



6
2ej
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

*DESARROLLO Y VALIDACION DE METODOS
ALTERNATIVOS PARA CUANTIFICACION
DE ALGINATO DE SODIO.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
LETICIA CRUZ ANTONIO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

I N D I C E

INTRODUCCION	5
I. FUNDAMENTACION DEL TEMA	6
A. Alginato de sodio	10
1. Descripción	10
2. Estructura	10
3. Formula empírica	12
4. Formula estructural	12
5. Sinónimos	13
6. Solubilidad	13
7. Estabilidad del polvo seco	13
8. Propiedades en solución	13
9. Propiedades físicas	14
10. Especificaciones farmacopéicas	14
11. Interacción con cationes metálicos polivalentes	15
12. Usos	18
B. Espectroscopia de emisión de llama	18
1. Espectro de llama	20
2. Características de la llama	20
3. Estructura de la llama	20
4. Tipos y temperaturas de la llamas	26
C. Validación	27
1. Definiciones	29
a. Linealidad	29
b. Exactitud	29
c. Precisión	29
1) Repetibilidad	29
2) Reproducibilidad	29
d. Limite de detección	30
e. Especificidad	30
2. Determinaciones	30
a. Linealidad del sistema	30
b. Precisión del sistema	30
c. Linealidad del método	30
d. Exactitud y repetibilidad del método	32
e. Precisión del método	33
f. Limite de detección	33

- II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 34
- III. OBJETIVOS 35
- IV. HIPOTESIS 36
- V. MATERIAL Y EQUIPO 37
- VI. METODOLOGIA GENERAL 38
 - A. Preparacion de soluciones 39
 - B. Procedimiento 39
 - C. Validación 40
 - 1. Linealidad del sistema 40
 - 2. Precisión del sistema 41
 - 3. Linealidad del método 41
 - 4. Exactitud del método 40
 - 5. Precisión del método (repetibilidad) 40
 - 6. Precisión del método (reproducibilidad) 40
 - 7. Limite de detección 41
- VII. RESULTADOS 42
 - A. Metodos propuestos 42
 - B. Validación del método propuesto 44
 - 1. Linealidad del sistema 44
 - 2. Precisión del sistema 46
 - 3. Linealidad del método 47
 - 4. Exactitud del método 49
 - 5. Precisión del método (repetibilidad) 50
 - 6. Precisión del método (reproducibilidad) 51
 - 7. Limite de detección 54
- VIII. ANALISIS DE RESULTADOS 53
- IX. CONCLUSIONES 61
- X. SUPRENCIAS 62
- XI. BIBLIOGRAFIA 7
- XII ANEXO I 58
- ANEXO II 58
- ANEXO III 7

I N T R O D U C C I O N

Historicamente el campo de la investigación analítica y el control de calidad derivan de la necesidad de supervisar las diferentes etapas de elaboración de los productos farmacéuticos, eliminando desde el principio problemas de calidad como lo son contaminación, mezclas y excesos de variación en especificaciones.

El desarrollo de métodos de análisis de materias primas, intermediarios químicos, sustancias activas o inactivas de los productos y que a menudo debe lograrse en presencia de otros componentes que interfieren exigen de técnicas especiales de análisis para eliminarlos o evitarlos, es lo que hace que la actividad del desarrollo de métodos de análisis confiables sea de gran importancia dentro de la Industria Farmacéutica.

El propósito del presente trabajo fue el de desarrollar métodos alternativos de cuantificación para alginato de sodio, una materia prima, que debido a sus diversos usos como: estabilizador de emulsiones, agente suspensor, desintegrante y/o aglutinante de tabletas (1,2), dentro de la Industria Farmacéutica, es importante controlar su calidad a través de técnicas de análisis sencillas, económicas y rápidas. Los métodos oficiales establecidos para cuantificar alginato de sodio (4,5), presentan desventajas por ser complicados, lentos e inaccesibles en el equipo.

El presente trabajo describe la cuantificación de Alginato de sodio, por precipitación con ácido clorhídrico del ión sodio empleando la técnica de espectrofotometría de flama, finalmente el método resultó ser específico, lineal, exacto, preciso y reproducible.

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

La demanda del uso del Alginato de Sodio, por parte de las industrias alimentaria, odontológica y farmacéutica en México, es debida a sus propiedades coloidales únicas, pueden ser utilizado como espesante, estabilizante, emulsificante, suspensor, formador de película y propiedades gelificante (1,2), aunque su acceso comercial en nuestro país sea solo a través de la importación del mismo (3).

De la versatilidad de usos del Alginato de Sodio y la necesidad de controlar su calidad, su método de cuantificación se hace oficial en algunos países como lo reporta la UTP XXII y National Formulary XVII (5) para los Estados Unidos de América, en México por la Farmacopea en su 5a. edición (6). Sin embargo, en las técnicas oficiales de cuantificación se involucran condiciones de hidrólisis, dióxido de carbono, presión y temperaturas, difíciles de controlar haciendo el análisis largo y poco confiable (Figura 1). Por lo que se justifican los reportes de métodos no oficiales para la cuantificación del Alginato de Sodio.

Achwall (6), reporta que el alginato de sodio puede ser cuantificado por precipitación con cloruro de calcio, aislado y convertido el precipitado en ácido alginico, el cual es titulado con una solución estándar de alcali, o bien a través de una titulación coloidal por medio de la formación de complejos poliiónicos, como lo describe Lorenaga (7).

Pechanek (8), reporta un método electroforético para el análisis cuantitativo y cualitativo de agentes gelificantes, como alginato de sodio.

A través de una complejación con poli (cloruro de hexametilenguanidina) la cuantificación de alginatos es determinada en extractos de algas café según investigaciones de Kennedy (5).

Toyodo (10), reporta un método de cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución, así como también, Preuss (11), cuantifica los espesantes naturales y gomas por metanólisis y cromatografía de gases usando columnas capilares.

Sin embargo, en general todos los métodos anteriormente mencionados ya sea oficiales o no oficiales en condiciones de rutina para el control de calidad de alginato de sodio, resultan ser poco prácticos.

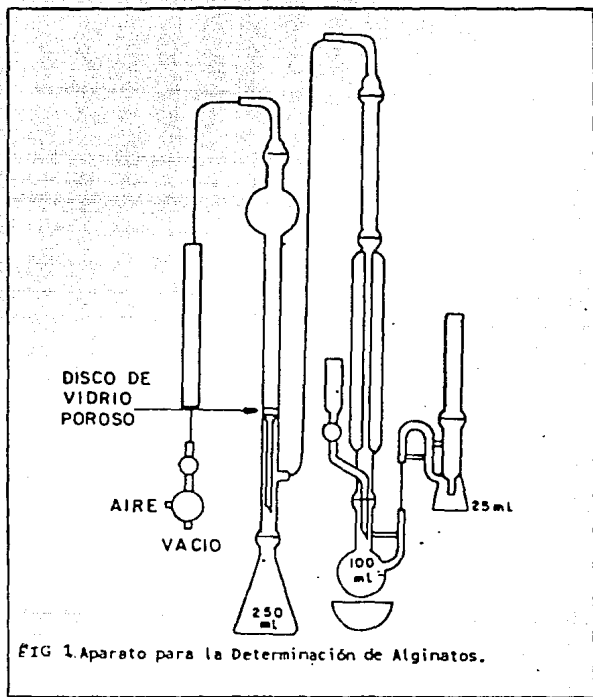
Las algas café fueron usadas como alimento en algunos países antes del descubrimiento de los alginatos ocurrido cerca de 1880, en el Reino Unido por E.C.C. Stanford. Tiempo después Shorthly y Ineffin aislan y purifican el ácido alginico (12).

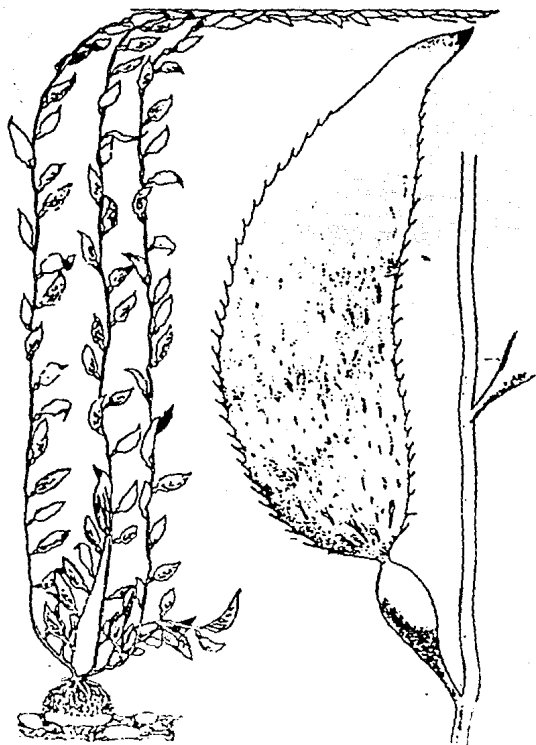
La primera producción comercial ocurrió en California E.U. en 1929 y a partir de ese momento, los usos de los alginatos se vieron significativamente incrementados (12,14).

Los alginatos están presentes en todas las membranas de las algas café, de la clase Phaeophyceae, como un componente estructural de sus paredes celulares en forma de una mezcla de sales insolubles de calcio, magnesio, sodio y potasio del ácido alginico, a pesar de esto los alginatos están presentes en todas las clases de Phaeophyceae, sólo pocas especies de algas café son usadas para la producción comercial. Estas especies son principalmente Macrocystis pyrifera, Ascophyllum nodosum, Laminaria digitata y Laminaria hyperborea por mencionar algunas. Los mayores productores de alginatos son: Estados Unidos de América, el Reino Unido, Noruega, Francia, Canadá y Japón, países en los cuales la producción de los alginatos proviene del aislamiento del alga Macrocystis pyrifera, la cual se desarrollada en las costas de esos países (14). Un esquema de la M. pyrifera se muestra en la Figura 2.

Dentro de los alginatos comercialmente disponibles se incluyen al alginato de sodio, de potasio, de amonio y de propilén glicol, tales alginatos se producen en diferentes de tamaños de partícula, grados de viscosidad y niveles de calcio para proporcionar propiedades específicas en alimentos y sistemas industriales (14).

Los alginatos de amonio, calcio, potasio y sodio son reconocidos como productos seguros de acuerdo con las buenas prácticas de manufactura del C.F.R 21 (192.7133).





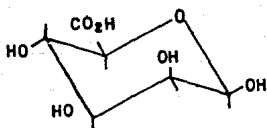
Mar-ecista pilifera

A. Alginato de sodio

1. Descripción. Las monografías oficiales para el alginato de sodio son enlistadas el No XVII, USF XII, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 5a edición (4.0). De donde el alginato de sodio es descrito como "el carbohidrato purificado extraído de algas marinas que consiste principalmente en la sal de sodio del ácido alginico, un ácido poliurónico compuesto de residuos de ácido α -D-manurónico enlazados de tal forma que el grupo carboxilo de cada unidad esta libre, mientras que el grupo aldehido esta protegido por un enlace glucosidico".
2. Estructura. Haug et al. (15), muestran la presencia de tres tipos de segmentos de polimeros en el ácido alginico a través de una hidrólisis acida. El principal componente de un segmento es el ácido D-manurónico, el principal componente del segundo segmento es el ácido L-gulurónico, y el tercer segmento contiene residuos alternados de ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico.

La estructura y conformación del ácido D-manurónico y el ácido L-gulurónico, ambos con representaciones esquemáticas de los segmentos de los polimeros, se muestran en la Figura 3.

La Tabla 1, muestra las proporciones de los tres segmentos de polimeros en muestras de ácido alginico extraídas a partir de Macrocystis pyrifera, Ascophyllum nodosum, y Laminaria hyperborea, de las cuales se aísla la mayor parte de los alginatos comercialmente accesibles (14).

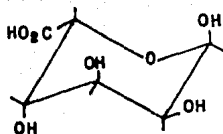


ACIDO β -D MANURONICO

...-M-M-M-M-M-M-M-...

SEGMENTO AL ACIDO
POLIMANURONICO

(polimanuronan)



ACIDO α -L GULURONICO

...-G-G-G-G-G-G-G-...

SEGMENTO AL ACIDO
POLIGULURONICO

(poliguluronan)

...-M-G-M-G-M-G-M-G-...

SEGMENTOS ALTERNANTES

FIGURA 3 ESTRUCTURA Y CONFORMACION DEL ACIDO
D-MANURONICO Y L-GULURONICO

Tabla 1

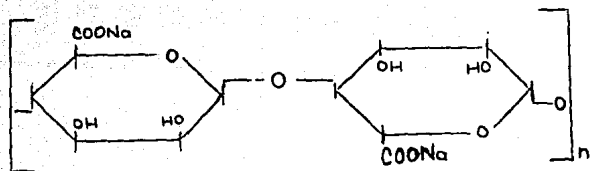
Proporciones de segmentos polimannuronan, poliguluronan y segmentos alternantes en el ácido alginico de tres orígenes diferentes

Origen	Polimannuronan %	Poliguluronan %	Alternantes %
<u>Macrocystis</u> <u>pyrifera</u>	40.6	17.7	41.7
<u>Ascophyllum</u> <u>nodosum</u>	38.4	20.7	41.0
<u>Laminaria</u> <u>hyperborea</u>	12.7	60.5	26.8

3. Fórmula empírica.



4. Fórmula estructural.



5. Sinónimos. Sal sódica del ácido alginico, algin, polimacurato de sodio, satralgin 820, Album S160, Kalcin, Kalcosei (2).
6. Solubilidad. Se disuelve en agua formando una solución coloidal viscosa, insoluble en alcohol y en soluciones hidroalcohólicas donde el contenido de alcohol es mayor a un 30% en peso; insoluble en cloroformo, éter, y ácidos cuando el pH de la solución desciende por debajo de 3 (1,2).
7. Estabilidad del polvo seco. Los alginatos tienen excelente estabilidad en un almacenaje seco y a temperatura (24°C). A altas temperaturas después de un año, la estabilidad decrece para las sales del alginato tendiendo a ser menos solubles (14).
8. Propiedades en solución. Las propiedades físicas de una solución al 1% en agua destilada para el alginato de sodio se muestran en la Tabla 2 (2,14).

Tabla 2

PROPIEDADES DEL ALGIN EN SOLUCION.

Como una solución al 1%
en agua destilada:

Calor de solución (cal/g)	0.080
Índice de refracción (20°C)	1.3367
pH	7.5
Tensión superficial (Dinas/cm)	52.2

9. Propiedades físicas. Las propiedades físicas típicas del alginato de sodio se enlistan en la tabla 3 (2).

Tabla 3
PROPIEDADES FÍSICAS TÍPICAS.

Alginato de Sodio	
Contenido de humedad 13 %
Cenizas 25 %
Color del polvo Amarillo Manfil
Gravedad específica 1.59
Temperatura de combustión (°C) 340
Temperatura de cenizas (°C) 480
Calor de combustión (cal/g.) 2.5

10. Especificaciones Farmacopeicas. Las especificaciones farmacopeicas del alginato de sodio se muestran en la Tabla 4. En la cual se realiza la comparación entre la farmacopea de los Estados Unidos de America (USP (11)) y la farmacopea de los Estados Unidos de Mexico (FEUM Sa. edición), (4,5).

Talla 4
Especificaciones Farmacopeicas.

Pruebas	USP XXI	FEEM
Identificación	+	+
Ensayo	90.8 - 106 %	90.8 - 106 %
Límites microbianos	200 UFC por gramo. <u>Salmonella</u> y <u>E. coli</u> ; ausentes.	
Pérdida por secado	21.5	21.5
Arsénico	1.5 ppm	1.5 ppm
Metales pesados	50.004 %	
Ion fierro	-	1.5 ppm
Cenizas sulfatadas	18 - 24%	18 - 24 %

(+) Pruebas realizadas por ambas farmacopeas

11. Interacciones . La más útil propiedad de los alginatos es su habilidad para reaccionar con cationes metálicos polivalentes, específicamente el calcio, para producir: (1) soluciones con mayor viscosidad; (2) geles; ó (3) polímeros insolubles (14). La Figura 4, muestra de una manera sencilla que la asociación del igin esta en función del cation calcio divalente con un anion carboxilato monovalente, de la misma molecula. Otras teorías que tratan de explicar la asociación de iones con el alginato de sodio plan con la formación de una red tridimensional como se muestra en la figura 5 (15,16).

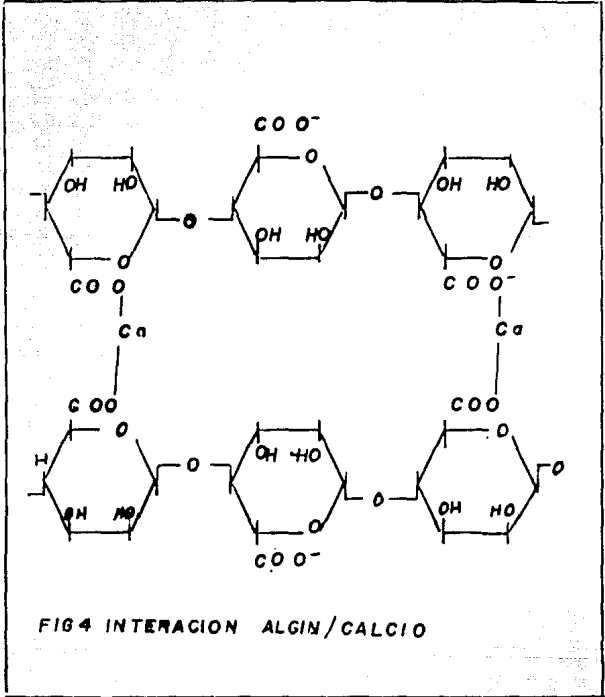
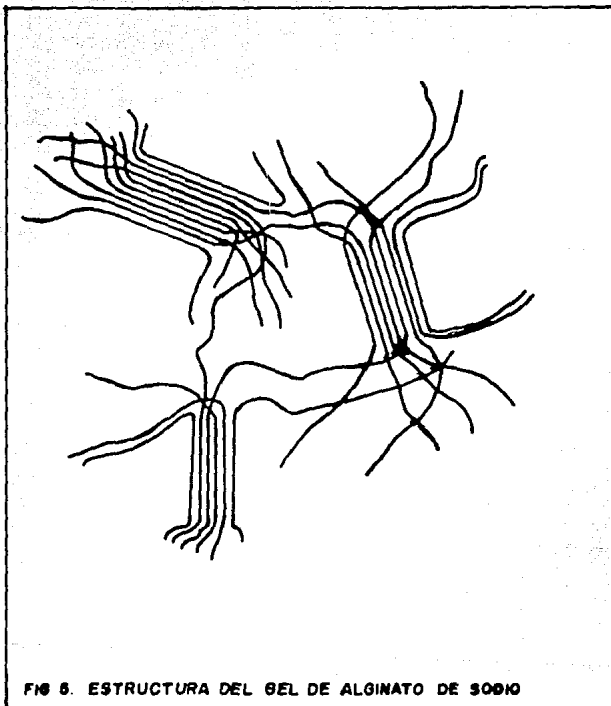


FIG 4 INTERACION ALGIN/CALCIO



17. (cont.) El alginato de sodio se usó como agente espesante y emulsificante. Esta propiedad se torna útil en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, se utiliza para impartir lustre y cuerpo a las cremas heladas y para prevenir la formación de partículas de hielo en ellas. Las aplicaciones en formulaciones farmacéuticas se muestran en la Tabla 5 (15,16).

Tabla 5

APLICACIONES EN FORMULACIONES

USO	CONCENTRACION (%)
Pastas y cremas	5 - 10
Estabilizador en emulsiones	1 - 3
Agente suspensor	1 - 5
Desintegrador de tabletas	2.5 - 10
Aglutinante para tabletas	1 - 3

B. Espectrofotometría de emisión de flama.

La espectroscopia atómica se basa en la absorción, emisión o fluorescencia de radiación electromagnética por las partículas atómicas. Las regiones del espectro proporcionan datos atómicos espectrales en la región ultravioleta, visible y la de rayos x. Para obtener espectros atómicos de ultravioleta y visible, es necesario atomizar la muestra. En este proceso las moléculas constituyentes se descomponen y se convierten en partículas pesadas atómicas. El espectro de emisión, absorción o fluorescencia de un elemento está constituido por una cantidad relativamente limitada de líneas discretas a longitudes de onda características para cada elemento. Recuentamente, estos procedimientos presentan la ventaja de su gran especificidad, amplio campo de aplicación, y su excelente sensibilidad, rapidez y conveniencia. Estos procedimientos se en-

existen entre los métodos analíticos más selectivos; ya que pueden determinarse y cuantificarse alrededor de 70 elementos (17,18,19).

La espectrofotometría de emisión de flama, es un método espectroscópico que los átomos son elevados a un estado electrónico excitado por medio de colisiones térmicas con los componentes de los gases quemados de una flama. Al regresar a un estado electrónico más bajo, los átomos excitados emiten las radiaciones características para cada elemento. Para separar la línea de radiación seleccionada, se emplea un monocromador o filtro, donde posteriormente el espectro es detectado en un fotodetector, la señal de salida se amplifica y registra (ver Figura 6). La correlación entre la intensidad relativa de la emisión y la concentración del elemento en solución constituye la base para las determinaciones cuantitativas (18,19).

1. Espectro de flama. Los espectros de emisión de partículas pesadas atómicas consisten en estructuras líneas bien definidas producidas por las transiciones electrónicas de los electrones más externos. En el caso de los metales, las líneas de la mayoría de estas transiciones se encuentran en las regiones ultravioleta y visible del espectro. Por ejemplo, el único elect. en estado de "s" di. metálico ocup. a el orbital 3s en estas circunstancias. La excitación de este elect. a orbitales más altos puede conseguirse por el calor de una flama o una chispa arco electrónicos. El tiempo de vida del átomo excitado es breve, y su vuelta al estado fundamental va acompañada de la emisión de un cuanto de radiación. Las líneas verticales en la Figura 7, señalan algunas de las transiciones electrónicas comunes que siguen a la excitación con la flama; también se indica la longitud de onda de la radiación resultante. Las dos líneas a 589.0 y 589.6, son las más intensas bajo las condiciones habituales de excitación y en consecuencia, son las que se emplean por lo general para fines analíticos (17.100).
2. Características de la flama. La principal fuente de incertidumbre en lo espectrofotometría de emisión de flama proviene de las variaciones de las características de la flama y las variables que la modifican, debido a que las muestras son introducidas dentro de la flama como un aerosol, generado normalmente usando un nebulizador neumático conectado al quemador de la flama por una cámara de atomización (Figura 8).
3. Estructura de la flama. Las tres zonas que son observables en una flama premezclada se muestran en la Figura 9. En la zona primaria de combustión, algunas veces llamada como inferior, ocurre la ignición de la mezcla combustible/oxidante. Las reacciones que ocurren en esta zona no están en equilibrio termodinámico debido a la poca significancia de temperatura existente en esta zona, y por tanto, el cono es raramente usado en métodos analíticos.

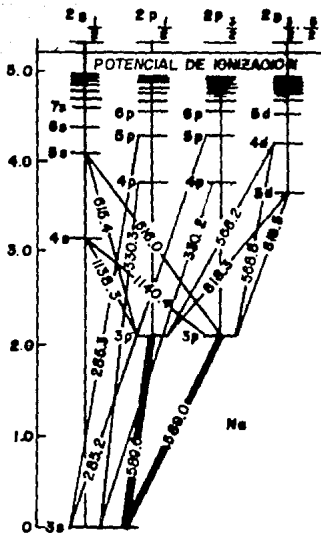
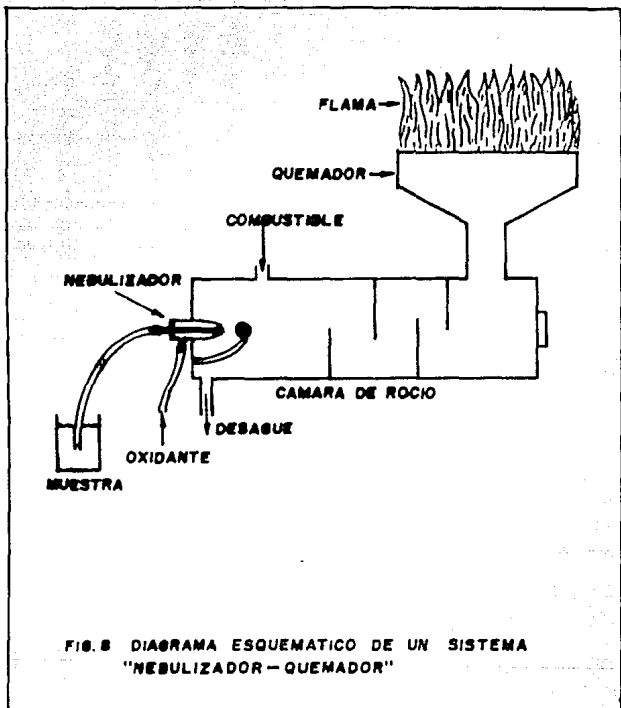


FIG.7. DIAGRAMA GOTRIAN PARA SODIO



La región interzonal o zona interzonal, ubicada inmediatamente arriba de la zona de combustión primaria. Aquí el equilibrio termodinámico en composición y temperatura existe, llegando a alcanzar la flama su máxima temperatura. Debido a esta razón la mayoría de las observaciones analíticas son realizadas aquí.

De tal forma que cuando, la muestra penetra en la base de la flama en forma de pequeñas gotas. En esta región el agua de una inyección de sustancia se evapora; parte de la muestra entra en el cono interior en forma de partículas sólidas. Allí se produce la vaporización y la transformación al estado atómico (Figura 10). también se efectúan los procesos de excitación, absorción y emisión de energía (18,19,20).

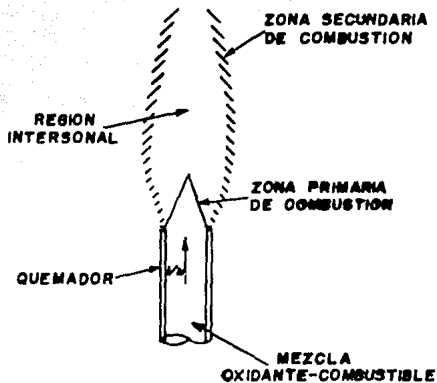
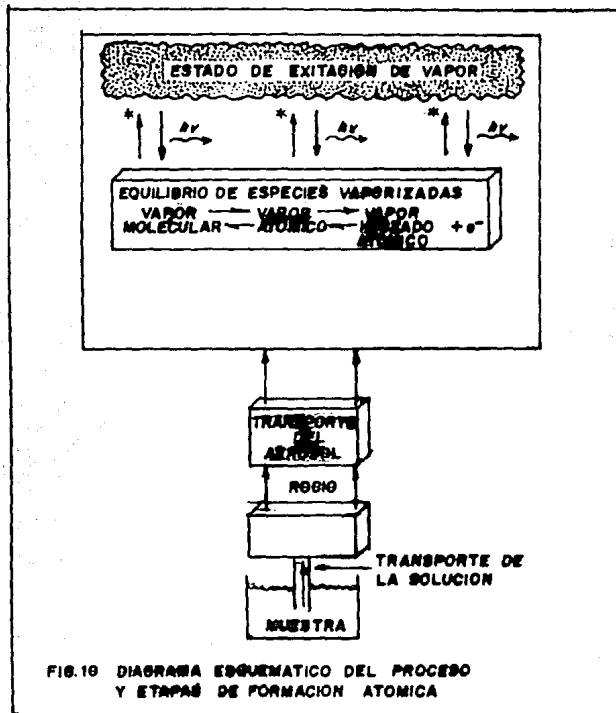


FIG. 9 ESTRUCTURA DE UNA LLAMA
"PREMEZCLADA"



4. Tipos y temperatura de las flamas. Una gran variedad de flamas pueden ser usadas para el analisis de espectroscopia como lo muestra la Tabla 6, aunque dos mezclas son generalmente usadas para los analisis: acetileno y oxido nitroso-acetileno. El cambio del tipo de flama y las condiciones de operacion depende de algunos factores como son: la proporcion en la cantidad de sus componentes, el tipo de analisis y la naturaleza de la muestra. La velocidad de flujo se controla por lo general, por medio de reguladores de presion con doble diafragma seguidos de valvulas de aguja localizadas en el instrumento (18,19).

Tabla 6
Llamas usadas en Emision At6mica

Oxidante	Combustible	Temperatura Maxima (°C)
Aire	Acetileno	2250
Oxido nitroso	Acetileno	2955
Aire	Propano	1725
Aire	Hidrogeno	2045
Aire/arg6n	Hidrogeno	1577
Oxigeno	Gas natural	2740
Oxigeno	Hidrogeno	2677
Oxigeno	Acetileno	3060
Oxigeno/helio	Acetileno	2812
Oxigeno	Cian6geno	4500

C. Validación

La obtención de un buen producto es el resultado de un buen proceso, y ambos pueden ser probados y controlados para garantizar la calidad del mismo. En el laboratorio, los métodos analíticos y procedimientos constituyen el proceso que será controlado para garantizar la calidad en esta etapa (21).

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método (21, 22, 23).

"La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas." La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos (23).

Considerando la variedad de ensayos es lógico que los diferentes métodos analíticos requieran diversos esquemas de validación. Los parámetros a valorar dependiendo de la aplicación del método se muestran a continuación en la Tabla 7 (23).

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

TABLA 7
PARAMETROS A EVALUAR DEPENDIENDO
DE LA APLICACION DEL METODO

PARAMETRO	CONTROL DE CALIDAD	INDICADOR ESTABILIDAD		BIODISPONIBILIDAD	REVALIDACION DE METODO	
		Signos como tratamiento	ANÁLISIS ESPACIALES		Con cambio de cond. / Clase de operación	Con cambio de cond. / diámetros de operación
Localidad y Precisión del Sistema	X	X	X	X	X	X
Límite de detección		X		X		
Límite de cuantificación		X		X		
Exactitud y reproducibilidad al 100%	X	X	X	X	X	X
Linealidad del método	X	X	X	X	X	X
Precisión (Reproducibilidad)	X	X	X	X		X
Especificidad (Control de Calidad)	X	X	X	X	X	X
Especificidad (Estabilidad)		X	X			
Tolerancia del sistema		X	X	X		X
Estabilidad de la muestra		X	X	X		

1. Definiciones (23).

- a. **Linealidad.** La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.
- b. **Exactitud.** La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.
- c. **Precisión.** La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar (DE) o del Coeficiente de Variación (CV).
La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

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

2) **Reproducibilidad.** Es la precisión del método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc).

- d. Límite de detección. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.
- e. Especificidad. Es la habilidad de un método analítico para obtener la respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

2. Determinaciones (23).

- a. Linealidad del sistema. Se determina, construyendo una curva de calibración (concentración contra respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis por duplicado para cada dilución.
El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para control de calidad, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100 %.

Criterio de aceptación:

$$\begin{aligned} CV &\leq 1.5 \% \\ r &\geq 0.99 \\ r^2 &\geq 0.98 \end{aligned}$$

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

Criterio de aceptación:

$$CV \leq 1.5 \%$$

- c. Linealidad del método: Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos a 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo el análisis por triplicado.

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

Criterio de aceptación:

1) Cantidad adicionada contra cantidad recuperada:

$$m \approx 1, b \approx 0, r^2 \geq 0.98$$

2) Los por cientos recuperados y el CV de todo el intervalo de linealidad deben de estar de acuerdo a la Tabla 8.

3) El intervalo de confianza (IC) para la media deberá localizarse dentro del 100 por ciento de recuperado.

Tabla 8

	Promedio de recobro	CV
METODO:		
Cromatográficos	98 - 102 %	± 2%
Titrimétricos	98 - 102 %	± 2%
Químicos y espectro- fotométricos	97 - 103 %	± 3%
Microbiológicos	95 - 105 %	± 5%

- d. Exactitud y repetibilidad al 100% del método. Se determina de, cuando menos, 6 placebo cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. Realizando el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Criterio de aceptación:

- 1) El por ciento recuperado y el CV deberán de estar de acuerdo con la Tabla 8.
 - 2) Por medio de contraste de hipótesis utilizando el estadístico de contraste " t " de student y χ^2 ("Ji" cuadrada) para la exactitud y precisión (repetibilidad) respectivamente.
- e. Precisión (Reproducibilidad). Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas diferentes en diferentes días y por triplicado.

Criterio de aceptación:

- 1) El CV total debe cumplir con los siguientes criterios:

<u>METODO</u>	<u>CV</u>
Cromatográficos	≤ 2 %
Químicos y Espectrofotométricos	≤ 3 %
Microbiológicos	≤ 5 %

2) Si se requiere(n) establecer la(s) fuente(s) de variación del método (lo cual no constituye un requisito mínimo dentro de la variación), se deberá realizar un análisis de varianza (consultar el anexo 1 .

- f. Límite de detección. Se determina adicionando cantidades exactas de una muestra correspondiente a 0, 1, 3, 5, 10, 15 y 20 % de la concentración máxima esperada.

Criterio de aceptación:

Se determina realizando una recta paralela a la recta de regresión a una distancia de $1.96 S_y/x$ con respecto al valor de Y obtenido y dará el intercepto igual al límite de detección.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que las técnicas de análisis para el alginato de sodio descritas (4,5), involucran condiciones de materiales, equipos y tiempos prolongados de análisis que los hacen costosos, complicados e inaccesibles para su realización como métodos de rutina, se pretende desarrollar métodos analíticos de cuantificación que aseguren la calidad del alginato de sodio y que cumplan características, tales como, las de ser: sencillas, rápidas, específicas, reproducibles y de costo accesible que puedan considerarse como caminos alternativos para la cuantificación de alginato de sodio.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar y validar un método alternativo de análisis para alginato de sodio.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- A. Seleccionar el método de análisis que cuantifique de mejor manera al alginato de sodio.
- B. Desarrollar un método de análisis para cuantificación de alginato de sodio a través de una reacción ácido-base.
- C. Desarrollar un método de análisis para cuantificar alginato de sodio por espectroscopía de emisión de flama.
- D. Evaluar la linealidad, precisión, exactitud y reproducibilidad del método seleccionado.

IV. HIPOTESIS

A. El anión carbonato y el catión sodio presentes en las moléculas de alginato de sodio son susceptibles de cuantificación, por medio de una titulación ácido-base al ser transformado completamente a grupos carboxil; mientras que a través de espectrofotometría de emisión de flama puede cuantificarse específicamente el sodio.

B. El método de análisis seleccionado para cuantificación de alginato de sodio es específico, exacto, preciso, lineal y reproducible por lo que podrá utilizarse con seguridad y efectividad en análisis de rutina de control de calidad.

V. MATERIAL Y EQUIPO

A. Material

Vaso de precipitado	pyrex	50, 100, 250 ml
Probeta graduada	pyrex	100 ml
Pipeta volumetrica	pyrex	1, 5, 10 ml
Matraz volumetrico	pyrex	50, 100, 1000 ml
Bureta	pyrex	5, 25 ml
Embudo talle corto	pyrex	5 cm de diametro
Soporte universal	AESA	
Barra de agitacion magnetica		varias dimensiones
Pinzas dobles para bureta	FELISA	
Tela de nylon.		

B. Equipo

Agitador magnetico	Lab-Line
Balanza analitica	Mettler H35AR
Espectrofotometro de absorcion atomica	PYE UNICAM SP192
Estufa	RIOSA
Cronometro	Casio

C. Reactivos

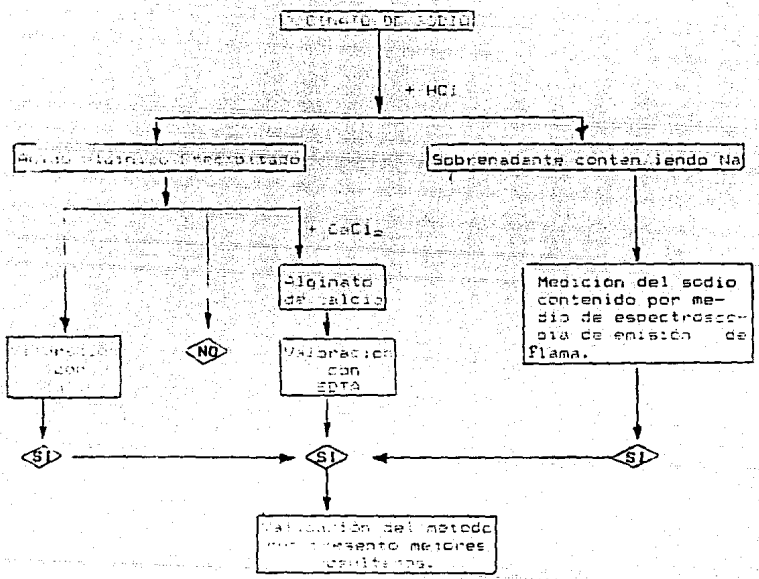
Acido clorhidrico	R.A	J.T. Baker
Acido etilendiamino tetrasodico	R.A	J.T. Baker
Cloruro de calcio	R.A	J.T. Baker
Hidroxido de sodio	R.A	J.T. Baker
Agua desionizada	Tehissier	

D. Sustancia

Alginato de sodio	
-------------------	--

METODOLOGIA GENERAL

DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL



A. Preparación de soluciones.

1. Solución concentrada de la muestra. Se trasladaron 0.2221 gramos de bicarbonato de sodio precedentemente seco a 105°C durante cuatro horas, a un matraz volumétrico de 50 ml, se disolvió y aforó con agua desionizada. Cada ml contenía 1000 µg de sodio.
2. Solución de trabajo de la muestra. La cantidad equivalente de sodio requerida para cada determinación fue tomada de la solución concentrada de la muestra anteriormente preparada y transferida, a un matraz volumétrico de 100 ml y aforado con agua desionizada. Transferir a un vaso deprecipitado de 250 ml la solución resultante, posteriormente se agregó 5 ml de solución 2N de ácido clorhídrico, se mezcló y dejó reaccionar por 20 minutos. Finalmente se filtró a través de una red de nylon.
3. Solución de referencia de sodio. Se transfirieron exactamente 254.2 mg de cloruro de sodio previamente seco a 120°C por dos horas, a un matraz volumétrico de 100 ml, se disolvió y aforó con agua desionizada. Cada ml contenía 1 µg de sodio (Na).
4. Curva de referencia para sodio. Se prepararon una serie de diluciones conteniendo 10, 20, 40, 80 y 160 ppm de sodio, a partir de una solución de referencia de sodio, usando ácido clorhídrico 2N como disolvente.
5. Blanco. A 100 ml de agua desionizada se agregarán 5 ml de solución 2N de ácido clorhídrico, se mezcló y dejó reaccionar por 20 minutos.

B. Procedimiento

1. Se calibró y ajustó el espectrofotómetro de emisión de llama a 589 nm como lo indica el manual de procedimiento.
2. Se tomarán las lecturas correspondientes a cada muestra.

7. Cálculos. Se realizó la curva de calibración, graficando las lecturas promedio obtenidas para las preparaciones de la solución de referencia contra las correspondientes concentraciones.

Se determinó la concentración de la preparación de la muestra problema interpolando el promedio de los valores obtenidos, en la curva de referencia.

C. Validación.

Los parámetros analíticos para la validación del método fueron evaluados de la siguiente manera:

1. Linealidad del sistema. Se realizaron con 5 niveles de concentración por triplicado cada uno, equivalentes a 15, 24, 30, 36 y 45 ppm de sodio respectivamente.
2. Precisión del sistema. Se analizaron 10 muestras correspondientes al 100 % de alginato de sodio igual a 30 ppm de sodio obtenidos de una misma solución patrón.
3. Linealidad del método. Se realizó con 5 niveles de concentración por quintuplicado equivalentes a 15, 24, 30, 36 y 45 ppm de sodio respectivamente en cada muestra.
4. Exactitud del método. Se prepararon 10 muestras individuales al 100% de alginato de sodio equivalentes a 30 ppm de sodio.
5. Precisión del método (Repetibilidad). A través de 10 determinaciones al 100 % de alginato de sodio igual a 30 ppm de sodio, tomadas de una misma solución de trabajo de la muestra, se determinó la precisión del método realizándose el análisis por duplicado.
6. Precisión del método (Reproducibilidad). Tres muestras individuales al 100 % de alginato de sodio fueron preparadas según el método de análisis descrito, en dos diferentes días y por dos diferentes analistas.

7. **Límite de detección.** Se elaboraron muestras por duplicado con concentración final de 1, 3, 5, 7, 9 y 10 ppr de sodio según sus cantidades equivalentes en alquitrato de sodio, determinándose a cada una su intensidad de emisión a 589 nm.

VII. RESULTADOS

A. Métodos propuestos

La Tabla 1, muestra los por ciento de alginato de sodio obtenidos a partir de un método de neutralización (reacción ácido-base) entre el hidróxido de sodio y el ácido algínico obtenido a partir de muestras de alginato de sodio, en condiciones diferentes de reacción, así como también, el por ciento recuperado de la transformación del alginato de sodio a alginato de calcio determinando por un método de valoración indirecta con EDTA. Los métodos son descritos en el Anexo 2.

Tabla 1

Por ciento recobro obtenido de muestras de Alginato de sodio.

M E T O D O	Alginato de Sodio recuperado %
1 A	41.0
1 B	41.0
1 C	101.0
1 D	71.0
2	127.16

La Tabla 2, muestra los promedio de los por ciento recuperados de alginato de sodio obtenidos en 6 diferentes corridas utilizando el espectroscopio de emisión de llama (método 3).

Tabla 2
Por ciento recuperados de
Alginato de sodio

Concentración	Alginato de Sodio %
100 % de Alginato de sodio equiva - lentes a 30 ppm de sodio.	97.33
	99.44
	99.63
	100.43
	100.03
	103.00

B. Validación del método propuesto.

1. Linealidad del sistema.

Curva de calibración del alginato de sodio*
contra lectura de emisión a 589 nm.

Concentración de Na ppm	Lectura de emisión (intensidad relativa)			Procedio del % recuperado
15	0.257	0.257	0.258	15.04
24	0.346	0.346	0.347	24.08
30	0.408	0.406	0.408	30.11
36	0.457	0.456	0.460	36.14
45	0.553	0.569	0.560	45.09

* Concentración equivalente en ppm de sodio.

El 100 % de la muestra de alginato de sodio corresponde a 30 ppm de sodio.

$$b = 0.0022$$

$$m = 1.0021$$

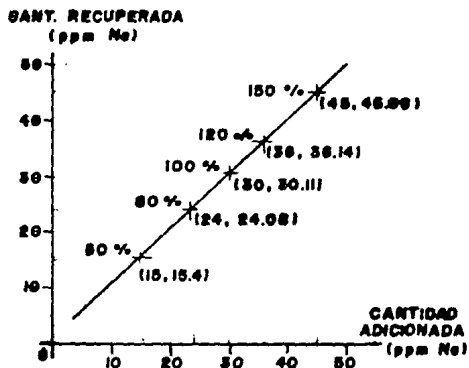
$$r = 0.9999$$

$$r^2 = 0.9999$$

$$CV = 0.3513 \%$$

Ya que $r > 0.99$, $r^2 > 0.98$ y $CV < 1.5 \%$, se cumple con los criterios para la linealidad del sistema.

GRAFICA 1
LINEALIDAD DEL SISTEMA



2. Precisión del sistema

Lecturas de emisión correspondientes
a 30 ppm de sodio*.

Concentración de Sodio ppm	Lecturas de emisión (Intensidad relativa)
30	0.356
30	0.357
30	0.351
30	0.355
30	0.355
30	0.357
30	0.358
30	0.359
30	0.359
30	0.359

* equivalente al 100% de alginato de sodio en la muestra.

$$CV = 0.7019 \%$$

Ya que $CV > 1.5$ se cumple con el criterio para la
precisión del sistema.

3. Linealidad del método

Cantidad adicionada - Cantidad recuperada
de alginato de sodio*.

Cantidad adicionada ppm Na	Cantidad recuperada ppm	% recuperado
15	14.41	96.06
24	24.14	100.59
30	29.93	99.77
36	35.34	98.16
45	45.35	100.77

* en ppm de sodio equivalentes al 50, 80, 100, 120 y 150% de alginato de sodio respectivamente.

$$m = 1.0178$$

$$b = -0.7004$$

$$r = 0.9994$$

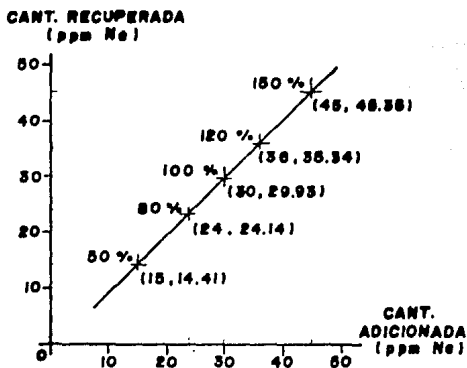
$$r^2 = 0.9984$$

$$CV = 2.0009 \%$$

$$IC = 98.3867\% \text{ a } 100.0256\%$$

Ya que $b \approx 0$, $m \approx 1$, $r > 0.99$ y $r^2 > 0.98$ y el CV menor al 3% y dentro del intervalo de confianza se localiza el 100% de recuperado; se cumple con los criterios de aceptación para la linealidad del método.

GRAFICA 2
LINEALIDAD DEL METODO



4. Exactitud del método.

Cantidad recuperada de alquitrán de sodio
en %

101.1, 101.76, 100.43, 98.43, 100.43

101.1, 98.43, 101.1, 101.1, 101.76

- En muestras teóricas del 100% de alquitrán de sodio equivalentes a 30 ppm de sodio.

a. Por coeficiente de variación:

$$CV = 1.2021 \%$$

Ya que el $CV > 2 \%$, se cumple con el criterio de exactitud para el método.

b. Por el estadígrafo de contraste t student

$$H_0 : \bar{x} = 100 \%$$

$$H_a : \bar{x} \neq 100 \%$$

$$t_{calculada} = 1.375$$

$$t_{tablas} = 2.501$$

Como t calculada menor a t de tablas nuestra hipótesis nula se acepta, obteniendo que la media teórica es igual a la media obtenida del 100%.

6. Precisión (Repetibilidad) del método:

Cantidad recuperada de alginato de sodio
en %

97.81	97.87	99.9	93.65	97.26
99.33	99.83	99.2	100.54	99.9

- En muestras teóricas del 100% de alginato de sodio equivalentes a 30 ppm de sodio.

7. Por coeficiente de variación :

$$CV = 0.9334 \%$$

Ya que el CV < 2% se cumple con el criterio de aceptación para la repetibilidad del método por estadígrafo de contraste

$$H_0 : DE \leq 2 \%$$

$$H_a : DE > 2 \%$$

donde:

DE = Desviación estándar obtenida

2% = Desviación estándar poblacional

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 1.9347$$

$$\chi^2_{\text{tablas}} = 10.92$$

Como el calculada menor a χ^2_{tablas} de tablas se acepta la hipótesis nula, por lo que se considera que la desviación estándar aritmética es igual a la desviación estándar poblacional del 2 %

c. Precisión (Reproducibilidad) del método:

Por cientos recuperados de alginato de sodio

DÍA	ANALISTAS	
	1	2
1	100.73	99.95
	100.50	104.59
	99.95	102.73
2	99.96	101.5
	100.73	99.95
	100.73	102.23

a. Por coeficiente de variación:

$$CV = 1.3419 \%$$

Como $CV < 2 \%$, se cumple con el criterio de precisión (reproducibilidad) para método espectrofotométrico.

b. Por análisis de varianza:

La siguiente tabla de Análisis de Varianza presenta los valores para la evaluación de la reproducibilidad del método de análisis del alginato de sodio presentado, en base a los valores de F de Fisher con una probabilidad acumulada del 0.975. Los valores son obtenidos de acuerdo a como lo muestra el Anexo I.

ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	" F " de calculo	" F " de tablas
Analista	1	0.639408	0.639408	0.022306	5.32
Día	1	2.7744	2.7744	0.09678	5.32
Analista-Día	1	0.261066	0.261066	1.1075×10^{-2}	5.32
Error	8	229.3193	28.664912	-----	----

a. Evaluación del efecto entre analistas

H_0 = No hay diferencia en el por ciento de recobro obtenido entre analistas.

H_a = Existe diferencia en el por ciento de recobro obtenido entre los analistas.

Regla de decisión :

Si F calculada $<$ F de tablas no se rechaza H_0 y por tanto no existe diferencia en los por ciento de recobro obtenidos por cada analista. Sin embargo si F calculada $>$ F de tablas, se rechaza H_0 y por tanto existe diferencia en los por ciento de recobro obtenidos por los analistas.

Debido a que $0.022306 < 5.32$, no se rechaza H_0 y se considera que no existe diferencia significativa en los por ciento de recobro obtenidos por los analistas.

b. Evaluación del efecto entre los días en que se realizó la determinación:

H_0 = No hay diferencia en el por ciento de recobro obtenido en los diferentes días.

H_a = Si hay diferencia en el por ciento de recobro obtenido en los diferentes días.

Regla de decisión :

Si, F calculada $>$ F tablas, no existe diferencia en los por cientos de recobro obtenidos entre el primero y segundo día en que se realizó las determinaciones, pero si, F calculada $>$ F tablas, existe efecto en los por ciento de recobro obtenidos entre el primero y segundo día en que se realizaron las determinaciones.

Como se obtuvo $0.096787 < 5.32$, no se rechaza H_0 , por lo que se considera que no existe efecto por parte del día en el que se realizaron los análisis.

c. Evaluación del efecto entre Analistas y Días en que fue realizado el análisis

H_0 : No hay diferencia en los por ciento de recobro obtenidos por los analistas en días diferentes.

H_a : Existe diferencia en los por ciento de recobro obtenidos por los analistas en diferentes días

Regla de decisión:

Si F calculada $>$ F tablas no existe diferencia significativa por los por ciento de recobro obtenidos por los analistas en diferentes; por lo contrario si F calculada $>$ F tablas existe diferencia significativa en los por ciento de recobro obtenidos.

Como se obtuvo $1.1075 < 10 > 5.32$ no se rechaza H_0 por lo que se considera que no existe efecto por parte del día ni por parte de los analistas que realizaron el análisis.

El límite de detección: Se determina a través del trazo de una recta de concentración de alginato de sodio en ppm de sodio contra la emisión obtenida a una longitud de 589 nm sin hacer referencia a una Curva de referencia para sodio.

- a. Curva de obtenida a partir de la concentración de alginato de sodio contra lecturas de emisión a 589 nm

Concentración de sodio ppm	Lecturas de emisión (Intensidad relativa)
1	0.040
3	0.079
5	0.120
7	0.151
9	0.174
10	0.191

$$m = 0.0165$$

$$b = 0.0293$$

$$r = 0.9951$$

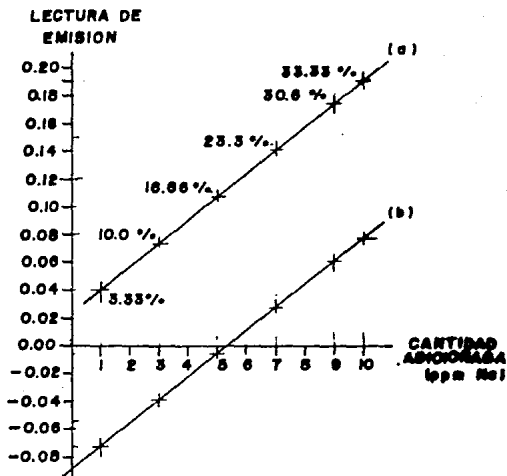
$$DE = 0.0579$$

b. Recta paralela a la recta de regresión obtenida de la curva anterior, a una distancia de " -1.96 s DE " con respecto a los valores de " Y " obtenidos.

Concentración de sodio ppm	Lecturas de emisión (Intensidad relativa)
1	- 0.0734
3	- 0.0344
5	- 0.0065
7	0.0175
9	0.0605
10	0.0775

$$\begin{aligned}
 m &= 0.165 \\
 b &= -0.0840 \\
 r &= 0.9951 \\
 DE &= 0.0579
 \end{aligned}$$

GRAFICA 3
LIMITE DE DETECCION



III. EL ANALISIS DE RESULTADOS

Por la facilidad de obtener métodos de análisis alternativos para el alginato, los cuales resultarían ser sencillos, económicos y rápidos, tres métodos fueron desarrollados. Dos métodos volumétricos (reacción ácido-base y complejador con EDTA), los cuales sirven para medir las características inicialmente descritas y presentar en algunos casos un porcentaje de recobro de alginato de sodio según especificaciones de farmacopea (5), como lo muestra la tabla I de los resultados, ninguno fue seleccionado para determinar la efectividad mediante una validación del método. Luego, el producto de hidrólisis del alginato es un gel que a fin de determinar el punto final de las valoraciones (ácido-base y complejadoras), variándolos con lo tanto poco reproducibles. Posteriormente se desarrolló un tercer método tomando como base que en las moléculas de alginato el ion que se encuentra unido (sódico) es susceptible de emitir una radiación a cierta longitud de onda, el cual finalmente resultó ser el método más confiable debido a la alta especificidad que muestra la técnica de espectrofotometría de emisión de flama, donde la detección del sodio extruido de la molécula del alginato, se cuantificó a una longitud de onda de 589 nm.

Para determinar la confiabilidad del método de análisis propuesto se realizó el mismo, primeramente a través de la estimación de la linealidad y precisión del sistema, el cual, en nuestro caso lo representaba las lecturas de emisión de sodio obtenidas en el espectrofotómetro de absorción atómica.

Se dice que un sistema de medición y/o método de análisis es lineal si su representación gráfica se aproxima a una línea recta, un coeficiente de correlación se aproxima a uno, la pendiente a cero y sus coeficientes de variación se encuentran menores al 1.5 % y 0.2 % para el sistema y método respectivamente.

Al obtener las Gráficas 1 y 2 de los resultados y conservando las condiciones establecidas a continuación se considera que tanto el sistema de medición como el método desarrollado son lineales según los criterios de aplicación descritos en la literatura (23).

Parámetro determinado	Linealidad del sistema	Linealidad del método
b	0.0282	- 0.7090
m	1.0021	1.0001
r	0.9999	0.9992
CV	0.3543%	2.0001%

Precisión del sistema. Un sistema de medición es preciso cuando tiene un coeficiente de variación menor al 1.5%; y dado este criterio el sistema de medición fue preciso, ya que se obtuvo un coeficiente de variación de 0.7019 %.

Precisión (repatibilidad) del método. De acuerdo a los resultados obtenidos, donde la \bar{X} calculada, usado como estadígrafo de contraste fue de 1.9347 para el método de análisis, siendo menor a una \bar{X} de tablas de 19.02, se infiere que la hipótesis nula ($H_0 = 2\%$) planteada cumple con el criterio de aceptación del mismo, de modo que cumple con el coeficiente de variación obtenido de 0.5924 % siendo menor al de 2 % establecido en la literatura, con lo que se deduce que el método de análisis es preciso, en las condiciones realizadas.

Exactitud del método. De acuerdo a los resultados obtenidos a través de la "t" de student usado como estadígrafo de contraste para evaluar la exactitud del método de análisis para el alginato de sodio. La hipótesis nula ($H_0 : \bar{X} = 100\%$) se acepta, ya que el valor obtenido para la "t" calculada es de 1.475, siendo este valor menor al reportado para la "t" de tablas, que es de 2.228, así mismo el coeficiente de variación obtenido de 0.5184 % es menor al 1 % tomado como criterio de aceptación; por lo tanto el método es exacto.

Reproducibilidad del método. Realizada para la cuantificación para alginato de sodio, por dos diferentes analistas, en dos días diferentes, fue evaluado mediante el análisis de varianzas de los datos por factores cruzados, a través de los cuales se observó que no existe efecto entre uno y otro analista, que realice el análisis ni entre los días en que sea realizado el mismo, ya que siempre las "F" calculadas fueron menores a las "F" de tabla, como se muestra en los resultados.

límite de detección. El límite se través de la representación de una línea parábola a la obtenida en una curva de concentración de sodio en la flama, tras de su emisión obtenidas. Se puede observar según la gráfica 7 de los resultados, que el límite de detección según el método de análisis es hasta de 1 ppm de sodio.

Especificidad y selectividad del método. La estructura química del Alquisito de sodio en la cual el sodio presente, tiene la propiedad de emitir una radiación característica en una flama, fue tomada como base para el método desarrollado, en el cual, después de obtener el sodio en solución y utilizar la técnica de espectroscopia de emisión de flama a 589 nm se determina la presencia del sodio en las muestras.

IX CONCLUSION

El método desarrollado para Alginato de sodio utilizando la técnica de espectrofotometría emisión de flama presenta características de ser rápido, accesible, además de ser específico, lineal, preciso, exacto y reproducible entre analistas y días para la cuantificación de Alginato, infiriéndose que el método propuesto queda validado en las condiciones en que fue desarrollado.

Por lo que se propone que este método sea considerado un método analítico de rutina para control de calidad, alternativo a los que propone la farmacopea nacional y norteamericana.

X SUGERENCIA

En cuanto al método volumétrico reacción ácido-base se sugiere sea retomado y probada la valoración a través de la detección del punto final por medio de una técnica potenciométrica, de tal forma que dicho punto final en la determinación sea más preciso y reproducible.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. " The Merck Index ", tenth edition, Published by Merck Co. Inc., Rahway, New York, U.S.A. (1983) pag.
2. " Handbook of Pharmaceutical Excipients ". American Pharmaceutical Association Production Staff and The Pharmaceutical Society of Great Britain Production Staff, 257-258 (1986).
3. J. Bravo, C.Rios, M.Altagracia "Análisis del contenido de aminoácidos de algas cafés y sus desechos sólidos por CLAR ". Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 21 (1), 24 - 27 (1990).
4. " The United States Pharmacopeia XXII ", Revisión oficial from 1990, 1501, 1502, 1978
5. " Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos ", 5ª. edición, Secretaría de Salud, Mexico, 871 - 1743 (1983).
6. Achwall, W.E. " Quality control of textile-process chemicals. I. Evaluation of polyvinyl alcohol and sodium alginate ". Journal of the Textile Association, 3, 31 - 34 (1981).
7. Horanaga Takashi " Studies in the formation of polyion complexes by means of colloid titration method " Mikrochimica Acta, II (5 - 6), 421 -431 (1979).
8. Pechanek, Udo. " Electrophoretic method for qualitative and quantitative analysis of gelling and thickening agents ", Journal Association Official Analytical Chemists, 65 (3), 745 - 752 (1982).
9. Kennedy, J.F.et.al., " The rapid quantitative determination of alginates by poly(hexamethylene biguanidinium chloride) complexation in industrial extracted from brown seaweed ", Carbohydrate Polymer 7 (1) 33 - 50 (1987), and Carbohydrate Research, 156, 76 -85 (1986).

10. Toyoda N. et al., " High- Performance liquid chromatographic method for determination of sodium alginate in foods ", Shokunin Eisei (Tokyo, Japan) 10 (1985) : 189 - 194 (1985).
11. Frouss, Anel, et al., " Quantitative analysis of natural thickeners and gums by methanolysis and capillary column gas chromatography ", Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung (1975) 60 : 92 - 100 (1980).
12. King, Alan H. " Brown seaweed extracts (alginates) ". Food Hydrocolloids, 7, 115 - 188 (1986).
13. " Gums ". Encyclopedia of Chemical Technology. Third edition, Board of John Wiley & Sons (U.S.A.) (1980).
14. Balaz, J. T. " Seaweed in pharmaceutical studies and applications ". Hydrobiologia 116/117, 29 - 40 (1983).
15. Haug G. Larsen B. and Smidsrud O., Acta Chem. Scand (20) 182 - 193 (1966).
16. Pees, D.A., " Structure, conformation, and mechanism in the formation of polycarbohydrate gels and networks ". in Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, Vol. 24.
17. Mercillo Rubio J., Orza Segade., " Espectroscopia " 7a. reimpresion. Alhambra Columbia S.A., España 1 - 19. 148 - 164 (1985).
18. Skoog A. Douglas, Donald M. West " Análisis Instrumental " 2a. edición, Nueva editorial Interamericana, Mexico, 352 - 353 (1987).
19. Christian D. Gary, O Reilly E.J. " Instrumental Analysis " second edition. Gilyn & Bacon Inc., U.S.A. 278 - 294 (1975).
20. James D. Ingle Jr, Stanley R. Drouch " Spectrochemical Analysis " Division of Simon & Schuster, New Jersey, U.S.A 225 - 226 (1988).
21. Cuello, Johnny. " Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories ". Pharmaceutical Technology, 10 (5) 1986.

22. Taylor J. "Validation of Analytical Methods", Analytical Chemistry, 53 (14) 1981,60.
23. "Métodos Analíticos, Validación".Eq. Comité de Elaboración de Series Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud. Secretaría de Salud. 1991.

ANEXO I

PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)

En este anexo se describe una prueba estadística adicional para la prueba de precisión específicamente en la reproducibilidad.

Cuando se evalúe el efecto del analista sobre el método en diferentes días, se está observando el comportamiento del método en dos factores fundamentales.

Un método es reproducible en cuanto a los factores que se analizan y no en otros.

Para el caso particular del análisis de dos analistas en dos días diferentes y con tres repeticiones cada uno, se realizó el análisis de varianza que se describe a continuación.

El modelo hipotético que representa este caso es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + D_j + A_i + AD_{ij} + E_{kij}$$

donde:

Y_{ijk} = El ensayo de la sustancia de interés de la i -ésima muestra analizada por el j -ésimo analista en el k -ésimo día.

μ = Media poblacional del ensayo de la sustancia de interés en la muestra.

A_i = Efecto del analista en el ensayo (donde $i = 1 \dots a$)

D_j = Efecto del día en el ensayo (donde $j = 1 \dots d$)

AD_{ij} = Efecto de la interacción analista-día

E_{kij} = Error del método analítico (donde $k = 1 \dots r$)

a = número de analistas (donde $a = 2$)

d = número de días (donde $d = 2$)

de r repeticiones (donde r = 2)

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Medio de cuadrados	" F " de calculo	" F " de tablas
Analista	a - 1	F ₁	SC _A /g _{1a}	MC _A /MC _E	F _{g_{1a}/g_{1e}}
Día	d - 1	F ₂	SC _D /g _{1d}	MC _D /MC _E	F _{g_{1d}/g_{1e}}
Analista Día	(a-1)(d-1)	F ₃	SC _{AD} /g _{1ad}	MC _{AD} /MC _{AD}	-----
Error	(r-1)(ad)	F ₄	SC _E /g _{1e}	-----	-----

$$F_1 = \frac{\sum Y_{1j}^2}{a} - \frac{\sum Y_{...}^2}{n}$$

$$F_2 = \frac{\sum Y_{...}^2}{ad} - \frac{\sum Y_{...}^2}{n}$$

$$F_3 = \frac{\sum Y_{1j}^2}{ad} - \frac{\sum Y_{...}^2}{n}$$

$$F_4 = \frac{\sum Y_{...}^2}{n} - \frac{\sum Y_{...}^2}{n}$$

ANEXO III

METODO 1

- A. 100 mg de muestras de alginato de sodio se disolvieron en 10 ml de agua destilada con buena agitación hasta obtener una solución clara. 0.5 ml de ácido clorhídrico 2.0 N fueron adicionados, dejando reaccionar la muestra durante 20 minutos con agitación ocasional, dentro de un baño de hielo. Filtrándose posteriormente a través de una malla número 60, y el ácido alcinico precipitado fue lavado con agua destilada, hasta que estuvo libre de ácido (prueba con nitrato de cobalto). El precipitado fue transferido a un vaso de precipitado de 50 ml y 15 ml de agua destilada le fueron adicionados, titulando finalmente con una solución de hidróxido de sodio 0.17 N, usando dos gotas de fenoftaleína como indicador. El punto final se obtuvo hasta tener una disolución completa del precipitado y el viraje de color obtenido fue estable de 3 a 4 minutos.
- E. 200 mg de muestras de alginato de sodio se disolvieron en 10 ml de agua destilada con buena agitación hasta obtener una solución clara. 5 ml de ácido clorhídrico 0.5 N fueron adicionados, dejando reaccionar la muestra durante 20 minutos con agitación ocasional, dentro de un baño de hielo. Filtrándose posteriormente a través de una malla número 60, y el ácido alcinico precipitado fue lavado con agua destilada hasta que se obtuvo libre de ácido (prueba con nitrato de cobalto). El precipitado fue transferido a un vaso de precipitado de 50 ml y 15 ml de agua destilada le fueron adicionados, titulando finalmente con una solución de hidróxido de sodio 0.17 N, usando dos gotas de fenoftaleína como indicador. El punto final se obtuvo hasta tener una disolución completa del precipitado y el viraje de color obtenido fue estable de 3 a 4 minutos.

7. Muestras de 2 grs. de aluminato de sodio se disolvieron en 100 ml de agua destilada con buena agitación hasta obtener una solución clara. 5 ml de una solución de ácido clorhídrico 0.1 N fueron adicionados para acidificar la solución durante 15 minutos con agitacion vigorosa y dentro de un baño de hielo. Filtrandose obtentivamente a través de una malla número --, y el ácido clorhídrico precipitado fue lavado con 75 ml de agua destilada, el precipitado fue transferido a un vaso de precipitado de 500 ml. 15 ml de agua destilada le fueron adicionados, titulando finalmente con una solución de hidróxido de sodio 0.2 N, usando dos gotas de fenofaleia como indicador. El punto final se obtuvo hasta tener una disolución completa del precipitado y el tinte de color obtenido fue estable de 3 a 4 minutos.

8. Muestras de 2 grs. de aluminato de sodio, fueron disueltas en 200 ml de agua destilada con buena agitación hasta obtener una solución clara. 100 ml de una solución de cloruro de calcio fueron adicionados bajo agitación y dejados reaccionar por 15 minutos hasta completar la precipitación. Se filtró a través de de una tela de nylon, fue lavado de 2 a 3 veces con agua destilada, se transfirió el precipitado a un vaso y le fueron adicionados 10 ml de una solución de ácido clorhídrico 0.1 N, dejados reaccionar 20 minutos. El ácido clorhídrico precipitado fue lavado hasta que estuvo libre de color (prueba con clorato de amonio) y después hasta que estuvo libre de ácido (prueba con rojo de metilo). El precipitado se transfirió a un vaso de precipitado de 500 ml y 100 ml de agua destilada le fueron adicionados; finalmente se titulaban con hidróxido de sodio 0.2 N, usando 2 gotas de fenofaleia como indicador. El punto final se obtuvo hasta tener una disolución completa del precipitado, el tinte de color obtenido fue estable de 3 a 4 minutos.

El por ciento de Alginato de sodio obtenido para todos los métodos anteriores fueron calculados a partir de la relación siguiente:

$$\% \text{ Alginato de sodio} = 22.0 \times V \times N / W$$

donde:

N = Normalidad del Hidroxido de sodio usado.

V = Volumen de Hidroxido de sodio gastados en la titulación.

W = Peso de Alginato de sodio usado en el análisis.

M E T O D O 2

Muestras de 200 mg de alginato de sodio se disolvieron en 10 ml de agua desionizada con buena agitación hasta obtener una solución clara, 5 ml de ácido clorhídrico 0.3 N fueron adicionados, dejando reaccionar la mezcla durante 20 minutos con agitación ocasional. Filtrandose posteriormente a través de una tela de nylon, el ácido alginico precipitado fue lavado hasta que estuvo libre de ácido (prueba con rojo de metilo). 10 ml de solución de cloruro de calcio fueron adicionados bajo agitación y dejados reaccionar por 15 minutos hasta completar la precipitación. Se filtro a través de una tela de nylon y fueron lavados de dos a tres veces con agua desionizada. El filtrado obtenido se transfirió a un vaso de precipitado y 10 ml de una solución de EDTA 0.1 M le fueron adicionados, 100 mg de indicador negro de eriocromo fueron adicionados y el calcio en exceso fue valorado con solución de EDTA 0.1M. hasta el viraje del indicador.

El por ciento de alginato de calcio obtenido fue calculado bajo la relación siguiente:

$$\% \text{ Alginato de sodio} = \frac{(V \times M) \times (P \text{ eq}) \times (100)}{\text{mg de muestra}}$$

donde:

V = Volumen total de EDTA gastados

M = Molaridad de EDTA

P eq = Peso equivalente de sodio

ANEXO I I I

FORMULAS PARA LA EVALUACION ESTADISTICA
DE LA VALIDACION DEL
METODO DESARROLLADO

1. Media

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad n = \text{número de repeticiones}$$

2. Desviación estándar

$$DE = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

3. Coeficiente de variación

$$CV = \frac{DE}{\bar{x}} \cdot 100$$

4. Coeficiente de correlación

$$r = \left[\frac{n (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)}{n (\sum x^2) - (\sum x)^2 \quad n (\sum y^2) - (\sum y)^2} \right]^2$$

5. Coeficiente de determinación

$$r^2 = \left[\frac{n (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)}{n (\sum x^2) - (\sum x)^2 \quad n (\sum y^2) - (\sum y)^2} \right]^2$$

6. Pendiente

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

7. Ordenada al origen

$$b = \frac{y - m (\Sigma x)}{n}$$

8. Por ciento recuperado

$$R = (y + x) 100$$

9. La prueba "t" de Student (Exactitud)

$$t = \frac{\bar{x} - 100}{DE / \sqrt{n}}$$

10. La prueba "χ²" Ji cuadrada (Precisión)

$$\chi^2 = \frac{(n - 1) (DE)^2}{2^2}$$