al nombre de la cadena principal que contiene ambos grupos carboxilo.

Todos los ácidos diácidos son sólidos cristalinos e incoloros, que a medida que crece la cadena alifática, las temperaturas de fusión tienden a bajar y los sólidos tienden a volverse más cerosos.

Muchos de los ácidos dicarboxílicos tienen más de una forma cristalina; las reacciones químicas de los ácidos dicarboxílicos dependen, principalmente, de los carboxilos terminales y de sus respectivos grupos hidroxilos reactivos. La acidez de los ácidos dicarboxílicos se da en dos etapas de ionización véase figura 2)

1.3.2 Ácido subérico (C8)

- $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
- características: cristales blanco descolorido
- peso molecular: 174.2 g/mol
- temperatura de fusión: 143° C a 143,3° C
- temperatura de ebullición: a 1 atm de presión 279° C, a 2 atm de presión 230° C, Sublima a 300° C sin descomposición
- se obtiene de la oxidación del ácido oleico con ácido nítrico
- usos: se utiliza de intermediario para la síntesis de drogas, en tintes y polímeros de alto peso molecular, véase figura 4

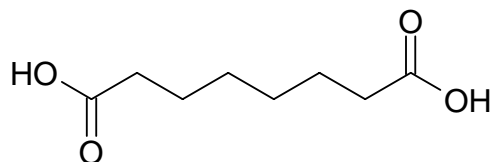


Figura 4 — Estructura química del ácido octanodioico, cuyo nombre común es ácido subérico (C8)

1.3.3 Ácido azelaico

- peso molecular: 106,5 g/mol
- propiedades físicas: el color del polvo es amarillento a blanco, sus cristales son prismas de forma monoclinica.
- temperatura de fusión: 107-108 °C
- temperatura de ebullición: 286,5 °C
- soluble: en agua caliente, alcohol y solventes orgánicos.
- deriva: de la oxidación del ácido oleico
- usos: uno de sus principales uso es en síntesis orgánicas, también se utiliza en la elaboración de lacas, resinas, poliamidas, pegamentos de poliéster, plásticos de baja temperatura, elastómeros, véase figura 5

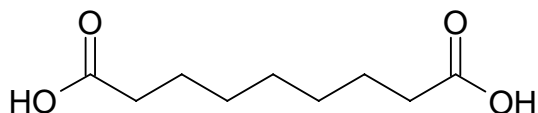


Figura 5 — Estructura química del ácido nonadioico, su nombre común es ácido azelaico

1.3.4 Ácido sebácico

- ácido 1,8 octanodioico
- $\text{COOH}(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
- peso molecular: 202,107 6 g/mol
- propiedades físicas: cristales blancos
- temperatura de fusión: 134-134,4° C
- temperatura de ebullición: a 1 atm de presión 294,5° C
- soluble: levemente soluble en agua, soluble en alcohol y éter
- deriva: se obtiene de butadieno, vía diclorobutano y sus derivados de nitrilo, destilando en vía seca en aceite con un álcali
- usos: Es un estabilizador en la síntesis de poliéster, en las resinas, los poliuretanos, fibras, en productos de pintura, velas , perfumes, también en lubricantes de baja temperatura, líquidos hidráulicos, y en la fabricación del nylon 610, véase figura 6.

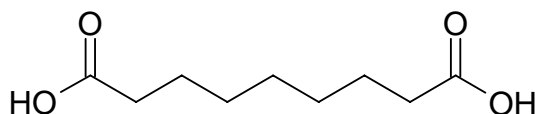


Figura 6 — Estructura química del ácido decanodioico, su nombre común es ácido sebácico (C10)

1.3.5 Ácido undecanoico

- ácido undecanoico
- $\text{COOH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
- propiedades: cristales descoloridos
- solubilidad: insoluble en agua, soluble en alcohol y éter.
- peso molecular: 216,118 6
- temperatura de fusión: 110,5° C a 112° C
- densidad de 1,207 g/l
- temperatura de Ebullición : 100° C a 50 mmHg
- acidez: $\text{p}K_{a1}$ 4,59, $\text{p}K_{a2}$ 7,59
- usos: se utiliza en síntesis orgánicas véase figura 7.

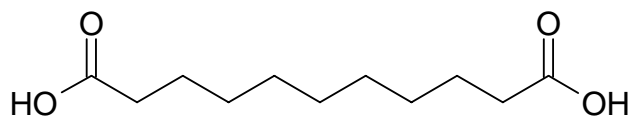


Figura 7 — Estructura química del ácido undecanodioico (C11)

1.3.6 Ácido succínico

- fórmula química desarrollada :COOH(CH₂)₂COOH
- peso molecular: 118,041 6 g/mol
- propiedades físicas: cristales blancos
- densidad: 1,56 g/l
- temperatura de fusión: 187,6-187,9° C
- temperatura de ebullición: 225° C
- tiene un valor de pH de 3,8 en una solución de 500 ppm
- solubilidad: soluble en agua, insoluble en hidrocarburos
- usos: se utiliza en los invernaderos para retardar el crecimiento de la fruta, véase figura 8

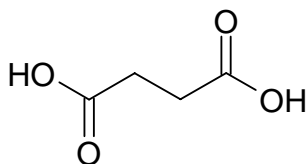


Figura 8 — Estructura química del ácido butanodioico, su nombre común es ácido succínico

Capítulo 2 – Derivatización

2.1 Reacciones de derivatización

El tratamiento de la muestra es muy importante, tanto en su toma, conservación y preparación, por lo cual es importante tomar en cuenta lo siguiente:

Considerar que la muestra que se tome sea representativa de la especie que se está estudiando, ya que muchas veces la determinación de la especie en estudio se llevó a cabo a nivel trazas.

Sin embargo, dada las limitaciones de la cromatografía de gases, donde los compuestos a separar y cuantificar deben de ser en general volátiles, frecuentemente es necesario realizar un proceso de derivatización, a fin de que los analitos se transformen en compuestos más volátiles para que puedan ser analizados por cromatografía de gases.

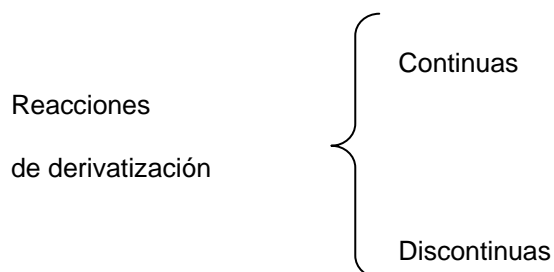
La técnica de derivatización o cromatoquímica de gases (Reaction Gas Chromatography), se basa en la transformación de los analitos en nuevas especies por medio de reacciones químicas; estas especies deben de ser compatibles con el sistema elaborado para la especie en estudio.

Los principales resultados que se buscan, al utilizar la técnica de derivatización son:

- a) la estabilidad térmica de los analitos
- b) una buena resolución cromatográfica, con la cual se evita la formación de picos indeseables dentro del cromatograma, las adsorciones irreversibles del analito esto se logra mediante un ajuste adecuado de la volatilidad del analito; es decir, mediante un ajuste adecuado de la volatilidad del analito, con la finalidad de evitar el solapamiento de picos dentro del cromatograma
- c) cambiar indirectamente la sensibilidad del detector. Se realiza introduciendo en la molécula de la especie que se encuentra en estudio, grupos funcionales que sean convenientes para la mejora de la sensibilidad y la separación

Generalmente las reacciones de derivatización dentro de la cromatografía de gases se efectúan en sistemas pre-columna, cambiando las características de los solutos que tienen escasa volatilidad o gran volatilidad dependiendo de cual sea el caso, es por eso que en muchos de los casos la técnica de derivatización se utiliza para transformar grupos funcionales protónicos en grupos no polares y que sean térmicamente estables.

Las reacciones de derivatización pueden ser:



Estas reacciones se pueden realizar antes o después de la inyección de la muestra, la diferencia radica en el tipo de reacción de derivatización a utilizar.

2.1.1 Discontinuo

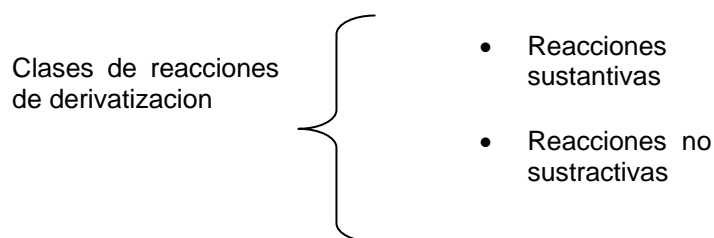
Las reacciones químicas se realizan para hacer cambios en los solutos antes de la introducción de la muestra a la columna.

2.1.2 Continuo

La derivatización se realiza en la columna, el reactivo derivatizador se introduce en el cromatógrafo inmediatamente después de la inyección de la muestra. Este tipo de reacciones se puede utilizar siempre y cuando el tiempo que dure la reacción no afecte a las constantes cromatograficas del proceso.

Existe una gran diversidad de reacciones químicas que se utilizan para la transformación de los solutos en derivados que presenten algunas propiedades cromatograficas adecuadas para su estudio.

Estas pueden agruparse en tres grupos los cuales son:



2.2 Reacciones sustractivas

En estas reacciones el grupo funcional del analito que es objeto de estudio, se hace reaccionar con otro reactivo para generar un producto derivado que no es volátil; este derivado no será arrastrado por el gas acarreador.

En el momento de realizar la inyección dentro del cromatógrafo de gases se obtiene un cromatograma donde se observa la ausencia de un pico, este correspondía al grupo funcional que fue sometido a la reacción de sustracción.

Lo anterior se puede comprobar, con la inyección al equipo tanto de la muestra original como la muestra que fue sometida a una reacción de sustracción, al comparar los cromatogramas obtenidos de ambas inyecciones.

Al utilizar las reacciones sustractivas, se obtiene:

- a) la exclusión del pico correspondiente al grupo funcional que fue sometido a una sustracción, cuyo pico puede estar traslapándose con otros picos de la muestra, los cuales se encuentran a nivel trazas
- b) la mejor resolución de picos cromatograficos complejos o mal resueltos

El caso de las parafinas es un claro ejemplo de que en ocasiones una sustracción no se trata de una reacción química sino de un método físico de separación, esto por que se utilizan tamices moleculares de distintos tamaños de poro.

Normalmente, las reacciones sustractivas se hacen de modo continuo, antes de inyectar la muestra en el cromatógrafo de gases.

2.3 Reacciones no sustractivas

Por lo general las reacciones no sustractivas son de tipo discontinuo, éstas se llevan a cabo en condiciones anhidras en frascos de vidrio forrados con teflón, la mayoría de estas reacciones son rápidas, originándose de forma instantánea a temperatura ambiente. En el caso de reacciones lentas, se eleva la temperatura, las más utilizadas son 60° C, 100° C y 150° C y en muy pocos casos se sube la temperatura hasta 200° C o se utiliza trimetilclorosilano (TMCS) que actúa como catalizador.

Suele usarse un disolvente polar como la piridina. Una vez que se ha completado la reacción, el producto derivado se inyecta en el cromatógrafo de gases.

Algunos ejemplos de este tipo de reacción de derivatización son:

2.3.1 Reacciones de sililación

Es la sustitución de un hidrógeno activo en un grupo funcional por un grupo sililo [(trimetilsililo),(-Si(CH₃)₃) o (TMS)], los efectos que ésta sustitución produce son:

- reduce la polaridad del soluto
- reduce la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno
- aumenta la volatilidad y estabilidad térmica del soluto
- mejora la resolución de los picos dentro del cromatograma
- reduce la asimetría de los picos cromatograficos
- reducción de interacciones indeseables con la columna, tales como adsorciones irreversibles

Las partes principales que debe de tener la molécula para lograr la reacción de sililación son dos:

- una de las partes de la molécula del reactivo derivatizador es una cadena orgánica que controla la volatilidad de la molécula del derivado formado, también controla la estabilidad térmica o química y la respuesta del detector a dicho derivado
- la segunda parte que conforma a la molécula de reactivo derivatizador es un grupo reactivo, el cual permite el enlace de la cadena orgánica a los solutos. Este grupo reactivo establece la selectividad del reactivo hacia determinados grupos funciones de los analitos, su rango de aplicación, la velocidad y extensión de la reacción de derivatización

Los reactivos derivatizantes que se utilizan para este tipo de reacciones son los siguientes:

Tabla 1 — Reactivos derivatizantes

Derivatizante	Nombre
TMSIM	Trimetildosilano
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
MSTFA	N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
TMSDEA	N-trimetilsilidimetilamina
MSA	N-metil-N-trimetilsililacetamida
TMCS	Trimetilclorosilano
HMDS	Hexametildisilano

De estos reactivos derivatizantes el que tiene una mayor capacidad donadora de grupos sililo es el TMSIM, y el de menor capacidad donadora de grupos sililo es el HMDS.

Existe una mezcla de reactivos de derivatizantes que tienen un gran poder de sililación, otra de sus bondades de esta mezcla es que ejerce un efecto catalítico, esta mezcla es: TMSIM-BSTFA-TMCS, en la siguiente proporción 1:1:1, en ésta mezcla el TMCS es el catalizador.

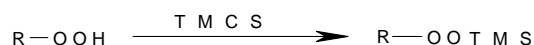


Figura 9 — Esquema general de la reacción de sililación

Los grupos funcionales en los cuales se puede realizar una reacción de sililación son: NH , NH_2 , OH , POH , $CONH_2$, CH_2CO , BOH , SH , SOH , y $COOH$.

La velocidad de formación del derivado depende de:

- la capacidad aceptora de los grupos funcionales
- la capacidad donadora de los grupos sililo
- el impedimento estérico que dificulta el acceso del reactivo derivatizante a los grupos funcionales.

El derivado sililo principalmente se forma para dar la mejor respuesta del detector de captura electrónica; este derivado no tiende a captar electrones. También puede obtenerse un aumento de la respuesta de este detector introduciendo en la molécula a derivatizar, un átomo de un halógeno en uno de los grupos metilo (Cl, Br, I), o reemplazando un grupo metilo por un anillo pentafluorfenilo.

2.3.2 Reacciones de alquilación

Al igual que la reacción de sililación, la alquilación es la sustitución de un átomo de hidrógeno activo por un grupo alquilo o en ocasiones se sustituye por un grupo arilo. Los reactivos más utilizados para las reacciones de alquilación son; los haluros de alquilo (bromuros y yoduros de hidrocarburos de bajo peso molecular) el más usado es el bromuro de bencilo) en presencia de un catalizador como oxido de plata.

Los grupos funcionales que se pueden utilizar para una alquilación son: $COOH$, $CONH_2$, SO_2COH , SO_2NH_2 , NHR , SH , $R^I COC-COR^{II}$, NH_2 y OH .

“Para obtener estos derivados se utiliza la técnica discontinua en la que el catalizador se añade al soluto en presencia de un exceso de agente derivatizador y la mezcla se agita en la oscuridad hasta que se completa la reacción”[3].

2.3.3 Reacciones de esterificación

Por lo general se utiliza este tipo de derivatización para derivatizar principalmente grupos funcionales ácidos. En este caso se utilizan alcoholes como reactivos derivatizantes.

La mayoría de las reacciones de esterificación son lentas, es por eso que se aceleran con temperaturas elevadas o utilizando un catalizador como cloruro de hidrógeno, cloruro de tionilo, tricloruro de boro o ácido sulfúrico.

Si esto no es suficiente para que la reacción se lleve a cabo, entonces se desplaza el equilibrio de la reacción esto con al finalidad de eliminar el agua que se forma en la reacción de esterificación, véase figura 9.

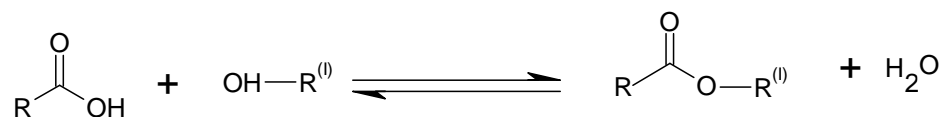


Figura 10 — Esquema general de la reacción de esterificación [4].

2.4 Técnica de derivatización empleada

La técnica de derivatización se seleccionó en base a la especie en estudio.

Existe una serie de reacciones que se pueden aplicar a este tipo de moléculas que contienen al ácido dicarboxílico como grupo funcional. Cada una de estas reacciones tiene sus ventajas y desventajas; alguna de estas ventajas es, el factor tiempo, por ejemplo la reacción de sililación, se lleva a cabo en un tiempo menor con respecto a la reacción de esterificación que es muy lenta.

La variable que se considero fue el tiempo de reacción de derivatización, tomando en cuenta que la sililación no es más que la sustitución de un átomo de hidrógeno ácido, por un grupo trimetilsilano, obteniendo como resultado un compuesto con menor polaridad, haciendo que sea más volátil y de mayor estabilidad térmica; estos resultados son favorables para que los ácidos dicarboxílicos se analicen dentro de la cromatografía de gases.

Por lo que, se optó por emplear la reacción de sililación, para llevar a cabo la derivatización.

Para la selección del reactivo derivatizante, se consideró la capacidad donadora de grupos sililo y el costo. El agente BSTFA (Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamino), tiene gran capacidad donadora de grupos sililo, reacciona rápidamente y sus subproductos (trimetilsililtrifluoroacetamida y trifluoroacetamida) son más volátiles; esta cualidad dio como resultado una menor interferencia cromatográfica.

La presencia de los átomos de fluor, tiende a ensuciar menos los detectores de ionización de flama (FID) del cromatógrafo de gases.

Debido a su naturaleza polar, el BSTFA puede actuar como su propio disolvente y puede funcionar como reactivo de sililación sin disolventes adicionales.

La energía de sililación del BSTFA se aumenta con la adición de catalizador, principalmente el TMCS (trimetilclorosilano) (1-50%), y si además se emplea piridina como disolvente éste, también funciona como un catalizador.

A continuación se muestran las estructuras (Figura 11 y Figura 12) y características más relevantes de los compuestos mencionados:

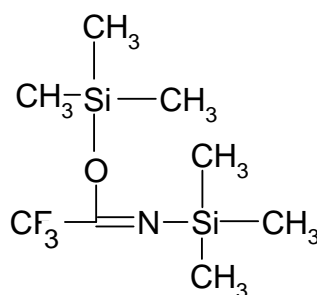


Figura 11 — Estructura química del derivatizante, N,O-Bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida

- formula molecular: $\text{CF}_3\text{C}=\text{NSi}(\text{CH}_3)_3\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$
- peso Molecular: 257,40 g/mol
- punto de Ebullición: 45° C a 55° C
- densidad: 0,969
- características: Líquido amarillo, inflamable, es sensible a la humedad

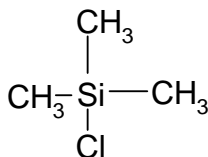


Figura 12 — Estructura química del derivatizante Trimetilclorosilano

- fórmula molecular: $\text{ClSi}(\text{CH}_3)_3$
- peso molecular: 108,66 g/mol
- punto de Ebullición: 57° C
- densidad: 0,856
- características: líquido claro de olor característico.

La reacción general de derivatización con BSTFA con TMCS es la siguiente, véase figura 13.

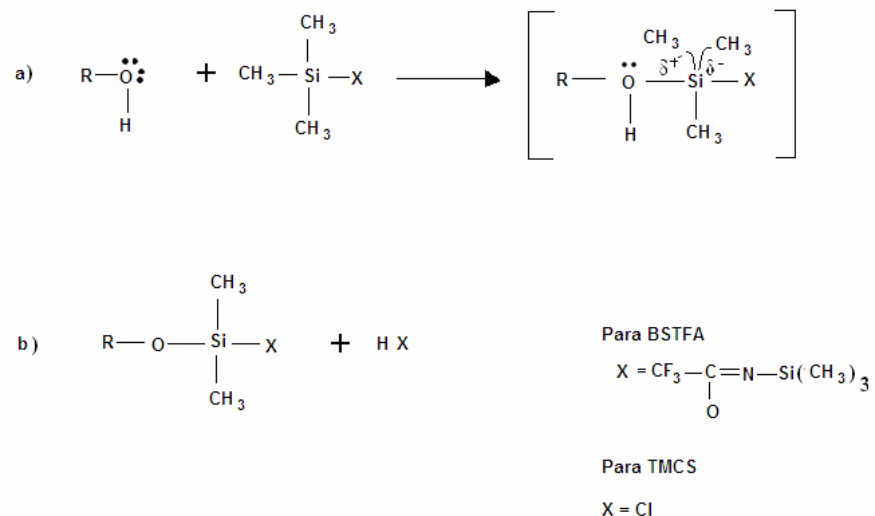


Figura 13 — Esquemización de la reacción de silación con BSTFA y TMCS [5]

La mezcla de BSTFA + TMCS es extremadamente sensible a la humedad y se debe emplear bajo condiciones anhidras, ya que si existiera un mínimo de humedad la reacción simplemente no se llevaría a cabo.

En base a lo anterior, se determinó que el mejor reactivo derivatizante a utilizar era el compuesto por BSTFA + 1% TMCS.

Como el analito en estudio es el ácido azelaico (C9), un ácido dicarboxílico, se tomaron en cuenta los posibles productos de degradación que pudieran existir en el proceso de producción. Además, por sugerencia de los laboratorios farmacéuticos interesados en el proyecto se escogieron el ácido pimélico (C7), ácido subérico (C8) el ácido sebácico (C10) y el ácido undecanoico (C11) véase Figura 14.

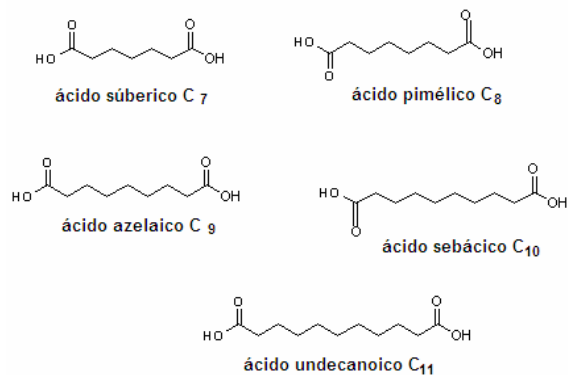


Figura 14 — Compuestos homólogos al ácido azelaico, utilizados en la experimentación

Capítulo 3.- Estándar interno

3.1 Utilidad del estándar interno para la cuantificación en CG

Los estándares internos, dentro de la cromatografía de gases son casi inevitables, sino se cuenta con un inyector automático.

Para cuantificar adecuadamente en CG es necesario la selección de un compuesto como estándar interno, que permita la reducción de errores en la inyección manual, dentro de las características principales son:

- estructura similar (grupos funcionales similares)
- tiempo de retención diferente al compuesto de estudio y a los generados por los derivatizantes, solventes y / o placebo
- señal cromatográfica generada (pico) debe estar bien resuelto, con respecto a las demás señales cromatográficas generadas por la muestra en estudio
- pico cromatográfico debe ser cercano al pico cromatográfico del analito en estudio
- no debe existir traslape de los picos con las señales con las generadas por los componentes del placebo de la muestra
- alta pureza

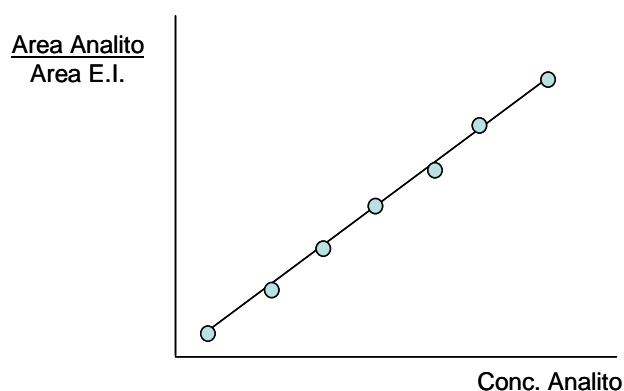


Figura 15 — Ejemplificación de una curva de calibración, empleando estándar interno

Al emplear un estándar interno se logra una precisión de 0.5% a 2 %, con inyección manual es necesario que el pico del estándar interno esté bien separado de los picos de los demás componentes de la muestra, y a la vez debe ser cercano al pico del analito.

También se logra una máxima precisión cuantitativa dentro de la cromatografía de gases, puesto que éste minimiza las incertidumbres que se introducen en el momento de la inyección de la muestra dentro del cromatógrafo de gases, la velocidad de flujo y variaciones que puedan existir en las columnas.

En este procedimiento, se introduce una cantidad medida cuidadosamente de un patrón interno en cada solución patrón y muestra(s), y entonces se usa como parámetro analítico para la proporción del área del pico del analito sobre el área del pico del estándar interno para la cuantificación del analito en base a una curva de calibración, por ejemplo véase figura 15.

Capítulo 4.- Desarrollo experimental

4.1 Desarrollo del método analítico

“El desarrollo de un método analítico se puede realizar empleando una herramienta estadística conocida como diseño de experimentos. Un diseño de experimentos involucra una serie de pruebas en las que se inducen cambios deliberados en algunos factores de algún subproceso del método analítico para observar el efecto de cada factor sobre una respuesta determinada” [6]

Para poder desarrollar un método cromatográfico, es necesario determinar una o varias respuestas a medir como tiempo de retención, área, simetría de los picos gaussianos, etc., e identificar factores que pueden afectar las respuestas dadas por el equipo.

Por lo que para el desarrollo del presente método analítico, comenzó por el establecer un proceso de derivatización, debido a que el ácido azelaico y sustancias relacionadas no son volátiles, por lo cual no pueden ser analizadas directamente por cromatografía de gases. Después fue necesario seleccionar las condiciones que permitieran la separación adecuada del ácido azelaico de sus compuestos relacionados y la búsqueda de un estándar interno, ya que la inyección al equipo es manual.

4.2 Descripción del equipo



Figura 16 — Imagen del Cromatógrafo de gases modelo buck scientific 910

El cromatógrafo de gases utilizado en la experimentación fue el modelo buck SCIENTIFIC 910, cuyas características principales son:

- a) las dimensiones del equipo son: 45,7 x 35,5 x 33 cm.
- b) sus requisitos de energía son de 110 VAC/60Hz o 220 VAC/50Hz, consume aproximadamente 750 watts, si se trabaja isotérmicamente el equipo puede funcionar con 120 VDC.
- c) su horno permite programar un rango de temperaturas desde una temperatura ambiente hasta 450° C, su tamaño es de 7 1/2" x 8" x 3"
- d) su sistema de ventilación permite que el horno retorne a la temperatura ambiente en menos de 5 minutos; esto para un mejor rendimiento.
- e) la exactitud del equipo es de $\pm 0.1^\circ \text{C}$ a 400° C.
- f) los controladores con los que cuenta el equipo son electrónicos, estos son tanto para la manipulación de temperatura, flujo del gas acarreador.
- g) en cuanto a los controles del flujo, en el caso particular del gas acarreador, el flujo se regula con ayuda del termostato, esta regulación es de alta presión, y se encuentra calibrado en libras por pulgada cuadrada (psi), siempre regula la presión del gas desde el momento de la inyección de la muestra, hasta que la muestra atraviesa la columna.
- h) programación de temperatura, La temperatura tanto del horno como la de la columna es controlada por el programa Peak Simple, en el se pueden colocar rampas y pasos ilimitados.
- i) el detector con el que cuenta actualmente es el detector de ionización de flama (FID). Este detector por lo general se utiliza para el estudio de compuestos orgánicos, como hidrocarburos, con una gama de trabajo de 10 ppm hasta el 10 % para los compuestos de C1 a C10. Se pueden manejar temperaturas que van desde la temperatura ambiente hasta los 400° C. Además este detector permite la conexión de otro detector, véase figura 17.

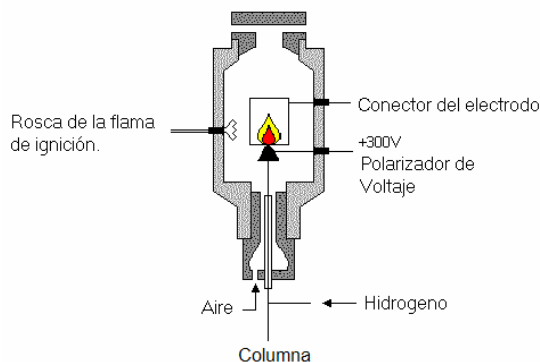


Figura 17 — Detector de ionización de flama para cromatografía de gases

4.3 Condiciones empleadas

Tipo de Columna Megabore:

- DB-5MS
- fase estacionaria 95 % metil silicon y 5 % fenilo.
- con una longitud de 30 m, DI = 0.53, df = 1.5 μm

Condiciones cromatograficas:

- gas acarreador N_2 a un flujo de 5 psi
- programa de temperaturas: 100° C por 2 min; con una rampa de 10° C/min. hasta 300° C, y a una temperatura final de 300° C por 5 min .
- inyector: On column
- volumen de inyección: 1.0 μL (Manual)

4.4 Reactivos

- ácido azelaico (C9) 99 % (laboratorios Darier, S. A.)
- ácido pimélico (C7) 98 %(laboratorios Darier, S. A.)
- ácido subérico (C8) 98 %(laboratorios Darier, S. A.)
- ácido sebácico (C10) 99 %(laboratorios Darier, S. A.)
- ácido undecanoico (C11) 99 %(laboratorios Darier, S. A.)
- ácido succínico (C4, estándar interno) 99 %(laboratorios Darier, S. A.)
- piridina R.A (Sigma-Aldrich, USA)
- derivatizante BSTFA + 1 % TMCS (Regis Technologies Inc USA)

4.5 Materiales de vidrio y otros

- a) micropipeta de volumen variable 100 μ l a 1 000 μ l y 20 μ l a 200 μ l.
- b) pipetas Pasteur
- c) matraz volumétrico de 5 ml y de 2 ml
- d) matraz Kitasato de 250 ml
- e) vasos de Precipitado de 50 ml
- f) vidrios de Reloj
- g) viales para cromatógrafo de 5 ml y 10 ml
- h) espátula

4.6 Otros Equipos

- a) balanza analítica (Mettler Toledo classic)
- b) horno
- c) cromatógrafo de gases modelo Buck scientific 910, todos los cromatogramas obtenidos en estés trabajo, corresponden a este equip

Capítulo 5 – Metodología

5.1 Metodología empleada

5.1.1 Preparación del estándar interno (EI)

Se pesan aproximadamente 40 mg de Ácido Succínico, se disuelve y afora a 5 mL con piridina. La concentración es de 8 mg de Ácido Succínico/ml.

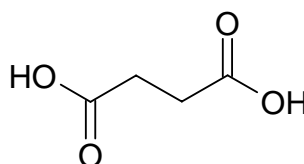


Figura 18 — Estructura química del ácido succínico, o del estándar interno seleccionado

Se selecciona al ácido succínico como estándar interno, porque tiene una estructura similar a la del analito en estudio (ácido dicarboxílico), no coeluye y su tiempo de retención no interfiere con los del los ácidos en estudio, además tiene un alto grado de pureza y era de fácil acceso en el momento de la experimentación en el laboratorio.

5.1.2 Preparación de la mezcla de los estándares

Para la preparación del estándar de los ácidos con una concentración de 4 mg de ácido / ml se pesan aproximadamente 20 mg de cada ácido (ácido subérico, ácido sebacoico, ácido undecanodioico, ácido pimélico y ácido azelaico), se disuelve y afora la mezcla a 5 mL con piridina. La curva de calibración se prepara de la siguiendo los volúmenes reportados en Tabla 2.

Tabla 2 — Preparación de los sistemas para la curva de calibración

Punto	Mezcla estándares (mL)	Estándar Interno (mL)	Derivatizante* (mL)	Conc. ácidos (mg/mL)	Conc EI (mg/mL)
1	0,1	0,40	0,50	0,20	1,60
2	0,2	0,40	0,50	0,40	1,60
3	0,3	0,40	0,50	0,60	1,60
4	0,4	0,40	0,50	0,80	1,60
5	0,5	0,40	0,50	1,00	1,60
6	0,6	0,40	0,50	1,20	1,60
7	0,7	0,40	0,50	1,40	1,60

Los sistemas se preparan en viales pequeños, tapan con teflón y se llevan al horno a 90° C por 45 minutos, pasado este tiempo se deja enfriar.

A cada sistema se extrae el contenido total con la ayuda de una pipeta pasteur y se lleva a un aforo de 2 mL con piridina. Se inyecta un 1µL en el CG.

5.2 Preparación de la muestra problema

5.2.1 Producto comercial (crema al 20 %)

Se pesan aproximadamente 50 mg de crema, se disuelven y aforan a 2 mL con piridina. La concentración es de 5 mg de ácido azelaico/mL.

5.2.2 Materia prima

Se pesan 10 mg de ácido azelaico, se disuelve y afora a 2 ml con piridina. La concentración es de 5 mg de ácido azelaico/mL, (se tomó como estándar del ácido azelaico).

5.2.3 Placebo (Blanco)

Se pesan aproximadamente 50 mg de placebo, se disuelve y afora a 2 ml con piridina.

5.2.4 Placebo fortificado

Se pesan aproximadamente 50 mg de placebo y 10 mg de la materia prima (ácido azelaico), se disuelve y afora a 2 ml con piridina. La concentración es de 5 mg de ácido azelaico/ml.

Tabla 3 — Preparación de los sistemas para las muestras.

Muestra	muestra (ml)	estandar. interno (ml)	piridina (ml)	Derivatizante (ml)
crema 20 %	0,40	0,40	0,60	0,50
materia prima	0,40	0,40	0,60	0,50
placebo	0,40	0,40	0,60	0,50
Placebo fortificado	0,40	0,40	0,60	0,50

Los sistemas se preparan en viales pequeños, se tapan con teflón y se llevan al horno a 90 °C por 45 minutos. A cada problema se le extrae el contenido total con la ayuda de una pipeta pasteur y se lleva a un aforo de 2 mL con piridina. Cada problema se inyecta 1 µl. Todo lo anterior se esquematiza en Figura 19.

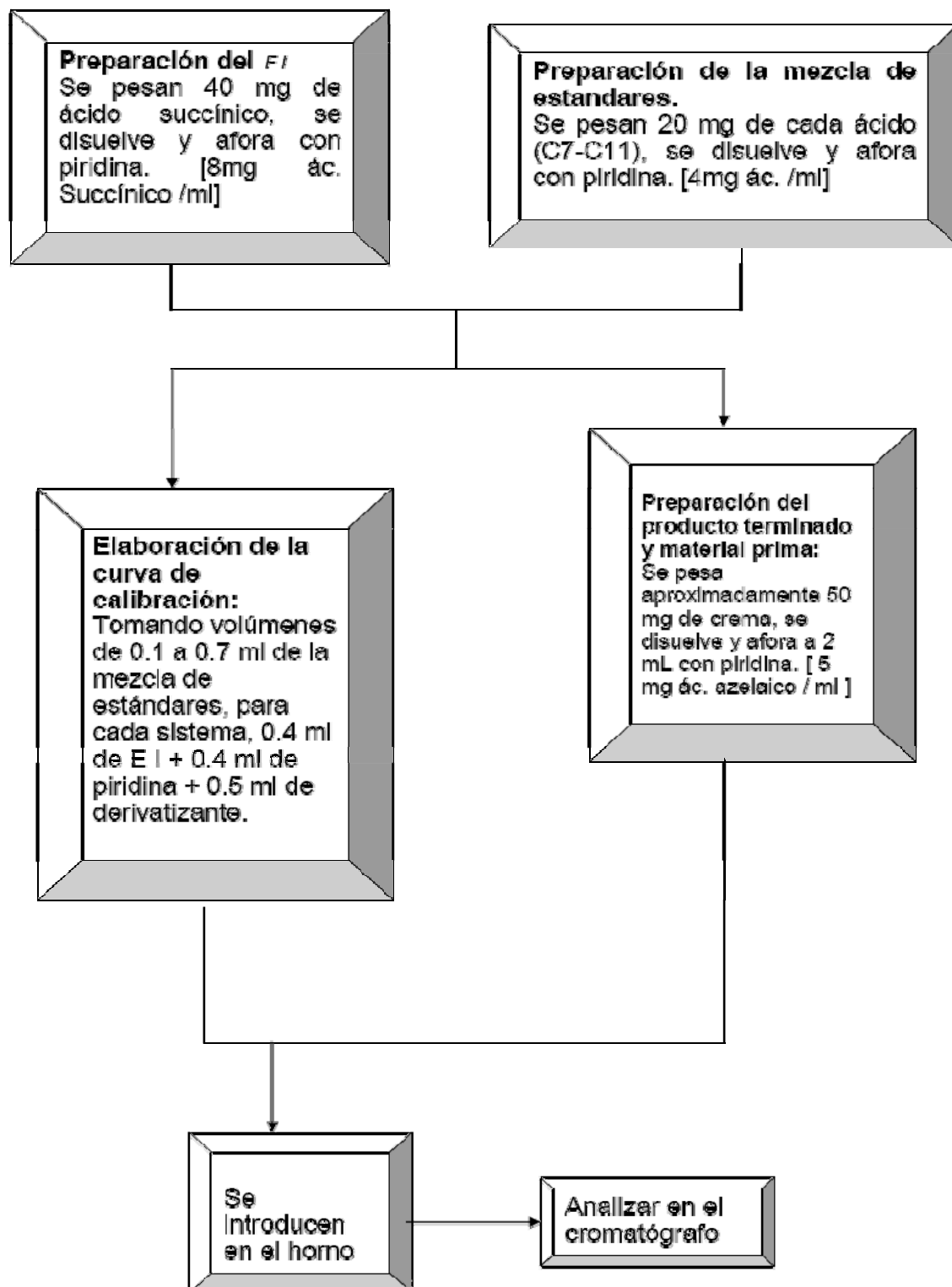


Figura 19 — Diagrama de flujo de la metodología empleada

Capítulo 6 – Desarrollo del método cromatográfico

6.1 Análisis cromatográfico

Sabiendo que los ácidos dicarboxílicos son poco volátiles, era necesario formar su correspondiente trimetilsilil derivado; con la técnica de derivatización seleccionada la cual ya fue mencionada con anterioridad. Véase figura 20, se presenta el cromatograma obtenido de la inyección (tomando un volumen de 1 μ l) de una muestra de la mezcla de estándares que se utilizaron en el estudio, también se encuentran las condiciones cromatograficas empleadas.

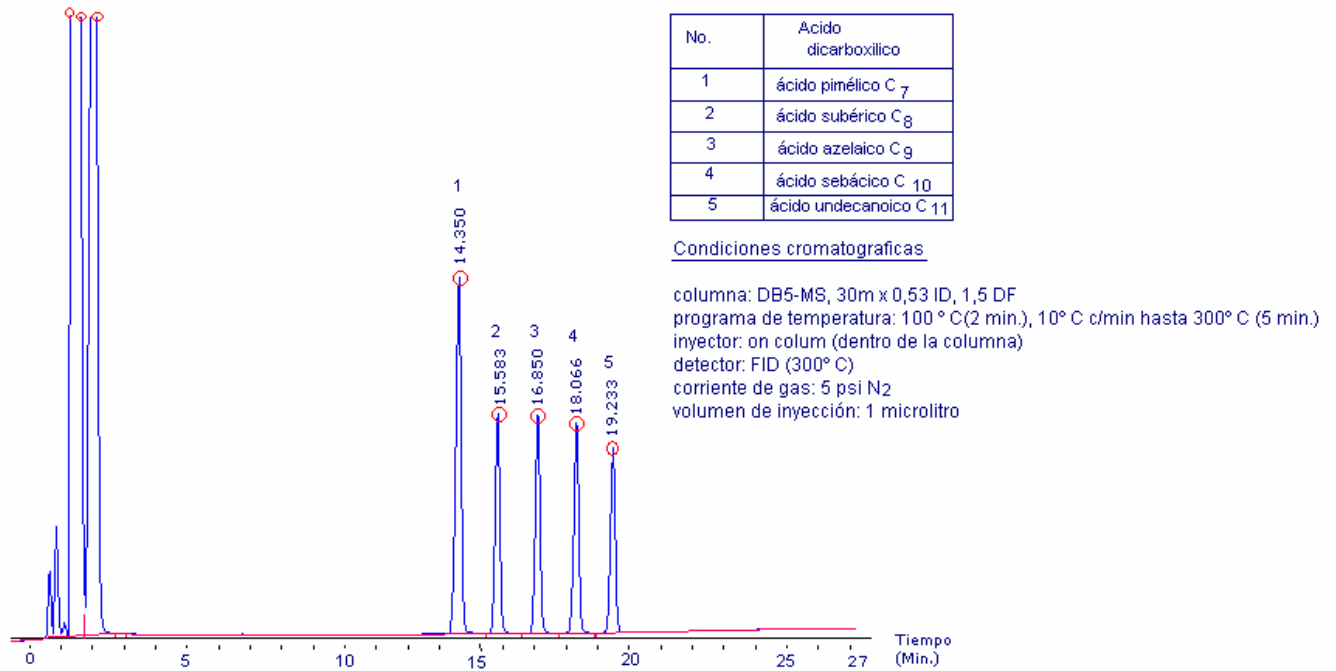


Figura 20 —. Cromatograma de la mezcla de estándares de los ácidos dicarboxílicos (C7- C11) en forma de su derivado trimetilsilil

Las primeras señales corresponden a los residuos de reactivo derivatizante y el disolvente piridina; estas señales se corroboran a partir de elaborar el blanco formado con piridina y reactivo derivatizante (véase Figura 21).

De acuerdo con lo anterior antes de 4 minutos, las señales que son las que corresponden a los residuos propios de la reacción de derivatización, no serán consideradas en discusiones posteriores.

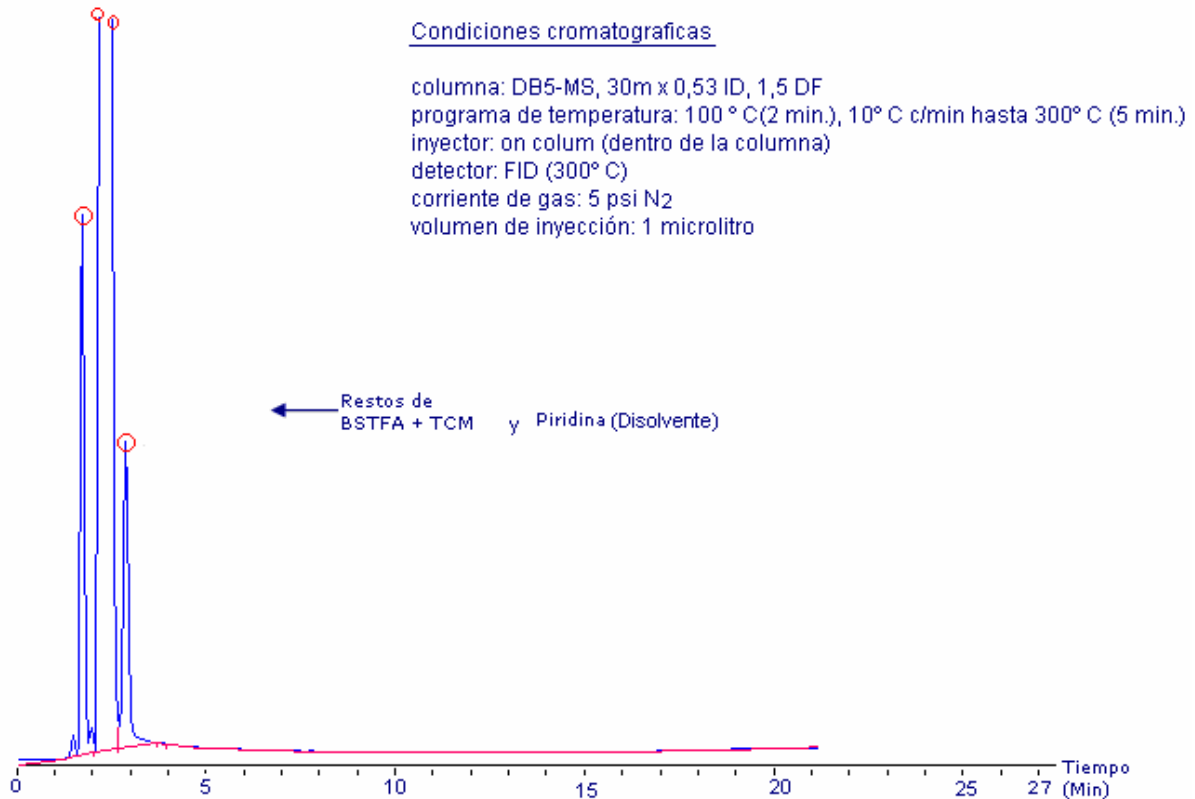


Figura 21 — Cromatograma del Blanco (derivatizante + piridina), ambos derivatizados)

Se realizó la caracterización de cada uno de los estándares, prosiguiendo de la siguiente manera; de forma individual se inyectaron los estándares, a fin de conocer su tiempo de retención en las condiciones cromatograficas empleadas, obteniendo como resultado la existencia de un pico gaussiano con su respectivo tiempo de retención característico para cada uno de los estándares. (Véanse Anexo A Figuras A.1 a la Figura A.5).

Ya obtenido el orden de elusión de cada uno de los estándares, se realizo una mezcla de estándares y se derivatizaron de la manera antes mencionada; (véase Figura 19) las señales mostradas en este cromatograma tienen un comportamiento gaussiano bien definido.

Los resultados de la mezcla de estándares, se manejaron estadísticamente, obteniendo lo siguiente (véase Tabla 4):

Tabla 4 — Tiempos de retención y parámetros estadísticos de la mezcla de ácidos dicarboxílicos.

Ácido Dicarboxílico	t_R (min)	σ	C.V. (%)	n
Succínico (C4)	9,80	0,06	0,56	7
Pimélico (C7)	14,09	0,05	0,34	7
Suberico (C8)	15,35	0,04	0,29	7
Azelaico (C9)	16,61	0,04	0,25	7
Sebacico (C10)	17,80	0,04	0,23	7
Undecanoico (C11)	18,95	0,04	0,19	7

Donde:

- σ : Desviación estándar.
- C.V. Coeficiente de variación.
- t_R : Tiempo de Retención
- n : Promedio de muestras de estándar, inyectadas en el CG

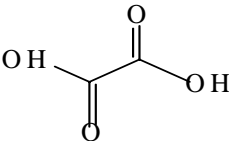
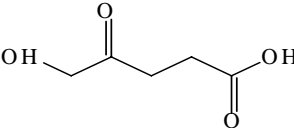
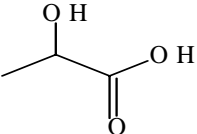
En la tabla anterior, se muestran los tiempos de retención, desviación estándar, coeficiente de variación para cada uno de los compuestos derivatizados. En el caso del ácido de azelaico (C9) tiene un tiempo de retención promedio de 16.61 min. y un C.V. de 0.25 % lo cual hace aceptable, su identificación y separación de sus compuestos homólogos por cromatografía de gases en las condiciones seleccionadas y por tanto desarrollar un método de cuantificación en esta técnica.

A partir de los datos obtenidos de este cromatograma se calculó la R_s para los pares de compuestos C8-C9 y C9-C10 obteniéndose un de valor de 2,75 y 2,44 respectivamente, obteniendo una eficiencia de separación total. Lo cual es aceptable, demostrándose que la resolución obtenida para el ácido azelaico es muy buena, por que el ácido azelaico se encuentra resuelto (separado) con respecto a compuestos vecinos y ha alcanzado una resolución a línea de base.

6.2 Selección de estándar interno

Para determinación de un estándar interno a utilizar en la experimentación se tomó como referencia la estructura molecular del ácido azelaico (en cuanto a los grupos funcionales de la molécula que en este caso el ácido dicarboxílico), y con los reactivos disponibles en el laboratorio, se probaron los compuestos reportados en la Tabla 5.

Tabla 5 — Ácidos disponibles para emplear como estándar interno

COMPUESTO	FORMULA	ESTRUCTURA
Ácido oxálico	$C_2H_2O_4$	
Ácido succínico	$C_4H_6O_4$	
Ácido Láctico	$C_3H_6O_3$	

Las muestras de estándar interno se derivatizaron en la condiciones descritas anteriormente en la metodología empleada, para determinar el comportamiento en las condiciones de análisis propuestas.

Los cromatogramas de cada compuesto individual se encuentran en el Anexo A véase Figuras A.6 a la Figura A.8. El tiempo de retención obtenido se reporta en Tabla 6.

Tabla 6 — Tiempos de retención de los ácidos posibles a utilizar como estándar interno

Ácido	t_R (min)
Acido láctico	3,433 – 3,75
Ácido oxálico	6,866
Ácido succínico	9,80

Analizando los resultados obtenidos en la tabla se tiene que para el caso del ácido láctico, sus resultados muestran que tiene un t_R de 3,43 min a 3,75 min.; y el cromatograma correspondiente a este ácido (véase Figura A.6).

En esta Figura se observa la existencia de una coelusión con otro compuesto de t_R 3,75; esto puede deberse a que dentro de la molécula del ácido láctico existen dos grupos funcionales diferentes, por lo que no trata de un ácido dicarboxílico, el cual a su momento de derivatización se obtienen dos derivados debido a los otros grupos funcionales (ácido dicarboxílico y alcohol ver su estructura orgánica en la Tabla 5) que presenta la molécula.

Además de que su señal puede confundirse con las generadas por el blanco (Figura 21). En consecuencia el ácido láctico se descarta para su uso como estándar interno.

Para el ácido oxálico (véase Anexo A Figura A.7), el t_R mostrado es de 6,66 min. Su señal cromatográfica (pico gaussiano) se encuentra bien definida, esta señal no interfiere con las señales generadas por el blanco (véase Figura 21), placebo fortificado (véase Figura 22) y ácido el azelaico. Se puede considerar como estándar interno.

Para el caso del succínico (véase Anexo A, Figura A.8) presenta un pico cromatográfico con t_R de 9.80 min., y es cercano al del ácido azelaico, no existe traslape o coelusión con los compuestos homólogos de los ácidos dicarboxílicos, y además no hay ninguna señal con el cromatograma blanco (véase Figura 20) y tampoco en el placebo fortificado (véase Figura 21). Estos mismos parámetros se cumplen para el ácido oxálico, sin embargo

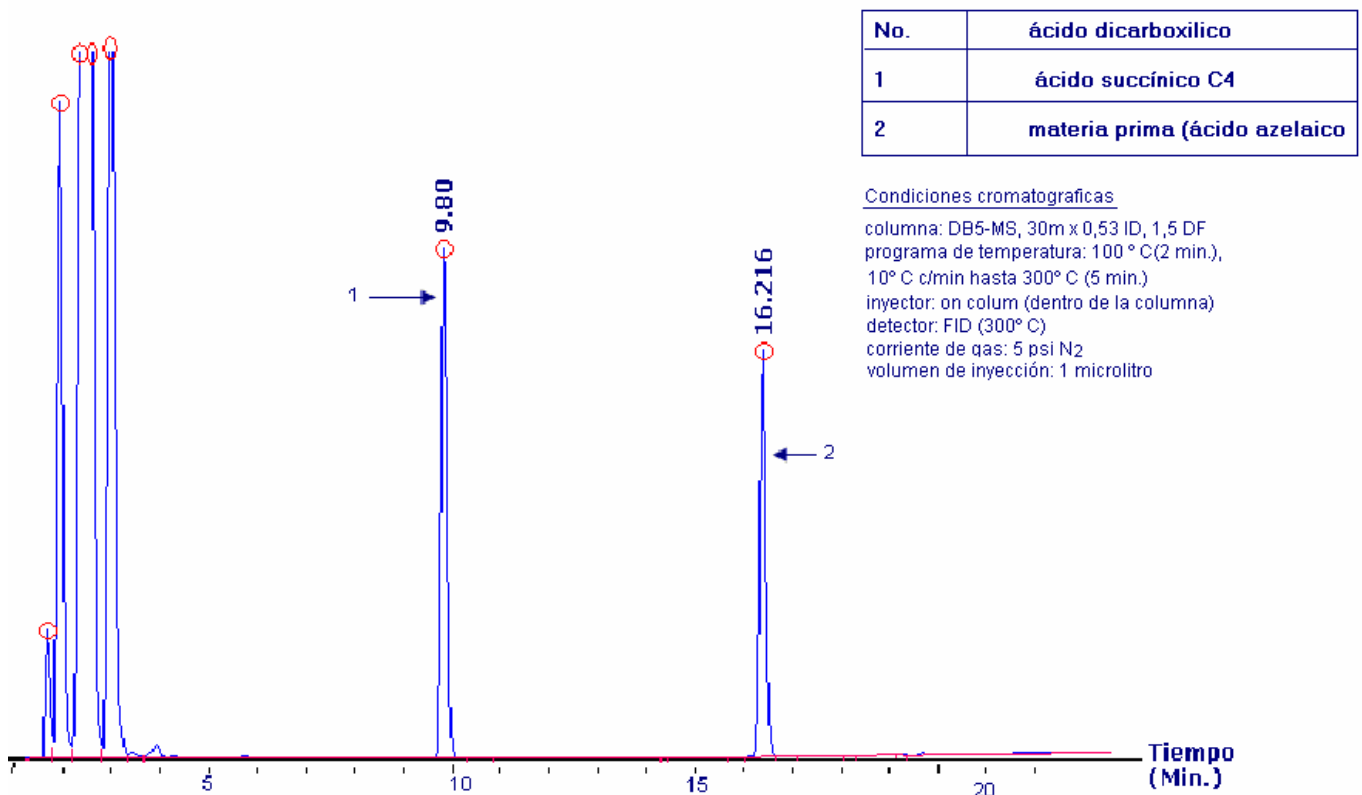


Figura 22 — Cromatograma de placebo fortificado con estándar ambos derivatizados

Por otra parte en el cromatograma del blanco no se presenta ninguna señal en el tiempo de retención del ácido azelaico. Para garantizar la separación de los compuestos, se realiza una mezcla de ácido succínico y ácido azelaico, se inyecta y analizan en el CG.

El resultado se muestra en el siguiente cromatograma (véase Figura 23).

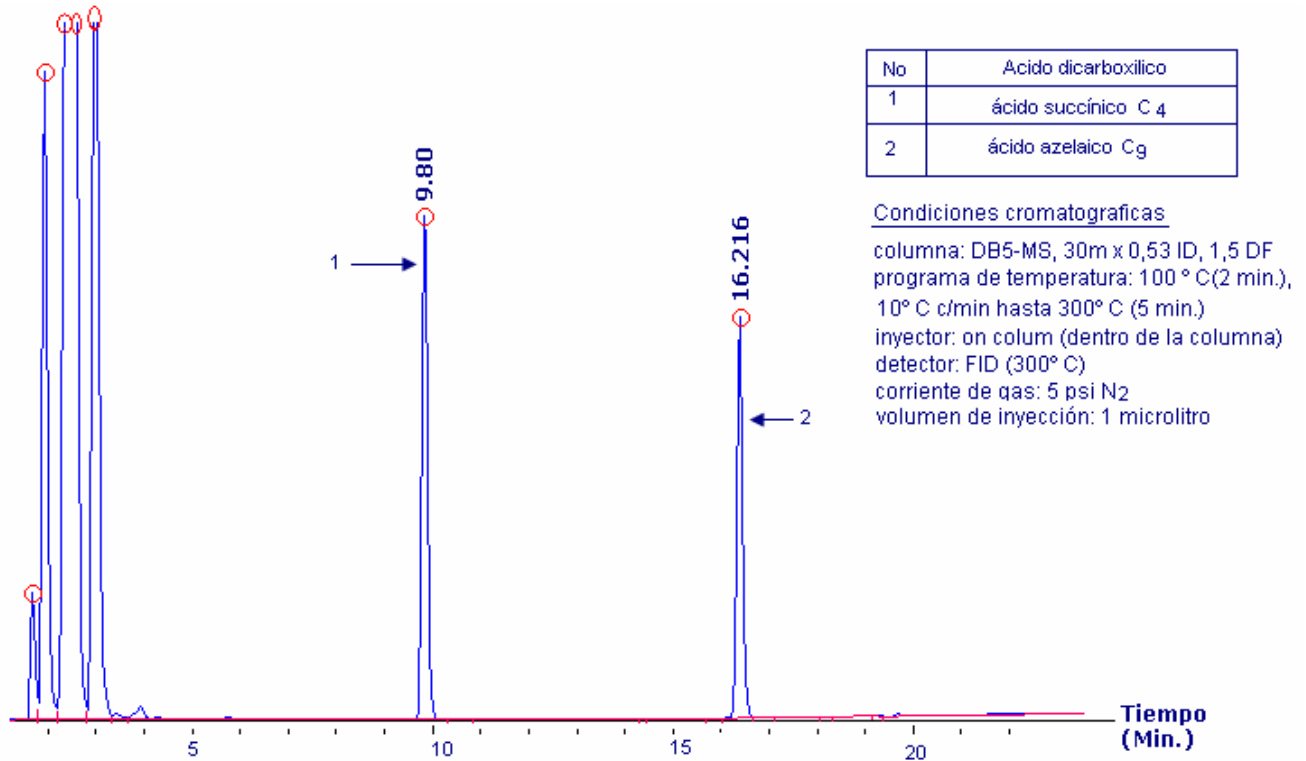


Figura 23 — Cromatograma obtenido para la mezcla de ácido succínico y ácido azelaico

El cromatograma anterior permite verificar, que:

- a) no existe interferencia alguna entre el estándar interno y el ácido en estudio (ácido azelaico)
- b) las señales que muestra el cromatograma no interfieren con el blanco (Figura 21)
- c) ni en las señales mostradas del cromatograma placebo fortificado (Figura 22)
- d) los t_R aquí obtenidos coinciden con los t_R obtenidos anteriormente tanto para el ácido azelaico como el ácido succínico que es el estándar interno

A fin de asegurar el grado de no interferencia de las señales, tanto del estándar interno como la mezcla de ácidos estándares (C7, C8, C9, C10, C11) utilizados, en el estudio, se realizó una mezcla de ácido succínico + mezcla de ácidos estándares, esta muestra se derivatizo y se inyectó al CG, (véase Figura 24).

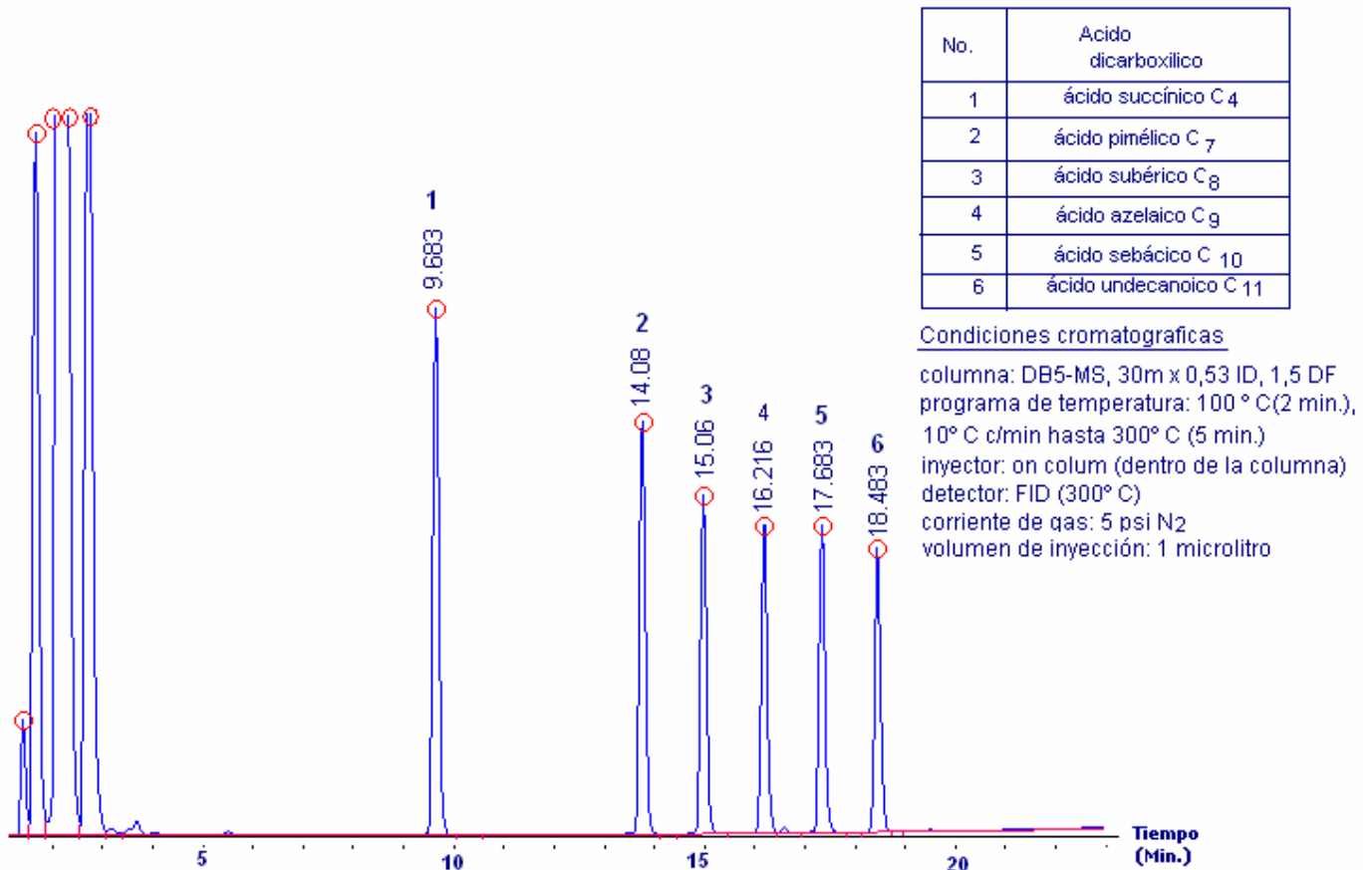


Figura 24 — Cromatograma de la separación de los derivados de los ácidos dicarboxílicos

De la figura anterior, se confirma que el estándar interno (ácido succínico) seleccionado no interfiere con ninguno de los otros analitos (C₇, C₇, C₉, C₁₀, C₁₁) por lo que se utilizará como estándar interno en lo posterior.

Al observar la Figura 24 y 25, se revalida, la no interferencia del estándar interno con la mezcla de ácidos estándares utilizados en la experimentación.

En la Figura 24 se muestran las señales obtenidas de la muestra de estándar interno y la mezcla de los ácidos estándares (C7, C7, C9, C10, C11), mientras que en la Figura 25 las señales mostradas son de la mezcla de ácidos estándares.

Comparando ambas figuras se tiene que el estándar interno seleccionado no interfiere con los tiempos de retención de la mezcla de ácidos estándares empleados en la experimentación.

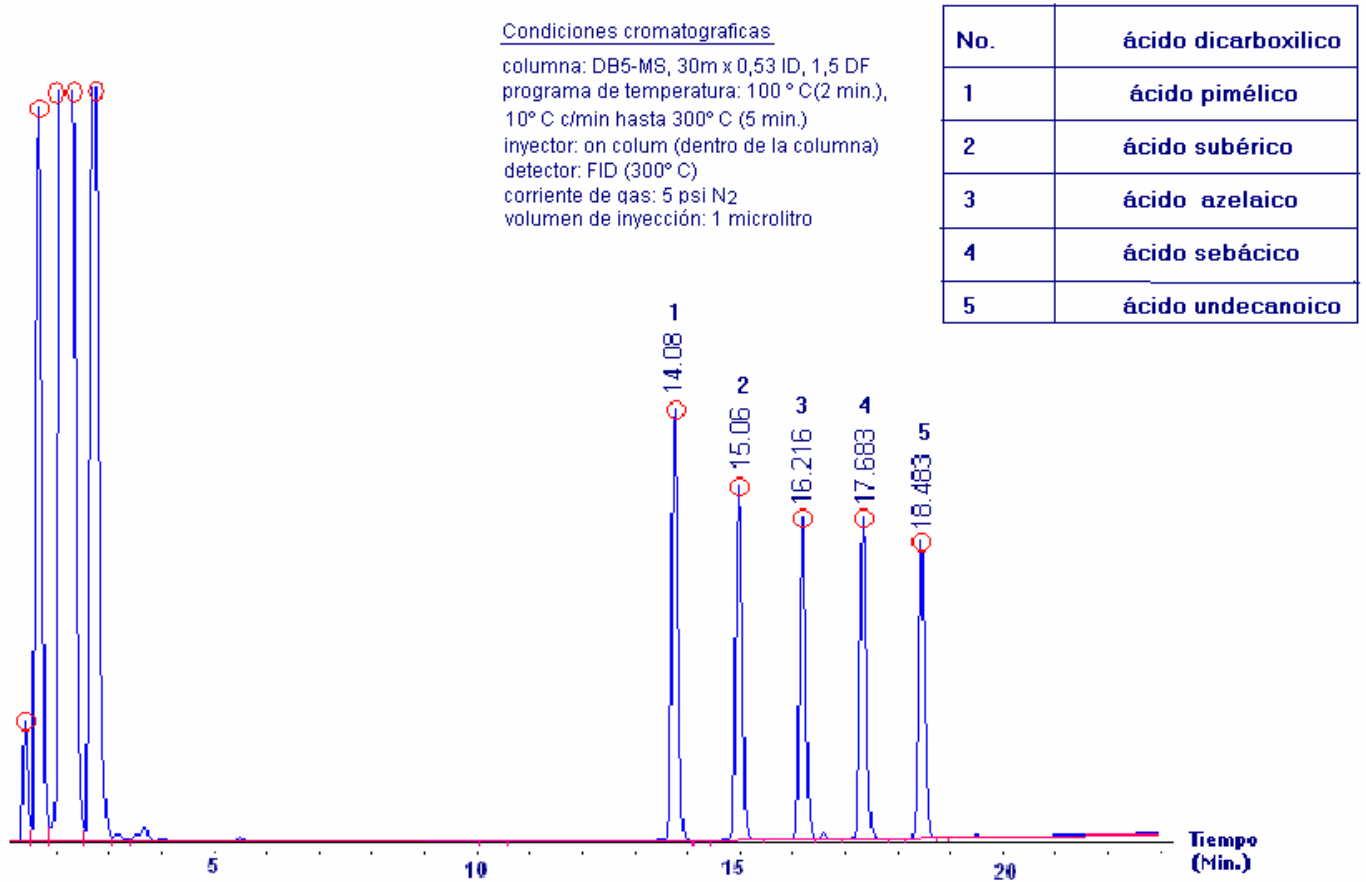


Figura 25 — Cromatograma de la mezcla de ácidos dicarboxílicos estándar

6.3 Análisis de interferencia

Una vez determinada la cantidad necesaria del placebo, se pesa, se adiciona estándar interno, se derivatiza la muestra y se afora con piridina a 2 ml., para que posteriormente sea analizada en el CG.

Esto se realiza, para ratificar que no hay presencia de otros picos relacionados con los excipientes (véase Figura 26).

Como dentro del desarrollo de un método analítico es necesaria la elaboración de un placebo (véase Figura 27) y placebo fortificado (véase Figura 28), para ratificar la no presencia de picos cromatograficos diferentes a los ya obtenidos.

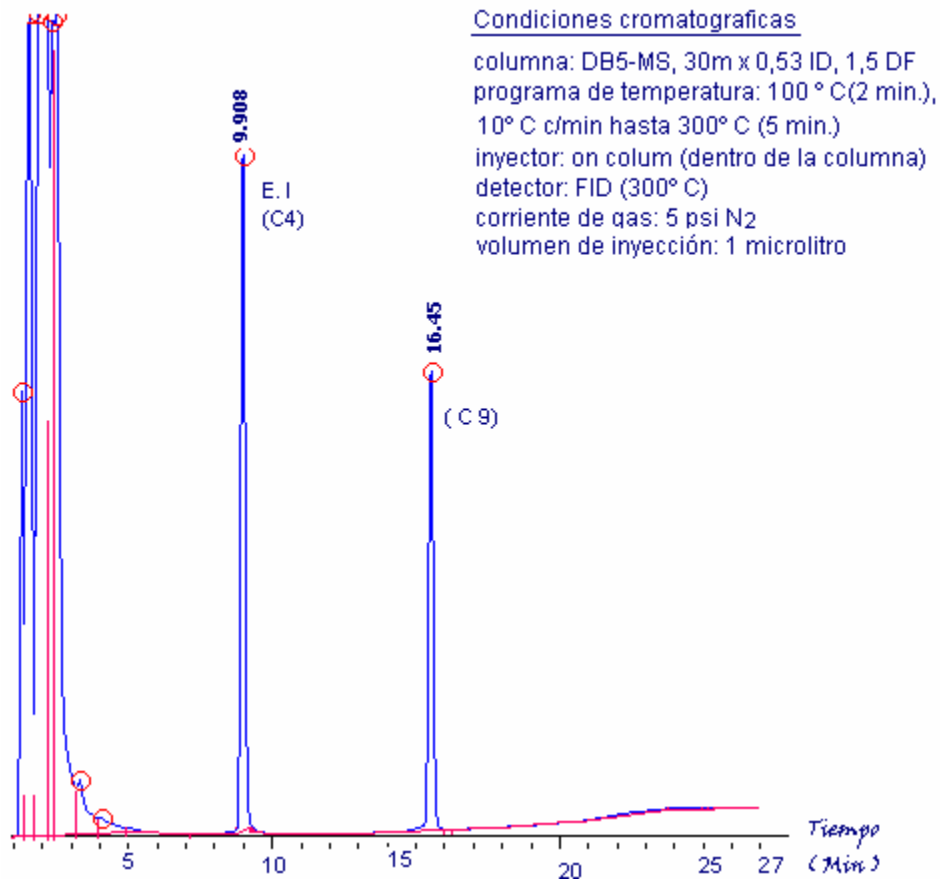


Figura 26 — Cromatograma de la muestra problema con estándar interno

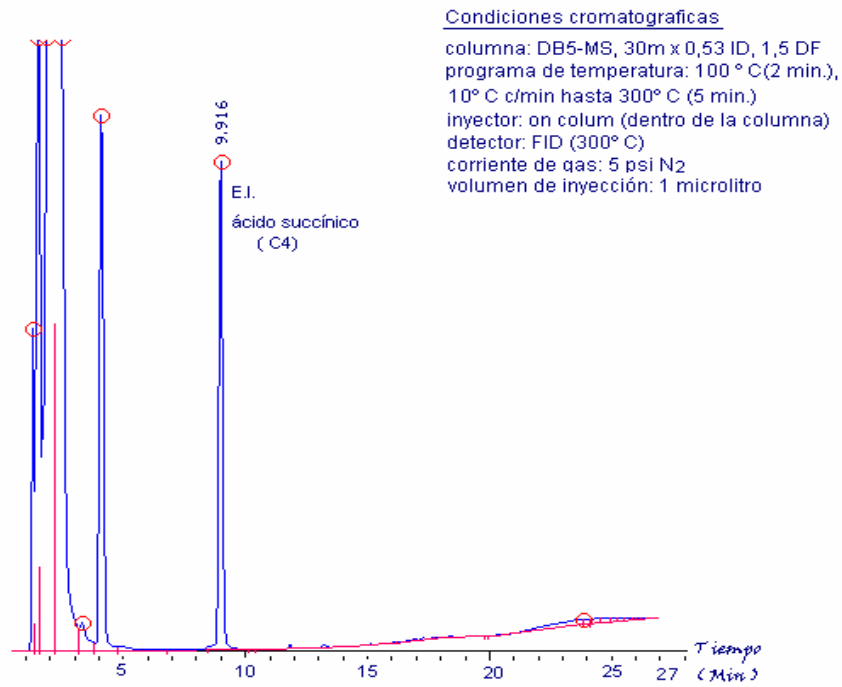


Figura 27 — Cromatograma de una muestra de placebo con estándar interno

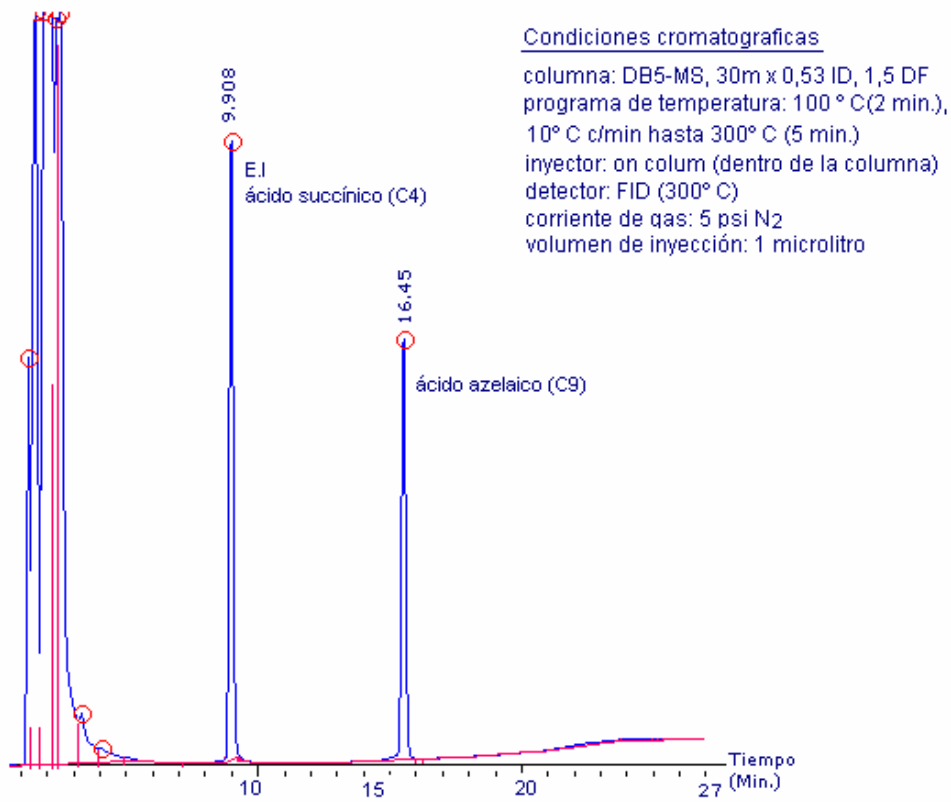


Figura 28 — Cromatograma del placebo fortificado con estándar interno

Al observar las Figuras 26, 27, y 28 se determina la no existencia de picos cromatograficos, que pudieran interferir con la metodología empleada en el presente trabajo.

6.4 Curva de calibración

La curva de calibración del presente trabajo se elaboro, de acuerdo a lo reportado en la Tabla 2, donde se reportan las concentraciones empleadas en la experimentación (véase capítulo 5- Metodología empleada)

A continuación se realizara el análisis de los resultados obtenidos.

6.5 Curva de calibración sin estándar interno

La curva de calibración sin estándar interno, se grafico el área del ácido succínico (estándar interno) vs. ácido azelaico de acuerdo a las concentraciones reportadas en la Tabla 7.

Tabla 7 — Elaboración de la curva de calibración sin estándar interno

Punto	Mezcla estándares (ml)	Conc. ácidos (mg/ml)
1	0,1	0,2
2	0,2	0,4
3	0,3	0,6
4	0,4	0,8
5	0,5	1
6	0,6	1,2
7	0,7	1,4

Los cromatogramas se encuentran en el Anexo A véanse Figuras A.9 a la A.13; con los resultados obtenidos de los cromatogramas, se realizó el tratamiento estadístico, obteniéndose la siguiente curva de calibración, (véase Figura 29).

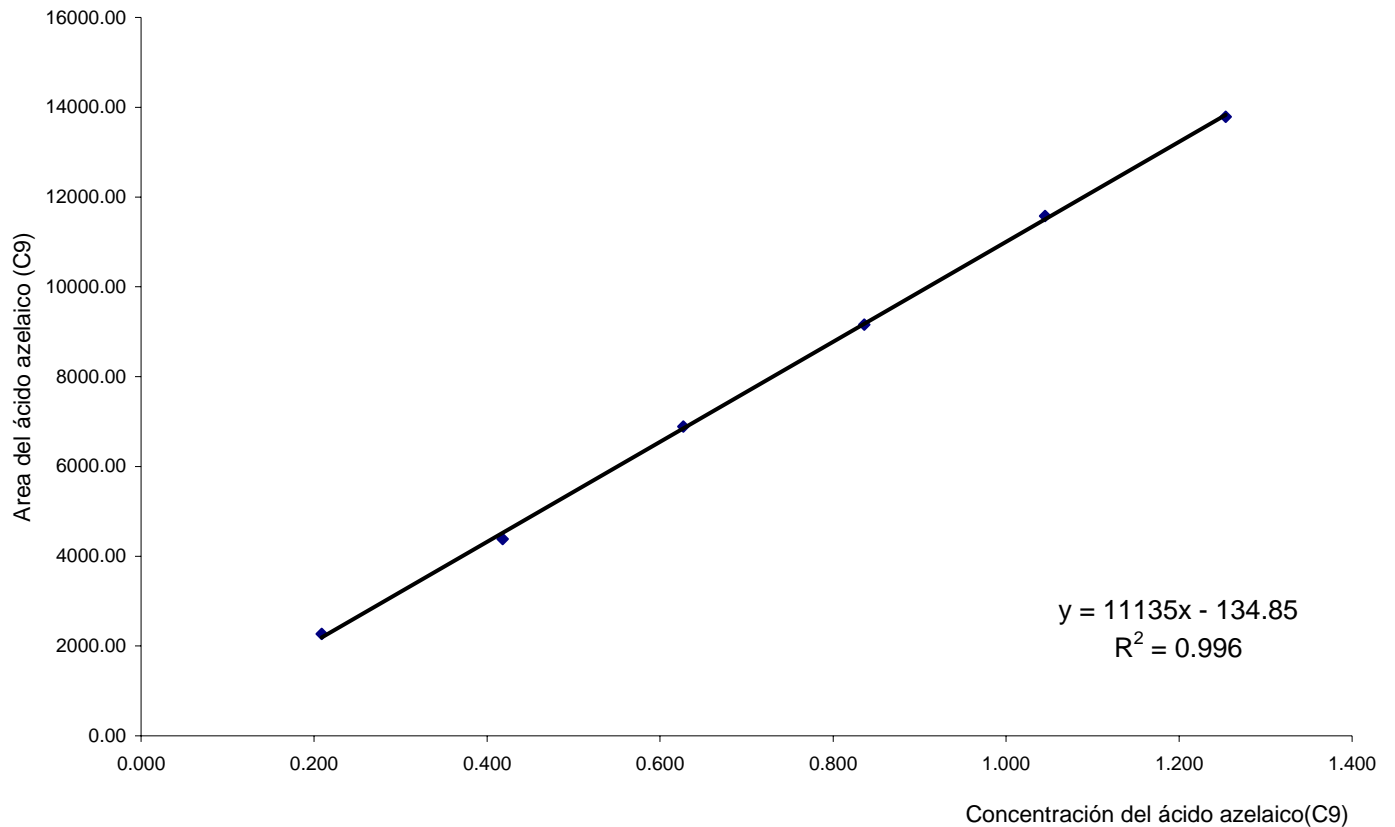


Figura 29 — Curva de calibración de (C9), sin estándar interno (C4), para la determinación del ácido azelaico en muestras farmacéuticas, por cromatografía de gases.

Con la figura anterior, se demuestra que el coeficiente de determinación (R^2), es igual a 0,996 9 cuyo valor, linealmente, es adecuado.

Así mismo se llevaron a cabo las curvas de calibración para los ácidos dicarboxílicos estándares utilizados en desarrollo experimental, los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 8.

Los gráficos de cada uno de los ácidos estándares se encuentran dentro del el Anexo A en las Figuras A.14 a la Figura A.17.

Tabla 8 — Resultados de las curvas de calibración sin estándar interno de cada uno los ácidos dicarboxílicos

Ácido dicarboxílico	Pendiente (m)	Ordenada al origen (b)	Coefficiente de determinación (R^2)
Acido Pimélico (C7)	789,6	-75,344	0,994
Acido Subérico(C8)	8 206,2	-158,52	0,997
Acido Azelaico (C9)	8 746,2	-102,4	0,996
Acido Sebácico (C10)	8 639,3	-428,52	0,996
Acido Undecanoico(C11)	7 981,7	-180,17	0,994

De acuerdo a la tabla anterior, los resultados obtenidos de las curvas de calibración, es decir, el valor del coeficiente de correlación lineal, todos los estándares presentan un comportamiento lineal, estos resultados en cuanto a linealidad se consideran aceptables.

6.6 Curva de calibración con estándar interno

Esta curva se preparó como lo indica la Tabla 7, pero con la adición del estándar interno.

Se le agregó 0,45 ml de ácido succínico (C4) a cada sistema, previa derivatización. Los cromatogramas respectivos se encuentran en el Anexo A en las Figuras A.18 a la Figura A.24.

Los datos obtenidos de cada cromatograma, correspondiente para cada ácido dicarboxílico; se analizaron estadísticamente, los resultados obtenidos de este análisis se encuentran en la siguiente tabla (véase Tabla 9).

Tabla 9 — Resultados de las curvas de calibración con estándar interno de cada uno los ácidos dicarboxílicos

Acido dicarboxílico	Pendiente (m)	Ordenada al origen (b)	Coefficiente de determinación (R^2)
Ácido pimélico (C7)	0,575	-0,002 2	0,998
Ácido subérico(C8)	0,592	-0,009 2	0,998
Ácido azelaico(C9)	0,631	-0,004 8	0,998
Ácido sebácico(C10)	0,625	-0,029 2	0,996
Ácido Undecanoico(C11)	0,576	-0,010 4	0,996

En la tabla anterior es evidente que los resultados presentan una mejora significativa, por ejemplo, incluso visiblemente, se refleja, en el momento en que se grafican todos los datos obtenidos de los cromatogramas; por ejemplo la curva de calibración correspondiente al ácido azelaico se tiene lo siguiente (véase Figura 30). Aquí

se observa una menor dispersión de los resultados para cada punto de la curva, además de que la ordenada al origen es más cercana a cero.

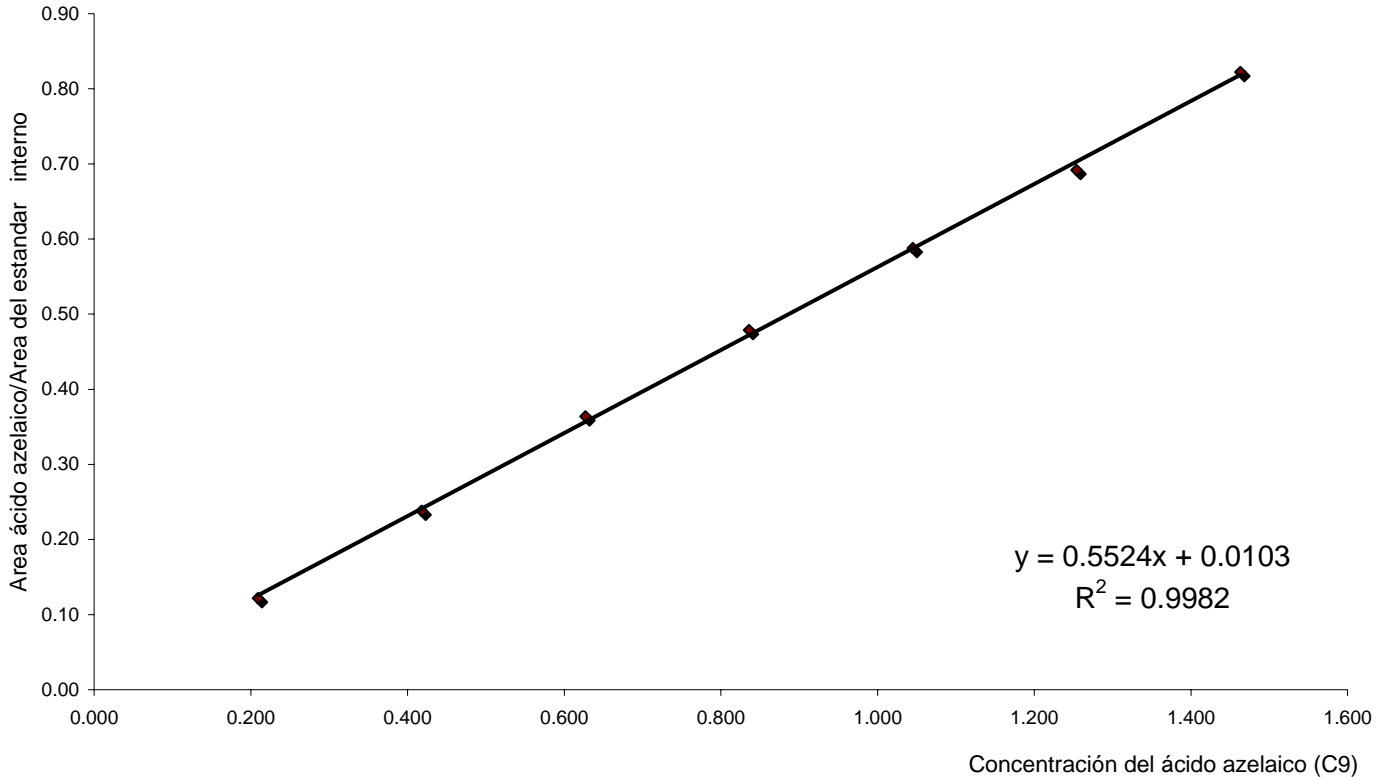


Figura 30 — Curva de calibración de (C9), con estándar interno (C4), para la determinación del ácido azelaico en muestras farmacéuticas, por cromatografía de gases

Al utilizar al ácido succínico como estándar interno, se obtiene un valor de $R^2 = 0,998 2$ (véase Figura 30), en cambio sin la utilización de un estándar interno el valor del coeficiente de correlación lineal (R^2) igual a 0,996 9.

De los resultados obtenidos de ambas curvas de calibración, con y sin estándar interno para C9, el valor de coeficiente de correlación lineal es más apropiado utilizando el estándar interno, ya que el principal objetivo del presente trabajo es el establecer una metodología analítica que permita la determinación del ácido azelaico y sus homólogos en una formulación farmacéutica, teniendo la máxima precisión cuantitativa. Esta precisión se logra con la utilización del estándar interno.

Lo discutido anteriormente, se repite para el análisis de linealidad de los ácidos dicarboxílicos (pimélico, subérico, sebacoico y undecanoico).

6.7 Especificidad

Comparando los cromatogramas obtenidos de las muestras del placebo fortificado y el producto comercial crema al 20 % (véase Figura 31 y Figura 32), se observa que tanto el estándar interno como el ácido azelaico se separan con una buena resolución; cada uno presenta un pico gaussiano con tiempos de retención característicos (véase Tabla 10).

Tabla 10 — Tiempo de retención, para materia prima y producto farmacéutico

Muestra	t _R del estándar interno (min.)	t _R del ácido azelaico (min.)
Crema al 20 %	9,70	16,23
Materia prima	9,66	16,21

Observado la tabla anterior, los tiempos de retención son similares, en ambas muestras, en cuanto a los primeros picos que se presentan al inicio de ambos cromatogramas; éstos indican la presencia de excipientes presentes en la formulación, los cuales no interfieren con los tiempos de retención estándar interno (C4), como el del ácido azelaico (C9) que es de especial interés.

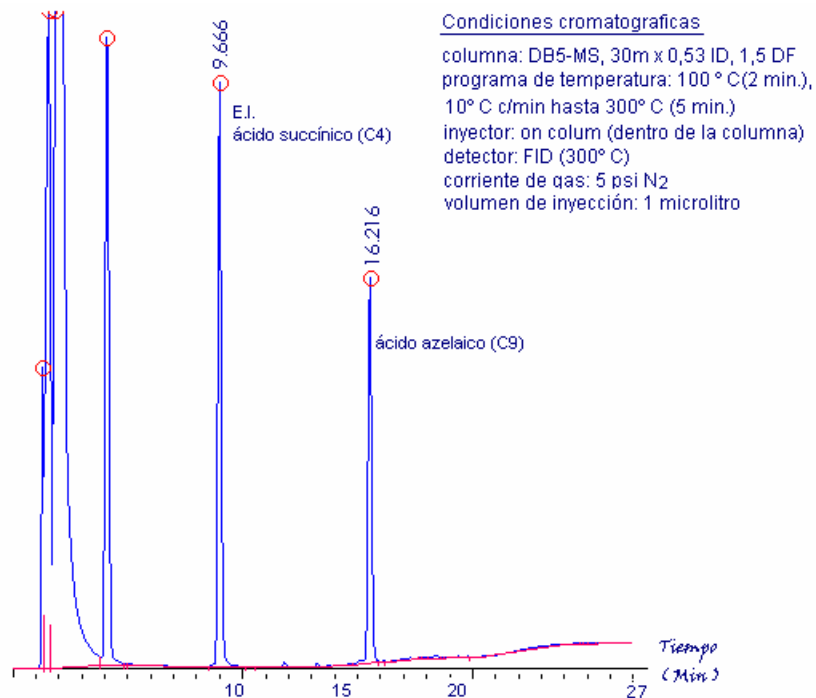


Figura 31 — Cromatograma de una muestra de placebo fortificado

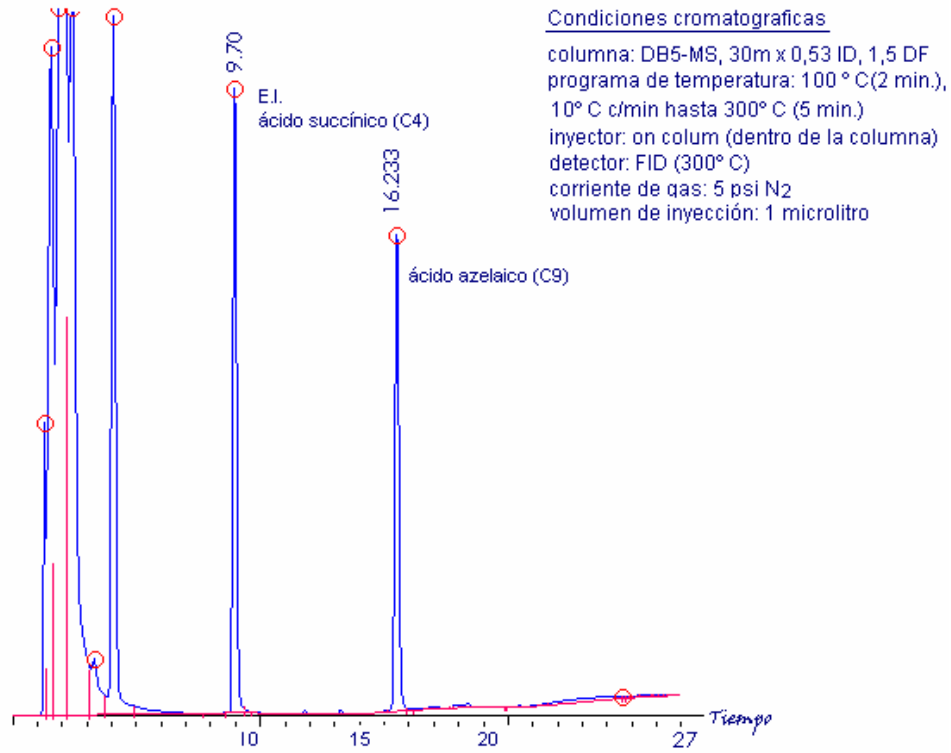


Figura 32 — Cromatograma de una muestra del producto comercial (crema)

6.8 Reproducibilidad

Para saber la reproducibilidad del método son necesarios los datos estadísticos obtenidos del tiempo de retención (t_r) de cada uno de los ácidos dicarboxílicos que conforma el estudio, estos datos fueron tomados de las curvas de calibración con estándar interno y sin estándar interno, estos resultados se encuentran en la siguiente tabla. El número de muestras utilizada para cada ácido dicarboxílico es de 7.

Tabla 11 — Resultados del tratamiento estadístico aplicado a los cromatogramas

Ácido dicarboxílico	t_r (min) promedio	σ	C.V %
Ácido succínico (C4)	9,69	0,015	0,152
Ácido pimélico (C7)	13,79	0,022	0,158
Ácido subérico (C8)	15,01	0,020	0,136
Ácido azelaico (C9)	16,22	0,022	0,138
Ácido sebácico (C10)	17,38	0,022	0,117
Ácido undecanoico (C11)	18,49	0,022	0,121

Con la tabla anterior se confirman la reproducibilidad del método con ambas curvas de calibración, en el rango de concentraciones de trabajo, y con un coeficiente de variación para el caso del ácido en interés (C9) que tiene un valor de 0,138 % por lo que éste valor es menor al 2 %, por lo tanto, cumple con el criterio de aceptación, según la bibliografía.

Es por esto que se pueden cuantificar diversas muestras de productos comerciales que contengan al ácido azelaico como principio activo con una cierta precisión y exactitud adecuada.

Por otro lado, en el caso de la curva de calibración sin estándar interno, el valor obtenido del coeficiente de determinación para el ácido azelaico (C9). Es de 0,996 9, y una ordenada al origen – 428,552, existiendo una relación lineal entre la concentración de C9 y área de C9, esto se ajusta a una la línea recta.

El coeficiente de variación para el caso del ácido en interés (C9) tiene un valor de 0.138 % por lo que este valor es menor al 2 %, por lo es aceptable, por lo tanto se pueden cuantificar diversas muestras de productos comerciales que contengan al ácido azelaico como principio activo.

Siendo que las dos curvas de calibración que se realizaron presentan una buena linealidad, ambas son consideradas adecuadas para la cuantificación del ácido azelaico. Más adelante se compara el % de recuperación obtenido de ambas curvas de calibración para las muestras problema, donde se mostrará la utilidad de un estándar interno.

Se tomaron en cuenta los ácidos dicarboxílicos homólogos al ácido azelaico, esto fue con el fin de tomar en cuenta a los posibles productos de degradación que pudieran existir en la síntesis del medicamento.

6.9 Cuantificación de ácido azelaico en muestras reales

Para la preparación de las muestras se empleó la metodología ya antes expuesta, una vez inyectadas la muestras problema, materia prima, crema al 20%, cada una por triplicado, se obtuvieron los respectivos cromatogramas, uno de ellos es el siguiente (véase Figura 33).

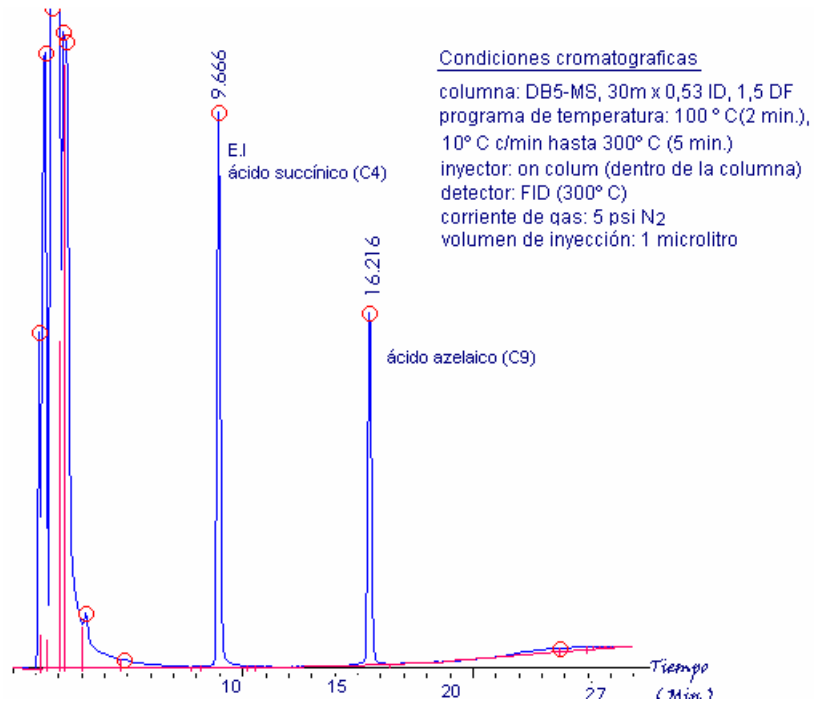


Figura 33 — Cromatograma de una muestra de materia prima

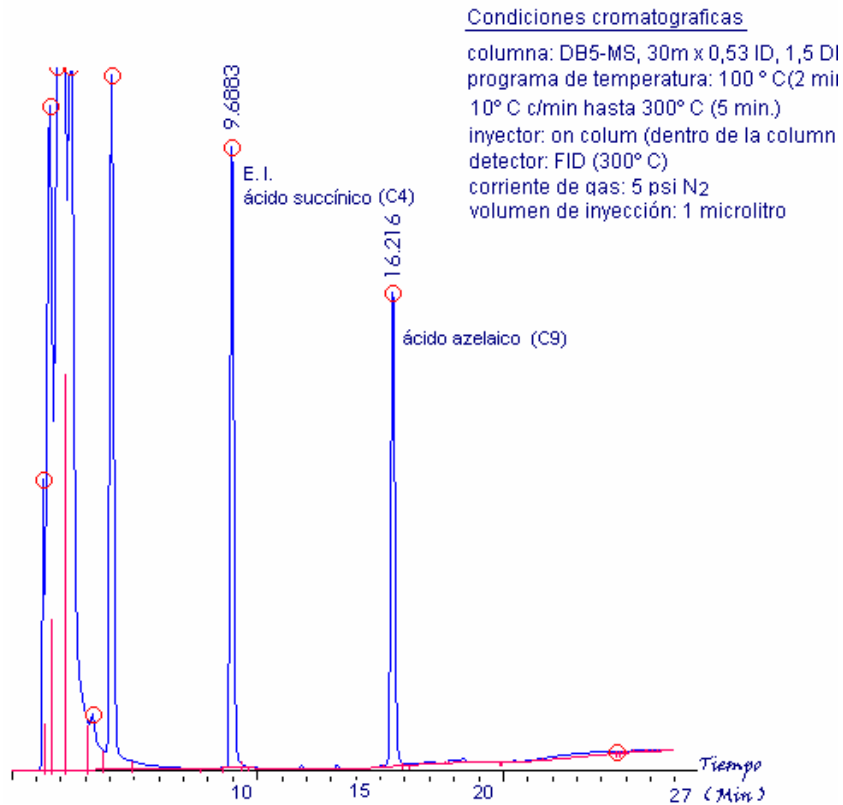


Figura 34 — Cromatograma de una muestra crema producto comercial

De los cromatogramas anteriores, se resumen los resultados (véase Tablas 11 y 12) para el producto comercial y la materia prima, empleando la metodología directa o bien empleando el estándar interno.

Tabla 12 — Resultados de las muestras con estándar interno

Muestra	Peso de la muestra (mg)	Área del problema	área del Succínico	Area C9/Area E.I.
Crema al 20% (A1)	50	10 378,49	15 928,71	0,651
Crema al 20% (A2)	51	10 372,41	15 577,76	0,649
Crema al 20 % (A3)	50	10 384,49	15 951,83	0,650
Materia Prima (01)	10	10 276,40	15 972,03	0,643
Materia Prima (02)	10	10 281,11	15 943,07	0,643
Materia Prima (03)	11	10 596,051 5	15 865,515	0,667 8

Tabla 13 — Resultados de las muestras sin estándar interno.

Muestra	Peso de la muestra (mg)	Área del problema
Crema al 20% (A1)	50	10 378,497
Crema al 20% (A2)	51	10 372,418
Crema al 20 % (A3)	50	10 384,494
Materia Prima (01)	10	10 276,4
Materia Prima (02)	10	10 281,117 5
Materia Prima (03)	11	10 596,051 5

Se interpolan los resultados obtenidos de las muestra, en la curva de calibración para C9 sin estándar interno (véase Figura 29) y con estándar interno (véase Figura 30) y se realiza la cuantificación para el ácido azelaico.

Tomando en cuenta la ecuación de la línea recta, se interpolaron las áreas obtenidas, se obtienen los siguientes resultados sin estándar interno (véase Tabla14) y con estándar interno (véase Tabla 15).

Tabla 14 — Resultados de las muestras sin estándar interno

Muestra	% p/p experimental sin C4	% p/p teórico	% p/p Marbete
Crema al 20% (A1)	23,96	20	119,83
Crema al 20% (A2)	23,48	20	117,41
Crema al 20 % (A3)	23,98	20	119,90
Materia Prima (01)	118,66	100	118,66
Materia Prima (02)	118,72	100	118,72
Materia Prima (03)	111,20	100	111,20

Tabla 15 — Resultados de las muestras con estándar interno

Muestra	p/p experimental con C4	% p/p teórico	% p/p Marbete
Crema al 20% (A1)	20,77	20	103,87
Crema al 20% (A2)	20,29	20	101,46
Crema al 20 % (A3)	20,75	20	103,78
Materia Prima (01)	102,57	100	102,57
Materia Prima (02)	102,61	100	102,61
Materia Prima (03)	101,382	100	101,381

Obteniendo un promedio de los resultados de %p/p según marbete de las Tablas 14 y 15, se tiene los siguientes resultados (véase Tabla 16).

Tabla 16 — Resultados obtenidos de los promedios de las muestras en estudio respecto al % p/p

Muestra	% p/p Marbete sin C4	% p/p Marbete con C4
Crema al 20 %	119,05	103,039
Materia Prima	116,19	102,19

En la tabla anterior, se observa que las muestras en estudio; existe un resultado coherente en cuanto a la cuantificación cuando se utiliza un estándar interno.

Dentro de los cromatogramas tanto para la materia prima, como producto comercial, se establece que no es necesario evaluar las curvas de calibración de todas las sustancias homólogas, ya que de los cromatogramas respectivos no hay otras señales, que indiquen la presencia de los posibles productos de degradación que pudieran existir.

6.10 Estudios de caducidad

En el presente trabajo el objetivo principal fue el diseñar un método cromatográfico, para la cuantificación de ácido azelaico en productos farmacéuticos en especial cremas, se incluyeron en el análisis los respectivos ácidos dicarboxílicos homólogos (pimélico, subérico, sebácico y undecanoico).

El motivo el por el cual fueron incluidos, fue el de verificar que:

- no están presentes como productos de degradación, en el producto farmacéutico
- o como subproductos en la síntesis del principio activo que es el ácido azelaico (C9)

Cabe mencionar que la crema, no indica la presencia de estos ácidos (pimélico, subérico, sebácico y undecanoico) como productos de degradación.

Se elaboraron, también las curvas de calibración de sus homólogos, ácido pimélico, ácido subérico, ácido sebácico y ácido undecanoico (véase Anexo B Figura B.1 a la Figura B.4). Las cuales, cabe mencionar, también siguen una tendencia lineal adecuada.

Conclusiones

Se estableció una metodología analítica que permite la cuantificación de ácido azelaico en una formulación farmacéutica (crema), empleando la técnica de cromatografía de gases, previa derivatización del analito de interés y usando una curva de calibración con adición de estándar interno y sin estándar interno.

Se lograron establecer las condiciones experimentales que permitieron la separación del ácido azelaico de sus compuestos homólogos y del ácido succínico, empleando una curva de calibración con adición de un estándar interno.

Las curvas demostraron una tendencia lineal en el intervalo establecido del presente trabajo (0.2 a 1mg/ml).

El método resulto específico, exacto y reproducible para ácido azelaico y sus homólogos, ya que los picos encontrados en placebo y muestra, no interfiere con la señal del analito de interés.

Los coeficientes variación son menores al 2% a lo largo de todo el trabajo.

Se logró cuantificar la cantidad de ácido azelaico en muestras comerciales, comprobando la aplicabilidad de la metodología desarrollada.

Referencias Bibliográficas

- [1] Pérez Elizondo, Antonio David. "Estudio comparativo de crema de ácido azelaico al 20% y solución alcohólica de hidroquinona al 4% en el tratamiento del melasma." Tesis de Posgrado para obtener el título de especialidad en dermatología. Facultad de Medicina-UNAM, 1998.
- [2] Nazario-Porro M, Possi S. Inibitori de lla pigmentogenesi in coltor edi pityrosporrum & loro effetti in vivo & in Vitro. *Gior ital Dermatol* 1977, pag 112,207-218.
- [3] Valcarcel Cases M. "Técnicas Analíticas de Separación". Editorial Reverté, Barcelona, España 1988. pag 709.
- [4] Solomos Graham. T.W. "Química orgánica" Editorial Noriega, México 1988. pag. 796.
- [5] D.R. Knapp "Handbook of Analytical Derivatización Reaction". John Wiley & Sons, New York, 1979.
- [6] Montgomery D. "Diseño y analisis de experimentos". Editorial Iberoamericana, México 1991.
- [7] Harris, Daniel; "Análisis Químico Cuantitativo", 3a. edición, Grupo editorial Iberoamericana. México 1992.
- [8] Skoog, D. Leary J; "Análisis Instrumental"; 4a. edición, McGraw Hill, México 1994.
- [9] Knapp, Daniel R; " Handbook of Analytical Derivatization Reactions." Ed. A Wiley-Interscience Publication. U.S.A. 1979.
- [10] Skoog, Douglas A; West Donald M; "Fundamento de Química analítica" Ed. Thomson. México 2005.
- [11] M.Valcárcel Cases, A. Gómez Hens; "Técnicas Analíticas de Seáración"; Ed. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España 1988.
- [12] Nazzaro-Porro M, Passi S. Inibitori della pigmentogenesi in coltor e di Pityrosporrum & loro effetti in vivo & in vitro . *Gior Ital Dermatol* 1977; 112: 207-218.
- [13] Brewer Stephe; "Solución de Problemas de Química Analítica." Ed. Limusa, México 1987.
- [14] Dr. Antonio David Pérez Elizondo, "Estudio comparativo de crema de ácido azelaico al 20 % y solución alcohólica de hidroquinona al 4% en el tratamiento del melasma." Facultad de Medicina – UNAM, 1998. Tesis de Posgrado para obtener el título de especialista en dermatología.
- [15] Magaña Martínez, Gabriela, "Desarrollo de un método cromatográfico para el análisis cualitativo de Mercaptanos en propelentes", Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán- UNAM, 2004. Tesis de Licenciatura
- [16] Marta Rendon, MD,^a Mark Berneburg, MD,^b Ivonne Arellano, MD,^c and Mauro Picardo, MD^d Boca Raton, Florida; Tu"bingen, Germany; Mexico City, Mexico; and Rome, Italy "Treatment of melasma" *Journal de Dermatología* 2006.
- [17] Alena Kubátová, Reinhilde Vermeylen, Magda Claeys, Jan Cafmeyer, Willy Maenhaut, Greg _Roberts, Paulo Artazo "Carbonaceous aerosol characterization in the Amazon basin, Brazil: novel dicarboxylic acids and related compounds", Sao Paulo, Brasil, *Atmospheric Environment* Vol. 34, 2000

[18]Hitoshi Nohta , Junichiro Sonoda , Hideyuki Yoshida , Hiroshi Satozono , Junichi Ishida ,Masatoshi Yamaguchi. "Liquid chromatographic determination of dicarboxylic acids based on intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization" Journal of Chromatography 2003

[19]Instituto Mexicano de Normalización y Certificación , A.C. "Directivas IMNC- Parte 2: Reglas para la redacción y estructuración de normas nacionales" México 2003.

Anexo A

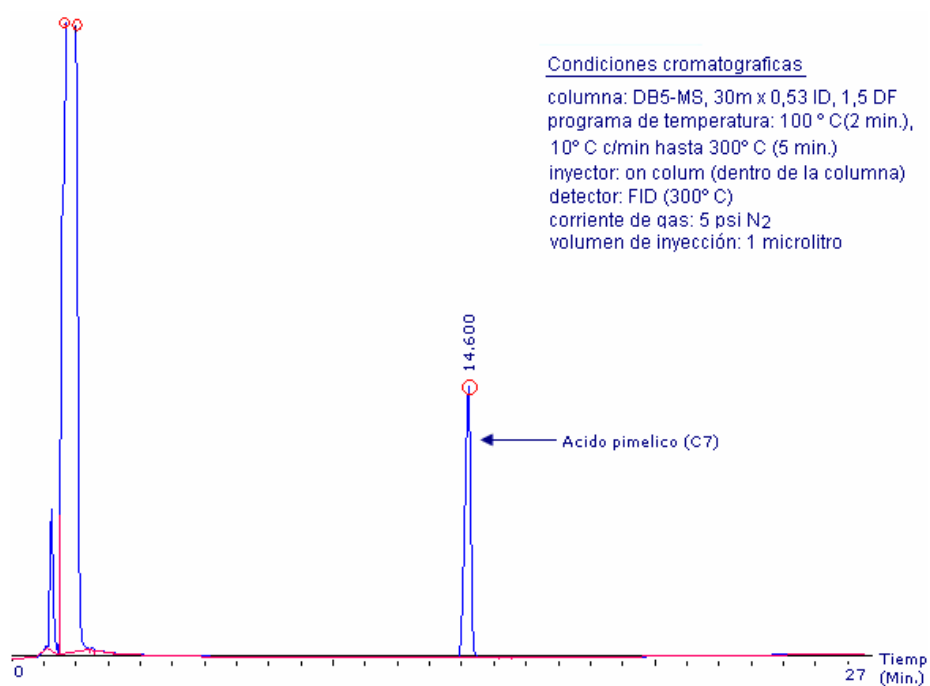


Figura A.1 — Cromatograma del ácido pimélico (C7) derivatizado

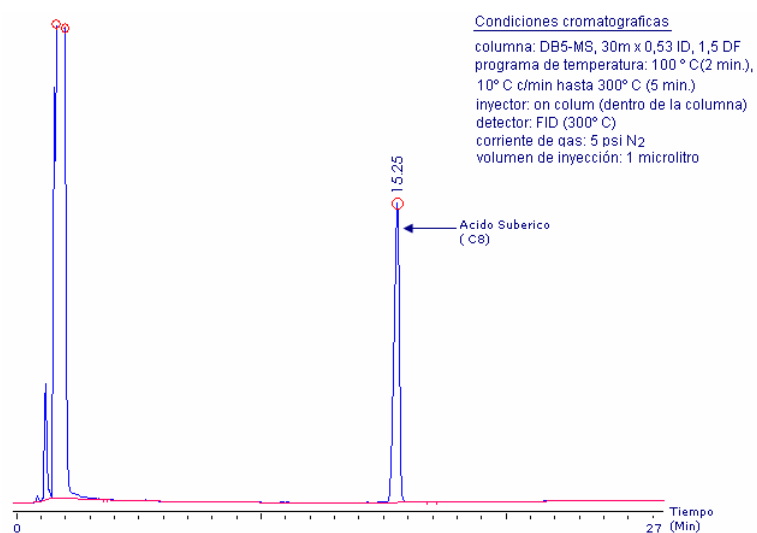


Figura A.2 Cromatograma del ácido suberico (C8) derivatizado.

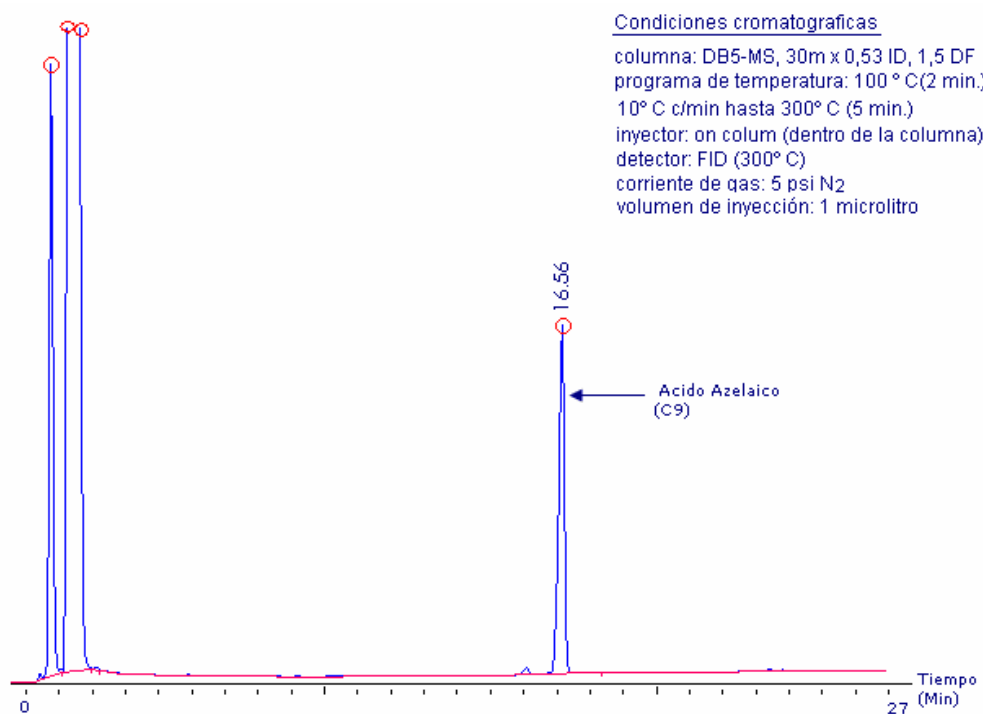


Figura A.3 — Cromatograma del ácido azelaico (C9) derivatizado.

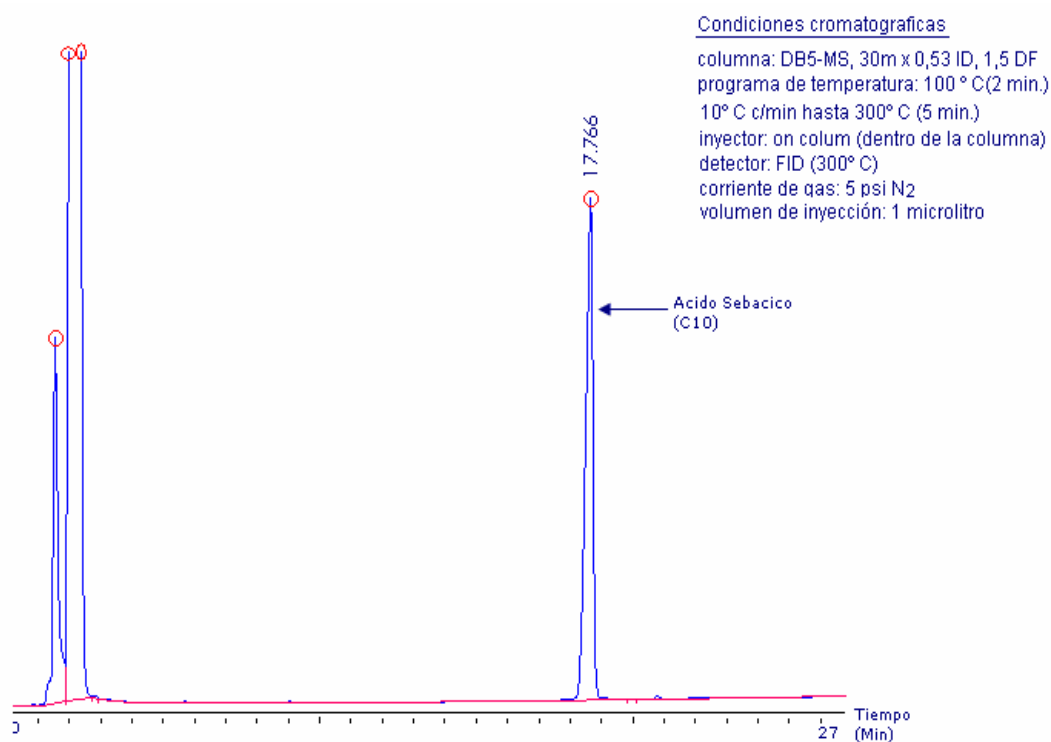


Figura A.4 — Cromatograma del ácido sebacico (C10) derivatizado

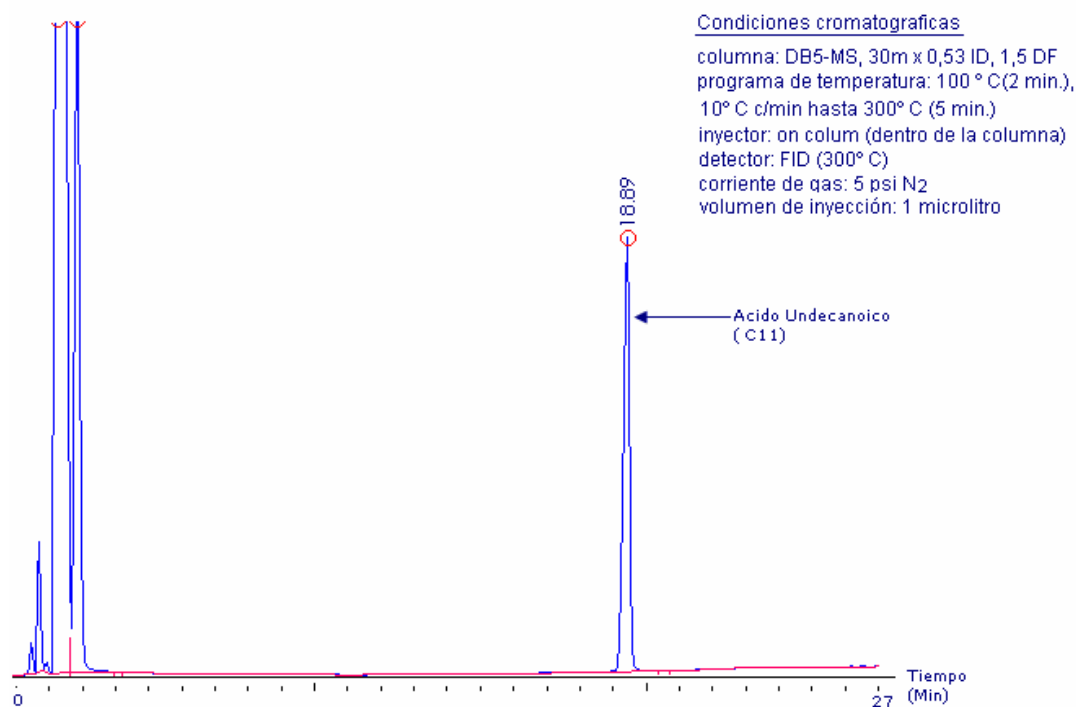


Figura A.5 — Cromatograma del ácido undecanoico (C11) derivatizado.

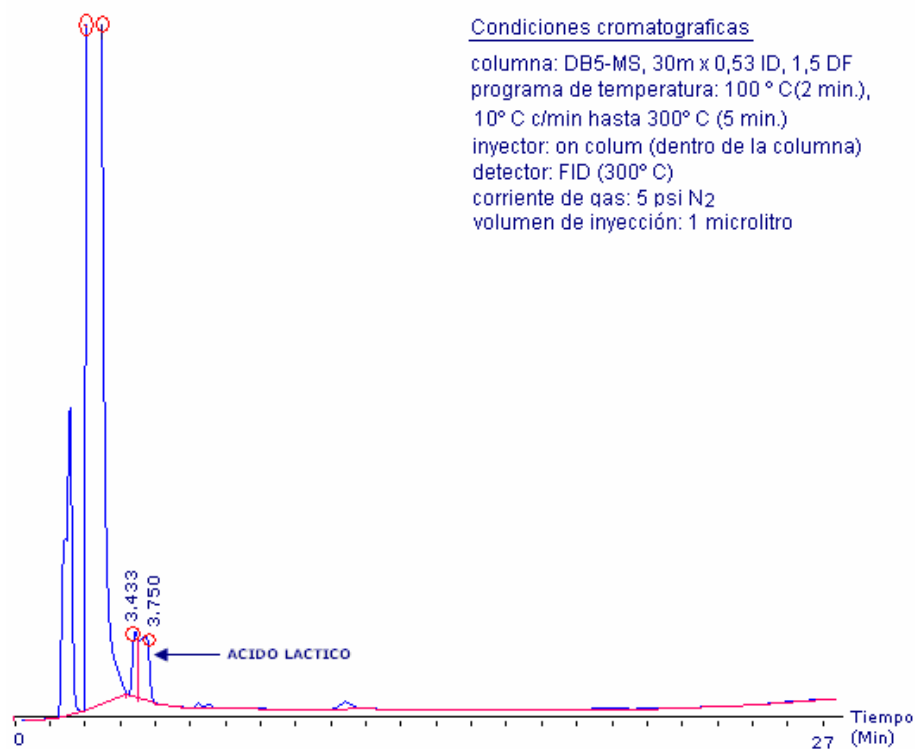


Figura A.6 — Cromatograma del ácido láctico derivatizado.

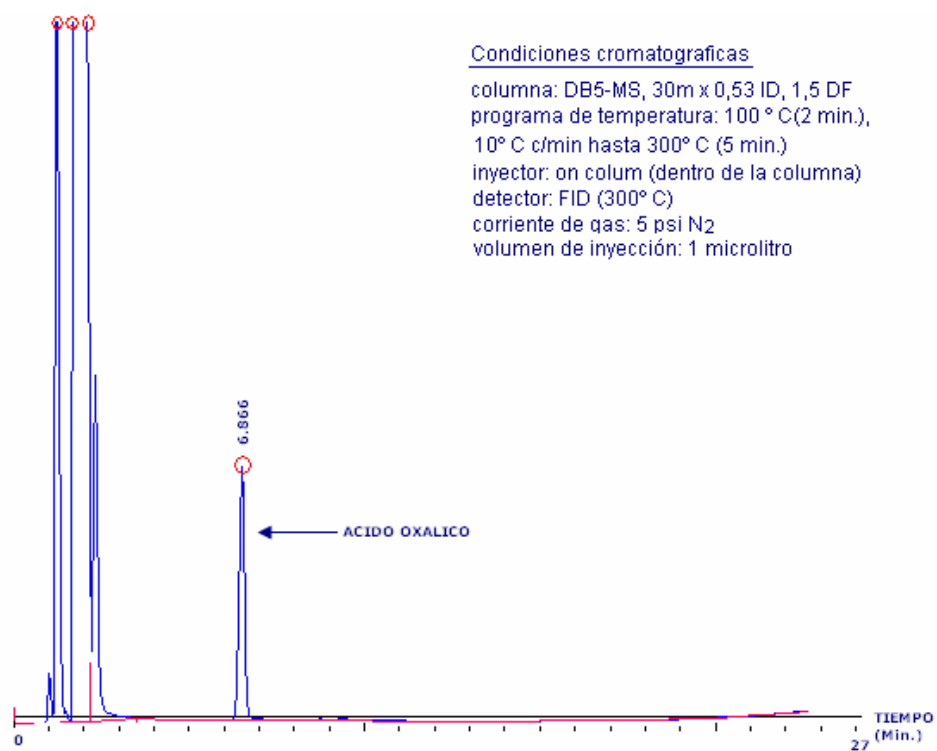


Figura A.7 — Cromatograma del ácido oxálico derivatizado.

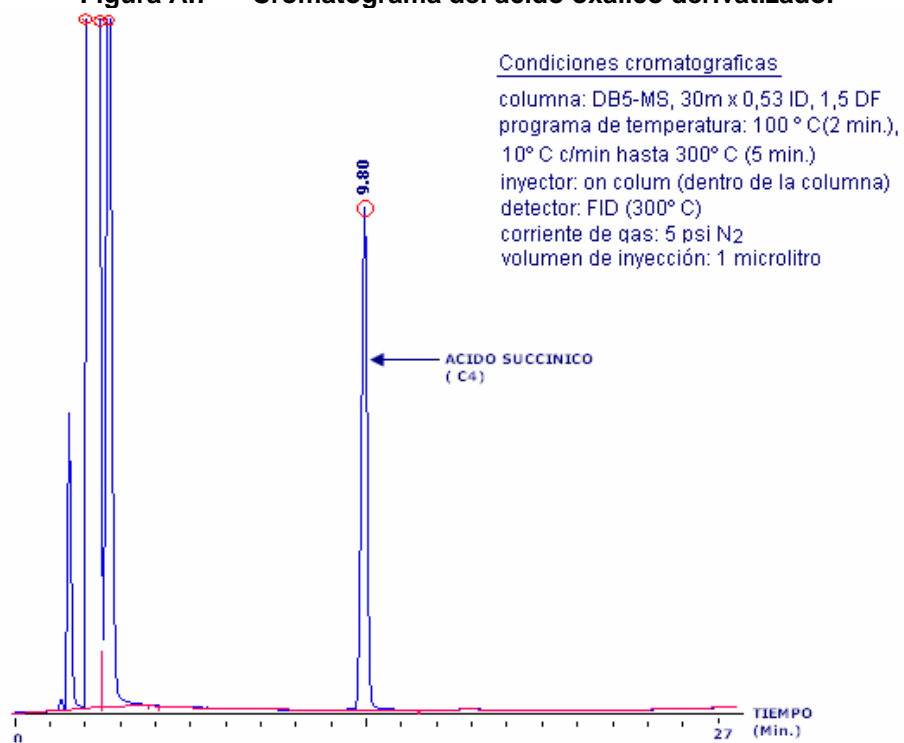


Figura A.8 — Cromatograma del ácido succínico derivatizado

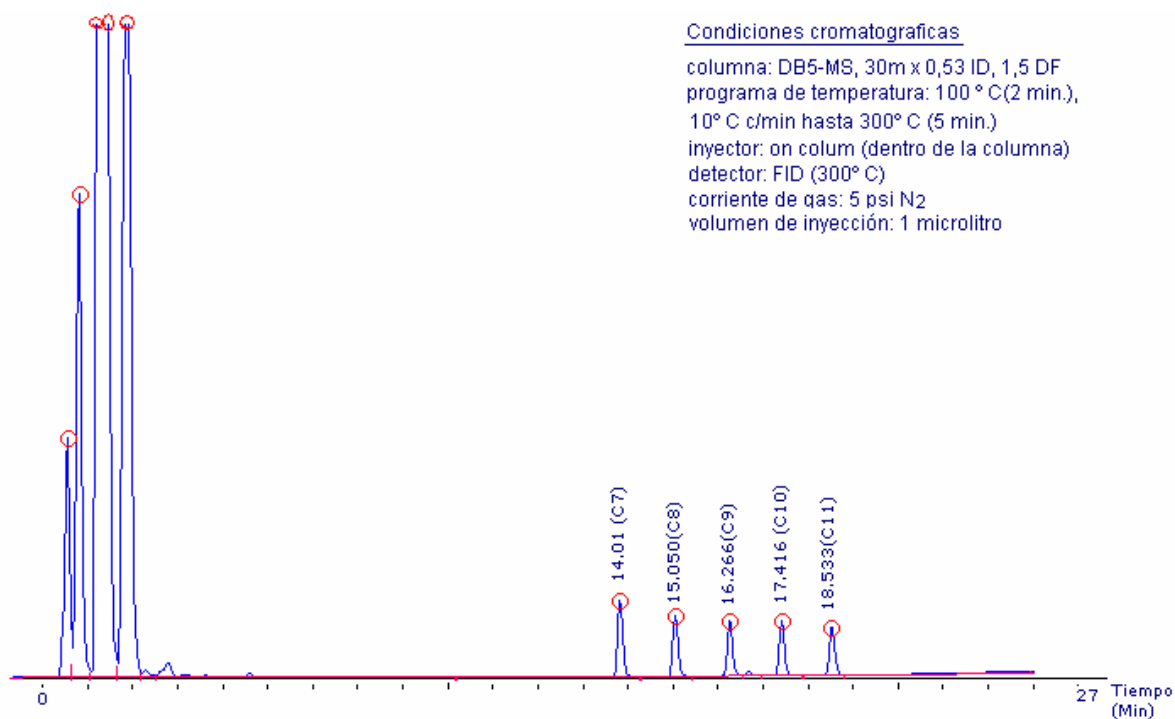


Figura A.9 — Cromatograma del primer sistema de la curva de calibración (sin ácido succínico) derivatizado.

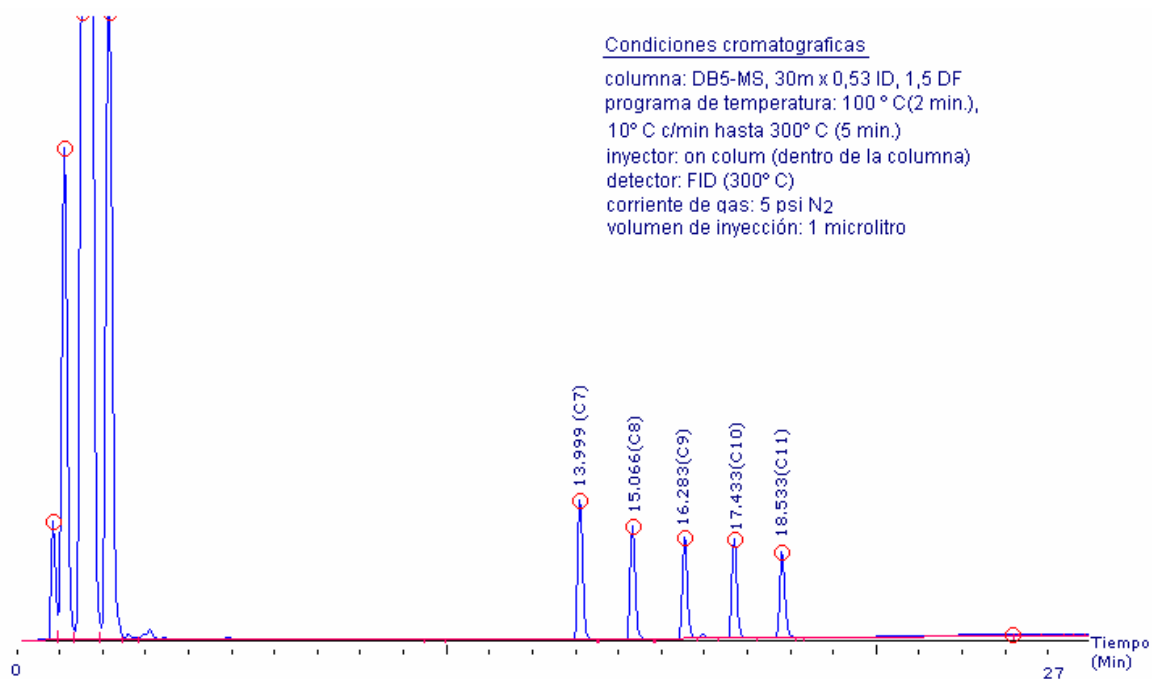


Figura A.10 — Cromatograma del segundo sistema (sin ácido succínico) derivatizado

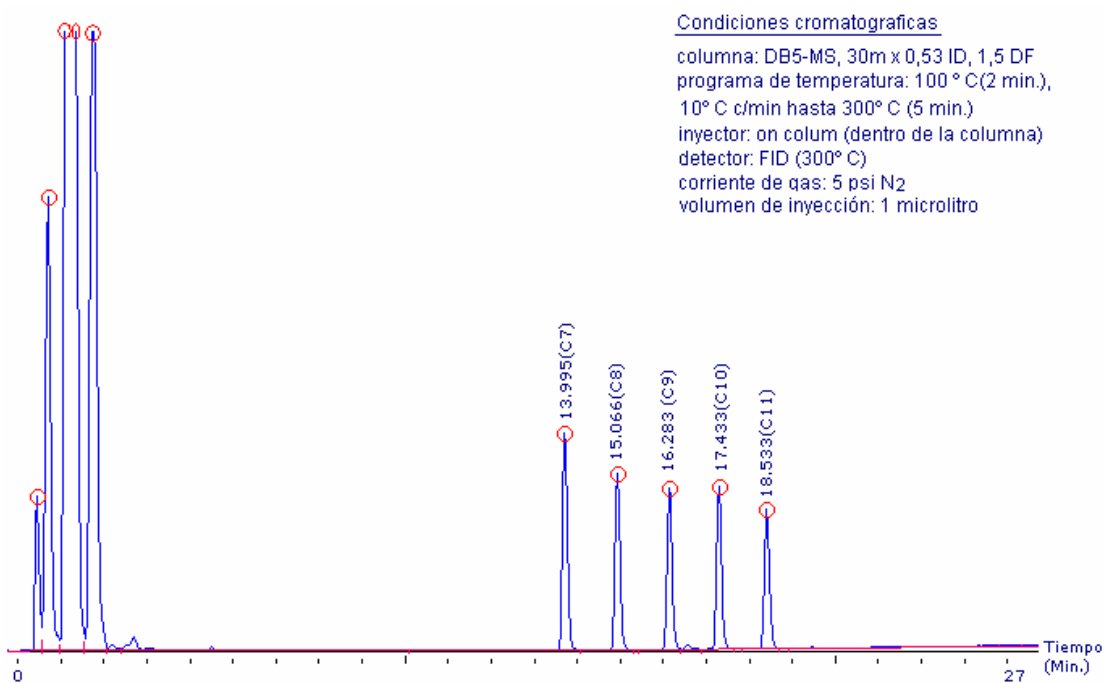


Figura A.11 — Cromatograma del tercer sistema (sin ácido succínico) derivatizado

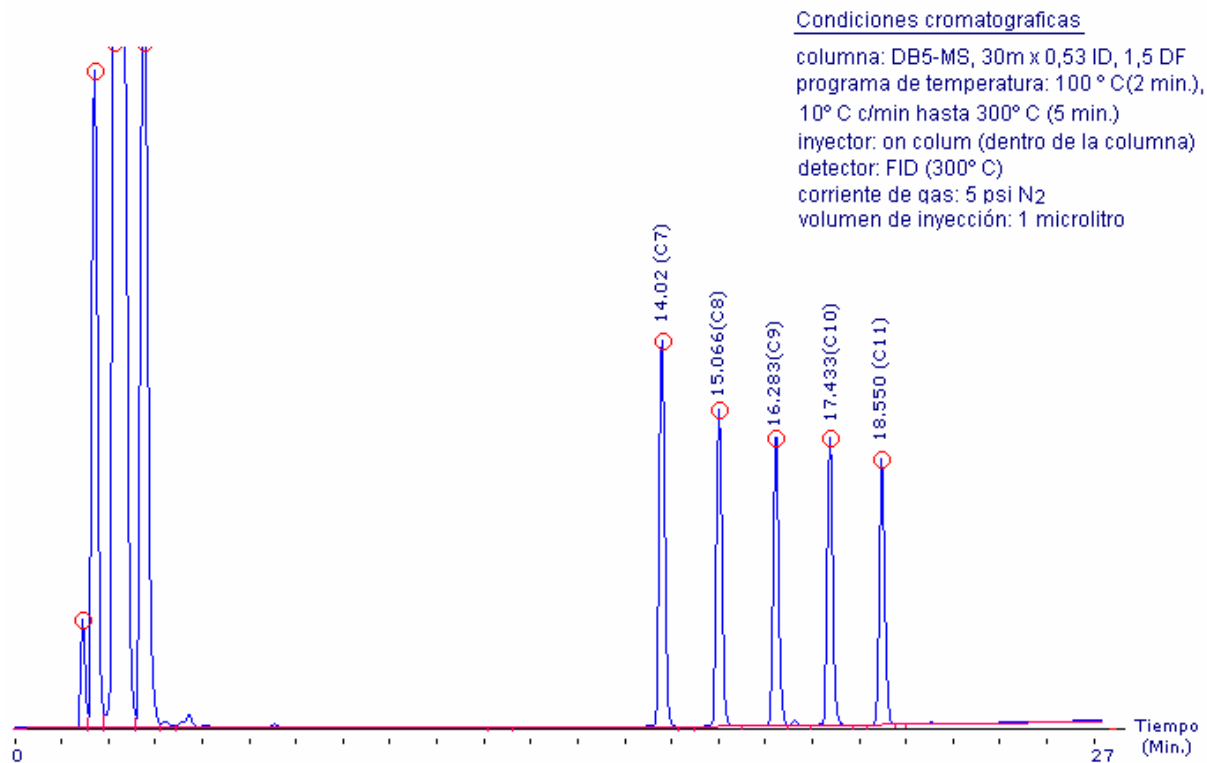


Figura A.12 — Cromatograma del cuarto sistema (sin ácido succínico) derivatizado, mostrando sus respectivos tr para cada ácido dicarboxílico

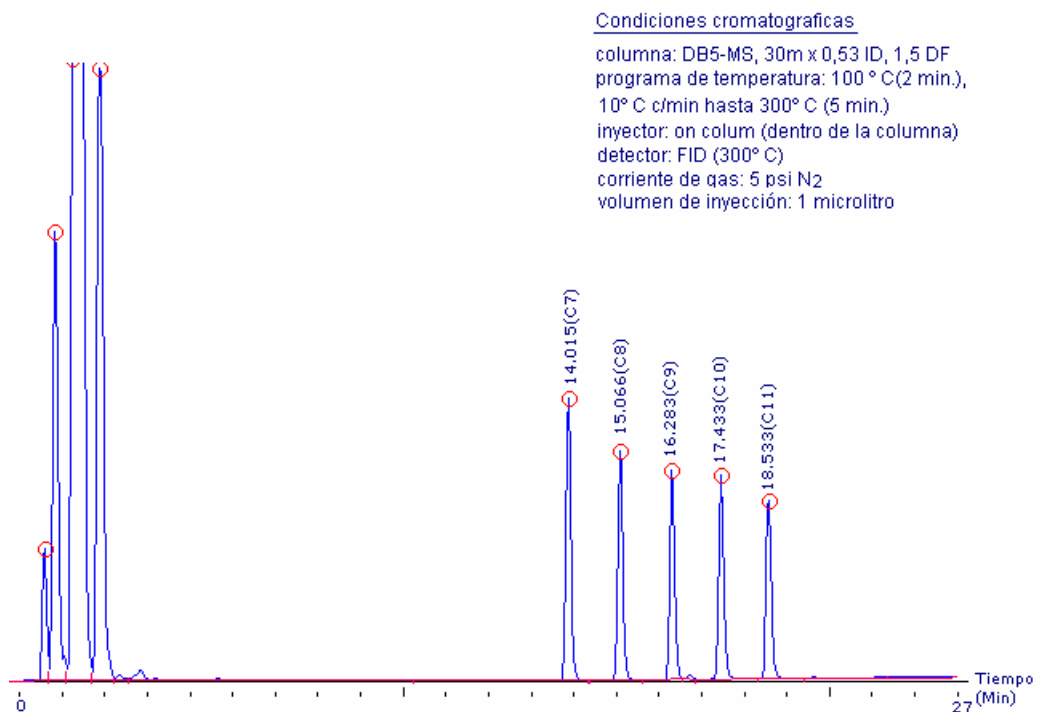


Figura A.13 — Cromatograma del cuarto sistema (sin ácido succínico) derivatizado

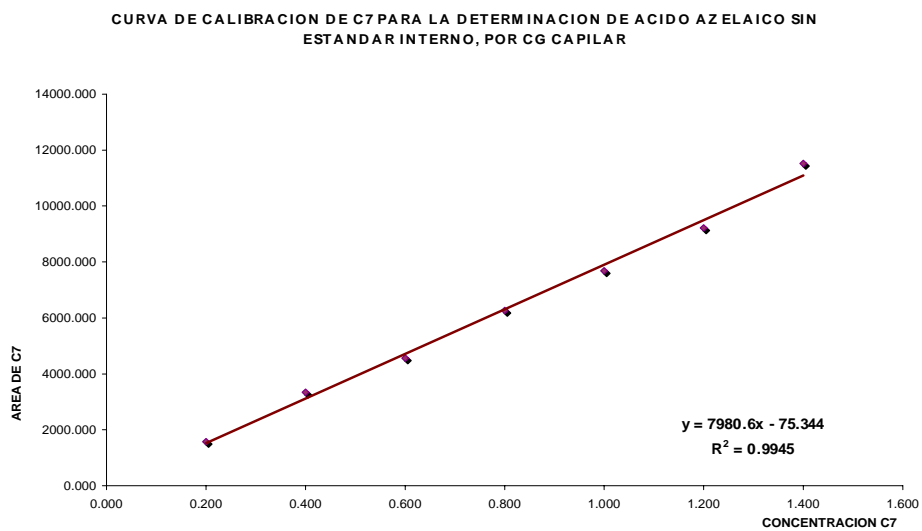


Figura A.14 — Curva de calibración ácido pimelico.

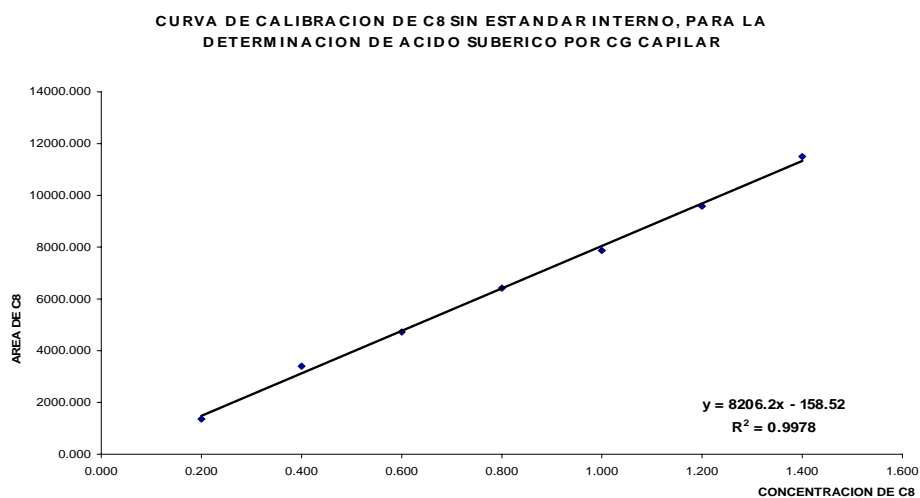


Figura A.15 — Curva de calibración del ácido suberico

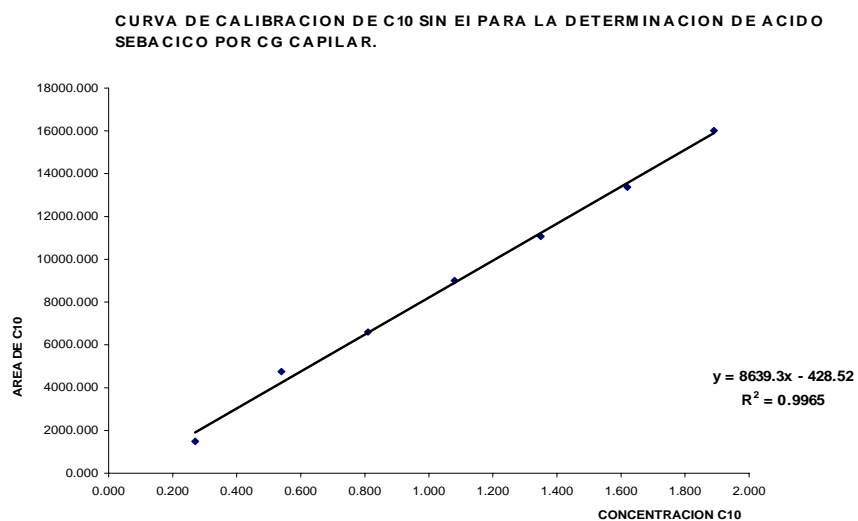


Figura A.16 — Curva de calibración del ácido sebacoico

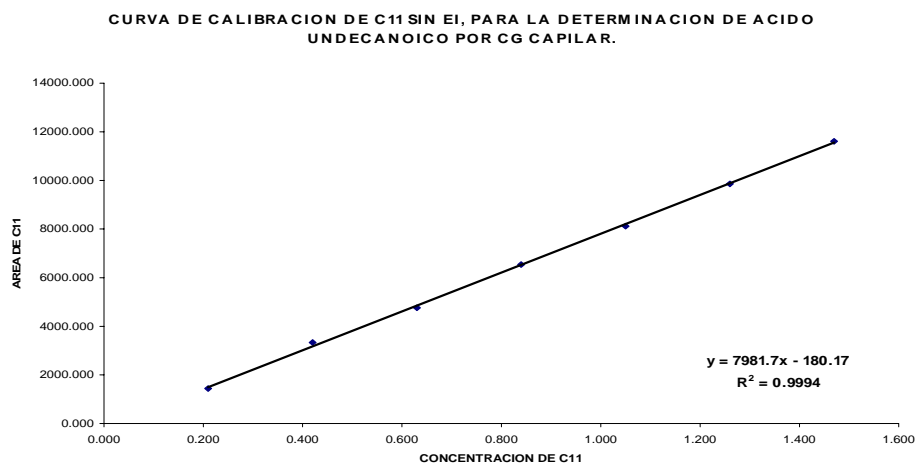


Figura A.17 — Curva de calibración del ácido undecanoico

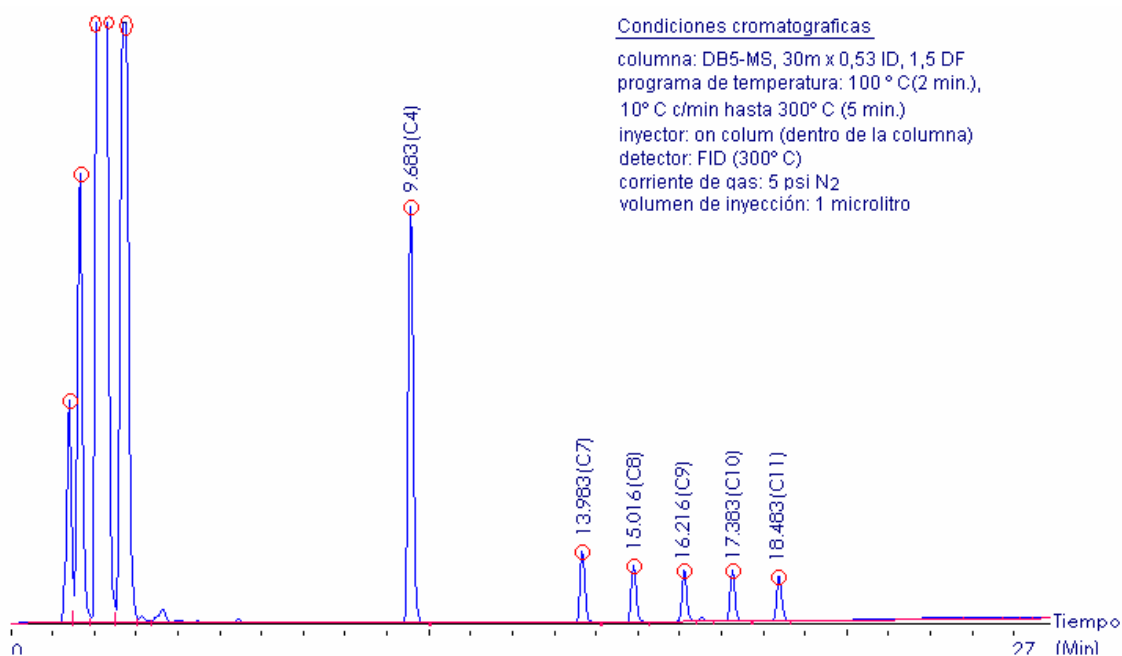


Figura A.18 — Cromatograma del primer sistema (con ácido succínico)

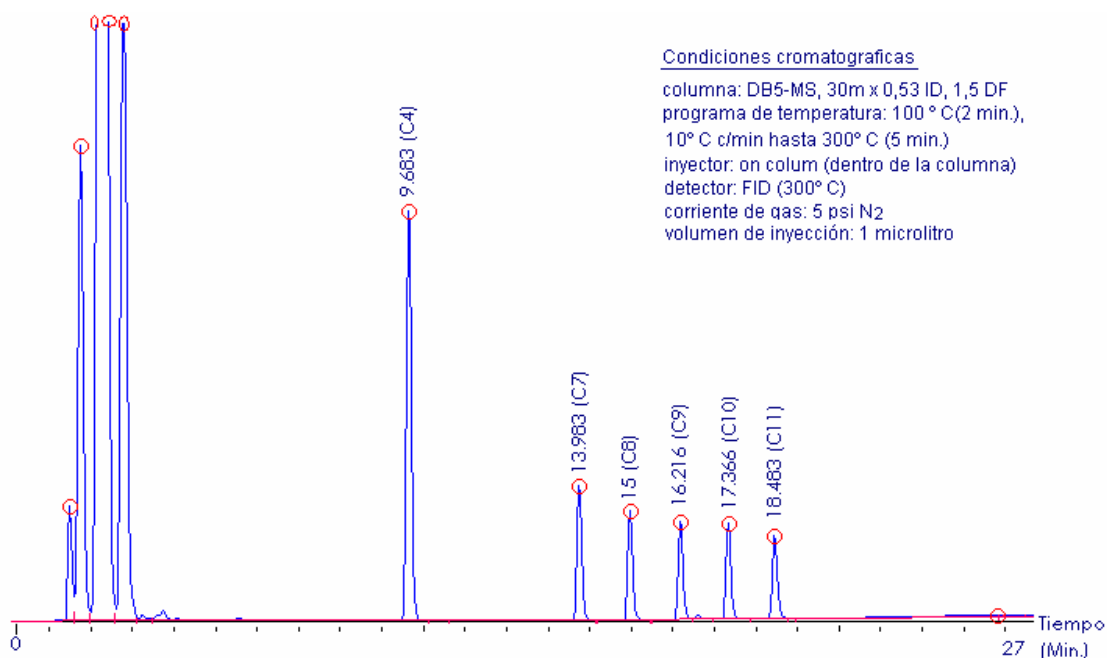


Figura A.19 — Cromatograma del segundo sistema (con ácido succínico)

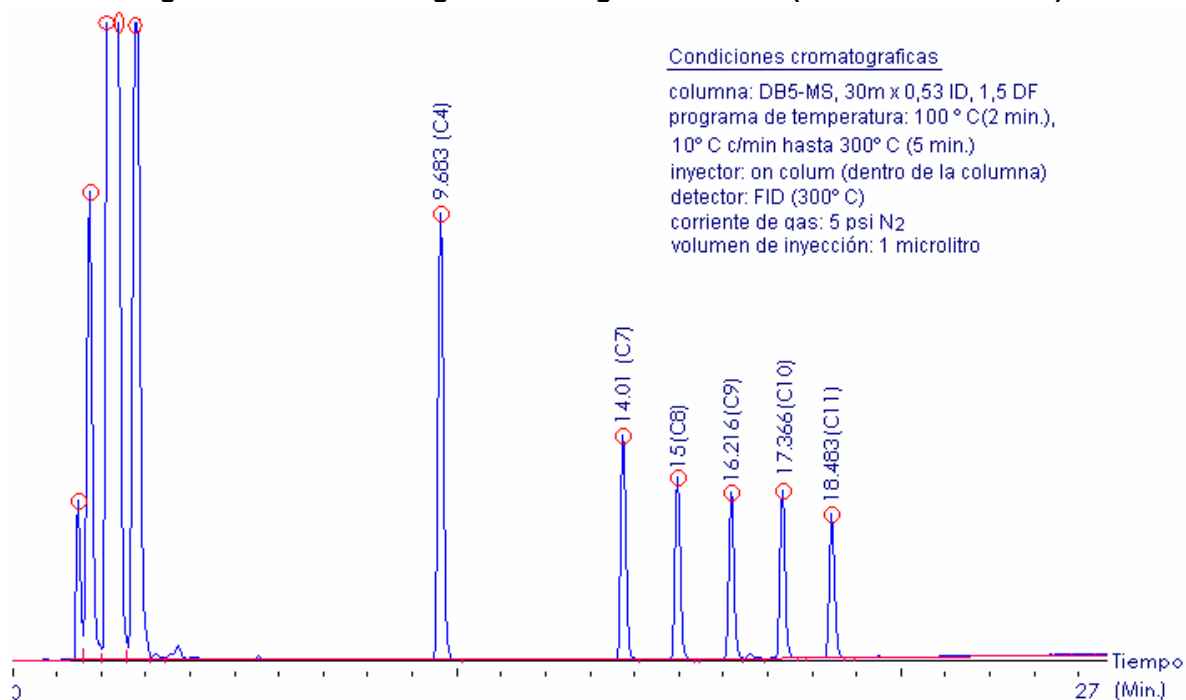


Figura A.20 — Cromatograma del tercer sistema (con ácido succínico)

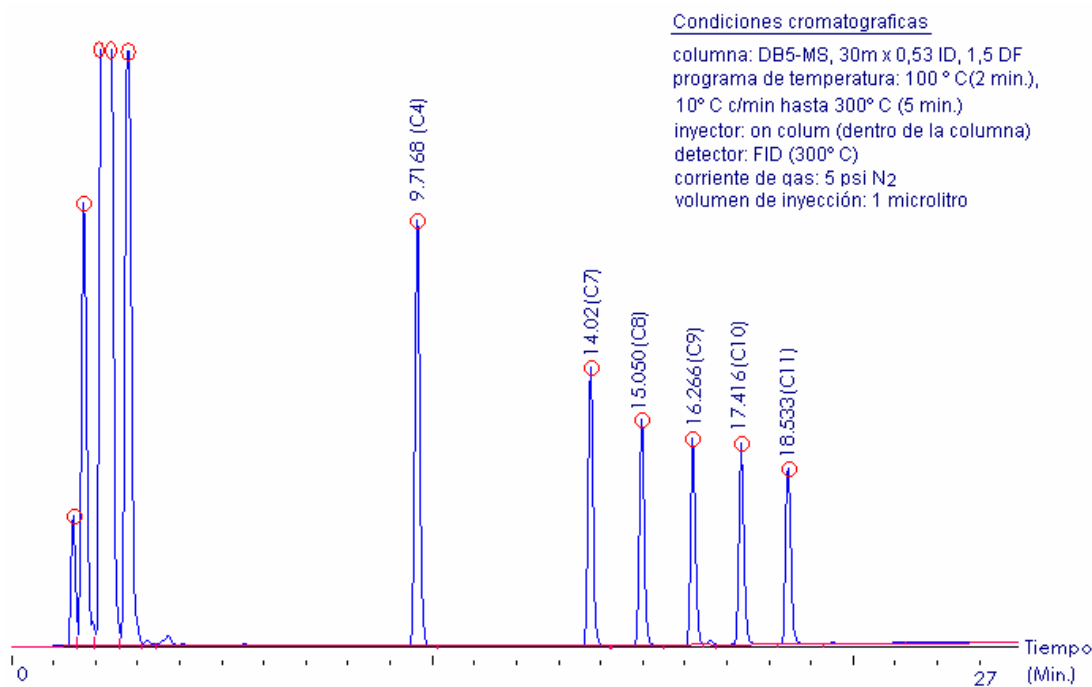


Figura A.21 — Cromatograma del cuarto sistema (con ácido succínico)

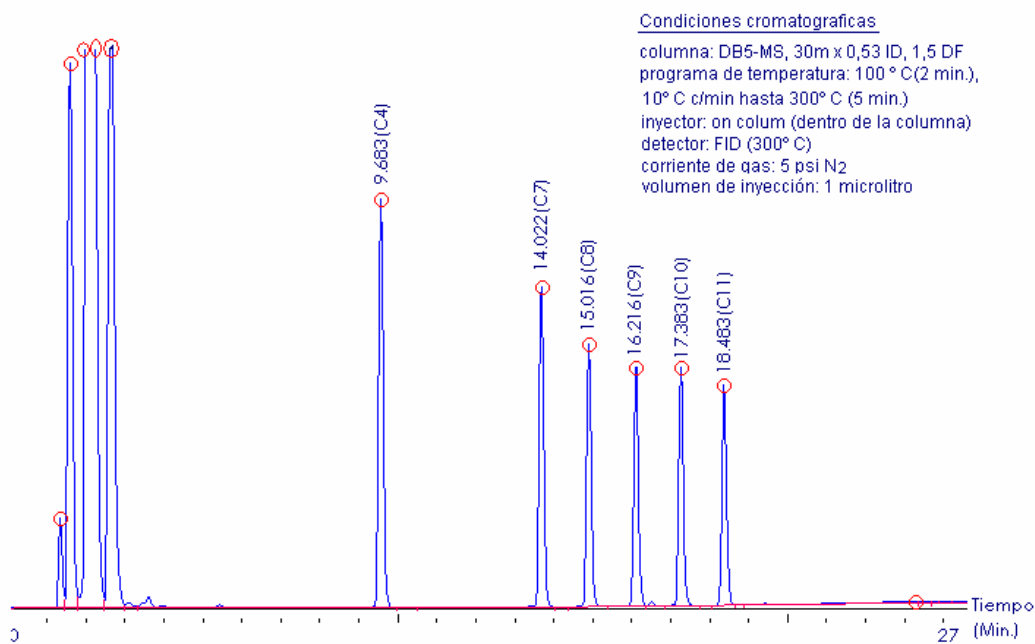


Figura A.22 — Cromatograma del quinto sistema (con ácido succínico) derivatizado, mostrando sus respectivos tr para cada ácido dicarboxílico

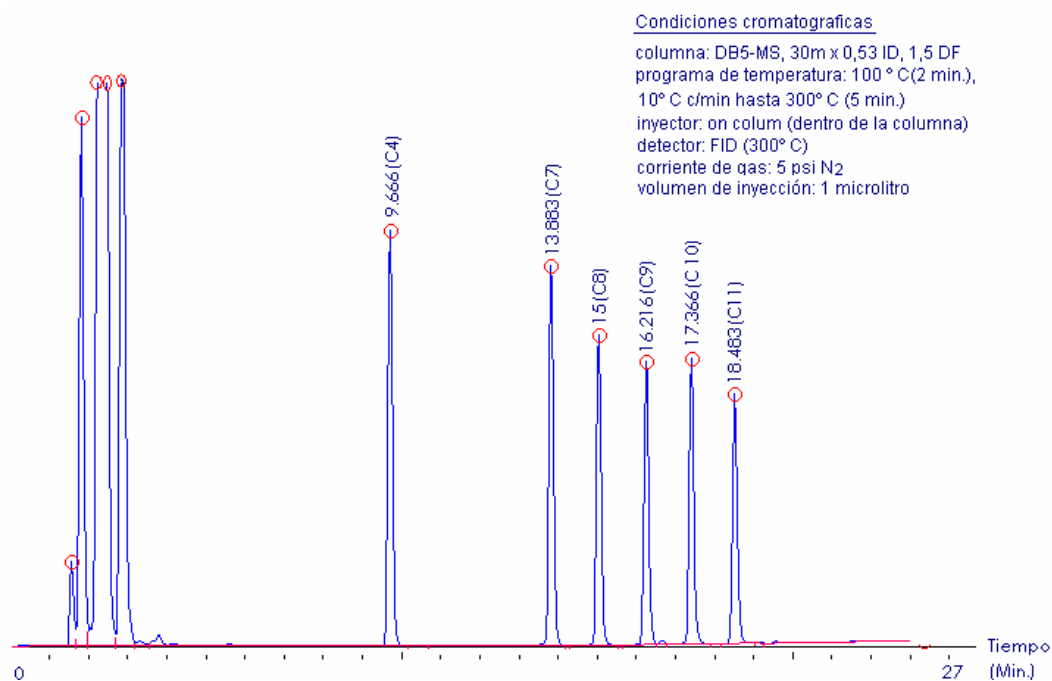


Figura A.23 — Cromatograma del sexto sistema (con ácido succínico) derivatizado, mostrando sus respectivos tr para cada ácido dicarboxílico

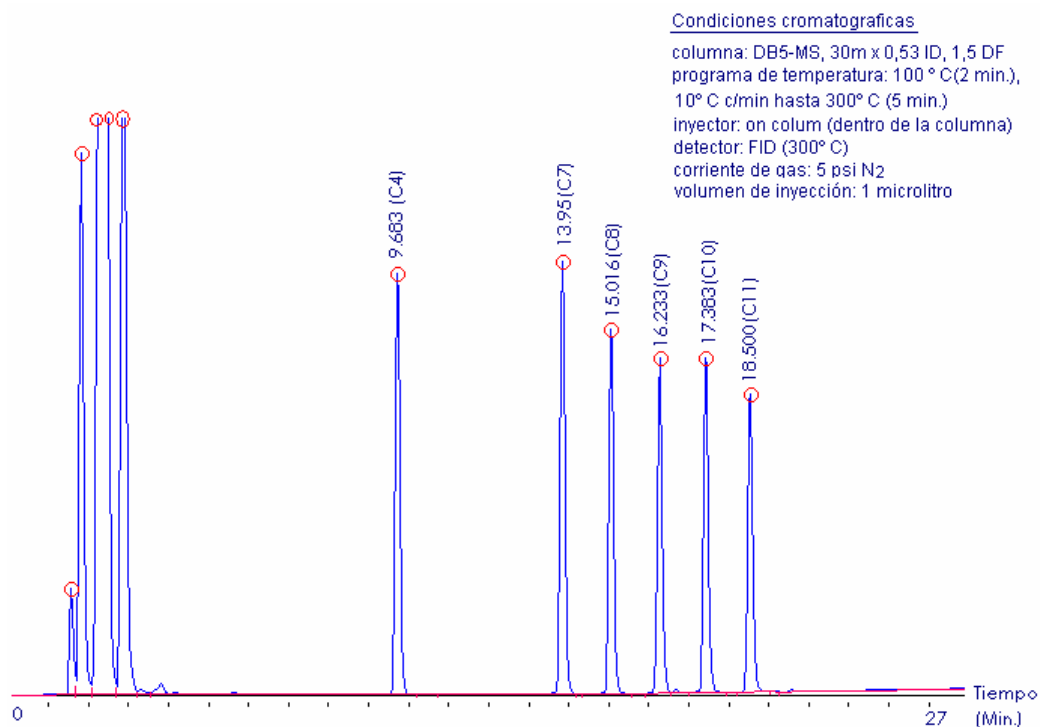


Figura A.24 — Cromatograma del séptimo sistema (con ácido succínico) derivatizado, mostrando sus respectivos tr para cada ácido dicarboxílico

Anexo B

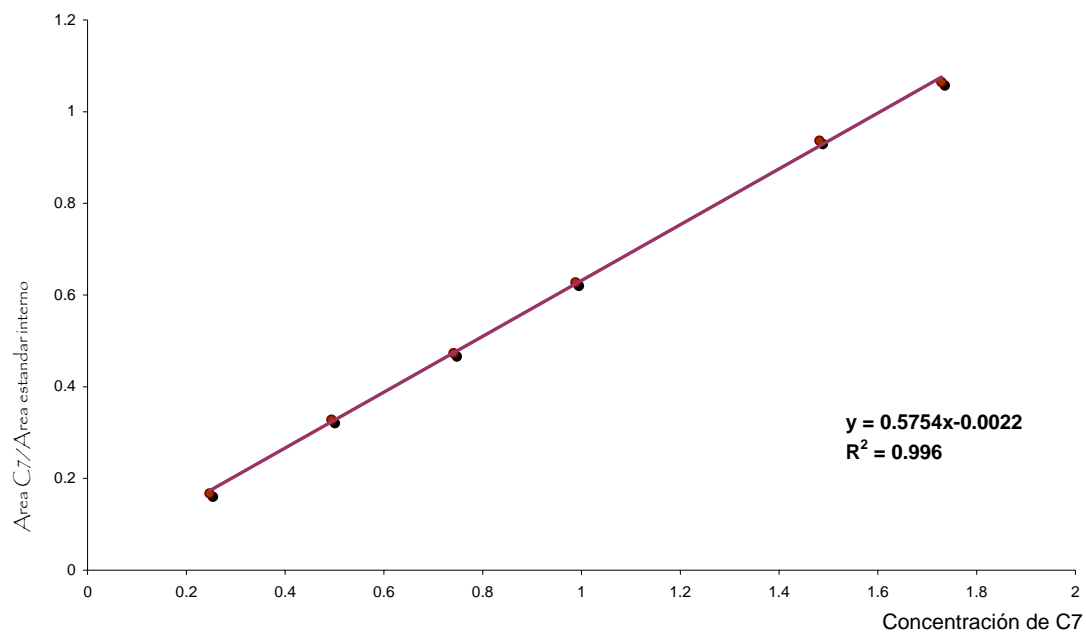


Figura B.1 — Curva de calibración de C7, con estándar interno para la cuantificación de ácido azelaico en productos comerciales

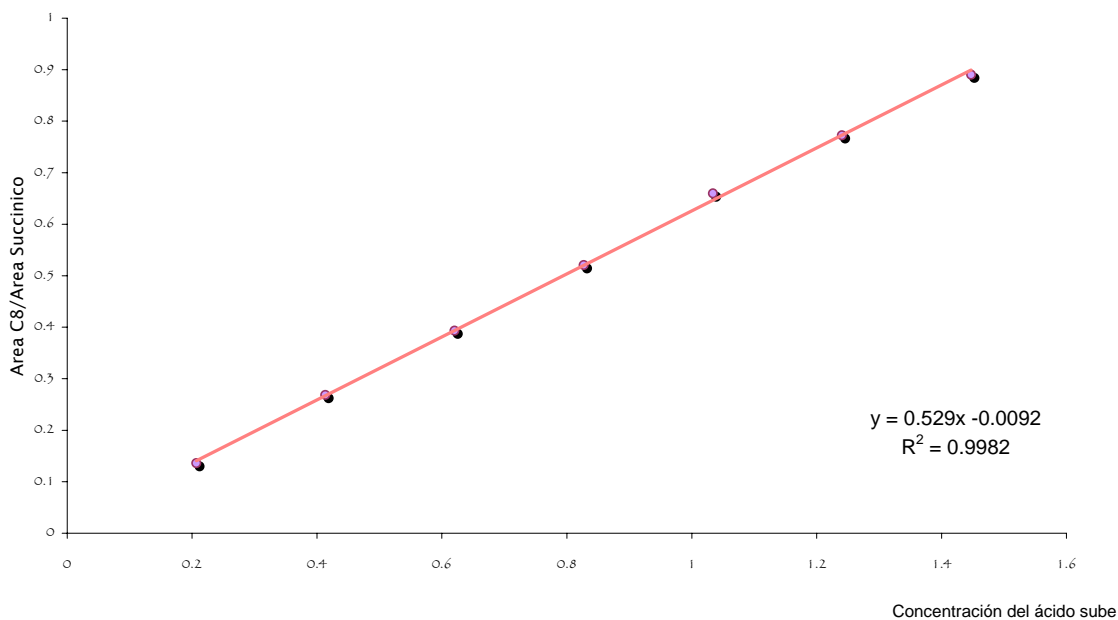


Figura B.2 — Curva de calibración de C8, con estándar interno para la cuantificación de ácido azelaico en productos comerciales

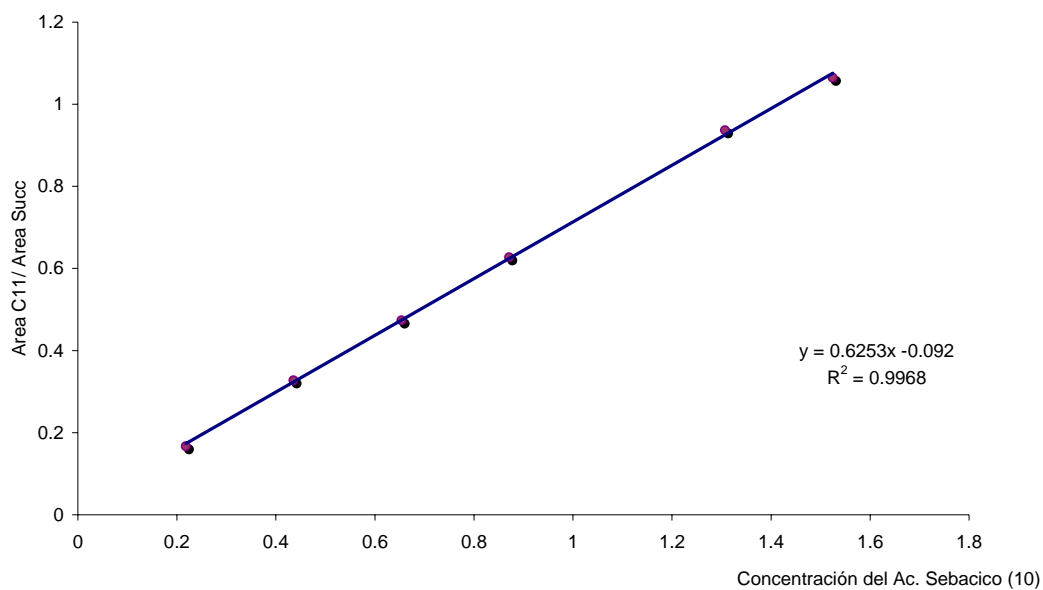


Figura B.3 — Curva de calibración de C10, con estándar interno para la cuantificación de ácido sebáico en productos comerciales

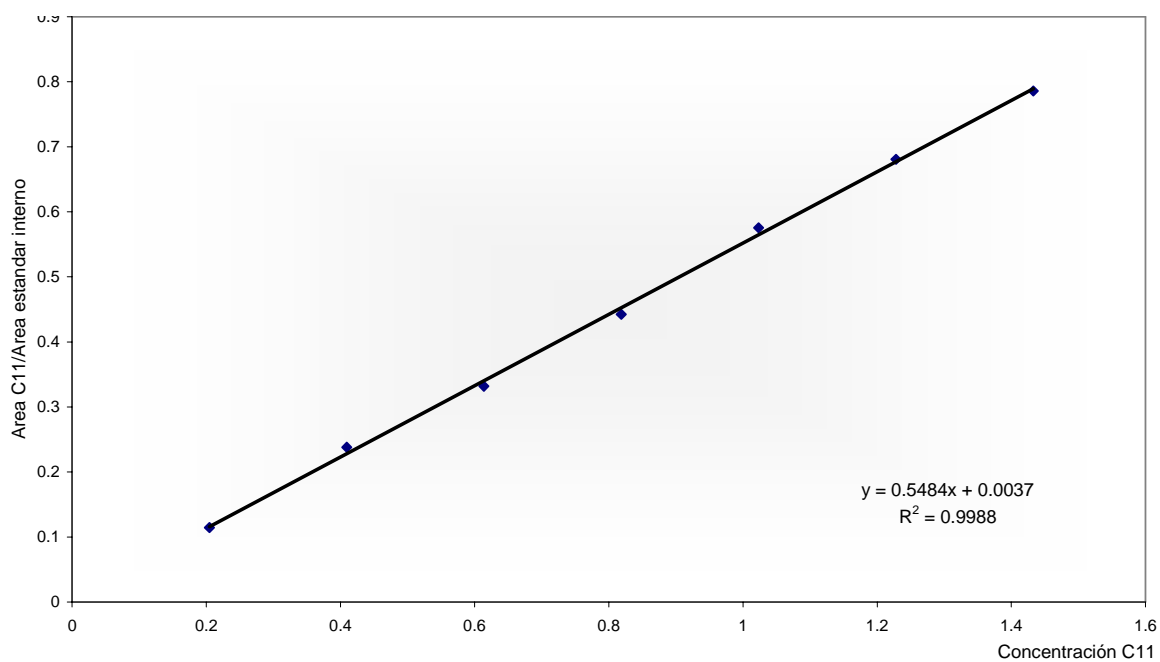


Figura B.4 — Curva de calibración de C11, con estándar interno para la cuantificación de ácido undecanoico en productos comerciales

