

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

"EVALUACION ESTADISTICA SOBRE DETERMINACIONES QUIMICAS
DE CORTICOSTEROIDES EN PRODUCTOS BIOLOGICOS"

TESIS

que presenta el señor
JOSE LUIS DELGADO MONTOYA
para obtener el
Título de Biólogo

MEXICO
1971



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis Padres con Profundo
Agradecimiento.

A mis Hermanos:

Dolores

Jorge

Silvia

Estela

Gerardo

Gonzalo

Con inmenso cariño a mi esposa Rosario.

A mis hijos:

José Mauricio

y

Maria del Rosario.

Al Dr. José Sosa-Martínez
por su acertada dirección.

A los Laboratorios Scheramex
por su valiosa ayuda para el
desarrollo de este trabajo.

**EVALUACION ESTADISTICA SOBRE DETERMINACIONES QUIMICAS DE
CORTICOSTEROIDES EN PRODUCTOS BIOLOGICOS.**

I.- INTRODUCCION.

- 1) Breve explicación de qué es la Estadística.
- 2) La aplicación de la Estadística en métodos fisicoquímicos.
- 3) Breve historia de la industria de los esteroides en México.
- 4) Significado biológico de los corticosteroides.

II.- METODOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACION DE CORTICOSTEROIDES.

- 1) Material.
- 2) Métodos:
 - a) Cromatografía en capa fina.
 - b) Espectrofotometría ultravioleta.
 - c) Determinaciones colorimétricas.

III.- RESULTADOS.

- a) Cromatográficos. Evaluación estadística del mismo.
- b) Espectrofotométricos.
- c) Colorimétricos. Evaluación estadística de dos métodos.

IV.- DISCUSION.

V.- BIBLIOGRAFIA.

1.- INTRODUCCION.

- 1) La Estadística es un término que se aplica a la recopilación de datos, generalmente numéricos y tabulados, que se relacionan con hechos importantes de cualquier rama de ciencia: física, química, biología, etc. La aplicación de métodos estadísticos en el estudio de la química o de la biología, implica evidentemente ciertas suposiciones previas que deben cumplirse para que se obtengan resultados válidos. De ahí que su empleo signifique un conocimiento a fondo del material en estudio.

Aparte de su función puramente descriptiva (determinación de tipos de distribución, promedios, dispersiones, tabulaciones de resultados) el método estadístico permite realizar ciertas inferencias como son las extrapolaciones de datos de una muestra en un universo o conjunto.

Si aplicamos una misma prueba a un mismo material abrigamos la firme esperanza de que todos los resultados sean exactamente iguales. Sin embargo la realidad es otra, pues los resultados exhiben diferencias entre sí tanto más grande cuando mayor sea la precisión con que efectuamos las pruebas.

- 2) A manera de ejemplo pensamos en la titulación de un ácido y para simplificación consideramos que tenemos una muestra de 500 ml perfectamente homogénea. Si sobre esta muestra hacemos pruebas tomando porciones alícuotas de la misma, encontramos que los resultados varían de una a otra siempre sobre la misma muestra. Esta variabilidad se debe a la contribución de diferentes factores; algunos perfectamente identificados y otros imposibles de reconocer. Entre los primeros podemos pensar en la temperatura del medio ambiente en

que se efectúen las pruebas, el equipo de laboratorio utilizado, la vejez o frescura de los reactivos indicadores, la iluminación de las mesas de titulación, etc. Los factores no identificables y por ende imposibles de desglosar, integran los llamados causas del azar.

Consideramos necesario hablar levemente sobre el fenómeno de variabilidad porque nos encontramos con personas propias, o extrañas que pretenderán obtener exactamente el mismo valor para una misma muestra respecto a cierta propiedad.

Siempre que se emplee la Estadística para evaluar métodos químicos o biológicos, habrá que establecer si realmente el nuevo método es superior al antiguo, efectuar un análisis crítico de lo que se hace en el laboratorio al ensayar los dos diferentes métodos y responder a preguntas tales como: estamos utilizando los debidos controles o testigos para la obtención y expresión de resultados analíticos? La diferencia de los resultados obtenidos es mayor que la que podría atribuirse al azar o a las fluctuaciones normales, las cuales implican el error personal al estar ensayando un método? Solamente cuando se hayan contestado preguntas como las anteriores se podrán obtener conclusiones respecto de un método u otro.

El aplicar métodos estadísticos permitirá calcular la probabilidad de encontrar una diferencia dada, evitando todo error sistemático de modo que podamos concluir en un caso particular, si la diferencia es o no significativa.

- 3) Para llevar a cabo este trabajo se empleó como universo o población la producción anual de un inyectable que contiene como principio

activo un esteroide extraído de la raíz del Barbasco (Dioscorea composita) conocido con el nombre genérico de Dexametasona, perteneciente al grupo de las sapogeninas las cuales se empezaron a trabajar en México por Marker en 1944, quien encontró una abundante fuente de Diosgenina, substancia básica para la síntesis de Dexametasona y otros esteroides de similar importancia médica, dicha substancia fue aislada de Dioscorea, conocida en México como cabeza de negro, y su método de degradación de la cadena lateral se adaptó admirablemente a la conversión de Diosgenina en Pregnenolona (Fig. 1), estableciéndose así la industria de esteroides en nuestro país.

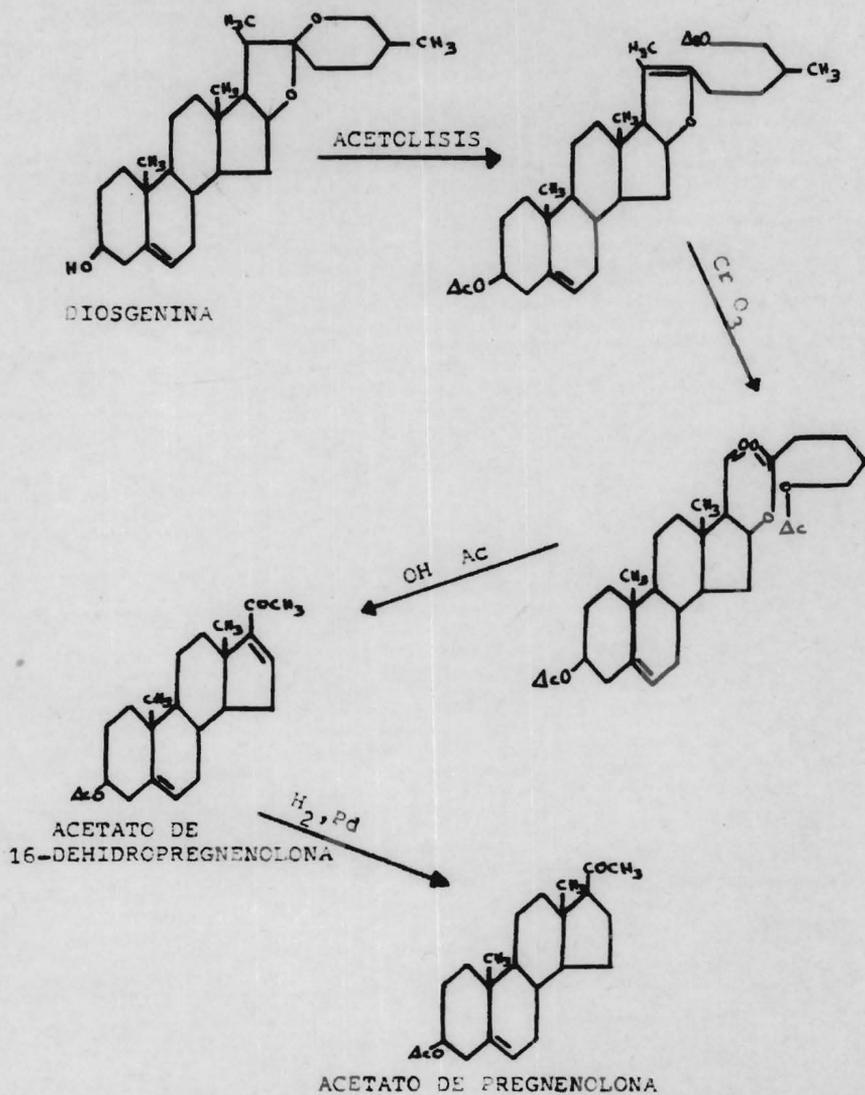


Fig.1).-ESQUEMA DEL METODO DE DEGRADACION DE LA CADENA LATERAL DE MARKER. (1)

4) Significado Biológico de los Corticosteroides.

Las glándulas suprarrenales. Entre los órganos que la Naturaleza dió al animal, incluyendo al Homo sapiens, están las glándulas suprarrenales, que originan sustancias como la adrenalina (base del sistema nervioso simpático) y las hormonas corticosteroides, y otras más. En efecto, recordamos que el animal (de los peces al hombre) a través de su vida en millones de años, ha estado sujeto al embate de factores adversos como frío, calor, agresiones, traumatismos, golpes, etc. Quiere decir que, a través de su vida azarosa, ha necesitado de una glándula regida por un mecanismo autónomo que produzca sustancias (corticosteroides) que protejan a sus órganos de la inflamación producida por los factores desfavorables. Estas sustancias se originan a partir de estímulos captados a nivel cerebral (hipotálamo e hipófisis), en parte estimulados por la adrenalina (situación en relación con la lucha o la huida) y que son transmitidos (por medio de la ACTH) a las cápsulas suprarrenales que, a su vez, liberan hormonas corticosuprarrenales que preservan al individuo de pérdidas ocasionadas por la lucha, es decir, conservan en todo lo posible sodio y agua para sostener su medio interno y, en forma inespecífica, salvaguardan a los órganos lesionados y calman el dolor al abstener la inflamación.

El animal suprarrenalectomizado. Uno de los métodos utilizados para conocer el papel de las hormonas corticosuprarrenales fue el de extirpar las glándulas suprarrenales a animales de laboratorio. Se encontró que la corteza suprarrenal es esencial para la vida ya que la suprarrenalectomía produce la muerte de los animales a los 2 ó 3 días de efectuada la operación. El animal suprarrenalectomizado pierde peso rápidamente y se torna demasiado débil, presenta grandes alteraciones en sus niveles sanguíneos de agua y electrolitos, ade-

más de trastornos en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. Al mismo tiempo, se hace extremadamente sensible al frío, calor, infecciones, etc., o sean situaciones que se han denominado como estímulos de alarma o de stress.

En el hombre, la insuficiencia suprarrenal (enfermedad de Addison) se caracteriza por debilidad muscular, hipotensión arterial, pigmentación de la piel, cambios complejos en el equilibrio hidroelectrolítico y en el metabolismo de hidratos de carbono, grasas y proteínas, y, finalmente, insuficiencia renal y circulatoria.

Estímulos de alarma o stress. Se ha postulado que cuando el organismo animal (y humano) normal se sujeta a estímulos mentales y físicos reacciona para adaptarse y sobreponerse a la nueva situación o condición. A esta reacción fisiológica y mental, Selye (investigador canadiense) ha llamado síndrome de adaptación, y se acompaña de aumento en la secreción de hormonas corticosuprarrenales e hipofisiarias (ACTH) que contribuyen a esta adaptación.

Entre los estímulos de alarma que aumentan la liberación de hormonas corticosuprarrenales tenemos: traumatismos físicos y mentales, calor intenso, incluyendo quemaduras, frío intenso, ejercicio físico, intervenciones quirúrgicas, manipulación de intestino, inyecciones dolorosas, intoxicaciones, y cualquier enfermedad debilitante.

Parece ser que el stress producido por los factores anteriores estimulan la producción de corticosteroides y que estas sustancias son necesitadas en el organismo para que, a través de sus efectos químicos sobre hidratos de carbono, grasas y proteínas, se liberen sustancias que van a ser necesitadas por los tejidos dañados. En

efecto, la glucosa y los aminoácidos, por ejemplo, aumentan en el torrente circulatorio. Sin embargo, cuando la concentración de corticosteroides es insuficiente para adaptarse y sobreponerse al trauma, el organismo entra en lo que se llama crisis o insuficiencia suprarrenal que puede conducir al shock y a la muerte.

El hecho es que cuando un tejido se somete a una lesión tisular (ocasionada por los factores mencionados anteriormente) hay inflamación, fenómeno que se caracteriza por escape de líquido de los capilares (edema), infiltración por leucocitos del área afectada, y proliferación posterior de tejido fibroso (fibroblastos). La liberación de corticosteroides en el síndrome de adaptación inhibe a estos fenómenos y los tejidos son protegidos. A lo anterior, se agrega que el dolor, que estaría ocasionado por la inflamación, también es disminuído o yugulado. Si la lesión es severa o intensa, la concentración de corticosteroides puede ser insuficiente para sobreponerse a la agresión y el individuo entra en shock, que se caracteriza por colapso cardiovascular, hipotensión y graves cambios metabólicos.

Características de la Dexametasona: (13)

Descripción: Se presenta como cristales o polvo fino.

Punto de fusión: 255°C

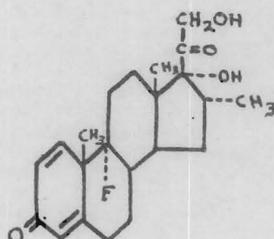
Solubilidad: Soluble en cloroformo, éter, dioxano, acetona, metanol, insoluble en agua.

Rotación específica + 72 a + 80°.

Dexametasona o 9 alfa fluoro-16 alfa-metil prednisolona; 9 alfa fluoro-11 beta, 17 alfa, 21-trihidroxi.-16 alfa metil-

pregna-,1, 4-diene-3, 20 diones.

$C_{22}H_{29}FO_5 = 392.5$



Dexametasona. La Dexametasona es un corticosteroide artificial derivado de la Diosgenina. Dado que la molécula de Dexametasona posee un metilo en C₁₆ y Fluor en C₉ sus propiedades farmacodinámicas, se aprovechan en individuos cuyas glándulas suprarrenales normales pero que padecen diferentes enfermedades alérgicas y reumáticas y de otros procesos que afectan el tejido mesenquimatoso.

La particular configuración molecular de la Dexametasona favorece su acción glucocorticoide y es activa a muy bajas concentraciones (1 ó 1.5 mg/día máximo) por lo que su dosificación debe estar perfectamente controlada, de ahí que los productos farmacéuticos que se fabrican deberán contar con un estricto control de dosificación.

Es importante que la preparación corticosteroide que se administra esté convenientemente balanceada en su concentración pues de lo contrario los efectos por sobredosis de Dexametasona pueden alterar el equilibrio iónico del citoplasma.

Efecto de los corticosteroides en el shock. El efecto de los corticosteroides en el tratamiento del shock resulta un buen ejemplo para acabar de entender la biología de estos productos. Ya habíamos mencionado que el stress causa una marcada elevación de la secreción de corticosteroides en el organismo. Más aún, si el efecto estimulante es muy prolongado puede conducir hasta un estado exhaustivo de la corteza suprarrenal, lo que suele producir colapso circulatorio, característica del shock. En la hemorragia y en la intoxicación por endotoxinas, el shock representa un estado avanzado de la estimulación agresiva al organismo, y es cuando se requieren de dosis masivas de corticosteroides para sobreponer el organismo del estado crítico en que se encuentra. Los efectos patológicos que más se observan en el shock son la disminución del gasto cardíaco y el descenso de la presión arterial.

Los datos anteriores nos hacen reconocer que los corticosteroides son de gran importancia en la regulación de la función circulatoria y que su ausencia o insuficiencia despena el colapso circulatorio por insuficiencia cardíaca. En general, concentraciones grandes de corticosteroides son de gran utilidad en los diversos tipos de shock (por hemorragias, por endotoxinas, por mordeduras de serpiente, por anafilaxia y por cirugía).

Para terminar, hemos expresado el origen y significación biológica de las hormonas corticosuprarrenales y el importante papel que

Juegan en preservar la homeostasis o sea la constancia de las características químicas, físicas y biológicas del medio interno y que está constituido por el plasma y líquidos intersticiales y lo que, a través de mecanismos compensadores, tienden a no alterarse a despecho de los cambios y agresiones del ambiente exterior.

II.- METODOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACION DE CORTICOSTEROIDES.

Revisando los resultados de 20 análisis anteriores para iniciar un control Estadístico de Determinación química, fue posible darse cuenta que todos estos resultados analíticos se encontraban por arriba del 100%; la primera reacción fue pensar que quizás al analizar, el analista por error personal siempre reportaba esos resultados (105%, 104%, 101%, 106%, 105%, 108%, 106%, 102%, 109%, etc.), pero indagando más a fondo fue posible saber que no había sido un solo analista sino diferentes y a diferentes tiempos, ya que estos datos eran de dos años a la fecha (1968-1969). Acto seguido se pensó en analizar esas mismas muestras encontrando resultados un poco diferentes, pero todos sobrepasaban el 100% (106%, 104%, 102%, 105%, 105%, 106%, 107%, 102%, 109%, etc.). Una vez hecho esto, se procedió a investigar la técnica analítica usada, dicha técnica se había venido usando en los últimos dos años sin que nadie notara la aparente anomalía del método, ya que cada análisis se efectuaba con intervalo de más o menos un mes y sin tener a la mano el resultado del análisis anterior; esta razón de tener a la mano todos los resultados anteriores en la forma más concreta posible fue lo que llevó a tratar de establecer Cartas de Control Estadístico (Levey y Jennings) (11) que más adelante se emplea-

rán. Hecho esto se concluyó que era necesario investigar todo esto más a fondo y no solo desde el punto de vista del análisis químico sino que era conveniente utilizar alguna ciencia auxiliar para poder evaluar desde un punto de vista más exacto y qué mejor para ello que la Estadística.

Concluído esto se procedió a elaborar un plan de trabajo siendo este el siguiente:

1o.- Determinar la pureza de la Dexametasona, tanto la de Referencia como la del Problema.

2o.- Comparar el método establecido con otro, también usado en determinaciones de esteroides.

3o.- Evaluar estadísticamente ambos métodos para saber si era posible cambiar el método analítico establecido por otro con mejores resultados. Para resolver el primer objetivo procedimos a practicar un análisis completo de nuestros compuestos de referencia al igual que de nuestro problema utilizando para ello dos sistemas diferentes; uno, la cromatografía en placa fina y el otro la espectrofotometría ultravioleta. Para el análisis cromatográfico fue necesario proveernos de un compuesto de referencia químicamente puro Dexametasona estándar U.S.P. para poder obtener un dato positivo; por lo tanto procedemos a explicar el método cromatográfico:

1) Material empleado en elaboraciones de trabajo:

- a) Placas de vidrio de 20 x 20 cms.
- b) Dióxido de Silicio Gel HF 254 para cromatografía en capa fina.
- c) Micropipetas de 10 microlitros.
- d) Cámara para cromatografía 20 x 20 x 8.5 cms.
- e) Horno eléctrico a 105°.
- f) Cloroformo G.R.

- g) Solución alcalina al 1% de azul de Tetrazolio.
- h) Espectrofotómetro de doble haz Hitachi Perkin Elmer modelo 165.
- i) Graficador Coleman Hitachi modelo 165.
- j) Celdillas de Silica Beckman.
- k) Alcohol etílico G.R.
- l) Acido sulfúrico G.R.
- m) Fenilhidrazina G.R.
- n) Hidróxido de Tetrametilamonio.
- ñ) Cloruro de Feniltetrazolio.
- o) Acido clorhídrico al 10%.

2) Métodos empleados para la elaboración de este trabajo:

- a) Cromatografía en placa fina.
- b) Espectrofotometría ultravioleta.
- c) Determinaciones colorimétricas:

Método I.

Método II.

- a) El método cromatográfico.- Se prepara una suspensión de Dióxido de Silicio Gel en agua destilada (30 g en 60 ml) la cual se vierte en el aplicador de placa fina, que se hará correr sobre las placas de vidrio perfectamente limpias sin vestigios de grasa; al colocar el aplicador sobre la primera placa se manipula de modo que éste vierta su contenido, quedando una placa fina (250 μ de espesor) de suspensión, se deja secar 20 minutos para activarse posteriormente; el activamiento consiste en colocar las placas en un horno a 105°C durante 15 minutos hecho esto se pasan a un desecador para que se enfríen y poder trazar el cuadrante el cual limitará el corrimiento

de los solventes, mientras tanto colocamos en la cámara de cromatografía el solvente adecuado (cloroformo) tomando en cuenta polaridad y solubilidad en relación con el compuesto a tratar, el volumen del solvente fue aproximadamente de 70 ml en cada cámara.

Una vez trazado el cuadrante se procedió a colocar las muestras (10 microlitros) para introducir la placa a la cámara previamente saturada y dejar que ascienda el solvente (10 cms. de ascensión en 15 minutos aproximadamente).

Una vez efectuado esto se sacaron las placas, se dejaron secar a la temperatura ambiente para posteriormente revelarlas con una solución alcalina al 1% de azul de tetrazolio en aerosol, el cual es recomendado para este tipo de trabajo (2). Concluido esto, se calculo el Rf (Relación de frentes) de cada uno de los compuestos; esto se hace dividiendo la distancia en centímetros que recorrió la muestra entre la distancia que recorrió el solvente, ejemplo:

$$\begin{aligned} \text{Muestra} &= \frac{5 \text{ cms.}}{10 \text{ cms.}} = 0.5 \\ \text{Solvente} &= \end{aligned}$$

- b) Espectrofotometría ultravioleta. - Dos leyes fundamentales están ligadas a la espectrofotometría; las leyes de Lambert y Beer. La ley de Lambert establece que la luz absorbida es directamente proporcional al espesor de la solución que se analiza. (6).

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = a_s b$$

Donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de la luz transmitida, a_s es el índice característico para

la solución; b es la longitud o espesor del medio y a es la absorbancia. La ley de Beer establece que la cantidad de luz absorbida es directamente proporcional a la concentración del soluto en solución. (6).

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = a_s c$$

y la ley combinada de Lamber y Beer es $\log_{10} I_0/I = a_s b c$. Si b se mantiene constante, empleando una cubeta y una celda estandar, la ley de Lamber y Beer se reduce a:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = a_s c$$

El índice de absorbancia se define como A/Cb donde C es la concentración de la sustancia en gramos por litro y b es la distancia en centímetros de la solución atravesada por la luz. (6).

El principio básico de la absorción ultravioleta está dado por el grado de excitación electrónica que es producida por el determinado haz de luz, en nuestros compuestos tratados dado que posee un núcleo básico (ciclo pentano fenantrenol) y en su primer anillo entre los carbonos 1 - 2 y 4 - 5 posee doble ligadura (enlace $\pi \longrightarrow \pi$ excitado electrónicamente), es éste el sitio de mayor excitabilidad electrónica; y atendiendo a las características cíclicas de dicho núcleo básico es posible obtener un espectro de absorción determinado de tal manera que nos proporcione un dato preciso para alcanzar nuestro objetivo.

Ya en la práctica se solubilizó la Dexametasona (referencia y problema) en alcohol para efectuar diluciones hasta alcanzar una

concentración de 0.02 mg/ml para posteriormente recorrer el espectro de absorción de 215 a 290 nm obteniéndose las curvas que se muestran en las gráficas 1 y 2.

c) Determinaciones Colorimétricas.- Las limitaciones de muchos procedimientos colorimétricos, radican en las reacciones químicas sobre las cuales están basados estos procedimientos más bien que sobre el instrumento que se tiene a la mano. Surgen muchas ocasiones cuando un compuesto no posee propiedades cromogénicas adecuadas; algunas veces puede convertirse en una especie absorbente o hacer que reaccione con un reactivo absorbente. Los puntos que deben considerarse en cualquier procedimiento colorimétrico incluyen:

- 1.- Especificidad de la reacción formadora de color. (6).
- 2.- Tiempo-estabilidad del sistema provocador de color. (6).
- 3.- Efecto del exceso de reactivo. (6).
- 4.- pH. (6).
- 5.- Temperatura. (6).
- 6.- Conformidad con la ley de Beer. (6).

Aunque muy pocas reacciones son específicas para una sustancia en particular; muchas reacciones son bastantes selectivas; el uso de técnicas de extracción con solventes, ajuste del estado de oxidación, son factores que debemos vigilar para obtener resultados satisfactorios durante el desarrollo de una técnica colorimétrica.

Tanto el reactivo provocador de color como el producto reactivo deben ser estables dentro de un período razonable de tiempo. A menudo es necesario especificar que la comparación de color sea efectuada dentro de un período definido y siempre se recomienda preparar el compuesto de referencia y el compuesto problema dentro

de un programa de tiempo definido. Cuando están presentes otras substancias es necesario que los compuestos de referencia igualen la composición de la solución del compuesto problema. Es deseable la adherencia a la ley de Beer ya que entonces la absorbancia es directamente proporcional a la concentración y solo se necesitan unos cuantos puntos para establecer la curva de calibración (gráficas 4 y 6).

Método I

Este método se basa en la reacción del grupo 17,21-Dihidroxi 20,Cetol con Fenilhidrazina-Ac.Sulfúrico.(10).

Partimos de la base que el inyectable en cuestión contiene 0.25 mg./ml. de Dexametasona; por lo tanto la solución de Dexametasona de Referencia obedecerá conseguir una concentración igual a la del problema, teniendo la precaución de acidificar antes de extraer con acetato de etilo; una vez hecho esto se toman porciones alícuotas de ambas soluciones y se vaporan sobre baño de vapor y corriente de nitrógeno hasta sequedad. Se adiciona 20 ml de alcohol metílico para disolver el residuo y se agregan 40 ml del reactivo de fenilhidrazina disuelta en una mezcla de metanol sulfúrico, se mantienen en baño María a 60°C por 20 minutos y después se enfría para leer en el espectro a 415 nm calibrando a cero con mezcla de metanol sulfúrico. El número total de determinaciones por este método fueron veinticinco.

Método II

El desarrollo de color en este método se debe a que en presencia de hidróxido de Tetrametilamonio el grupo alfa cetol de la Dexametasona reduce lassales de Tetrazolio al correspondiente

cromógeno formazán (3). Ya extraídos los compuestos, se evaporan sobre baño de vapor y corriente de nitrógeno hasta sequedad; después de adicionar alcohol etílico para disolver el residuo y de esta manera proceder a reaccionarlo; esto se logra agregando primero la solución de cloruro de Tetrazolio y después la solución de Hidróxido de Tetrametilamonio, una vez hecho esto se mantienen en baño María a 45°C durante 30 minutos terminado este tiempo se agrega una pequeña cantidad de ácido acético (0.1 ml) para estabilizar la reacción, se enfrían y se leen a 485 nm.

Como en el caso del método I el número total de determinaciones fue de veinticinco.

3) Técnicas estadísticas empleadas en este trabajo.

La razón de calcular un promedio es el de obtener un dato representativo de todas las determinaciones; dicho de otro modo es en realidad el centro de gravedad de la distribución.

PROMEDIO:

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} \quad (1)$$

DONDE:

\bar{X} = Promedio

\sum = Suma de valores individuales

n = Número de determinaciones

X_i = Valores individuales

Desviación estándar. Esta medida de variación es universalmente usada para mostrar la dispersión de los valores individuales alrededor del promedio de una distribución dada y su valor permite

establecer los límites del universo o conjunto; esto es posible observarse concretamente en las gráficas 3, 5 y 7.

En estadística existe una técnica conocida como cifrado la cual consiste en multiplicar por un número X los valores individuales de tal manera que sea posible trabajar solamente con números enteros ejemplo: $0,001 \times 1000 = 1$.

La inversa de esta técnica se conoce con el nombre de decifrado y consiste en dividir los valores individuales entre un número X ejemplo: $\frac{1.0}{1000} = 0,001$.

Coefficiente de variación. En muchas ocasiones cuando se comparan resultados obtenidos con otros es necesario recurrir al término estadístico conocido como coeficiente de variación que aporta una relación porcentual, ya que el coeficiente de variación es la desviación estandar expresada en % y es igual a:

$$C_v = \frac{S_x}{\bar{X}} \times 100 \quad (12)$$

Gráficas de Control Estadístico. Llámase representación gráfica toda manera de visualizar datos cuantitativos. Ella permite cuando ha sido correctamente hecha, obtener en forma rápida una impresión de conjunto del material presentado. La dependencia entre los valores numéricos correspondientes a diversas magnitudes puede ser a menudo mejor y más rápidamente comprendida mediante una representación gráfica que con una simple tabla. Hay muchas clases de representaciones gráficas, por ejemplo las gráficas de control de Levey y Jennings.

El Dr. Walter A. Shewhart (14) estableció el sistema de

Gráficas de Control por medio de las cuales se obtiene la representación de las variaciones que se van sucediendo durante la elaboración de un proceso para comprobar de continuo si el proceso esta bajo control, (sucesión de puntos dentro de ciertos límites que se denominan de control), o bien si la variación ha aumentado por haber intervenido una causa asignable y los puntos de la gráfica se salen de los Límites de Control.

La precisión de toda Gráfica de Control, radica esencialmente en el orden de agrupamiento de una serie de observaciones, con respecto al tiempo, al lugar, a la fuente de producción o a cualquiera otra condición que provea una base de clasificación en las condiciones bajo las cuales se obtienen los datos de las observaciones.

III.- RESULTADOS.

a) Para el método cromatográfico se obtuvo el siguiente cuadro:

CUADRO COMPARATIVO DE Rf PARA A Y B

A = Dexametasona de Referencia

B = Dexametasona Problema

Tabla No. 1

No.	A Rf X_1	B Rf X_1	A $X - \bar{X} \times 100$	B $X - \bar{X} \times 100$	A $(X - \bar{X} \times 100)^2$	B $(X - \bar{X} \times 100)^2$
1	.53	.58	0	5	0	25
2	.57	.53	4	0	16	0
3	.52	.52	1	2	1	4
4	.53	.53	0	0	0	0
5	.51	.52	2	1	4	1
6	.55	.55	2	2	4	4
7	.56	.51	3	2	9	4
8	.52	.53	1	0	1	0
9	.53	.51	0	2	0	2
10	.51	.52	2	1	4	1
Σ	5.33	5.30			39	40

Promedio para:

$$\begin{array}{c} \text{A} \\ \frac{5.33}{10} = .53 \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{B} \\ \frac{5.30}{10} = .53 \end{array}$$

Por lo tanto la desviación estándar es igual a:

$$S_x = \sqrt{\frac{(\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}} \quad (1)$$

Donde:

S_x = desviación estándar.

Substituyendo para A:

$$S_x = \sqrt{\frac{39}{9}} = \sqrt{4.3} = \frac{2.07}{100} = 0.02$$

S_x de A = 0.02 (Gráfica No. 3)

Substituyendo para B:

$$S = \sqrt{\frac{40}{9}} = \sqrt{4.4} = \frac{2.09}{100} = 0.02$$

S_x de B = 0.02 (Gráfica No. 3)

Coefficiente de variación:

$$C_v = \frac{0.02}{0.53} \times 100 = 3.7\%$$

Tabla comparativa No. 2

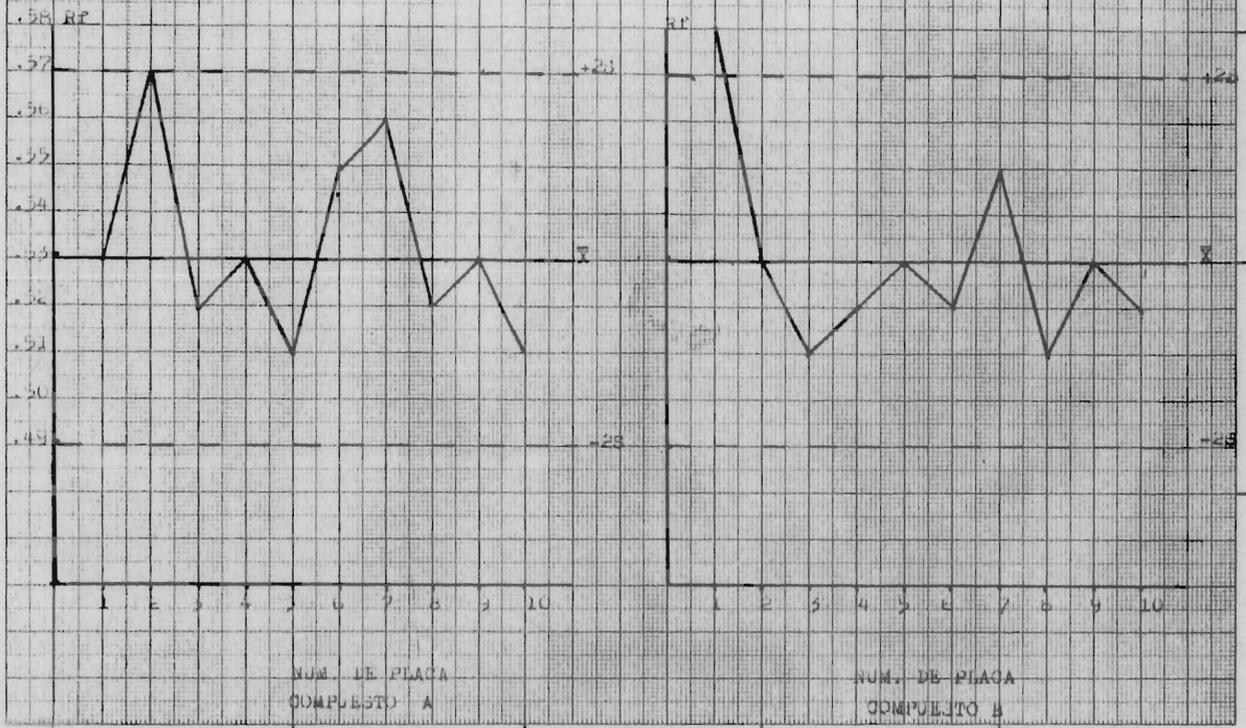
Resultados bibliográficos contra resultados prácticos

C_v Bibliográficos	1.5%, 2.5%, 3.5% (12)
C_v para A y B	3.7%

CARTAS DE CONTROL DE LEVY Y JENNINGS

RELACION DE FUENTES PARA A Y B

GRAFICA No. 3



b) Espectrofotometría ultravioleta:

En el análisis espectrofotométrico se obtuvo el siguiente cuadro:

Tabla No. 3

Longitud de Onda máxima de absorción

Compuesto Referencia	239 \pm 1 nm
Compuesto Problema	239 \pm 1 nm
Resultado Bibliográfico (2) (3) (7)	239 \pm 1 nm

c) Determinaciones colorimétricas:

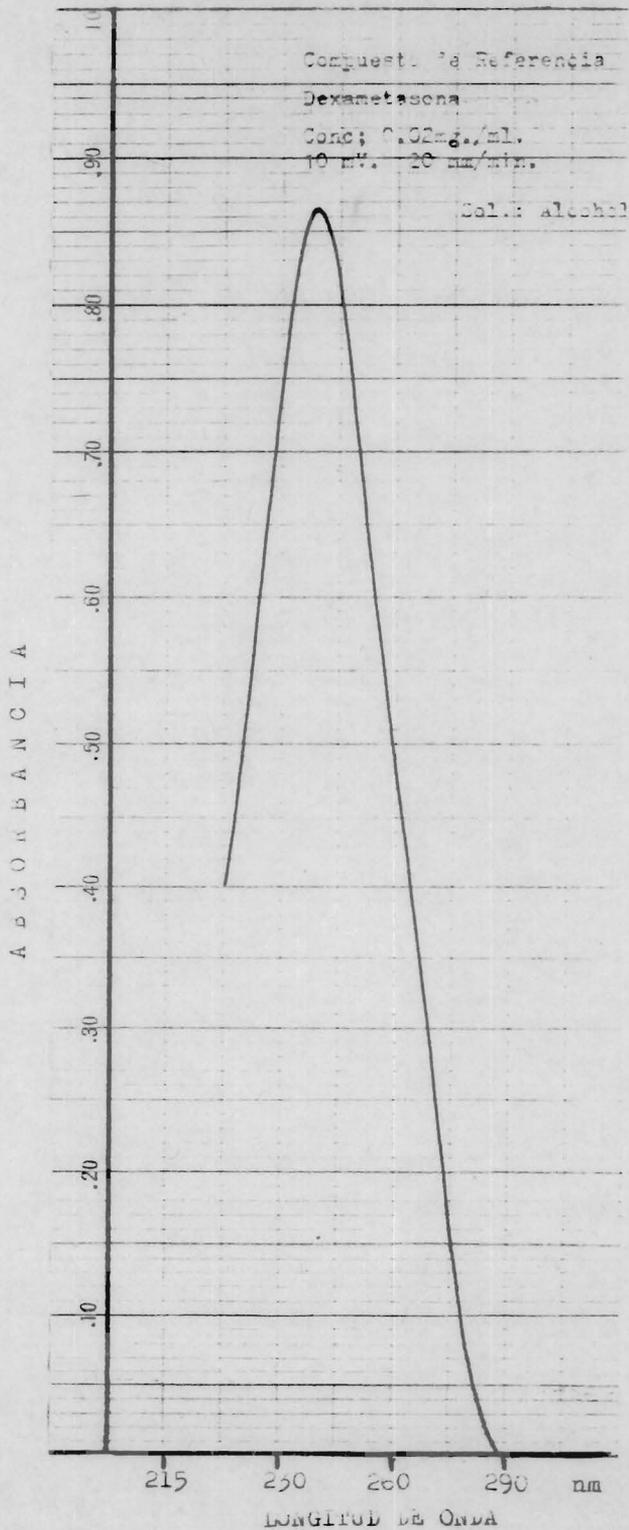
Método I y II

Tomandose el compuesto de referencia como el 100% se puede calcular el porcentaje de Dexametasona en las veinticinco pruebas como sigue:

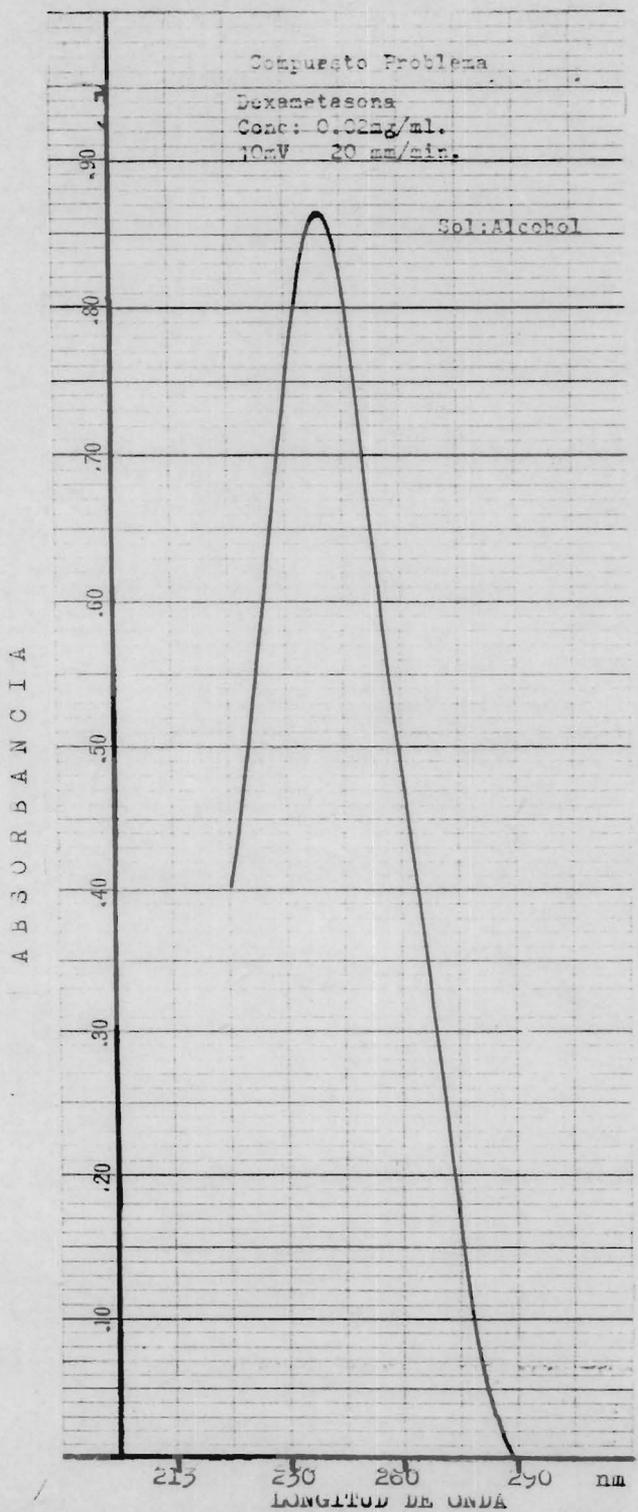
% de Dexametasona =

$$\frac{\text{Absorbancia Problema}}{\text{Absorbancia Referencia}} \times 100$$

Es importante que al valorar una determinada técnica se tenga la precaución de establecer una curva de Dosis Respuesta por lo tanto para el Método I se observa en la gráfica No. 4, y para el Método II la gráfica No. 6.



GRAFICA N°1



GRAFICA N°2

Tabla No. 4

RESULTADO PARA EL METODO I

% de Dexametasona en el Análisis	Diferencia Aritmética $X_i - \bar{X}$	Diferencia al cuadrado $\leq (X_i - \bar{X})^2$
106	2	4
109	5	25
104	0	0
108	4	16
105	1	1
104	0	0
97	7	49
100	4	16
105	1	1
104	0	0
95	9	81
105	1	1
106	2	4
107	3	9
108	4	16
102	2	4
107	3	9
105	1	1
106	2	4
92	12	144
107	3	9
106	2	4
104	0	0
103	1	1
100	4	16

$\Sigma = 2595$

$\Sigma = 415$

$\bar{X} = \frac{2595}{25} = 104$

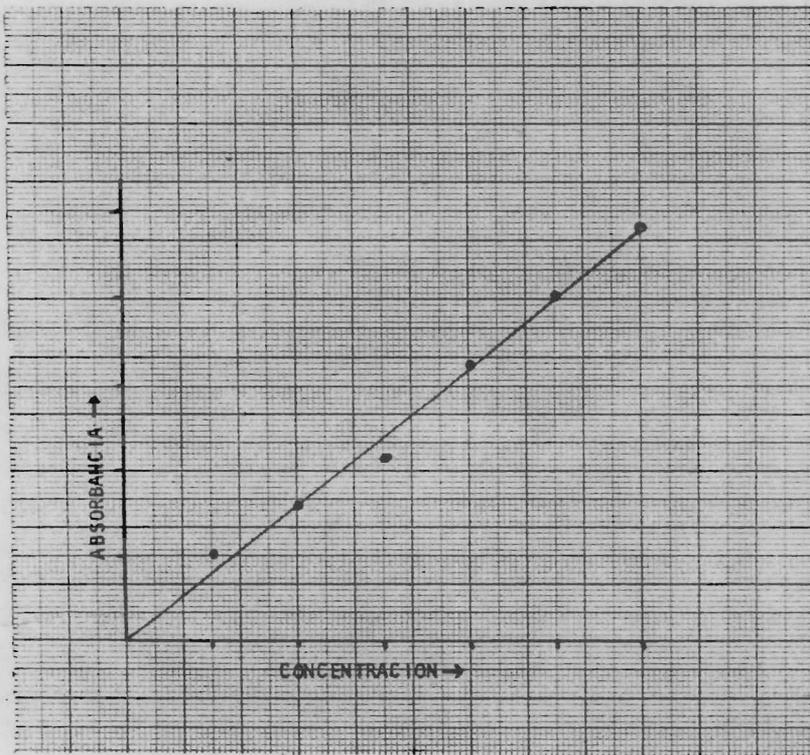
Por lo tanto la desviación estándar:

$S_x = \sqrt{\frac{415}{25}} = 4.08$

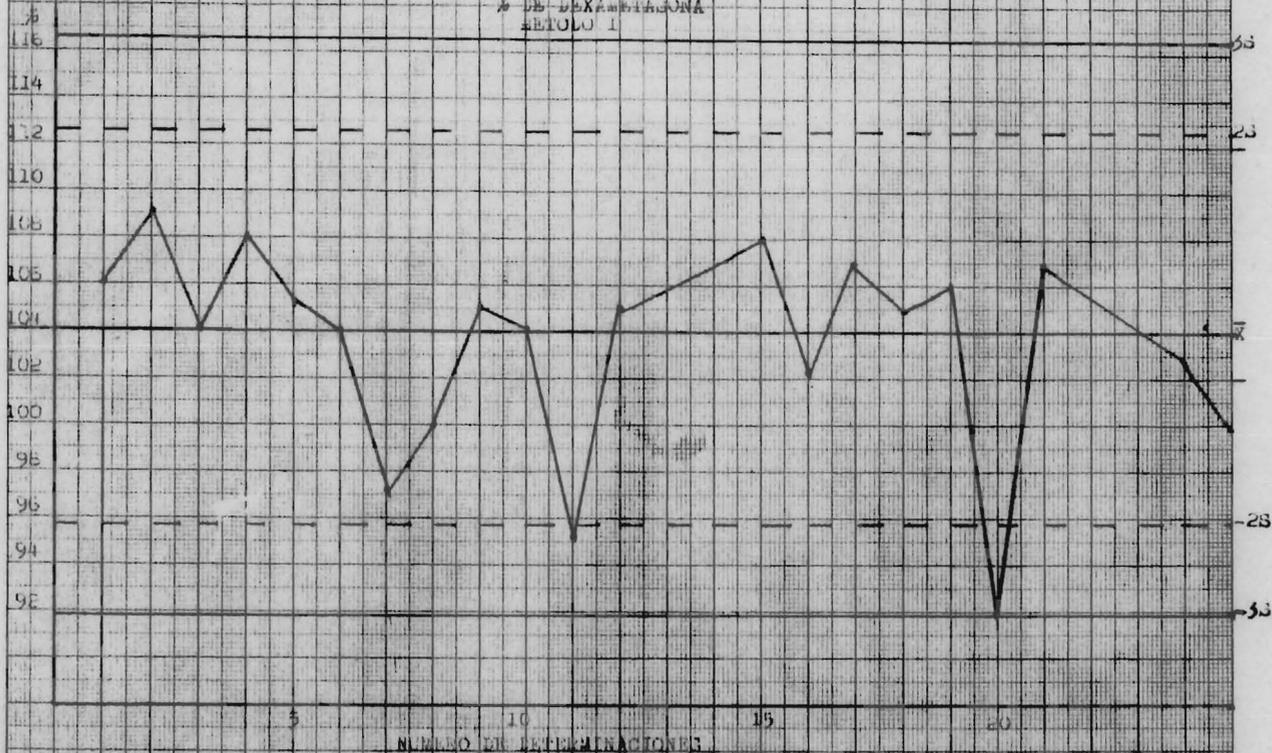
$\pm 1S = 4.08\%$
 $\pm 2S = 8.16\%$
 $\pm 3S = 12.24\%$

CURVA DE DOSIS RESPUESTA PARA EL METODO I
A DIFERENTES CONCENTRACIONES

GRAFICA N° 4



CARTA DE CONTROL DE LEVLY Y JENIUS
% DE DEXAMETASONA
ARTICULO 1



NÚMERO DE DETERMINACIONES

GRAP. 14 20-2

Tabla No. 5

RESULTADO PARA EL METODO II

% de Dexametasona en el Análisis	Diferencia Aritmética $\bar{x}_i - \bar{x}$	Diferencia al cuadrado $\leq (\bar{x}_i - \bar{x})^2$
105	5	25
99	1	1
100	0	0
97	3	9
98	2	4
99	1	1
102	2	4
96	4	16
106	6	36
100	0	0
94	6	36
102	2	4
102	2	4
102	2	4
104	4	16
93	7	49
98	2	4
97	3	9
99	1	1
97	3	9
99	1	1
100	0	0
101	1	1
102	2	4
104	4	16

= 2496

Σ = 254

$$\bar{x} = \frac{2496}{25} = 99.8$$

Por lo tanto la desviación estándar:

$$S_x = \sqrt{\frac{254}{25}} = 3.3$$

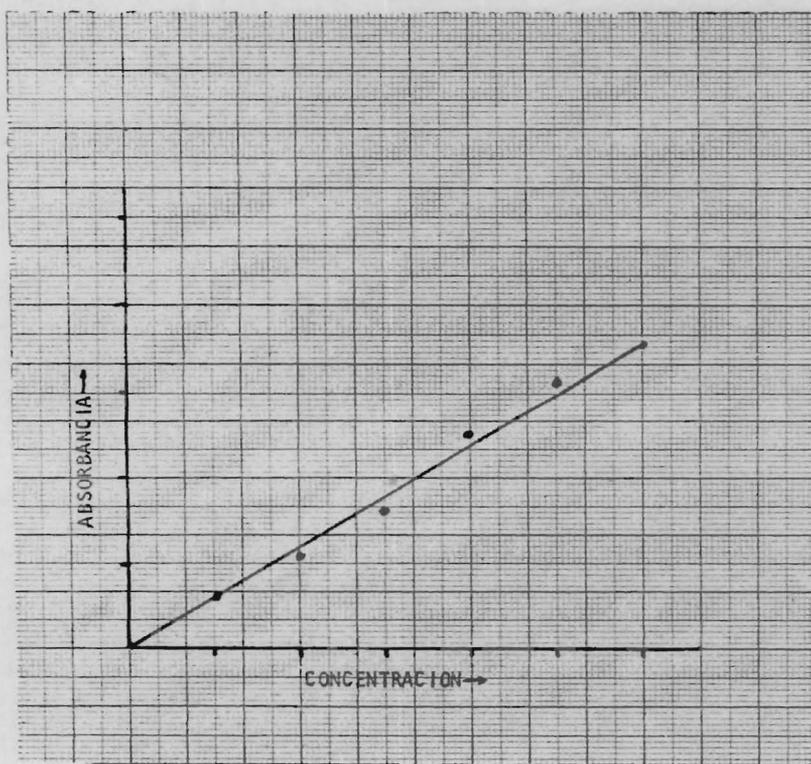
$$\pm 1S = 3.3\%$$

$$\pm 2S = 6.6\%$$

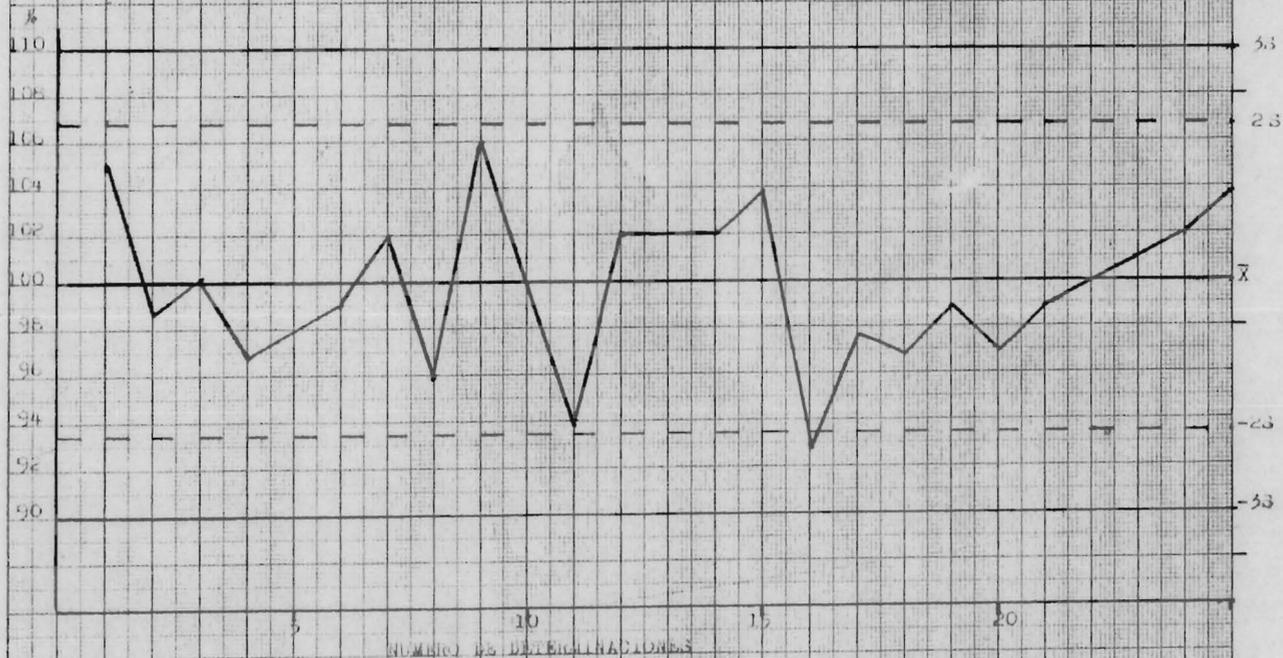
$$\pm 3S = 9.9\%$$

CURVA DE DOSIS RESPUESTA PARA EL METODO 11
A DIFERENTES CONCENTRACIONES

GRAFICA N° 6



CARTA DE CONTROL DE LEVY Y JENNIGS
% DE DEXAMETASONA
MÉTODO II



NUMERO DE DETERMINACIONES

GRAFICA No. 2

IV.- DISCUSION.

El empleo de la estadística ayuda a determinar la calidad del trabajo efectuado, ahora bien, fue posible determinar la reproducibilidad y exactitud de diferentes técnicas analíticas obteniendo así las siguientes conclusiones:

- 1) Cromatografía en capa fina. Es un excelente método para identificar y valorar cualquier compuesto, siempre y cuando como en este caso se cuente con los medios adecuados.

Fue necesario también contar con reportes bibliográficos propios de la técnica usada para comparar los resultados obtenidos (R_f , promedio, desviación estándar y coeficiente de variación) y de esta manera tener la conclusión arriba señalada. (Tablas No. 1 y 2, Gráfica No. 3).

- 2) Espectrofotometría ultravioleta. Es una técnica precisa la cual permitió reafirmar la identidad y pureza del compuesto de referencia y del compuesto problema.

En las gráficas No. 1 y 2 es posible comparar ambos espectros y al mismo tiempo determinar a qué longitud de onda se obtiene la máxima absorción; dichos resultados se compararon con datos bibliográficos, correspondiéndose estos entre sí completamente, Tabla No. 3.

- 3) Una vez llevada a cabo la comprobación de los compuestos en cuestión, fue posible hacer una comparación entre dos técnicas colorimétricas para la valoración de dexametasona en productos biológicos y llevando esta comparación a las siguientes conclusiones:

- a) El Método 1 tiene una mayor desviación estándar (4.08) lo

cual puede atribuírse a la poca facilidad de manejo del ácido sulfúrico; y como se observa en la tabla de resultados No. 4 y la gráfica de control No. 5 de este método el 88% de los resultados están por arriba del 100% que corresponde a la determinación de la Dexametasona de referencia, infiriendo así que uno de los componentes de la solución inyectable problema también reacciona de igual manera que la Dexametasona; esto condujo a pensar que dicho error se puede corregir preparando una solución inyectable con las mismas características (solución correctora) que la solución problema solo que en la solución correctora se omita la adición de Dexametasona y analizando paralelamente las tres soluciones (Referencia, Problema y Correctora) y al final restar ya sea a nivel de lecturas o de porcentajes el valor de esta solución correctora lo que implica hacer más extenso este método.

b) El Método II tiene una desviación estándar (3.30) menor que el anterior además que no presenta la dificultad de manejo de reactivos y como se observa en la tabla de resultados No. 5 y la gráfica de control No. 7 de este método, existe una distribución equilibrada de dichos datos; obteniendo así el 48% abajo del promedio y el 52% arriba. Es importante hacer notar que el promedio corresponde muy cerca de la cantidad real por lo tanto este método ofrece ventajas siendo estas las siguientes:

METODO I	METODO II
Poca facilidad de reactivos	Facilidad de reactivos
Desviación estándar 4.08	Desviación estándar 3.30
Resultados unilaterales	Resultados bilaterales
Método de fácil desarrollo	Método de fácil desarrollo
usando solución correctora	sin usar solución correctora

V.- BIBLIOGRAFIA.

- 1) Bancroft, M.: Introducción a la Bioestadística, Eudeba/Argentina, 1968. Págs. 59-72.
- 2) Clarke, E.G.C.: Isolation and Identification of Drugs, The Pharmaceutical Press / London, 1969. Pág. 63.
- 3) Drugs of Today, Vol. III, No. 1, Marbur / Spain, 1967. Págs. 18-19.
- 4) Fieser, L.F. y Fieser, M.: Steroids, Reinhold Publishing Corporation / New York, 1959. Págs. 547-549.
- 5) Fieser, L.F. y Fieser, M.: Química Orgánica Grijalbo / México, 1968. Págs. 91; 1202-1204.
- 6) Hobart, H.W., Lynne, L.M. y Dean, J.A.: Instrumental Methods of Analysis, D. Van Nostrand Company Inc. / New York, 1960. Págs. 109-170
- 7) Jenkins, G.L., Knevel, A.M. y Digangi, F.E.: Quantitative Pharmaceutical Chemistry, McGraw-Hill Book Company / New York, 1967. Págs. 328-352.
- 8) Johnson, C.A.: Drug Identification, The Pharmaceutical Press / London, 1966. Pág. 100.
- 9) Litter, M.: Farmacología, Ateneo / Argentina, 1966. Págs. 885-925.
- 10) Porter-Silver: J. Biol. Chem. 1950. Págs. 185-201.
- 11) Martin-Cook: Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co. / Pennsylvania, 1961. Págs. 100-121.
- 12) Shellard, E.J.: Quantitative Paper and Thin Layer Chromatography, Academic Press/ New York, 1968. Págs. 1 -3.
- 13) The Merck Index, Merck & Co., Inc. / Rahway 8th Edition, 1968 Pag. 334.
- 14) American Society for Quality Control, Sección Ciudad de México / México, 1971. Págs. 5-7