



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO EN MICROESCALA
PARA CUANTIFICACION DEL CITRATO DE OXOLAMINA.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
OCTAVIO ORTEGA LÓPEZ

M. en C. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD.
DIRECTOR

M. en C. ELIZABETH GUADALUPE SÁNCHEZ GONZÁLEZ
ASESOR





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.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	4
2.1 Desarrollo de un método analítico en microescala.....	4
2.1.1 Antecedentes.....	4
2.1.2 Ventajas de la química en microescala.....	6
2.1.3 Desventajas de la química en microescala.....	7
2.2 Citrato de Oxolamina.....	8
2.2.1 Historia y categoría terapéutica.....	8
2.2.2 Propiedades.....	8
2.2.3 Farmacocinética.....	9
2.2.4 Farmacodinamia.....	9
2.3 Validación de Métodos Analíticos.....	10
2.3.1 Definición de Validación.....	11
2.3.2 Beneficios de la Validación.....	11
2.3.3 Procedimientos analíticos a ser validados.....	11
2.3.4 Parámetros de evaluación en validación.....	12
2.3.6 Validación del sistema.....	13
2.3.6.1 Precisión del Sistema.....	13
2.3.6.2 Linealidad del sistema.....	13
2.3.7 Validación del Método.....	14
2.3.7.1 Especificidad.....	14
2.3.7.2 Contenido de producto en pruebas de estabilidad.....	15
2.3.7.3 Contenido o límite de impurezas.....	16
2.3.7.4 Exactitud y repetibilidad.....	16
2.3.7.5 Linealidad del Método.....	17
2.3.7.6 Precisión intermedia.....	18
2.3.7.7 Estabilidad analítica de la muestra.....	19
2.3.7.8 Tolerancia.....	20
2.3.7.9 Estudios de Robustez.....	21
2.3.8 Comparación de dos métodos analíticos.....	21
2.3.8.1 Especificidad.....	21
2.3.8.2 Repetibilidad en exactitud.....	22
2.3.8.3 Repetibilidad en linealidad.....	22
2.3.8.4 Exactitud.....	22
2.3.8.5 Linealidad del método.....	23
2.3.8.6 Precisión del método.....	23
2.3.8.7 Estudios de correlación.....	24
2.3.8.8 Proporcionalidad.....	24
2.3.8.9 Precisión.....	25
2.4 Métodos volumétricos de análisis.....	26
2.4.1 Clasificación de las titulaciones.....	27
2.4.1.1 Por tipo de reacción química.....	27
2.4.1.2 Por la forma de realizar la titulación.....	27
2.4.1.3 Por la cantidad de analito adicionado.....	29
2.4.1.4 Titulación en ácido acético.....	30
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31

4. OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo general.....	32
4.2 Objetivos Particulares.....	32
5. HIPÓTESIS	33
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
6.1 Reactivos, Material y Equipo.....	34
7. MÉTODO	36
7.1 Diagrama de Flujo.....	36
7.2 Metodología.....	39
7.2.1 Revisión Bibliográfica.....	39
7.2.2 Verificación de existencia de la materia prima y reactivos.....	39
7.2.3 Asignación del proyecto.....	39
7.2.4 Validación del método farmacopéico.....	39
7.2.4.1 Exactitud del Método.....	39
7.2.4.2 Linealidad del Método.....	40
7.2.4.3 Precisión del método.....	40
(Repetibilidad y precisión intermedia del método).....	40
7.2.4.4 Robustez del método.....	40
7.2.5 Escalamiento del método a 50, 25 y 10 %.....	41
7.2.5.1 Determinación de precisión en 50%.....	41
7.2.5.2 Determinación de exactitud en 50%.....	41
7.2.5.3 Determinación de precisión en 25%.....	41
7.2.5.4 Determinación de exactitud en 25%.....	42
7.2.5.5 Determinación de precisión en 10%.....	42
7.2.5.6 Determinación de exactitud en 10%.....	42
7.2.6 Determinación estadística de la técnica en microescala.....	42
7.2.7 Validación del método en microescala en 10%.....	43
7.2.7.1 Linealidad del método.....	43
7.2.7.2 Exactitud del método.....	43
7.2.7.3 Precisión del método.....	43
7.2.7.4 Robustez del método.....	44
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS	45
8.1 Identificación de materia prima.....	45
8.2 Resultados del escalamiento de la técnica farmacopéica.....	45
8.3 Resultados de linealidad del método al 100%.....	48
8.4 Resultados de linealidad al 10%.....	49
8.5 Resultados de exactitud del método al 10% y al 100%.....	50
8.6 Precisión del método.....	51
8.6.1 Repetibilidad al 100% y 10%.....	51
8.6.2 Precisión intermedia del método al 10% y al 100%.....	52
8.7 Robustez del método.....	53
8.8 Comparación de costos en los métodos.....	55
8.9 Comparación de generación de desechos en el medio ambiente.....	56
9. CONCLUSIONES	58
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	59

1. INTRODUCCIÓN.

Desde el advenimiento del desarrollo y validación para procesos de manufactura de diversas formas farmacéuticas, han surgido diferentes métodos y técnicas de cuantificación, como es el caso de la valoración de principio activo de diferentes medicamentos.

El presente proyecto se encamina al desarrollo y validación de un método analítico en microescala, que permita cuantificar Citrato de Oxolamina por medio de su valoración, determinando parámetros como: la linealidad, precisión, exactitud, repetibilidad y robustez, tanto del método oficial (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Séptima edición) como del método desarrollado de acuerdo a lo señalado en la International Conference on Harmonization, Validation on Analytical Procedures.

La microquímica preexiste sobre las mismas bases teóricas de la química inorgánica, el microanálisis es la parte más importante de aquella. La química en microescala es el término que se utiliza para designar sus tratados sobre las manipulaciones químicas efectuadas con pequeñas cantidades de sustancia.

Actualmente Benedetti-Pichlere, define a la química en microescala como el conocimiento sistemático del desarrollo, ejecución y correlación de los métodos requeridos para manipular, observar y determinar propiedades de cantidades de materia sustancialmente inferiores a las empleadas en la práctica química usual, lo que constituye sin duda una reciente modalidad de la química analítica.¹

El enfoque de la Química en microescala en la actualidad se hace vital en un mundo cada día mas contaminado, donde es necesario formar una conciencia del impacto que la actividad propia de las prácticas químicas generan en el ambiente; ya que los residuos de productos, han erosionando gravemente la ecología. Otra finalidad de la implementación de la química en microescala es buscar el aumento de interés en el alumno y un notable

desarrollo del sentido crítico en economizar reactivos en sus prácticas fomentando el concepto de Química Verde.

Dentro de las ventajas que se generan en la optimización de los recursos en los métodos analíticos están, el mejoramiento en la calidad del aire ya que se disminuirá la cantidad de vapores desprendidos por los solventes, al mismo tiempo los riesgos con la salud del analista al inhalar estos que en su mayoría son tóxicos, irritantes, alergénicos, o cancerígenos.

Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que, tanto académicos y alumnos, han puesto en tela de juicio a la Química en microescala, ya que es común escuchar lo difícil que es llegar a realizar experimentos con estas técnicas porque se puede presentar un alta incertidumbre en los resultados.

En el presente trabajo se desarrolló y validó el método analítico farmacopeico para la cuantificación de Citrato de Oxolamina, donde a través de la evaluación estadística de los resultados obtenidos en el laboratorio, es posible asegurar que los resultados obtenidos con el método en microescala son tan validos como los generados en técnicas convencionales.

RESUMEN

Desde hace varias décadas existe una tendencia generalizada hacia la realización de experimentos en escala cada vez menor, lo que además de representar un ahorro efectivo en materiales, y por tanto en costos, significa una reducción en los problemas de contaminación ambiental, de higiene y seguridad.

En el presente trabajo se desarrollo y valido el método analítico farmacopéico para la cuantificación de Citrato de Oxolamina en la modalidad de microescala , evaluando la linealidad, precisión, exactitud, repetibilidad y robustez, de ambos métodos de acuerdo a lo señalado en la International Conference on Harmonization, Validation on analytical Procedures. Los datos obtenidos fueron analizados por técnicas estadísticas adecuadas para comprobar que se cumpliera con los criterios de aceptación para cada parámetro de la validación.

La técnica analítica farmacopéica se escalo a 10% logrando trasladar el método convencional a un método en microescala, ambos métodos validados son lineales, exactos, reproducibles y repetibles en el rango de 90 a 110% y el ahorro económico de recursos en sustancias es del 90%, al igual que la reducción en la generación de desechos.

El presente trabajo se realizo en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la Facultad de Estudios superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México, apoyado con recursos del proyecto PAPIME EN215403, "Implementación de técnicas analíticas en microescala en la enseñanza experimental de la química en los laboratorios de docencia de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza."

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

2.1 Desarrollo de un método analítico en microescala.

2.1.1 Antecedentes.

Actualmente en la Industria Farmacéutica, es primordial el control de la calidad tanto de la materia prima como del producto terminado, asegurando que los métodos y los procedimientos mediante los cuales son analizados cumplan con los requerimientos mínimos necesarios para su aplicación.

Dado que la mayoría de los métodos reconocidos consisten en una serie de pasos, y que cada paso podría producir errores, solo se conseguirán resultados correctos si el analista se apega cuidadosamente a procedimientos bien establecidos. Los análisis químicos requieren de una gran destreza manual, una paciencia extrema y una aplicación sistemática de los principios de la cuantificación.

Conviene insistir sobre el hecho de que una de las características peculiares de las técnicas microquímicas, no presentan dificultades manipulativas extraordinarias, ya que cualquiera que este dotado de una formación analítica aceptable, adiestrándose por tiempo en la resolución de problemas experimentales, logrará adquirir el criterio necesario para poder traducir en microescala cualquier macroprocedimiento, sin más que un poco de ingenio y alguna paciencia para diseñar una técnica manipulativa y de observación que permita, manteniendo invariables las concentraciones del método ordinario, seguir los cambios químicos en el seno del pequeño problema.

Dentro de las perspectivas actuales, en cuanto al porvenir inmediato de esta ciencia hace concebir las mejores esperanzas, la brillantez de los resultados obtenidos en el análisis, empleando métodos que durante años han utilizados grandes cantidades de reactivo, se pone de manifiesto el gran vacío que existe en el tratamiento de temas de Química en microescala, ya que los adelantos tecnológicos han dado mas importancia al control de calidad y los fabricantes empezaron a buscar métodos de análisis más rápidos y simples dando como resultado una revolución instrumental y hoy probablemente, se hacen más análisis basados en mediciones físicas que en reacciones químicas.

Dentro de la década de los noventa y hasta nuestros días la mayoría de los análisis químicos de rutina se llevan a cabo mediante instrumentos automatizados o semiautomáticos, indudablemente la mayoría de los instrumentos se basa en la medición de fenómenos físicos ejemplo: Emisión de rayos X o de otras radiaciones electromagnéticas. Sean cuales sean los medios utilizados para obtener información de todos los métodos posibles de análisis para un proyecto dado, la etapa final consiste siempre en la evaluación de los procedimientos².

La microquímica; el análisis microquímico son ejemplo de ciencia nacida por la agudización de las necesidades de los métodos que la preexisten, encuentra su origen con la publicación del primer número de la revista Microquímica en 1923, recibiendo su respaldo como ciencia, reposando sobre las mismas bases teóricas puesto que de química no añade nada, residiendo su originalidad en sus técnicas y, por tanto en su instrumental de trabajo de una finura acomodada a los nuevos requerimientos.

Es característica peculiar de la ciencia actual la tendencia hacia lo pequeño, desde la escala ordinaria hasta el ultra microanálisis más refinado; el descenso de las cantidades de material manejado va desde los gramos hasta los microgramos, que si en algunos casos esta condicionada por las dimensiones mismas del objeto que se estudia o de la muestra disponible, han llegado a plantear una necesidad de la que ha surgido el nacimiento de las microtécnicas, que lejos de ser refinamientos inoperantes, obedecen a un estímulo. Este estímulo movió, en el terreno de análisis inorgánico a Federico Emich (1860-1940) quien es el auténtico padre de la Microquímica.

En la Universidad de Graz Austria, puso a prueba su valor brillante en el momento crítico de los trabajos que condujeron a la utilización de la energía atómica, cuando hubo que realizar el estudio de toda la química y la tecnología de un nuevo elemento absolutamente desconocido, el Plutonio; con una cantidad que no alcanzaba el medio miligramo, es cierto que hubo que resolver múltiples problemas y afinar hasta el máximo las manipulaciones, pero toda la sistemática y las técnicas necesarias existían ya, constituyendo una auténtica ciencia.¹

La microquímica es más que análisis de pequeñas muestras, es nada más y nada menos que toda la química orgánica e inorgánica, análisis y síntesis experimentada en escala substancialmente inferior a la ordinaria y sirve para desplazar, en forma insospechada, el límite de eficiencia de aquella,

dotando al profesional de medios que le permiten resolver problemas inabordables con auxilio de técnicas clásicas; algunos la utilizaron para investigar, pero aún la mayoría la utiliza en los laboratorios de enseñanza garantizando el éxito de tal innovación. Las revistas de los últimos diez años contienen numerosos artículos en que se refieren las excelencias pedagógicas de la enseñanza de la química analítica en microescala economía en reactivos, tiempo y material, dada la menor fragilidad de los microutensilios y su reducido costo, aumento de interés y notable desarrollo del sentido crítico en el alumno, son las conclusiones mas destacables de estos ensayos¹.

Las ventajas y las posibilidades de la Química en microescala en México han sido presentadas por muchas personas en diversos foros y publicaciones. En la década actual ha surgido un movimiento en todo el país para emplear la Química en microescala en los laboratorios de los diferentes niveles educativos, esto coincide con la generación de una conciencia ambiental que lleva a cuestionar los métodos tradicionales de vivir y hacer las cosas a favor de posibilidades mas acordes con una conciencia ambiental y de racionalidad en la utilización de recursos naturales.²

Un paso que es necesario para impulsar más el empleo de estas técnicas consiste en proporcionar una cultura de observación y de medición en cuanto a las cantidades de desechos generados, a la reducción de costos en el uso de reactivos, reducción de tiempos de reacción, la ruptura comparativa de material de vidrio, etc. Por otra parte su utilización debe ser paralela a un desarrollo de habilidades, actitudes y de valores a fin de que la ganancia tanto en la industria como en el modelo educativo en sus diferentes niveles, sea completa dando respuesta a los problemas.

2.1.2 Ventajas de la química en microescala.

- ⊕ Reducción en el uso de productos químicos y por tanto reducción de residuos en su origen.
- ⊕ Reducción en los costos tanto de compra de productos como de recogida y reciclado.
- ⊕ Aumento considerable de la seguridad e higiene en el laboratorio
- ⊕ Mejora en la calidad del aire del laboratorio.
- ⊕ Menor exposición a productos químicos tóxicos.
- ⊕ Menor peligro de fuego y explosiones.
- ⊕ Menor número de accidentes por derramamientos de productos químicos.
- ⊕ Reducción en la duración del experimento:
- ⊕ Aumento en el repertorio de experimentos.

- ⊕ Reducción del gasto de agua en el refrigerado y reducción de gas o electricidad en el calentamiento.
- ⊕ Menor coste en vidrio roto.
- ⊕ Mayor espacio de almacenamiento.
- ⊕ Ahorro de tiempo en la preparación de reactivos.
- ⊕ Política medioambiental que promueve el principio de las 3 rs:
- ⊕ Reducir, recuperar y reciclar.
- ⊕ Mayor motivación a los estudiantes ya que están convencidos de que:
- ⊕ Operan del modo más racional posible.
- ⊕ Están haciendo "química verde".
- ⊕ Existe poco riesgo de sufrir accidentes serios durante la experimentación.
- ⊕ Mejor preparación de los estudiantes:
- ⊕ Adquisición de destreza en el manejo de materiales y productos.
- ⊕ Les hace ser más cuidadosos en todas las operaciones.
- ⊕ Desarrollan habilidades que no adquirirían operando a escala normal.
- ⊕ Ganan tiempo que dedican al análisis e interpretación de resultados.
- ⊕ El profesional con este tipo de formación se halla mentalmente preparado para abordar el reto del desarrollo de nuevos procesos químicos, más limpios y a la medida de las necesidades del momento, que la sociedad está demandando.³

2.1.3 Desventajas de la microescala.

La necesidad de adquisición de material de vidrio especial y de equipos de medición más precisos, así como de reactivos químicamente puros.

Incremento en el riesgo de contaminación del producto y obtención de menores rendimientos, debido a pérdidas mecánicas por causa de impurezas.

Dificultad en la observación de ciertos fenómenos como pérdida o ganancia de energía. En estos casos la microescala se auxilia en técnicas de vanguardia como la Cromatografía de alta resolución (en líquidos y gases) o el análisis térmico diferencial, etc.

La imposibilidad de aplicar óptimamente algunas técnicas, como una destilación fraccionada.⁴

2.2 Citrato de Oxolamina.

2.2.1 Historia y categoría terapéutica.

Con objeto de crear fármacos que pudieran deprimir el centro de la tos y aliviar la misma sin presentar efectos adversos de los alcaloides del opio (principalmente dependencias), se han obtenido por síntesis una serie de fármacos no adictivos de distinta estructura química, no se ha determinado una estructura común responsable de la acción antitusigénica algunos de los grupos mas importantes son:

- ⊕ Derivados del morfinano corresponde el Dextrometorfano, derivado de los
- ⊕ alcaloides del opio como la codeína.
- ⊕ Difenilpropanoles, derivados de fenilaminobutanol, esencialmente el Clofedimenol de estructura similar a Clofedianol.
- ⊕ Feniloxidiazoles, corresponde esencialmente a la Oxolamina.⁵

El Citrato de Oxolamina es uno de los derivados sintéticos de 3,5 disustituido 1,2,4- oxadiazol, fue sintetizado en 1961 por Angelini Francesco obtenida mediante la condensación de derivados de amidoximas a partir de aminas secundarias, en la actualidad este fármaco es utilizado para el tratamiento de la tos como mucolítico expectorante y antitusivo.⁶

2.2.2 Propiedades.

- ⊕ Nombre Químico: Citrato de 3-fenil-5-(β-dietilaminoetil)-1, 2,4-oxadiazol.

Fórmula Desarrollada:

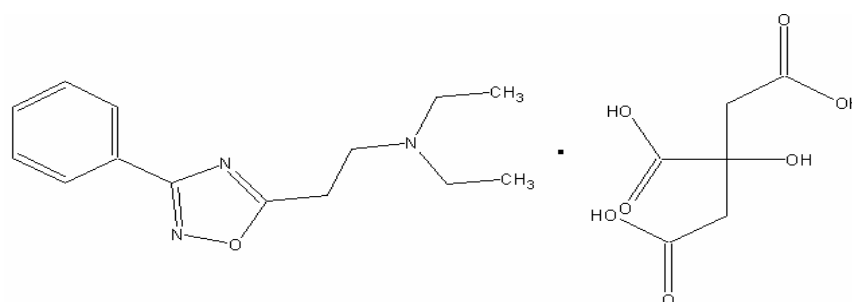


Figura 1. Citrato de Oxolamina.

Fórmula Condensada: $C_{14}H_{19}N_3 O$ O. $C_6H_8O_7$

Peso Molecular: 437.45 g/mol.

Descripción: Polvo cristalino blanco.

Solubilidad: Es muy soluble en agua, fácilmente soluble en alcohol poco soluble en éter etílico e insoluble en cloroformo.

Punto de fusión: 140-143°C

pH: En solución al 1% (p/v), en agua es de 3.6 a 3.9

Pureza: No menos del 98%

Espectroscopia Ultravioleta: En solución acuosa presenta una longitud de onda de 239nm.

Indicaciones Terapéuticas: Antitusígeno (Inhibición de la inflamación en el tracto respiratorio).⁷

Presentaciones Comerciales: Bredon, Jarabe por laboratorio Organon. Oxhatos, Jarabe por laboratorio Medix.⁸

2.2.3 Farmacocinética.

Después de su administración oral la Oxolamina es totalmente absorbida, para después de ser metabolizada unirse a proteínas. Es distribuida a varios tejidos como hígado, cerebro, riñones, corazón y pulmones. En el hombre, el tracto respiratorio en particular parece ser el único influenciado por el fármaco, que después de su acción terapéutica es excretado por la orina no más de un tres por ciento de lo administrado.

2.2.4 Farmacodinamia.

La Oxolamina inhibe la inflamación, esto puede ser de utilidad en alteraciones inflamatorias del tracto respiratorio, en el cual el fenómeno exudativo y el incremento de las secreciones bronquiales tiene un papel importante. La Oxolamina de propiedades analgésicas y antiinflamatorias es activa inhibiendo la tos de origen periférico, causada por inhalación de irritantes. También se ha demostrado que tiene efecto en la de origen central, consecuentemente el efecto antitusivo de la Oxolamina depende principalmente del mecanismo periférico el cual está cercanamente relacionado con su acción antiespasmódica.

En otras palabras, alivia la tos al reducir el exudado inflamatorio y mejora la irritación local de las terminales nerviosas locales en la mucosa respiratoria. En las contraindicaciones éste fármaco no debe ser administrado a niños menores de tres meses de edad, durante el embarazo y lactancia.

Se presentan alucinaciones visuales en niños cuando es excedida la dosis recomendada, la ligera acción anestésica local puede producir disminución pasajera de la sensibilidad de la mucosa oral, náusea y mareo.^{9, 10}

2.3 Validación de Métodos Analíticos.

Debido al gran incremento de nuevos productos farmacéuticos y alimenticios, y a la gran competitividad comercial, se requiere que el producto que salga a la venta sea de calidad es por ello que el laboratorio de Control de Calidad debe garantizar la calidad del producto y para ello se requiere de un laboratorio en óptimas condiciones de funcionamiento tanto en equipo como de instrumentos.¹¹

Una parte complementaria del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para demostrar la efectividad, mediante análisis estadístico de acuerdo a parámetros a evaluar y es la medición del sistema analítico total, en otras palabras es la medición del efecto de los instrumentos, solventes, reactivos, analista y todos los demás elementos que son utilizados durante el ensayo para probar su funcionalidad en las aplicaciones analíticas deseadas.

Es muy importante la acción de validar, puesto que toda acción que se repite dos o más veces, está sujeta al fenómeno de variación, siendo que es muy difícil que en una misma acción se obtengan resultados iguales ya que estará sujeta a un gran número de factores que provocan que se den diferencias en las condiciones de la primera vez.

Más que la simple medición de un proceso, la validación implica que se tenga seguridad de que el método, instrumentos, disolventes, reactivos y todo lo demás utilizado durante el análisis es adecuado para el compuesto a analizar.¹²

2.3.1 Definición de Validación.

La validación es la evidencia documentada que provee un alto grado de aseguramiento de que un proceso específico o equipo, producirán de manera consistente un producto de calidad determinada.

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso mediante el cual se demuestra por estudios de laboratorio la capacidad de que el método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. También como la actividad documentada que permite demostrar que un método analítico cumple con su objetivo.

2.3. 2 Beneficios de Validación.

Los beneficios obtenidos al realizar la validación son diversos entre los cuales se encuentran: la optimización de recursos en el método, cumplimiento con la regulación sanitaria, contar con el procedimiento normalizado de operación para el aseguramiento del control de calidad, y en lo económico (reducción de costos en el proceso ya que al estar validado se asegura una mejor calidad productiva).

2.3.3 Procedimientos analíticos a ser validados.

La discusión de la validación de procedimientos analíticos esta dirigida a los cuatro tipos mas comunes de procedimientos analíticos.

- ⊕ Pruebas de identificación.
- ⊕ Pruebas cuantitativas para contenido de impurezas.
- ⊕ Pruebas límite para el control de impurezas.
- ⊕ Pruebas cuantitativas del activo en muestras de sustancia o de producto terminado, o de otros componentes seleccionados en el producto.

Las pruebas de identificación están destinadas a asegurar la presencia de un analito en una muestra mediante la comparación de una propiedad de la muestra del producto a granel o de los ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos terminados mediante análisis como reactividad química, espectro, cromatografía, etc.

El análisis de impurezas puede ser, una prueba cuantitativa o una prueba de límite de impurezas en productos a granel o compuestos de degradación en el producto terminado. Pretendiendo reflejar con exactitud las características de pureza de la muestra.

En los métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño la valoración representa una medición cuantitativa del o los componentes de una sustancia, mientras que para la determinación de un producto terminado se aplican las mismas características de validación, pudiendo aplicar a las valoraciones asociadas con otros procedimientos analíticos como una disolución.^{13,14}

2.3.4 Parámetros de evaluación en validación.

El plan prueba para la validación se establece en función de estudios de laboratorio. Para varios parámetros de desempeño, que dependen de la aplicación analítica deseada. En la tabla I se muestran los parámetros de desempeño que se deben evaluar en función de la aplicación analítica deseada.

Tabla I. Parámetros de desempeño en la validación de métodos analíticos ¹⁵

PARAMETRO DE DESEMPEÑO	CONTENIDO/POTENCIA / VALORACIÓN	CONTENIDO /VALORACIÓN	LÍMITE	IDENTIFICACIÓN
PRECISIÓN/ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.	SI	SI	SI	*
LINEALIDAD DEL SISTEMA.	SI	S	NO	NO
ESPECIFICIDAD.	SI	SI	SI	SI
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD.	SI	SI	NO	NO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SI	SI	NO	NO
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA.	SI	SI	NO	NO
ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA	*	*	NO	NO
LÍMITE DE DETECCIÓN	NO	NO	SI	NO
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO	SI	NO	NO
TOLERANCIA	*	*	*	NO
ROBUSTEZ	*	*	*	NO

*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

1. La falta de especificidad de un método analítico puede ser compensado por otra alternativa analítica soporte como cromatografía en Capa Fina (CCF).
2. También es definido como un estudio de tolerancia.
3. Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico a los otros componentes de la muestra.¹⁶

2.3.5 Validación del Sistema.

2.3.5.1 Precisión del Sistema.

⊕ Metodología.

Determinar la respuesta de 6 soluciones al 100% del estándar obtenida por dilución o pesada independientes de lo indicado en el método analítico.

⊕ Información, reporte y cálculos.

Reportar la señal analítica y calcular el coeficiente de variación.

⊕ Criterios de aceptación.

El Coeficiente de variación (CV) no debe exceder el 2% para métodos analíticos. Valores superiores pueden presentarse en métodos de contenido de impurezas o en métodos que utilicen un sistema biológico de medición, pero estos deben ser justificados.

2.3.5.2 Linealidad del sistema.

⊕ Metodología.

Para contenido: Preparar cinco niveles de concentración, el nivel de concentración central debe ser la solución de concentración del estándar como lo indica el método, lo que usualmente es el 100% y se deben preparar los niveles de concentración adicionales superiores e inferiores al 100%, por ejemplo 90, 95, 100, 105 y 110%.

Cada nivel de concentración debe prepararse al menos al doble, ya sea por dilución de una solución estándar concentrada o por pesadas separadas. El intervalo de linealidad debe incluir la especificación de contenido del producto. Para métodos de contenido de materias primas y producto terminado, se pueden evaluar rangos de concentración del $100 \pm 25\%$. Otros esquemas se pueden justificar como es el caso para los métodos de contenido para producto en estabilidad, producto intermedio o de control de proceso.

Para métodos de contenido de impurezas, se evalúan rangos que pueden ir desde el límite de cuantificación hasta el nivel de impureza del producto al 120% de la especificación fijada para la impureza.

⊕ Formación de reporte y cálculos.

Reportar la relación señal analítica vs. Concentración. Calcular el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de correlación y el coeficiente de variación para la señal analítica vs. Concentración.

⊕ Criterios de aceptación.

El coeficiente de determinación debe ser no menor a 0.98.

El intervalo de confianza al 95% para la pendiente no debe incluir el valor de cero.

El coeficiente de variación de regresión no debe exceder al 2%.

Valores menores del coeficiente de determinación deben ser justificados. Valores superiores al criterio de aceptación del coeficiente de variación se pueden presentar en métodos de contenido de impurezas o en métodos que utilicen un sistema biológico de medición y estos deben ser justificados.

2.3.6 Validación del Método.

2.3.6.1 Especificidad.

Para contenido de materias primas, producto intermedio control de proceso y producto terminado.

⊕ Metodología.

Analizar como lo indica el método, muestras individuales del producto sin analito, sustancias relacionadas, de precursores, de homólogos y una mezcla de producto con sustancias relacionadas y/o precursores y homólogos.

⊕ Información de reporte.

Mostrar el registro de la señal analítica (cromatograma, espectro, etc.) dependiendo del caso.

⊕ Criterio de aceptación.

La señal analítica de las sustancias relacionadas y/o precursores y homólogos no deben inferir en la señal del analito.

2.3.6.2 Contenido de producto en pruebas de estabilidad.

⊕ Metodología.

Si los productos de degradación reportados se pueden adquirir en el mercado; proceda a analizar como lo indica el método, muestras individuales del producto y de los productos de degradación, así como la mezcla de ambos.

Si no se tiene información de ambos productos de degradación o estos no se pueden adquirir en el mercado, someta a las siguientes condiciones de estrés al producto: Luz, temperatura, oxígeno, álcali, entre otras proceda a analizar las muestras de estrés y de producto, como lo indica el método.

⊕ Información de reporte.

Mostrar el registro de la señal analítica (cromatograma, espectro, etc.).

Mostrar el registro de la señal analítica (cromatograma, espectro, etc.) y reportar el contenido del producto.

⊕ Criterio de aceptación.

Para el primer caso, la señal analítica de los productos de degradación, no debe interferir con la señal del analito.

Para el segundo caso siempre y cuando se presente degradación, la señal analítica de los productos de degradación, no debe interferir con la señal del analito y el contenido debe disminuir significativamente.

2.3.6.3 Contenido o límite de impurezas.

⊕ Metodología.

Analizar muestras individuales de impurezas (orgánicas, inorgánicas o solventes residuales) y del producto de pureza elevada, como lo indica el método, así como la mezcla de estos.

⊕ Información del reporte.

Mostrar el registro de la señal analítica (cromatograma, espectro, etc.).

⊕ Criterio de aceptación.

La señal analítica del producto, no debe inferir con la señal de impureza y esta debe ser consistente.

2.3.6.4 Exactitud y Repetibilidad.

⊕ Metodología.

Recuperar el analito en el producto al nivel 100% de la especificación, utilizando el método analítico. Para métodos de contenido se pueden evaluar rangos de concentración del 100+- 20%. Otros esquemas se pueden justificar como es el caso de los métodos de contenido para productos en estabilidad, producto intermedio; control de proceso.

Para métodos de contenido de impurezas se evalúan rangos que pueden ir desde el límite de cuantificación hasta el límite de impureza en el producto hasta el 120% de la especificación fijada para la impureza.

⊕ Información de reporte y cálculos.

Reporte el recobro de cada muestra.

Para el recobro reportar el promedio aritmético, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza del recobro.

✚ Criterios de aceptación.

El intervalo de confianza de recobro debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:

98-102% si el método es cromatográfico.

98-102% si el método es volumétrico.

97-103% si el método es químico o espectrofotométrico.

95-105% si el método es microbiológico.

El Coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro:

No debe ser mayor al 2% si el método es cromatográfico.

No debe ser mayor al 2% si el método es volumétrico.

No debe ser mayor a 3% si el método es químico o espectrofotométrico.

No debe ser mayor a 4% si el método es microbiológico.

No debe ser mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Para el caso de contenido de impurezas o en método que utilice un sistema biológico de medición, se puede justificar valores superiores. Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

2.3.6.5 Linealidad del Método.

✚ Metodología.

Recuperar el analito en el producto, por lo menos a tres niveles de concentración, incluyendo la especificación, utilizando el método analítico y realizando el análisis de por lo menos tres veces a cada nivel de concentración.

Para métodos de contenido se puede evaluar rangos de concentración del $100\% \pm 20\%$. Otros esquemas se pueden justificar como es el caso de métodos de contenido para productos de estabilidad, producto intermedio o control de procesos.

Para métodos de contenido de impurezas, se evalúan rangos que pueden ir desde el límite de cuantificación o del nivel de la impureza en el producto al 120% de la especificación fijada para la impureza.

✚ Información para el reporte y cálculos.

Reportar la relación cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada (como %) de cada muestra.

Para la relación cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada calcular la pendiente, ordenada al origen, desviación estándar, coeficiente de determinación, intervalo de confianza para la pendiente, intervalo de confianza para la ordenada al origen y el coeficiente de variación de regresión.

✚ Criterios de aceptación.

El coeficiente de determinación de la cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada debe ser mínimo 0.98. Valores menores de coeficiente de determinación deben ser justificados.

El intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad.

El intervalo de confianza para la ordenada al origen debe incluir el cero.

El coeficiente de variación de regresión:

No debe ser mayor al 2% si el método es cromatográfico o volumétrico.

No debe ser mayor a 3% si es químico o espectrofotométrico

No debe ser mayor al 5% si es microbiológico.

No mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

2.3.6.6 Precisión Intermedia.

✚ Metodología.

Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual a 100% (en caso de contenido), o una muestra homogénea cuyo contenido está incluido en el rango lineal de exactitud (para el caso de impurezas), en dos días diferentes y por dos analistas diferentes aplicando el método analítico.

✚ Información de reporte y cálculos.

Reportar el contenido de cada muestra y calcular el promedio aritmético, desviación estándar y el coeficiente de variación (CV).

✚ Criterios de Aceptación.

CV<2% para métodos cromatográficos o volumétricos.

CV<3% para métodos químicos o espectrofotométricos.

CV<5% para métodos microbiológicos.

2.3.6.7 Estabilidad Analítica de la Muestra.

⊕ Metodología

El analista debe establecer la etapa del análisis en la cual se desea evaluar la estabilidad, además de determinar si en dicha etapa es posible fraccionar (muestra dependiente) o no (muestras independientes) y las condiciones de almacenaje.

Para determinar la estabilidad analítica para muestras dependientes, el analista debe procesar hasta la etapa preestablecida por lo menos por triplicado una muestra homogénea. Fraccionar cada una de las preparaciones de acuerdo con las condiciones de almacenaje de interés.

Terminar el análisis de una de las fracciones de cada preparación (contenido, potencia, valoración inicial). Proseguir el análisis de cada una de las fracciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una solución de referencia recientemente preparada. Si el método contempla el uso de una solución de referencia reportar el contenido, potencia y valoración de cada fracción.

Para determinar la estabilidad analítica para muestras independientes a partir de una muestra homogénea, el analista debe analizar por triplicado (contenido, potencia, valoración inicial).

Simultáneamente y de la misma muestra procesar el mismo número de muestras necesarias para cada condición de almacenaje hasta la etapa preestablecida (preparaciones) al menos por triplicado, proseguir al análisis de cada una de las preparaciones, al último de cada condición de almacenaje, utilizando una solución de referencia recién preparada, si el método contempla el uso de una solución de referencia. Reportar el contenido/ potencia/ valoración de cada preparación.

⊕ Información de reporte y cálculos.

Calcular la media aritmética del análisis inicial (\bar{x}) y de cada condición de almacenaje (y_i) Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial (d_i).

⊕ Criterios de aceptación.

$|d_i| \leq 2\%$ para métodos cromatográficos y volumétricos.

$|d_i| \leq 3\%$ para métodos químicos y espectrofotométricos

$|d_i| \leq 5\%$ para métodos microbiológicos.

No mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra. Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

2.3.6.8 Tolerancia.

⊕ Metodología.

Se deben establecer aquellos factores ajenos al método como diferentes equipos, diferentes lotes de reactivos, diferente material y/o diferente analista. Al analizar por triplicado la muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual a 100% (en caso de contenido) o una muestra homogénea cuyo contenido este incluido en el rango lineal de exactitud (para el caso de impurezas) aplicando el método analítico a las condiciones de tolerancia definidas. Otros esquemas deben ser justificados.

⊕ Información de reporte y cálculos.

Calcular la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación total (CV) de contenido/potencia/valoración.

⊕ Criterio de aceptación.

$CV < 2\%$ para métodos cromatográficos y volumétricos.

$CV < 3\%$ para métodos químicos y espectrofotométricos.

$CV < 5\%$ para métodos microbiológicos.

No mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito de la muestra. Cualquier otro criterio de aceptación debe ser justificado.

Para el caso de contenido de impurezas se pueden justificar valores superiores.

2.3.6.9 Estudios de Robustez.

⊕ Metodología.

Se deben establecer aquellos factores instrumentales o al menos dos condiciones de operación con cambios menores en el método analítico.

Analizar una muestra homogénea del producto que tenga nivel cercano o igual al 100% (para contenido) o una muestra homogénea cuyo contenido sea cuantitativo (contenido de impureza), por triplicado a las diferentes condiciones de operación de análisis, además de la condición normal de operación. Reportar el contenido/potencia/valoración del analito para las muestras de condición normal de operación y para las muestras de otras condiciones de operación expresadas como %.

⊕ Información de reporte y cálculos.

Calcular la media aritmética de la condición normal de operación y de cada condición de operación diferente a la condición normal. Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal.

⊕ Criterios de Aceptación.

$|di| < 2\%$ para los métodos cromatográficos y volumétricos.

$|di| < 3\%$ para los métodos químicos y espectrofotométricos.

$|di| < 5\%$ para los métodos microbiológicos.

No mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

2.3.7 Comparación de dos Métodos Analíticos.

2.3.7.1 Especificidad.

Este parámetro se debe cumplir para cada método analítico ya sea demostrando su especificidad o exactitud.

2.3.7.2 Repetibilidad en Exactitud.

⊕ Metodología.

De los datos de exactitud y repetibilidad utilizar la información del porcentaje de recobro.

⊕ Información de reporte y cálculos.

Calcular la varianza (S) del por ciento de recobro de cada método.

⊕ Criterio de aceptación.

El intervalo de confianza para la razón de varianzas debe incluir el valor de

2.3.7.3 Repetibilidad en linealidad.

⊕ Metodología

Los datos de linealidad del método utilizar la información de % de recobro.

⊕ Información y reporte de cálculos.

Calcular la varianza del % de recobro de cada método.

⊕ Criterios de aceptación.

El intervalo de confianza para la razón de varianza debe incluir el valor de

2.3.7.4 Exactitud.

⊕ Metodología.

De los datos de exactitud y repetibilidad utilizar la información de por ciento de recobro.

⊕ Información de reporte y cálculos.

Calcular la media aritmética y la varianza del por ciento de recobro de cada método.

⊕ Criterio de aceptación.

El intervalo de confianza para la diferencia de las dos medias poblacionales del por ciento de recobro debe incluir el cero.

2.3.7.5 Linealidad del método.

⊕ Metodología.

De los datos de linealidad del método utilizar la información de la cantidad adicionada y la cantidad recuperada para cada método, así como el porcentaje de recobro.

⊕ Información de reporte y cálculos.

Para cada método calcular la pendiente y la ordenada al origen de la relación cantidad adicionada menos la cantidad recuperada, así como la media aritmética y varianza del por ciento de recobro.

⊕ Criterio de aceptación.

El intervalo de confianza para la diferencia de las pendientes de la cantidad adicionada menos la cantidad recuperada se debe incluir el valor de cero.

El intervalo de confianza para la diferencia de las ordenadas al origen de la cantidad adicionada menos la cantidad recuperada debe incluir el valor de cero.

El intervalo de confianza para la diferencia de las dos medias poblacionales del por ciento de recobro, debe de incluir el valor de cero.

2.3.7.6 Precisión del Método.

⊕ Metodología.

De los datos de precisión del método, utilizar la valoración del analito de cada método.

⊕ Información y reporte de cálculos.

Calcular las varianzas.

⊕ Criterios de aceptación.

El intervalo de confianza para la razón de varianzas debe incluir el valor de

2.3.7.7 Estudios de Correlación.

⊕ Estos estudios se aplican a métodos de contenido, los parámetros a evaluar a este tipo de estudio son: la proporcionalidad y la precisión.

2.3.7.8 Proporcionalidad.

Estos estudios no necesariamente establecen equivalencia de resultados sino proporcionalidad ya que en muchas ocasiones la respuesta analítica es diferente.

⊕ Metodología.

Caso 1.

Se conocen los componentes de la muestra y es posible preparar un placebo analítico. El analista debe preparar una cantidad suficiente del placebo analítico con el tipo de componentes que comúnmente están presentes en la muestra, de tal manera que pueda ser analizado por ambos métodos en tres diferentes niveles de análisis que incluya la especificación.

Del placebo analítico preparado, tomar una cantidad suficiente para adicionar el analito al nivel inferior. Fraccionar en tres muestras y analizar cada muestra de ambos métodos bajo las condiciones analíticas de cada método.

Caso 2.

El analista debe seleccionar por lo menos nueve muestras del producto cuyo nivel de analito cumple con la especificación.

El analista debe fijar una etapa de los métodos analíticos en los cuales se transfiera una mayor o menor cantidad con el objeto de variar la cantidad del analito, como puede ser al pesar la muestra, al transferir el volumen de una alícuota, al efectuar una dilución entre otros casos.

Es conveniente que 3 muestras presenten un nivel bajo del analito, tres correspondan al nivel especificado y tres a un nivel superior al del analito.

Las nueve muestras deben estar identificadas y analizadas por ambos métodos bajo las condiciones analíticas de cada método.

⊕ Información y reporte de cálculos.

Reportar la relación contenido/ valoración/ potencia del método a comparar (y) menos método de referencia (x). Calcular el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación, el intervalo de confianza para la pendiente y el coeficiente de variación de regresión.

⊕ Criterio de aceptación.

El Intervalo de Confianza (IC) no debe de incluir el cero.

2.3.7.9 Precisión

Es deseable que el método no oficial tenga una precisión igual o mejor que el método oficial o que su precisión sea aceptable para su aplicación analítica deseada.

⊕ Metodología.

Por lo menos dos analistas en por lo menos dos días deben analizar por triplicado muestras independientes (pesadas o alícuotas) de un lote homogéneo del producto, cuyo nivel del analito este cercano a especificación tanto con el método de referencia como con el método a comparar.

⊕ Información de reporte y cálculos.

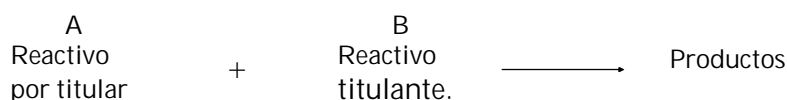
Reportar el contenido de analito de todas las muestras en % para ambos métodos.

⊕ Criterios de aceptación.

El intervalo de confianza unilateral inferior para la razón de varianzas del método a comparar respecto del método de referencia no debe exceder el valor de uno.^{16, 17, 18}

2.4 Métodos Volumétricos de Análisis.

Una titulación es una operación analítica que permite conocer la cantidad de una especie química en una disolución llamada reactivo por titular (A). Consiste en agregar gradualmente al reactivo por titular por medio de una bureta, una cantidad químicamente equivalente de un reactivo de concentración conocida llamada reactivo titulante (B).



El punto en la titulación en que reaccionan las cantidades químicamente equivalentes del reactivo por titular y reactivo titulante se define como punto de equivalencia. Conociendo el volumen del titulante agregado hasta el punto de equivalencia y por cálculos estequiométricos sencillos se puede determinar la cantidad de reactivo por titular presente en la disolución.

El reactivo titulante debe ser de concentración conocida, se puede preparar a partir de un patrón primario o de un patrón secundario y la estandarización posterior de este.

Un patrón primario es un reactivo que tiene las siguientes características:

- ⊕ Alta pureza ($100 \pm 0.02\%$)
- ⊕ La composición del reactivo debe de corresponder exactamente a su fórmula.
- ⊕ Peso molecular elevado para minimizar errores en la operación de pesada.
- ⊕ Debe de ser estable a temperatura ambiente y no debe de cambiar su composición al aumentar la temperatura o al secarse en la estufa.
- ⊕ No debe absorber agua o dióxido de carbono de la atmósfera.
- ⊕ Debe de reaccionar estequiométricamente, cuantitativa y rápidamente con el reactivo por titular.
- ⊕ Ser fácilmente soluble en disolventes empleados.
- ⊕ De fácil adquisición y módico precio.

El Indicador es una sustancia que estando en contacto con la muestra en solución es capaz de detectar o hacer evidente el punto final de la reacción al cambiar de un modo característico en el punto de equivalencia o cerca de él.¹⁹

2.4.1 Clasificación de las Titulaciones.

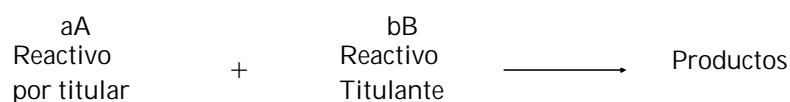
2.4.1.1 Por tipo de reacción química.

- ⊕ Titulación ácido base.
- ⊕ Titulación por formación de complejos.
- ⊕ Titulación por precipitación.
- ⊕ Titulación redox.

2.4.1.2 Por la forma de realizar la titulación.

- ⊕ Titulación Directa.

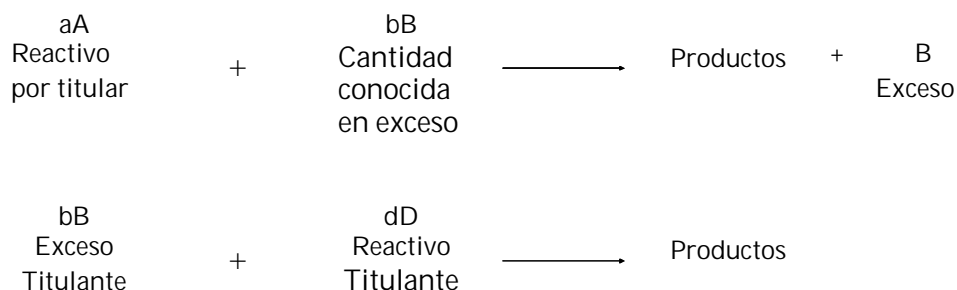
El reactivo titulante se adiciona directamente con una bureta a la disolución que contiene el reactivo por titular.



Con la concentración conocida y el volumen de disolución del reactivo titulante B gastado para alcanzar el punto de equivalencia se determina la cantidad de reactivo A presente en la muestra.

⊕ Titulación por Retroceso.

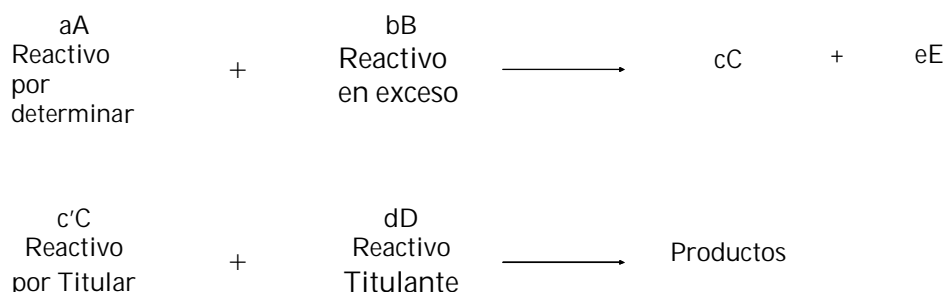
Se añade el reactivo por titular A, con una pipeta volumétrica o una bureta, una cantidad conocida y el exceso de una disolución estandarizada del reactivo B. El exceso de B que no reacciona con A se titula con el reactivo titulante D.



Restando la cantidad de B que no reacciona a la cantidad de B inicial añadida se puede determinar la cantidad de reactivo presente en la muestra.

⊕ Titulación Indirecta.

En las titulaciones indirectas, se hace reaccionar el reactivo por titular A con un reactivo específico B, como resultado de esta reacción se obtiene la cantidad químicamente equivalente de un activo C el cual se titula con un reactivo D.



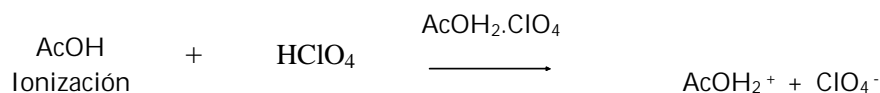
Las titulaciones indirectas se realizan cuando no es posible hacer una titulación directa.

2.4.1.3 Por la cantidad de analito adicionado.

- ⊕ Macro de 1000 – 100mg de muestra
- ⊕ Semimacro 100 – 10mg de muestra.
- ⊕ Micro 10 – 1 mg de muestra.

2.4.1.4 Titulación en Ácido Acético.

Las Bases que son muy débiles en agua ($8 < pK_a$ de la base del agua < 12) pueden ser tituladas convenientemente en ácido acético (AcOH) ya que éste es un disolvente anfiprótico. (Capaz de donar o aceptar protones) de baja constante dieléctrica donde las especies con carga tienden a asociarse formando pares iónicos. El ácido perclórico (HClO₄) es un ácido débil en este disolvente:



Para simplificar el equilibrio se escriben sin las moléculas del disolvente.

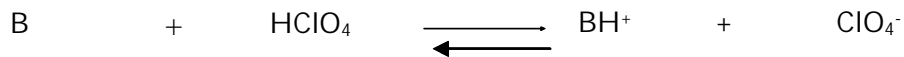


La ionización procede casi totalmente
Mientras que la disociación es despreciable.

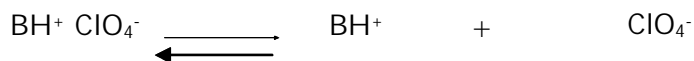
$$K_d = \frac{|H^+| |ClO_4^-|}{|HClO_4|}$$

En las expresiones anteriores K_i es la constante de ionización y K_d constante de disolución.

Cuando se titula una base sin carga



La disociación del par iónico es despreciable



En ácido acético el espectro de absorción del indicador en el par iónico (Indicador $H^+ ClO_4^-$) es el mismo que el de la especie protonada (Ind H^+) el cambio de color depende de la constante de ionización y no del valor de pH como sucede en agua.

También se ha observado que el cambio de color del indicador no es afectado por la disolución por lo que se puede emplear en las disoluciones diluidas. Cuando la base se consume el ácido perclórico reacciona con el indicador y el color de disolución cambia, el indicador no debe ser una base fuerte debido a que se ioniza antes de que se añada el titulante (es bloqueado antes de iniciar la titulación).

El cristal violeta y el violeta de metilo son los indicadores que son generalmente empleados en ácido acético.²¹

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la valoración de Citrato de Oxolamina del método farmacopéico se emplean grandes cantidades de reactivo, generando grandes cantidades de residuos tóxicos perjudiciales para el medio ambiente, estos a su vez necesitan de cierto tratamiento para ser eliminados, y siendo utilizada esta materia prima comúnmente por los alumnos de la FES Zaragoza, provoca gasto a la universidad en la adquisición de reactivos.

Por tal motivo, se tiene la necesidad de minimizar la escala del método farmacopéico con la finalidad de abatir el daño al medio ambiente, disminuir costos en reactivos y generación de residuos, además de aumentar la seguridad en el laboratorio.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo General:

Desarrollar y validar un método analítico en microescala que sea preciso, eficiente y funcional para la valoración de Citrato de Oxolamina como materia prima.

4.2 Objetivos Particulares:

Disminuir la escala convencional en la valoración de Citrato de Oxolamina en proporciones. 1:5, 1:25, 1:10.

Reducir el consumo en las cantidades de reactivos y materia prima utilizadas en el método farmacopéico, para contribuir con la ecología minimizando los desechos generados por las reacciones químicas.

Disminuir los costos en la adquisición de reactivos para el laboratorio.

5. HIPÓTESIS.

Al realizar la valoración para la determinación de Citrato de Oxolamina tanto en el método farmacopéico como en microescala, y no existir diferencia significativa en los resultados obtenidos, estos serán equivalentes y será posible utilizarlos indistintamente sin que su desempeño este afectado.

 6. DISEÑO EXPERIMENTAL.

6.1 Reactivos, Material y Equipo.

Tabla II. Lista de reactivos, marca y lote.

REACTIVO	MARCA	LOTE
BIFTALATO ACIDO DE POTASIO	JT BAKER	Y09598
ACIDO PERCLORICO	JT BAKER	39465
ANHIDRIDO ACETICO	JT BAKER	A34652
ACIDO ACETICO GLACIAL	JT BAKER	A36C77
CRISTAL VIOLETA	JT BAKER	S/N
CITRATO DE OXOLAMINA	JT BAKER	S/N

Tabla III. Lista de material, capacidad y marca.

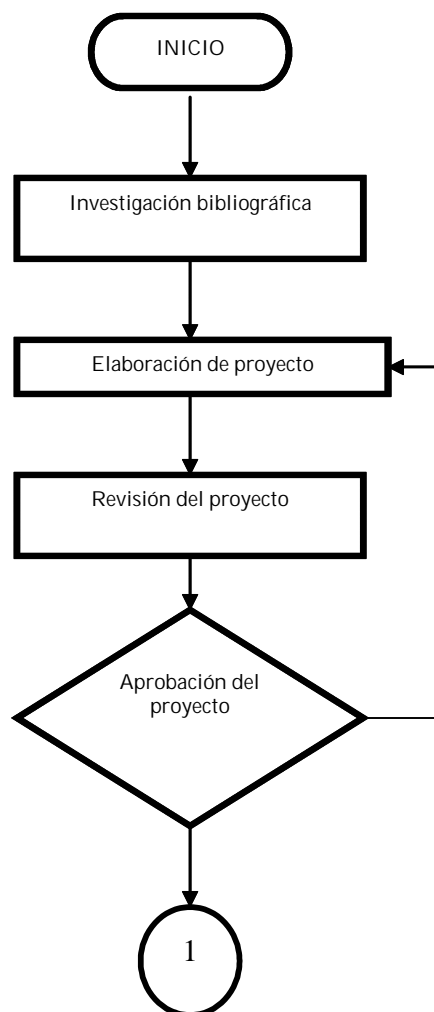
MATERIAL	CAPACIDAD	MARCA
MATRAZ ERLEMEYER	25 mL, 50 mL, 500 mL	PYREX
VASO DE PRECIPITADOS	0ml, 25ml,50ml	KIMAX
BURETA	5ml,10ml	PYREX
	5ml,10ml,25ml	PYREX
PROBETA		
SOPORTE UNIVERSAL		
BARRA MAGNETICA		
PINZAS PARA BURETA		
MATRAZ AFORADO	1000ml	KIMAX
PIPETAS	5ml;10ml	KIMAX

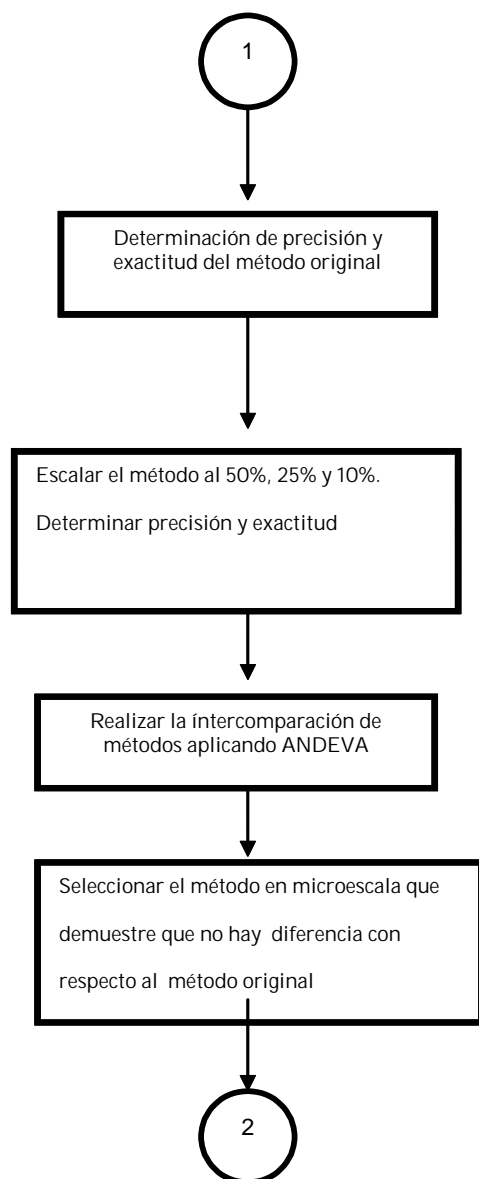
Tabla IV. Lista de equipo y marca.

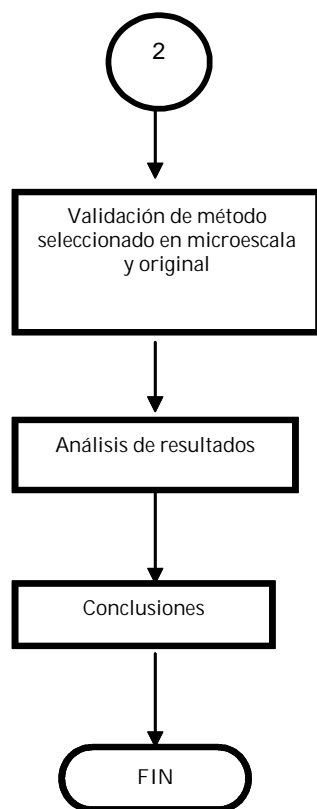
EQUIPO	MARCA
ESTUFA	NATIONAL APLIANCE CO.
PARRILLA	CIMAREC 2 TERMOLINE
CAMPANA DE EXTRACCION	SEVCH76
BALANZA ANALITICA	OHAUS EXPLORER PRO
MICROBALANZA	OHAUS EXPLORER PRO

7. MÉTODO.

7.1 Diagrama de Flujo.







7.2 Metodología.

7.2.1 Revisión Bibliográfica

7.2.2 Verificación de existencias de materia prima, reactivos e insumos en la planta piloto.

7.2.3 Asignación de proyecto.

7.2.4 Validación del Método farmacopéico para la valoración de Citrato de Oxolamina.

7.2.4.1 Determinación de Exactitud.

- ⊕ Pesar 150 mg de Citrato de Oxolamina en un matraz de 250 mL.
- ⊕ Disolver en una mezcla de 25 mL de anhídrido acético y 20 mL de ácido acético.
- ⊕ Titular con una solución 0.1 N de ácido perclórico.
- ⊕ Utilizar cristal violeta como indicador.
- ⊕ Efectuar la determinación en blanco para hacer las correcciones necesarias.
- ⊕ Cada mL de ácido perclórico 0.1 equivale a 43.74 mg de Citrato de Oxolamina.
- ⊕ Realizar la determinación seis veces y calcular el porcentaje recuperado, la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación.

7.2.4.2 Determinación de Linealidad.

- ⊕ Realizar una curva de calibración con cinco niveles de concentración por triplicado.
- ⊕ El nivel de concentración central debe ser el nivel de concentración de la solución estándar como lo indica el método que corresponde en un 100%.
- ⊕ Los niveles de concentración son 90, 95, 100, 105 y 110%.
- ⊕ Cada nivel de concentración debe prepararse por triplicado, ya sea por dilución o por pesadas separadas.
- ⊕ Aplicar el procedimiento de la valoración correspondiente al método farmacopéico.
- ⊕ Calcular el valor de la pendiente (m), la ordenada el origen (b), el coeficiente de variación (CV) para la señal analítica contra la concentración.

7.2.4.3 Determinación de precisión.

Repetibilidad.

- ⊕ Determinar el coeficiente de variación considerando los valores correspondientes al 90,100 y 110% de concentración obtenidos en Linealidad del método.
- ⊕ Calcular el coeficiente de variación y el % de recobro.

Precisión Intermedia.

- ⊕ Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto en dos días diferentes cumpliendo con el siguiente formato

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DÍA 1		
DÍA 2		

- ⊕ Calcular el contenido de cada muestra y reportar el coeficiente de variación total.

7.2.4.4 Robustez del método.

- ⊕ Se consideran cambios de pureza y lote de ácido acético y se reporta el coeficiente de variación totales tomando los tres primeros valores obtenidos en exactitud del método
- ⊕ Se preparan soluciones correspondientes al 100% por triplicado para cada cambio considerado.
- ⊕ Se analizan las muestras considerando los cambios en los factores analíticos
- ⊕ Se reporta el contenido de muestra para cada condición.

-
-
- ⊕ Se calcula la diferencia absoluta entre el promedio de cada condición instrumental respecto a la condición normal de operación.

7.2.5 Escalamiento del método a 50%,25%,10% determinar la Precisión y Exactitud en cada uno de los escalamientos.

7.2.5.1 Determinación de Precisión en 50%.

- ⊕ Pesar 75 mg de Citrato de Oxolamina en un matraz Erlenmeyer de 50 mL.
- ⊕ Disolver con 12.5 mL de Anhídrido Acético y 10 mL de Ácido acético.
- ⊕ Determinar el punto final con ayuda de Cristal Violeta hasta encontrar el vire amarillo.
- ⊕ Titular con una solución 0.1 N de ácido perclórico.
- ⊕ Hacer un blanco y efectuar las correcciones necesarias.
- ⊕ Cada mL de solución de Ácido Perclórico 0.1 N contiene 43.74 mg de Citrato de Oxolamina.
- ⊕ Realizar la determinación seis veces y calcular la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación.

7.2.5.2 Determinación de exactitud en 50%.

Calcular el porciento recuperado de cada una de las determinaciones realizadas en 7.2.5.1 determinando los mismos parámetros.

7.2.5.3 Determinación de Precisión en 25%.

- ⊕ Pesar 37.5 mg de Citrato de Oxolamina en un matraz Erlenmeyer de 25 mL
- ⊕ Disolver con 6.25 mL de Anhídrido Acético y 5 mL de Ácido acético.
- ⊕ Determinar el punto final con ayuda de Cristal Violeta hasta encontrar el vire amarillo.
- ⊕ Titular con una solución 0.1 N de ácido perclórico.
- ⊕ Hacer un blanco y efectuar las correcciones necesarias.
- ⊕ Cada mL de solución de Ácido Perclórico 0.1 N contiene 43.74 mg de Citrato de Oxolamina.

-
-
- ⊕ Realizar la determinación seis veces y calcular la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación.

7.2.5.4 Determinación de Exactitud en 25%.

Calcular el porcentaje recuperado de cada una de las determinaciones realizadas en 7.2.5.3 determinando los mismos parámetros.

7.2.5.5 Determinación de Precisión en 10%.

- ⊕ Pesar 15 mg de Citrato de Oxolamina en un matraz Erlenmeyer de 10 mL.
- ⊕ Disolver con 2.5 mL de Anhídrido Acético y 2.0 de Ácido Acético.
- ⊕ Determinar el punto final con ayuda de Cristal Violeta hasta encontrar el vire amarillo.
- ⊕ Titular con una solución 0.1 N de ácido perclórico.
- ⊕ Hacer un blanco y efectuar las correcciones necesarias.
- ⊕ Cada mL de solución de Ácido Perclórico 0.1 N contiene 43.74 mg de Citrato de Oxolamina.
- ⊕ Realizar la determinación seis veces y calcular la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación.

7.2.5.6 Determinación de Exactitud en 10%.

Calcular el porcentaje recuperado de cada una de las determinaciones realizadas en 7.2.5.5 determinando los mismos parámetros.

7.2.6 Realizar la intercomparación de métodos escalados aplicando un ANDEVA; utilizando como factores el peso del fármaco, y el volumen del ácido perclórico gastado, y como determinaciones la precisión y exactitud para la selección del método a escalar.

7.2.7 Validación del método en microescala en 10%.

7.2.7.1 Linealidad del Método.

- ⊕ Realizar una curva de calibración con cinco niveles de concentración.
- ⊕ El nivel de concentración central debe ser el nivel de concentración de la solución estándar como lo indica el método de microescala correspondiente (lo que usualmente corresponde en un 100%).
- ⊕ Los niveles son 90, 95, 100, 105 y 110%.
- ⊕ Cada nivel de concentración debe de prepararse por triplicado ya sea por dilución de una solución estándar concentrada o por pesadas separadas.
- ⊕ Aplicar el procedimiento de la valoración correspondiente al método en microescala seleccionado.
- ⊕ Calcular el valor de la pendiente(m), la ordenada al origen(b), el coeficiente de variación (CV) para la señal analítica contra concentración.

7.2.7.2 Exactitud del Método.

- ⊕ Pesar 15 mg de Citrato de Oxolamina en un matraz Erlenmeyer de 10 mL
- ⊕ Disolver con 2.5 mL de Anhídrido Acético y 2.0 mL de Ácido Acético.
- ⊕ Titular con solución de ácido perclórico 0.078 N.
- ⊕ Determinar el punto de equivalencia utilizando SI de cristal violeta como indicador.
- ⊕ Cada mL de solución de ácido perclórico 0.1 N contiene 43.74 mg de Citrato de Oxolamina.
- ⊕ Realizar por seis veces y determinar % de recobro en cada muestra, coeficiente de variación (CV) e intervalo de confianza de recobro.

7.2.7.3 Precisión del Método.

Repetibilidad.

- ⊕ Se determina el coeficiente de variación considerando los valores correspondientes al 90,100 y 110% de concentración obtenidos en Linealidad del método.
- ⊕ Calcular el coeficiente de variación y el % de recobro.

Precisión Intermedia.

- ⊕ Se analiza por triplicado una muestra homogénea del producto en dos días diferentes cumpliendo con el siguiente formato:

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DÍA 1		
DÍA 2		

- ⊕ Calcular el contenido de cada muestra y reportar el coeficiente de variación total.

7.2.7.4 Robustez del método.

- ⊕ Considerar cambios de pureza y lote de ácido acético y se reportar el coeficiente de variación totales tomaron los tres primeros valores obtenidos en exactitud del método
- ⊕ Preparar soluciones correspondientes al 100% por triplicado para cada cambio considerado.
- ⊕ Analizar las muestras considerando los cambios en los factores analíticos
- ⊕ Reportar el contenido de muestra para cada condición.
- ⊕ Calcular la diferencia absoluta entre el promedio de cada condición instrumental respecto a la condición normal de operación.

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

8.1 Identificación de la materia prima.

Se realizaron los análisis para Citrato de Oxolamina como materia prima, según la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7ª edición, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla V. Resultados de análisis para la identificación de Citrato de Oxolamina.

Análisis	Especificación	Resultado
Descripción	Polvo blanco claro.	Cumple
Solubilidad	Ligeramente soluble en agua y alcohol, soluble en anhídrido acético y ácido acético.	Cumplen
Temperatura de Fusión	Entre 140 – 143 °c	Cumple con 142°c
Valoración	Contiene no menos del 99.0 % y no mas del 102.5 %	100.075 %

Al realizar la identificación de la materia prima es posible continuar con los ensayos para escalar la técnica analítica, ya que la materia prima cumple con las especificaciones farmacopéicas.

8.2 Resultados del escalamiento de la técnica Farmacopéica.

El análisis de varianza se aplica ampliamente en la investigación, pues esta íntimamente relacionado con un diseño experimental ya que la relación entre estos dos tópicos se resume cuando al diseñar un experimento el cual se requiere someter a un análisis, los investigadores pueden, antes de llevar a

cabo su investigación identificar aquellas fuentes de variación que se consideren importante y así seleccionar el modelo que permita medir la extensión de las fuentes de variación total.

El análisis de varianza (ANDEVA) es una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se divide en varios componentes, cada una de las cuales tiene asociada una fuente de variación específica, de manera que en el análisis sea posible conocer la magnitud de las contribuciones de cada fuente de variación a la variación total.²²

El análisis de varianza puede ser utilizado en dos tipos de análisis: a) para estimar y contrastar hipótesis acerca de varianzas, y b) para estimar y contrastar hipótesis acerca de medias. Nosotros la usaremos para contrastar hipótesis acerca de medias sin embargo nuestras conclusiones dependerán de la magnitud de las varianzas observadas.

Con los resultados obtenidos del escalamiento de la técnica a los niveles de 50%, 25% y 10%, considerando también el 100% se realizó la tabla VI en la cual se descompone la variación de los datos en dos componentes; uno entre grupos y otro dentro del grupo para realizar el análisis.

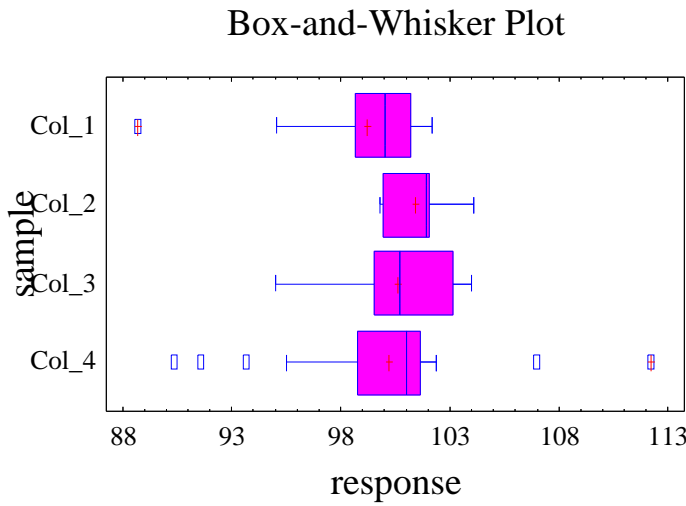
Tabla VI. Tabla de análisis de varianza del escalamiento considerando los cuatro niveles.

Analysis of Variance						
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value	
Between groups	45,9585	3	15,3195	1,28	0,2884	
Within groups	814,1	68	11,9721			
Total (Corr.)	860,058	71				

El valor de P (probabilidad) a partir de la F calculada es mayor a 0.05% nos muestra que no existe una relación estadísticamente significativa entre las medias de las variables a un nivel de confianza del 95%, ya que el propósito es escalar la técnica de la farmacopea a la menor cantidad de reactivos con los cuales se obtengan resultados químicamente equivalentes a la técnica convencional.

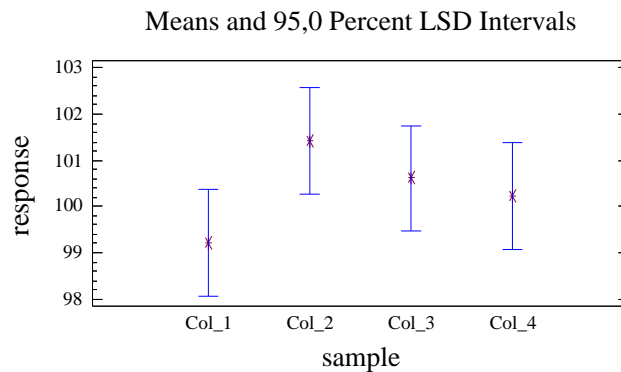
La gráfica 1 muestra la media para cada grupo de datos, también muestra el error normal de cada media que es una medida de su variabilidad.

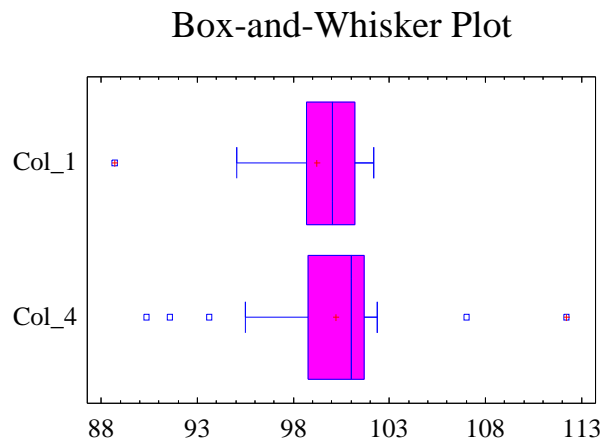
Gráfica 1. Diagrama de medias.



En la grafica 2 el nivel uno representa la media del grupo de datos obtenidos al realizar la valoración de citrato de oxolamina al 100%, el nivel dos representa los datos obtenidos en la valoración escalada al 50%, mientras el nivel tres representa los datos de la valoración al 25% y el nivel cuatro, representa el grupo de datos obtenidos de la valoración en el escalamiento de 10%.

Gráfica 2. Diagrama de medias.



Gráfica 3. Comparación de medias.

En la gráfica 3 representa los datos obtenidos en las poblaciones de 100% y 10% nos muestra que no existe diferencia significativa entre ambos métodos, por lo cual se eligió el escalamiento en 10%.

8.3 Resultados de Linealidad del Método al 100 %

A continuación se muestran los resultados de la linealidad del método al 100%, mostrando la tabla de análisis de varianza, tabla de criterios de aceptación y la grafica del % adicionado y % recuperado.

El valor de F obtenido de tablas es de 9.07

$$F (g_{lr}, g_{lr}, 0.01) = 9.07$$

La F calculada es de 833.249216, siendo mayor que la F de tablas nos indica que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Tabla VII. Criterios de aceptación para la Linealidad del Método al 100%.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
Coefficiente de determinación debe ser mayor a 0.98.	0.9846381	SI
Intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad.	0.985008007 a 1.14442767	SI
Intervalo de confianza de la ordenada al origen debe incluir el cero.	-133.438638 a 135.407915	SI
El coeficiente de variación de la regresión no debe ser mayor al 2%.	1.00263131	SI
La F calculada debe ser mayor a la F de tablas .	833.249216 > 9.07	SI

El método de valoración de Citrato de Oxolamina cumple con los criterios de aceptación para la linealidad del método cuando se realiza como se indica en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7ª edición.

8.4 Resultados de Linealidad del Método en 10%.

El valor de F obtenido de tablas es de 9.07

$F(glr, glr, 0.01) = 9.07$

La F calculada es de 856.50506, siendo mayor que la F de tablas nos indica que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Tabla VIII. Criterios de aceptación para la Linealidad del Método al 100%.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
Coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98	0.985049	SI
Intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad	0.9228815 a 1.0699645	SI
Intervalo de confianza de la ordenada al origen debe incluir el cero	-0.2674095 a 2.2375074	SI
El coeficiente de variación de la regresión no debe ser mayor al 2%	0.9327213	SI
La F calculada debe ser mayor a la F de tablas	856.50506 > 9.07	SI

El método de valoración de Citrato de Oxolamina cumple con los criterios de aceptación para la linealidad del método cuando se realiza con la técnica escalada al 10%.

8.5 Resultados de Exactitud del Método al 100 y 10%.

Tabla IX. Muestra los resultados de la exactitud en la validación de métodos obtenidos a partir de 6 muestras independientes.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
NIVEL 100%		
El intervalo de confianza del recobro debe incluir el promedio aritmético	Promedio =150.75333 Intervalo = 148.35511 a 153.151	SI
El C.V. del % del recobro debe ser menor o igual al 2%	1.51564%	SI
NIVEL 10%		
El intervalo de confianza del recobro debe incluir el promedio aritmético	Promedio = 15.69301567 Intervalo= 15.69242 a 15.69368	SI
El C.V. del % del recobro debe ser menor o igual al 2%	0.00381158%	SI

En la tabla IX. Se muestran los resultados y los criterios de aceptación para la exactitud cuando el método se desarrolla en forma convencional y cuando se realiza con el método escalado al 10%, se muestran juntos para facilitar la comparación de los resultados.

En ambos casos se observa que el intervalo de confianza del recobro incluye el promedio aritmético, los intervalos de confianza son calculados con el estadígrafo de contraste t de student, esta herramienta es útil al comparar dos medias o dos grupos de datos.

El coeficiente de variación del recobro no excede el 2% en ambos casos, por lo que cumple con ese parámetro para la linealidad.

El propósito de la exactitud es verificar la concordancia entre el valor experimental (cantidad recuperada) con su verdadero valor (cantidad adicionada), al desarrollar el método al 100 y al 10 % existe una concordancia entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

8.6 Precisión del Método.

8.6.1 Repetibilidad del método al 100 y 10 %

Existen diversas formas de evaluar la repetibilidad de un método analítico, de hecho, puede ser evaluada con los datos obtenidos en la exactitud, ya que ambos se encargan de medir la concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica bajo las mismas condiciones de trabajo, sin embargo, en este caso uno de los métodos propuestos en las guías de la International Conference On Harmonization (ICH Q2A Y Q2B) haciendo 3 repeticiones de 3 niveles de concentraciones, se calculó el coeficiente de variación.

Tabla X. Criterios de aceptación para la repetibilidad del método 100 y 10%.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
NIVEL 100%		
El coeficiente de variación total no debe exceder el 2%.	0.759063441	SI
El coeficiente de variación total no debe exceder el 2%	1.091653273	SI

En la tabla X se muestran los resultados de la repetibilidad del método al 100% y 10% donde se observa que ambos métodos cumplen con el criterio de aceptación, ya que en ninguno de los casos el CV es mayor a 2%.

El coeficiente de variación es una medida de dispersión relativa, ya que está exenta de unidades, debido a esta propiedad el CV es la forma más adecuada de medir la variabilidad de dos conjuntos de datos.

Los resultados presentados muestran que existe una variabilidad de menos del 2% cuando se realiza el método al 100 y al 10%.

8.6.2 Precisión Intermedia del método al 100 y 10%

La precisión intermedia se realizó por dos diferentes analistas en dos diferentes días, con pesadas independientes en cada muestra por triplicado.

Tabla XI. Criterios de aceptación de la precisión intermedia al 100 y 10%.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
NIVEL 100%		
El coeficiente de variación debe ser menor al 2%	1.221464768	SI
NIVEL 10%		
El coeficiente de variación debe ser menor al 2%	1.757699237	SI

Se cumple con el criterio de aceptación para la presión intermedia interdía, interanalista de los ambos métodos.

8.7 Robustez del Método.

Ya que la robustez de un método analítico representa su capacidad para proporcionar resultados confiables al realizar cambios internos en los parámetros del método, en este caso se realizó el cambio deliberado de pureza de ácido acético que es utilizado como disolvente y posteriormente cambio de lote del mismo reactivo, ya son cambios de los más comunes que pueden ocurrir en la práctica.

Tabla XII. Criterios de aceptación de la Robustez del Método al 100 y 10% cambiando la pureza del ácido acético utilizado como disolvente.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
NIVEL 100%		
La diferencia absoluta de la media aritmética de la condición dada, respecto a la media de la condición normal no debe ser mayor de 2%	34.0235613	NO
NIVEL 10%		
La diferencia absoluta de la media aritmética de la condición dada, respecto a la media de la condición normal no debe ser mayor de 2%	27.4747814	NO

Tabla XIII. Criterios de aceptación de la Robustez del Método al 100 y 10% cambiando el lote de ácido acético.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CUMPLE
NIVEL 100%		
La diferencia absoluta de la media aritmética de la condición dada, respecto a la media de la condición normal no debe ser mayor de 2%	0.24331067	SI
NIVEL 10%		
La diferencia absoluta de la media aritmética de la condición dada, respecto a la media de la condición normal no debe ser mayor de 2%	0.90103851	SI

Se cumple con el criterio de aceptación para la robustez del método solo cuando hay cambio de lote, cuando se realiza al 100% y al 10%, ya que la diferencia absoluta de la media aritmética de la

condición dada, respecto a la media de la condición normal no es mayor al 2%, sin embargo se recomienda ser cuidadosos al hacer cambio de reactivos ya que en este caso en particular es crítico el cambio de pureza ya que al utilizar el grado reactivo del disolvente de ácido acético, este al entrar en contacto con la muestra se presentaba una reacción de efervescencia y liberación de energía dado por las impurezas del reactivo.

La tabla XIII muestra el resultado entre ambos métodos, donde se puede observar que los criterios para cada parámetro evaluado se encuentran dentro del rango de aceptación.

8.8 Comparación en costos de los Métodos.

Uno de los objetivos planteados al inicio fue, una vez escalada la técnica farmacopéica evaluar el ahorro económico que representa el escalar la técnica y así poder ver uno de sus beneficios reales.

Tabla XIV. Comparación de costos del método al 100 y 10%.

Reactivo	Cantidad utilizada al 100%	Costo en la valoración al 100% (USD)	Cantidad utilizada al 10%	Costo en la valoración al 10% (USD)
Citrato de Oxolamina	5 gramos		0.5 gramos	
Ácido Perclórico	8 gramos		0.8 gramos	0.79
Ácido acético	30 mL	0.5196	3ml	0.05196
Anhídrido acético	81 gramos	4.58	8.1 gramos	0.458
TOTAL		16.4996		1.64996

Datos obtenidos del catalogo Aldrich 2003-2004.²³

Para la realización de la tabla anterior se redondeó de la cantidad de reactivos que se requiere para realizar la valoración por triplicado de Citrato de Oxolamina con base a la cantidad de reactivos que se emplearon durante el estudio, se obtuvo la equivalencia del precio a esa cantidad de reactivos según los costos mostrados en el catálogo Aldrich 2003-2004.

En la tabla se observa que la reducción de costos en este caso es del 90%, lo que implica una reducción radical de costos de operación en el ahorro de sustancias químicas.

Actualmente el material para microescala con juntas ensamblables (muchas de ellas no sólo esmeriladas, sino con rosca) son relativamente más costosos que los convencionales, pero conforme aumente su demanda y consecuentemente la competencia entre los diferentes fabricantes, sus costos bajarán apreciablemente. A pesar de esto en química analítica no es necesario adquirir material especial para microescala, ya que se puede realizar eficazmente con el material con el que cuenta comúnmente un laboratorio.

Indirectamente los costos también se reducen ya que la fragilidad del material pequeño es menor porque el grosor del vidrio es algo mayor y la resistencia mecánica en las piezas pequeñas es más alta.

8.9 Comparación de generación de desechos de ambos métodos

Tabla XV. Comparación de generación de desechos del método al 100 y 10%.

Reactivo	Cantidad utilizada al 100%	Cantidad utilizada al 10%
Ácido Acético	20 mL	2.0 mL
Anhídrido Acético	25 mL	2.5 mL
Ácido Perclórico	4.5 mL	0.45 mL
Total	49.5 mL	4.95 mL

Los reactivos empleados en la valoración de Citrato de Oxolamina son anhídrido acético, ácido acético, solución indicadora, el cristal violeta; ya que es una valoración volumétrica en medio no acuoso se emplea una cantidad aproximada de 4.5mL de ácido perclórico por cada valoración, se consideran como desechos se encuentran disueltas aquí.

Al realizar la valoración en un análisis normal por triplicado tenemos un volumen de 148.5 mL de desechos, sin embargo al utilizar el método escala al 10% tenemos un volumen total de desechos de 4.95 mL, lo que implica una reducción de desechos del 90%.

Los beneficios de esta reducción de desechos se pueden ver reflejada en diferentes ámbitos: económico-ambiental, es menos costosa la eliminación de desechos por su tratamiento; la probabilidad de accidentes es menor, y el ambiente del laboratorio mejora al tener menor exposición a los compuestos tóxicos.

9. CONCLUSIONES.

Se escaló a un 10% la técnica para la cuantificación de Citrato de Oxolamina, con respecto a la técnica farmacopéica.

Ambos métodos validados son lineales, exactos, reproducibles y repetibles en el rango de 90 a 110%.

Es posible emplear indistintamente cualquiera de los dos métodos en la valoración de Citrato de Oxolamina.

El ahorro económico de recursos es del 90%, al igual que la reducción en la generación de desechos.

10. REFERENCIAS.

1. Aguilar, S.A. Fundamentos de Química Analítica en Micro y Ultramicroescala. ED. Madrid España 1950.pp1-115.
2. Stell, Jeannie Microscale Chemistry, Journals Speaking oil ä Gas Journal, Oct. 8, 2001: 9941, pag 15-18.
3. Universidad Iberoamericana (en línea) Centro Mexicano de Química en Microescala, Dpto. de ingeniería de Ciencias Químicas (México) 1990, acceso Nov. 2004
www.via.mx/ibero/oacadémica/postgrado/ciencias/cienquim/microescala.
4. PAPIME EN215403 "Implementación de técnicas en microescala en la Enseñanza experimental de química en los Laboratorios de docencia de FES "Zaragoza."
5. Goodman and Gilmans .Las bases Farmacológica de la Terapéutica. ED. Médica Panamericana. 8ª Edición, México 1991.
6. Journal Chemical Abstracs Vol.56 11598h,1962
7. Bubavari, S. THE MERCK INDEX 1996 by Merck Co. Inc. Whirehouse Station, NJ, USA.

-
-
8. PLM 2003 Diccionario de Especialidades Farmacéuticas México 49ª ED pp. 593,2117.
 9. B.B. Ceyhan and S Korakurt. Effect of Oxolamine on cough sensitivity in Chronic obstructive Pulmonary Medicine patients. Department of pulmonary Medicine, Marmora University School of Medicine, Istanbul, turkey Vol. 96(2002) pp. 61-63
 10. Smith, CM Reynnard.A.M.D. Farmacología, ED. Panamericana Argentina 1993
 11. SSA. Guía Oficial de Validación de métodos analíticos de la Dirección general de Control de insumos para la salud.
 12. Guerra J. Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories Part 1. Pharmaceutical Technology 10 (3), 74-77, (1986)
 13. Informacèutico. Validación de Métodos Analíticos, Resumen impartido por AFM Febrero de 2001, 45. pp45-51.
 14. The United States Pharmacopeia 25, The National Formulary 20, United states Pharmacopeia Convention, INC., Toronto Canada 2001
 15. Courent. Concepts for the Validation of Compendial Assays. Pharmacopeia Forum (1992)516-519pp.

-
-
16. International Conference On Harmonization Of Technical, Text On Validation Of Analytical Procedures Q2A, ICH Steering Committee, 1994
 17. G.M. Araceli. Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos AC. Edition 2002.
 18. International Conference on Harmonization of Technical Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, ICH Steering Committee, 1996.
 19. Skoog. Douglas A. Fundamentos de Química Analítica 4ª ED. Editorial Reverte, Barcelona 2000.
 20. Skoog. Douglas. Química Analítica 7ª Edición, editorial Mc Graw Hill Interamericana editores, S.A. de CV México 2000.
 21. Connors Kenneth A. Curso de Analisis Farmacéutico (ensayo del medicamento) ED. Reverte, S.A. España 1981.
 22. Márquez Dos. Santos Ma. José, Estadística para Ciencias Químico Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México 2004.
 23. Aldrich, Manual de químicos finos y equipos de laboratorio, Sigma Aldrich Química, S.A. de C.V. Mexico 2003-2004.

GLOSARIO.

- ⊕ Analito. Es el componente específico a cuantificar o identificar mediante un análisis químico.
- ⊕ Cantidad Mínima Cuantificable. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser medida con exactitud y precisión aceptable.
- ⊕ Cantidad Mínima Detectable. Es la menor cantidad de un analito en una muestra determinada que puede ser detectada, pero no cuantificada.
- ⊕ Calibración. Conjunto de operaciones que tiene por finalidad determinar los errores de un instrumento para medir y de ser necesarias otras características metrologías.
- ⊕ Coeficiente de Variación. Es el valor que resulta de dividir la desviación estándar entre el promedio multiplicada por 100.
- ⊕ Desviación Estándar. Es la medida de dispersión de un conjunto de valores respecto de su valor promedio.
- ⊕ Especificidad. Es la característica de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a los otros componentes de la muestra.
- ⊕ Estabilidad Analítica de la Muestra. Propiedad de una muestra preparada para su cuantificación conservando su integridad física, química y microbiológica, conservando la concentración del analito después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.
- ⊕ Exactitud. Expresa la concordancia entre un valor obtenido y un valor conocido del analito en una muestra, al analizar aplicando un método analítico. Generalmente se expresa como por ciento de recobro.
- ⊕ Linealidad. Es la habilidad del sistema o del método analítico para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo definido.
- ⊕ Límite de detección. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificable bajo condiciones de operación establecidas.
- ⊕ Límite de cuantificación. Es la mínima cantidad del analito en una muestra que puede ser cuantificado con una precisión y exactitud aceptables, bajo las

condiciones de operación establecidas. El límite de cuantificación es un parámetro de contenidos cuantitativos a bajos niveles de concentración del analito en la muestra y es usado particularmente en la determinación de impurezas y/o productos de degradación.

- ⊕ Matriz Analítica. Muestra de constitución conocida que es empleada en la validación de métodos analíticos, que contiene todos los elementos de la muestra a excepción del analito.
- ⊕ Método Analítico. Descripción de una o más técnicas en las cuales se identifican los recursos materiales, la secuencia de actividades y procedimientos normalizados de operación.
- ⊕ Métodos Analíticos Desarrollados Internamente en el Laboratorio. Son los métodos desarrollados por el mismo laboratorio.
- ⊕ Métodos Analíticos de Identificación. Métodos que incluyen pruebas de barrido de IR, Calorimetría de Exploración Diferencial (CED), difracción de Rayos X, Barrido de UV, Tiempo de retención de HPLC, Colorimetría, etc.
- ⊕ Método Analítico de Contenido. Es el método que permite cuantificar al analito, que puede ser principio activo, conservadores, excipientes o alguna impureza entre otras.
- ⊕ Métodos Límite. Métodos que permiten determinar la presencia o ausencia del analito.
- ⊕ Métodos Analíticos no Oficiales. Son aquellos que aparecen en la literatura técnica reconocida.
- ⊕ Muestra analítica. Es la cantidad representativa de un lote, que es objeto de evaluación en un laboratorio de control de calidad.
- ⊕ Muestra analítica adicionada. Muestra de constitución conocida, que es empleada en la validación de métodos analíticos, que contiene además de los componentes de la muestra, una cantidad conocida del analito.
- ⊕ Precisión. Expresa una concordancia de resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. La precisión puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad que generalmente se expresa como coeficiente de variación.

-
-
- ⊕ Protocolo de Validación. Documento de plan retrospectivo o prospectivo experimental, que cuando es llevado a cabo, es encaminado a producir evidencia documentada de la metodología analítica ha sido validado.
 - ⊕ Repetibilidad. Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en que un mismo intervalo de corto tiempo. Conocida también como precisión intracontenido.
 - ⊕ Precisión Intermedia. Expresa la precisión con diferentes analistas y en días diferentes.
 - ⊕ Recobro. Cuantificación de la cantidad conocida del analito, determinado en el placebo, analítico adicionado o muestra adicionada, empleando un método analítico de interés.
 - ⊕ Reproducibilidad. Expresa la precisión entre diferentes laboratorios.
 - ⊕ Revalidación. Repetición de la validación de un método analítico o parte de este.
 - ⊕ Rango. Es el intervalo entre los niveles de concentración alta y baja del analito, estudiadas en linealidad.
 - ⊕ Robustez. Es la capacidad del método de proporcionar resultados confiables al realizar cambios internos en los parámetros del método.
 - ⊕ Tolerancia. Grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones externas al método como: diferentes proveedores de reactivos diferentes equipos, condiciones ambientales, estabilidad de la lectura, diferentes analistas, etc.
 - ⊕ Validación de Métodos Analíticos. Es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio y métodos estadísticos que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.¹⁵