



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.  
Laboratorio de Investigación Farmacéutica.**

**Diseño, desarrollo y validación de un método  
potenciométrico para la valoración de benzoil  
metronidazol a microescala.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

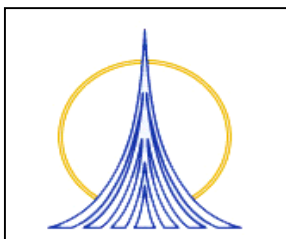
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**HÉCTOR RAMÍREZ LÓPEZ**

**M. en C. Elizabeth Guadalupe Sánchez González.  
Director**

**M. en C. Vicente J. Hernández Abad.  
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.

**El presente trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, apoyado con recursos del proyecto PAPIIME EN215403, "Implementación de técnicas en microescala en la enseñanza experimental de la Química en los laboratorios de docencia de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza".**

*Este trabajo se lo dedico a mi padre el Sr. Héctor Ramírez Cuevas y a mi madre la Sra. María del Carmen López Álvarez, a quienes les agradezco todo el cariño, comprensión y todo el apoyo que me han brindado a lo largo de la vida, y en especial por haberme ayudado a tener una formación profesional. A mis hermanos Eduardo Noel y Nancy Araceli quienes son parte fundamental en mi formación como persona y por el apoyo que me han brindado como hermanos durante nuestras vidas.*

*Agradezco en especial a Federico Barajas Cervantes por ser mi amigo, por el apoyo brindado y por haberme ayudado a concluir una más de mis metas.*

*Agradezco a la M. en C. Elizabeth G. Sánchez González y al M. en C. Vicente J. Hernández Abad por su apoyo, y a todos los profesores que infundaron en mi conocimientos positivos para mi formación como Químico Farmacéutico Biólogo.*

*A mis amigos Manuel Salinas, Carlos Gómez, Salvador Osiris, Carlos Salvador, Edwin Anaya y a José Morán, gracias por la amistad y el apoyo brindado durante todo momento, y por todos los momentos buenos y malos que pasamos a lo largo de nuestra vida en la FES Zaragoza. A Arturo Belmont Torres por su amistad y por su valiosa cooperación en la parte experimental de la validación de este trabajo.*

*A Elsa Espidío Flores por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.*

## ÍNDICE.

### INTRODUCCIÓN.

<b>1. MARCO TEÓRICO.</b>	1
1.1. Microquímica y microanálisis.	1
1.2. Microescala.	3
1.2.1. Ventajas.	3
1.2.2. Desventajas.	5
1.3. Características del benzoil metronidazol.	6
1.3.1. Indicaciones terapéuticas.	6
1.3.2. Farmacocinética y farmacodinamia.	6
1.3.3. Contraindicaciones.	7
1.3.4. Restricciones de uso durante el embarazo y lactancia.	7
1.3.5. Reacciones secundarias y adversas.	8
1.3.6. Interacciones medicamentosas y de otro género.	8
1.3.7. Presentaciones comerciales.	8
1.3.8. Método analítico para la valoración de benzoil metronidazol.	9
1.4. Potenciometría.	10
1.4.1. Definición.	10
1.4.2. Métodos para determinar el punto de equivalencia.	11
1.4.2.1. Método de las tangentes.	11
1.4.2.2. Gráfica de la primera derivada.	11
1.4.2.3. Gráfica de la segunda derivada.	11
1.5. Validación.	13
1.5.1. Definición.	
1.5.2. Validación de métodos analíticos.	13
1.5.3. Justificación legal para realizar la validación de un método analítico.	14
1.5.4. Procedimientos analíticos a ser validados.	15
1.5.5. Categorías de ensayo de los métodos analíticos.	16
1.5.6. Parámetros de desempeño en validación de un método analítico.	16
1.5.6.1. Especificidad.	17
1.5.6.2. Exactitud.	18
1.5.6.3. Precisión.	18
1.5.6.3.1. Repetibilidad.	19
1.5.6.3.2. Precisión intermedia.	19
1.5.6.3.3. Reproducibilidad.	19

1.5.6.4. Límite de detección.	19
1.5.6.5. Límite de cuantificación.	19
1.5.6.6. Linealidad.	19
1.5.6.7. Rango.	20
1.5.6.8. Robustez.	20
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVOS.</b>	<b>22</b>
<b>4. HIPÓTESIS.</b>	<b>23</b>
<b>5. DISEÑO EXPERIMENTAL.</b>	<b>24</b>
5.1. Materiales y reactivos.	24
5.2. Metodología del proyecto.	25
5.2.1. Diagrama de flujo.	25
<b>6. DESARROLLO.</b>	<b>26</b>
6.1. Caracterización de benzoil metronidazol.	26
6.1.1. Sustancia de referencia.	26
6.1.2. Descripción.	26
6.1.3. Ensayo de identidad.	26
6.1.4. Temperatura de fusión.	26
6.1.5. Solubilidad.	26
6.1.6. Pérdida por secado.	27
6.1.7. Valoración.	27
6.2. Realización a microescala del método analítico farmacopéico.	28
6.2.1. Microescala a un 50 por ciento.	28
6.2.2. Microescala a un 25 por ciento.	28
6.2.3. Microescala a un 20 por ciento.	28
6.2.4. Microescala a un 10 por ciento.	28
<b>7. SELECCIÓN DEL MÉTODO EN MICROESCALA A VALIDAR.</b>	<b>29</b>
<b>8. METODOLOGÍA DE VALIDACIÓN.</b>	<b>30</b>
8.1. Linealidad del sistema.	30
8.2. Precisión del método.	30
8.2.1. Repetibilidad.	30
8.2.2. Precisión intermedia.	31
8.3. Linealidad del método.	31
8.4. Exactitud y repetibilidad.	32
8.5. Robustez.	32

<b>9. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.</b>	33
9.1. Identificación de materia prima.	33
9.2. Validación del método analítico farmacopéico.	34
9.2.1. Precisión del sistema.	34
9.2.2. Exactitud y repetibilidad.	35
9.2.3. Precisión del método.	36
9.2.4. Linealidad del método.	37
9.2.5. Linealidad del sistema.	39
9.2.6. Robustez.	41
<b>10. RESULTADOS DEL ESCALAMIENTO DEL MÉTODO OFICIAL.</b>	42
<b>11. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN A LA ESCALA DE 25 POR CIENTO.</b>	44
11.1. Precisión del sistema.	44
11.2. Exactitud y repetibilidad.	45
11.3. Precisión del método.	46
11.4. Linealidad del método.	47
11.5. Linealidad del sistema.	49
11.6. Robustez.	51
<b>12. COMPARACIÓN DE COSTOS DE LOS MÉTODOS.</b>	52
<b>13. COMPARACIÓN DE LA GENERACIÓN DE DESECHOS ENTRE AMBOS MÉTODOS.</b>	53
<b>14. CONCLUSIONES.</b>	54
<b>15. REFERENCIAS.</b>	55
<b>INDICE DE TABLAS.</b>	
<b>Tabla 1.</b> Las técnicas en la Microquímica y sus precursores.	2
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de desempeño a estudiar en la validación.	17
<b>Tabla 3.</b> Lista de reactivos, marca y lote.	24
<b>Tabla 4.</b> Lista de material, características y volumen.	24
<b>Tabla 5.</b> Lista de equipos e instrumentos, marca y modelo.	24
<b>Tabla 6.</b> Tabla de solubilidad.	27
<b>Tabla 7.</b> Resultados obtenidos en la identificación de benzoil metronidazol.	33
<b>Tabla 8.</b> Precisión del sistema, respuesta analítica y parámetros estadísticos.	34

<b>Tabla 9.</b> Cantidad recuperada, parámetros estadísticos y criterios de aceptación para exactitud y repetibilidad.	35
<b>Tabla 10.</b> Parámetros estadísticos, criterios de aceptación y contenido de analito para precisión del método.	36
<b>Tabla 11.</b> Cantidad recuperada, cantidad adicionada, por ciento de recobro, parámetros estadísticos y criterios de aceptación para linealidad del método.	37
<b>Tabla 12.</b> Concentración teórica, respuesta analítica y criterios de aceptación para linealidad del sistema.	39
<b>Tabla 13.</b> Concentración en por ciento, promedio aritmético de la concentración en por ciento y criterios de aceptación para robustez.	41
<b>Tabla 14.</b> Tabla de análisis de varianza considerando los 4 niveles de concentración.	42
<b>Tabla 15.</b> Respuesta analítica, parámetros estadísticos y criterios de aceptación para precisión del sistema.	44
<b>Tabla 16.</b> Exactitud y repetibilidad, por ciento de recobro, parámetros estadísticos y criterios de aceptación.	45
<b>Tabla 17.</b> Contenido del analito, parámetros estadísticos y criterios de aceptación para precisión del método.	46
<b>Tabla 18.</b> Cantidad recuperada, cantidad adicionada, por ciento de Recobro y criterios de aceptación para linealidad del método.	47
<b>Tabla 19.</b> Concentración teórica, respuesta analítica y criterios de aceptación para linealidad del sistema.	49
<b>Tabla 20.</b> Concentración en porcentaje, promedio aritmético de la concentración en porcentaje y criterios de aceptación para robustez.	51
<b>Tabla 21.</b> Comparación de costos del método al 100 por ciento y del método al 25 por ciento.	52
<b>Tabla 22.</b> Comparación de la generación de desechos del método al 100 por ciento y del método al 25 por ciento.	53



---

---

## INTRODUCCIÓN.

En nuestros días se ha hecho más evidente la necesidad de reducir la escala de los métodos analíticos en los laboratorios escolares e industriales, con el fin de proteger el medio ambiente, la seguridad de los trabajadores y disminuir los elevados costos de operación de los laboratorios. Para llevar a cabo las distintas técnicas de microescala las cantidades son menores de 1g o de 2 mL.

Para obtener una mayor seguridad en los laboratorios de análisis farmacéutico, la introducción de la microescala es una herramienta muy útil de acuerdo con los resultados que proporciona, es decir, actualmente en los laboratorios se realiza la valoración y validación de un método analítico utilizando gramos de analito o muestra; la técnica de microescala consiste en utilizar la cantidad mínima necesaria para realizar dicho análisis. La microescala proporciona una mayor seguridad tanto en el laboratorio como en el personal, ya que se manejan volúmenes pequeños de reactivos para la preparación de soluciones o de las muestras.

En comparación con los métodos analíticos tradicionales el manejo de material voluminoso a veces resulta incomodo, ya que, durante su traslado o uso se puede llegar a tener descuidos y por ende romper el material. Con la microescala el volumen del material utilizado es menor y por lo tanto el manejo del material resulta más fácil y apropiado. Una de las características de la microescala en este rubro es la reducción del costo de material que se llega a romper en el transcurso del análisis.

La microescala ayuda a tener una mayor higiene dentro del laboratorio de análisis como para con el medio ambiente, ya que se produce una menor cantidad de desechos tóxicos, por lo cuál se reduce el costo de operación por el servicio de recolecta de los mismos.

---

---

---

El desarrollo del método analítico para valorar benzoil metronidazol utilizando la microescala para su realización es una forma de comprobar que todo lo relacionado con esta técnica se puede aplicar a un método analítico para ser reproducido dentro de un laboratorio de análisis farmacéutico. Para demostrar que la realización del método a microescala es confiable y pueda ser sugerido como método analítico es necesario validarlo.

El prototipo de la validación actualmente se encuentra en la industria farmacéutica. Esto es debido a que los métodos analíticos utilizados para medir la calidad de los productos farmacéuticos abarcan casi todo el rango de las tecnologías y técnicas de que se dispone actualmente. Desde el inmunoensayo y las técnicas electroforéticas, hasta los métodos cromatográficos y potenciométricos utilizados para evaluar la calidad de las moléculas pequeñas.

Un método de análisis realizado a microescala validado asegura que el proceso producirá de manera consistente un producto de calidad predeterminada. De aquí la importancia de la microescala en todos sus aspectos ya que ayuda a tener un mayor aseguramiento de la calidad y a la innovación de nuevos procedimientos para cuantificar analitos en muestras muy pequeñas.

---

---

---

## 1. MARCO TEÓRICO.

### 1.1. Microquímica y Microanálisis.

La Microquímica y su rama más relevante, el análisis microquímico, son ejemplo muy característico de la Ciencia nacida, no por extensión de la base de otra y subsiguiente fragmentación, sino por agudización de las necesidades y, en consecuencia de los métodos de la preexistente. Reposa sobre las mismas bases teóricas que su antecesora, residiendo su originalidad en sus técnicas y por lo tanto, en su instrumental de trabajo, de una finura acomodada a los nuevos requerimientos.<sup>1</sup>

Es difícil señalar donde empieza el microanálisis propiamente dicho, ya que existen todos los grados intermedios, desde la escala ordinaria hasta el ultramicroanálisis más refinado; el descenso en las cantidades de material manejado va desde los gramos a los microgramos y aún décimas de microgramo, con una diferencia, por tanto, del orden de decenas de millones.<sup>1</sup>

Con la publicación del primer número de la revista *Mikrochemic*, en el año de 1923, la Microquímica recibió su confirmación como ciencia. El microanálisis, parte la más importante de aquella, constituye, sin duda, una reciente modalidad de la Química analítica.<sup>1</sup>

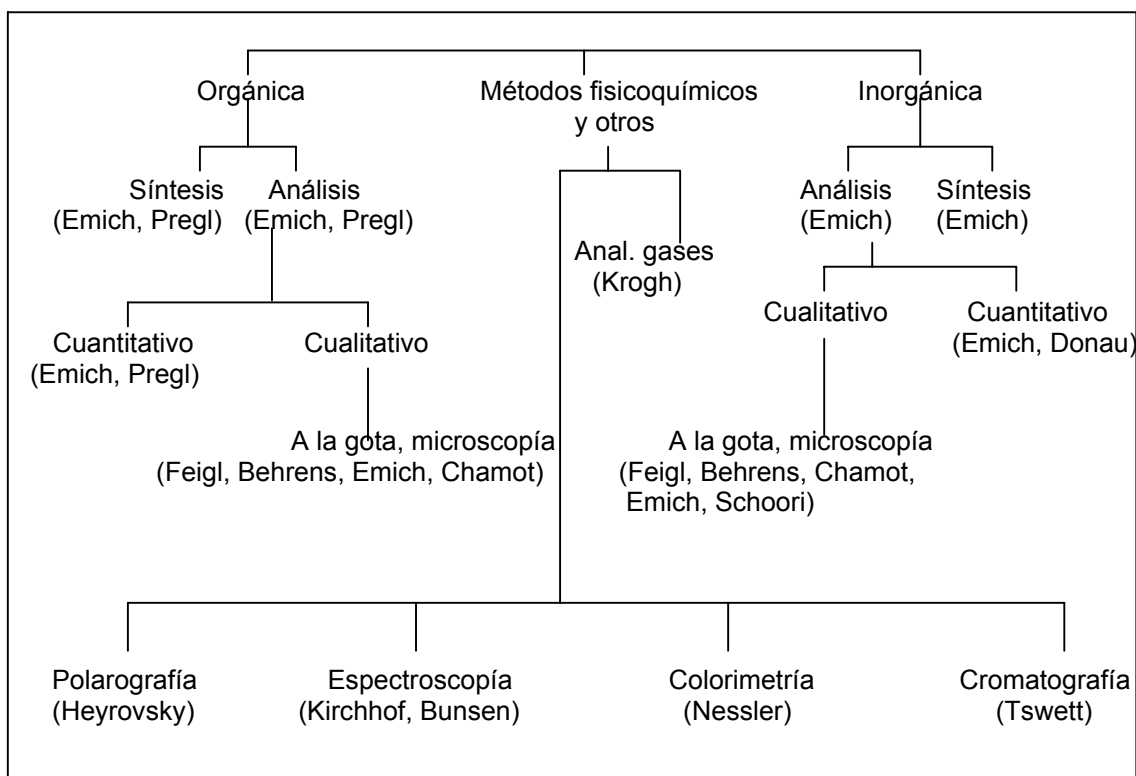
El primero y único trabajo de Química Analítica del que se tiene noticia que ha sido galardonado con el Premio Nóbel, es el *Microanálisis orgánico cuantitativo*, de Fritz Pregl. Las técnicas de Pregl se incorporaron pronto a todos los laboratorios de solvencia en Química orgánica, como poderoso y, muy frecuentemente, imprescindible medio de investigación.<sup>1</sup>

Pero, en contra de la creencia bastante generalizada, la Microquímica es algo más que el análisis de pequeñas muestras orgánicas. Es, nada más y nada menos, que toda la química orgánica e inorgánica-análisis y síntesis-experimentada en escala sustancialmente 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 las técnicas clásicas.<sup>1</sup>

Conviene insistir sobre el hecho de que los métodos microquímicos no presentan dificultades manipulativas extraordinarias. Cualquiera que esté dotado de una formación analítica aceptable, preparándose unos meses 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.<sup>1</sup>

**Tabla 1.** Las técnicas en la Microquímica y sus precursores.



---

---

## 1.2. Microescala.

En nuestros días se ha hecho más evidente la necesidad de reducir la escala de los métodos analíticos en los laboratorios escolares e industriales, con el fin de proteger el medio ambiente, la seguridad de los trabajadores y disminuir los elevados costos de operación de los laboratorios.

Hace algunos años lo común era trabajar con 50 o 100 g para sólidos y 500 a 2000 mL para líquidos. Para llevar a cabo las distintas técnicas de microescala las cantidades son menores de 1g o de 2 mL, estas cantidades oscilan entre los 25 mg a 150 mg para sólidos y de 100 a 200 mL para líquidos.

El fin de la técnica en microescala radica en dirigir los métodos experimentales a las cantidades mínimas de reactivos químicos requeridos y obtener los mismos resultados que con los métodos tradicionales en donde las cantidades de estos son elevadas. Por lo que esta técnica es una excelente forma para enseñar la química experimental en los laboratorios escolares.

### 1.2.1. Ventajas.

Las ventajas de la Química a microescala son:

- ♦ Reducción en el uso de productos químicos, y por lo tanto la reducción de residuos en su origen.<sup>2</sup>
- ♦ Reducción tanto en los costos de compra, así como, del reciclaje y de la recopilación de los materiales.<sup>2</sup>
- ♦ Se produce un aumento considerable de la seguridad e higiene en el laboratorio, de forma tal que se puede mejorar la calidad

---

---

de aire, se produce una menor exposición a productos químicos tóxicos, existe una menor posibilidad de que se inicie un fuego o se produzca una explosión y se disminuiría el número de accidentes por el derrame de productos químicos.<sup>2</sup>

- ♦ Menor costo en vidrio roto, debido al costo del material convencional más pequeño (vasos, matraces, pipetas, placas, etc.), en la actualidad los equipos que se utilizan para la microescala son con juntas ensamblables algunas de ellas esmeriladas o con rosca, son de alguna forma más costosos que el material convencional.<sup>2</sup>
- ♦ De acuerdo con la tendencia de utilizar la microescala tanto en laboratorios escolares como en la industria, se espera que el costo del material disminuya debido a que habría un mayor número de proveedores, los cuales conforme se incremente la oferta y la demanda de material tendrían que disminuir su costo.<sup>2</sup>
- ♦ Implementar la política medioambiental que promueve el principio de las 3R's: Reducir, reciclar y recuperar.<sup>2</sup>
- ♦ Operar de manera más racional posible de acuerdo a la técnica utilizada, es decir ninguna de las técnicas es más difícil de aprender y aplicar con respecto a las técnicas convencionales. De hecho el material a utilizar es más fácil de montar que los convencionales.<sup>2</sup>
- ♦ Adquisición de destreza en el manejo de materiales y productos, desarrollo de habilidades que no se adquieren a escala normal.<sup>2</sup>
- ♦ Ahorro de tiempo en la dedicación al análisis e interpretación de resultados. Por otro lado se reduce el tiempo de reacción de los experimentos realizados a microescala en comparación con los realizados de manera convencional.<sup>2</sup>

Actualmente más productos son caracterizados por técnicas instrumentales, incluyendo análisis térmicos, infrarrojo, resonancia magnética nuclear, y espectroscopia. Estas técnicas son inherentemente en microescala, ya que se requiere 1 g de producto

---

---

para un estudio completo, suficiente para caracterizar el material en varios métodos.<sup>3</sup>

### **1.2.2. Desventajas.**

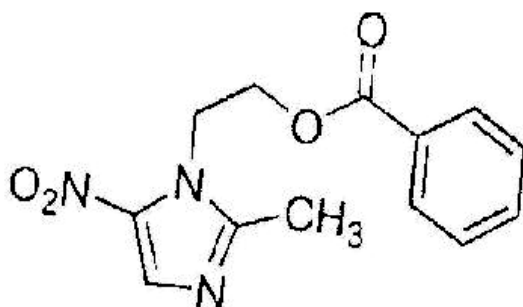
No propiamente se trata de desventajas, sino de pormenores o inconvenientes que se pueden presentar como:

- ♦ Adquisición de material de vidrio más preciso y especial, así como de equipos de medición más sofisticados y reactivos químicamente más puros.<sup>4</sup>
  
- ♦ La dificultad de observar ciertos fenómenos en comparación a una escala normal, como la transferencia de calor. Por lo que la microescala se apoya de diversas técnicas instrumentales más recientes como la cromatografía de alta resolución de gases o líquidos, o de técnicas de análisis térmico.<sup>4</sup>
  
- ♦ El realizar una escrupulosa limpieza del material y el limitarse a no poder usar grasas para sellar las juntas esmeriladas, debido a que se produce un incremento en el riesgo de contaminación del producto y por lo consiguiente obtener un rendimiento menor.<sup>4</sup>

---

---

### 1.3. Características de benzoil metronidazol.



Polvo cristalino, blanco o amarillo claro.

Soluble en ácido acético, cloroformo, acetona y benceno. Poco soluble en alcohol y eter dietílico; casi insoluble en agua.

Fórmula:  $C_{13}H_{13}O_4N_3$  MM 276.26.

Temperatura de fusión: entre 98°C y 102°C. <sup>5</sup>

#### 1.3.1. Indicaciones terapéuticas.

Tratamiento de la amebiasis intestinal aguda y crónica, amebiasis luminal y extraluminal, incluyendo el absceso hepático amebiano. También está indicado en el tratamiento de infecciones bacterianas por anaerobios. Está indicado en el tratamiento de la tricomoniasis sintomático y asintomático para ambos sexos, y en el tratamiento de giardiasis. <sup>6</sup>

#### 1.3.2. Farmacocinética y farmacodinamia.



---

---

El metronidazol posee una actividad antiprotozoaria y antimicrobiana sobre formas intestinales y sistémicas muy amplias; es un amebicida de tipo difusible de acción directa y efecto destructor sobre la *E. histolytica* en sus formas quística y trofozoita. También actúa contra bacterias anaerobias obligadas como bacteroides y *Fusobacterium spp*, es útil en todas las formas de amebiasis, pero particularmente en la extra intestinal y en la tricomoniasis de localización intra y extra vaginal en la mujer y en las del tracto genitourinario del hombre. <sup>6</sup>

Por su bajo peso molecular, el metronidazol se difunde por todos los tejidos y líquidos del organismo, incluyendo líquido cefalorraquídeo, alveolas, saliva, lágrimas, esperma en el hombre y leche materna en la mujer. <sup>6</sup>

Se metaboliza en el hígado y se elimina a través de la orina, heces y leche materna. <sup>6</sup>

### **1.3.3. Contraindicaciones.**

Hipersensibilidad al principio activo. Pacientes con antecedentes de discrasias sanguíneas. No debe usarse en forma simultánea con alcohol (posee efecto disulfiram). El metronidazol cruza la placenta, por lo que su uso no se recomienda durante el primer trimestre del embarazo. No se administre a pacientes con enfermedad orgánica del SNC. No se debe administrar a pacientes con insuficiencia hepática grave. <sup>6</sup>

### **1.3.4. Restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia.**

El metronidazol atraviesa la placenta y penetra a la circulación fetal rápidamente. <sup>6</sup>

El uso de metronidazol en el tratamiento de la tricomoniasis no debe recomendarse en el primer trimestre del embarazo. Su uso en el segundo y tercer trimestre del embarazo sólo se recomienda en pacientes con sintomatología que no pueda controlarse con otras

---

---

medidas terapéuticas locales por el riesgo de producir altos niveles de metronidazol en sangre materna y fetal. <sup>6</sup>

El metronidazol es excretado por leche materna; sus concentraciones son similares a las del plasma materno. No se recomienda su uso en la lactancia, durante este tipo de tratamientos debe suspenderse la lactancia y reiniciarla 24 a 48 horas después de discontinuar el tratamiento. <sup>6</sup>

### **1.3.5. Reacciones secundarias y adversas.**

Náuseas, vómito, sabor metálico y desagradable en la boca, cefalea, diarrea, mareo, prurito. A dosis altas fiebre, eritema, leucopenia, convulsiones, neuropatía periférica. <sup>6</sup>

### **1.3.6. Interacciones medicamentosas y de otro género.**

Si se toman bebidas alcohólicas se presenta una reacción disulfirámica caracterizada por enrojecimiento y sensación de calor en la cara, cefalea y ocasionalmente descenso de la tensión arterial. Todas estas reacciones desaparecen al terminar el tratamiento. <sup>6</sup>

Se ha informado que el metronidazol potencia los efectos anticoagulantes de agentes cumarínicos. Su efecto disulfiram obliga a que no se ingiera alcohol durante el tratamiento. <sup>6</sup>

La ingestión simultánea de barbitúricos reduce la vida media del metronidazol.

Puede disminuirse el metabolismo hepático del metronidazol usado en conjunto con cimetidina, lo que retarda su eliminación y aumenta su concentración sérica y por lo tanto su toxicidad potencial. <sup>6</sup>

### **1.3.7. Presentaciones comerciales.**

---

---

Flagenol-S. Tratamiento de la amebiasis intestinal. Suspensión.  
ALLEN. <sup>6</sup>

Nidrozol. Tricomonica, lamblicida y amebicida. Suspensión, tabletas.  
IVAX. <sup>6</sup>

Stomffler. Antibacteriano. Suspensión. LOEFFLER. <sup>6</sup>

### **1.3.8. Método analítico para la valoración de benzoil metronidazol.**

Disolver 250 mg de la muestra en 50 mL de ácido acético glacial y 10 mL de anhídrido acético, titular con solución 0.1 N de ácido perclórico, determinando el punto final potenciométricamente. Efectuar una determinación en blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mililitro de solución 0.1 N de ácido perclórico equivale a 27.53 mg de benzoil metronidazol. <sup>5</sup>

---

---

## 1.4. Potenciometría.

### 1.4.1. Definición.

Los métodos potenciométricos de análisis se basan en las medidas del potencial de celdas electroquímicas en ausencia de corrientes apreciables. Desde el comienzo del siglo XX, las técnicas potenciométricas se han utilizado para la detección de los puntos finales en los métodos volumétricos de análisis.<sup>7</sup>

De origen más reciente son los métodos en los que las concentraciones de los iones se obtienen directamente del potencial de un electrodo de membrana selectiva de iones. Tales electrodos están relativamente libres de interferencias y proporcionan un medio rápido y conveniente para estimaciones cuantitativas de numerosos aniones y cationes importantes. El equipo requerido para los métodos potenciométricos es sencillo y económico e incluye un electrodo de referencia, un electrodo indicador y un dispositivo para la medida de potencial.<sup>7</sup>

Las titulaciones potenciométricas se encuentran entre las más exactas, porque el potencial sigue el cambio real de actividad, y por tanto, el punto final a menudo coincidirá directamente con el punto de equivalencia.<sup>8</sup>

En la titulación volumétrica de una sustancia en solución, contenida en un recipiente adecuado, se utiliza una solución previamente valorada determinando electrométricamente el punto final, por medio

---

---

de un medidor potenciométrico, o visualmente si se usa un indicador interno.<sup>5</sup>

La solución valorada se selecciona respecto a su normalidad, de tal manera que el volumen agregado, por medio de una bureta graduada, sea entre el 30 por ciento y el 100 por ciento de la capacidad nominal de la bureta.<sup>5</sup>

***Nota:** cuando se requiere menos de 10 mL de solución valorada, se deberá utilizar una microbureta. Cuando el punto final se aproxima, la solución volumétrica se agrega gota a gota, hasta que la última adición corresponda al punto final. La cantidad de sustancia contenida en la solución muestra, se calcula de acuerdo con el volumen utilizado, tomando en cuenta la normalidad de la solución volumétrica y el factor de equivalencia de la sustancia.*<sup>5</sup>

#### **1.4.2. Métodos para determinar el punto de equivalencia.**

##### **1.4.2.1. Método de las tangentes.**

Si se grafica el potencial obtenido después de cada adición del titulante contra el volumen del mismo, se obtiene una curva cuya inflexión corresponde al punto de equivalencia, el cual se determina trazando las tangentes a dicha inflexión. Cuando la diferencia de potencial entre el oxidante y el reductor es muy grande en el punto de equivalencia el cambio de potencial es muy pronunciado y puede dar lugar a un error considerable si la tangente en el eje de las ordenadas no se traza en forma adecuada.<sup>9</sup>

##### **1.4.2.2. Gráfica de la primera derivada.**

Al añadir titulante la reacción de cambio del potencial alcanza un valor máximo en el punto final. Así, si se graficase la relación de cambio del potencial al variar el volumen ( $\Delta E / \Delta V$ ) contra el volumen, se obtendrá una curva en forma de espiga y la punta de la misma coincidirá con el punto final. Esto se logra de manera conveniente añadiendo cantidades adicionales iguales de titulante en las cercanías del punto final.<sup>8</sup>

##### **1.4.2.3. Gráfica de la segunda derivada.**

---

---

Se basa en el principio matemático de que la segunda derivada de la curva de titulación  $\Delta^2 E / \Delta V^2$  es cero en el punto en el que el valor de la primera derivada  $\Delta E / \Delta V$  es un máximo. Como la segunda derivada cambia de signo. Cuando los incrementos de volumen son muy pequeños, se pueden unir los puntos máximo y mínimo por medio de una línea recta. El punto de equivalencia se puede determinar por interpolación matemática de acuerdo con la expresión: <sup>9</sup>

$$V = V_1 + \Delta V \left( \frac{\Delta^2 E / \Delta V^2 (\text{máximo})}{\Delta^2 E / \Delta V^2 (\text{máximo}) - \Delta^2 E / \Delta V^2 (\text{mínimo})} \right)$$

Donde: V = volumen en el punto de equivalencia.

$V_1$  = volumen al cuál la segunda derivada  $\Delta^2 E / \Delta V^2$  tiene el máximo valor.

$\Delta V$  = incremento de volumen.

---

---

## **1.5. Validación.**

### **1.5.1. Definición.**

Es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.<sup>10</sup>

### **1.5.2. Validación de métodos analíticos.**

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar lo conveniente que es para el propósito considerado.<sup>11</sup>

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.<sup>12</sup>

En la validación de métodos se suele hacer una división de los mismos en dos grandes categorías: aquellos métodos que son solamente cualitativos y los que son, además, cuantitativos. La diferencia entre ambas categorías estriba en el nivel de análisis de los datos, lo cual implica un tratamiento más exhaustivo de los

---

---

resultados (en el caso de los métodos cuantitativos) o un nivel menos extenso de los mismos (en el caso del método cualitativo).<sup>13</sup>

La parte medular de la validación es, sin duda, la aplicación de toda una serie de fórmulas y criterios para el manejo de los datos que se obtienen en el laboratorio al hacer un análisis o un experimento de manera repetida. Finalmente, se obtiene una serie de números y datos que, vistos de golpe, no nos dicen nada. Sin embargo, el agrupamiento, manejo y evaluación de los mismos arroja resultados que, a lo largo de los años y con el desarrollo de la validación se han convertido en lenguaje común y se han venido uniformizando para poder establecer, con unos cuantos resultados, si un método es válido o no.<sup>5</sup>

### **1.5.3. Justificación legal para realizar la validación de un método analítico.**

Un método analítico es identificado como un sistema crítico en el aseguramiento de la calidad, ya que tiene repercusión directa en el producto. La constante de las empresas por alcanzar una mayor productividad a menores costos, está determinada entre otros factores, al dictamen del producto y de sus materias primas en corto tiempo, utilizando métodos de prueba de menor costo y menor tiempo. por lo que el profesional farmacéutico es el responsable de la calidad de los procesos, por lo que todo producto debe de satisfacer los requisitos mediante la validación de los métodos analíticos.

El Reglamento de Insumos para la Salud hace referencia a los establecimientos que se dediquen a la fabricación de insumos (medicamentos, fármacos, materias primas y aditivos) y establece que: los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos, llevarán el control analítico de estos. Dicho control deberá incluir, la validación de las técnicas empleadas.

La Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998. buenas prácticas de fabricación para fármacos que establece: que los controles de laboratorio e inspecciones deben apoyarse en normas, PNO's o manuales que contengan las especificaciones para garantizar la confiabilidad de sus resultados. Tales controles deben incluir: validación de métodos analíticos utilizados por la empresa, no



---

---

farmacopéicos o farmacopéicos que tengan desviaciones frente a la farmacopea de referencia.

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos; establece que:

- Se lleven a cabo estudios de validación de los procesos de fabricación y de los sistemas involucrados.
- Los métodos analíticos deben ser validados, de acuerdo a lo establecido en el apartado "control del laboratorio analítico".
- Debe contarse con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima.

#### **1.5.4. Procedimientos analíticos a ser validados.**

La discusión de la validación de procedimientos analíticos esta dirigida a los cuatro tipos más comunes de procedimientos analíticos.<sup>11</sup>

- Pruebas de identificación.<sup>11</sup>
- Pruebas cuantitativas para el contenido de impurezas.<sup>11</sup>
- Pruebas límite para el control de impurezas.<sup>11</sup>
- Pruebas cuantitativas del activo en muestras de sustancia o del producto terminado o de otros componentes seleccionados en el producto.<sup>11</sup>

Las pruebas de identificación están destinadas a asegurar la presencia de un analito en una muestra. Esto se logra normalmente mediante la comparación de una propiedad de la muestra (por ejemplo, espectro, comportamiento cromatográfico, reactividad química, etc.) con la de una sustancia de referencia.<sup>11</sup>

---

---

El análisis de impurezas puede ser, ya sea una prueba cuantitativa o una prueba límite para la impureza en una muestra. Cualquiera que sea, se pretende reflejar con exactitud las características de pureza de la muestra.<sup>11</sup>

Los procedimientos de valoración pretenden medir el analito presente en una muestra dada. En este contexto, la valoración representa una medición cuantitativa del o de los componentes principales en una sustancia. Para el producto final, se aplican características de validación similares cuando se trata del activo que para otros componentes seleccionados, las mismas características de validación pueden también aplicarse a las valoraciones asociadas con otros procedimientos analíticos, por ejemplo disolución.<sup>11</sup>

#### **1.5.5. Categorías de ensayo de los métodos analíticos.**

La USP divide los ensayos en categorías asignando a cada una de ellas la diferente información analítica que es necesario obtener, esta clasificación es la siguiente.<sup>13</sup>

Categoría I: Métodos analíticos para la cuantificación de los componentes principales del producto a granel o de los ingredientes activos (incluyendo los conservadores) en los productos terminados.<sup>13</sup>

Categoría II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas en productos a granel o compuestos de degradación en el producto terminado. Estos métodos incluyen ensayos cuantitativos y pruebas límite.<sup>13</sup>

Categoría III: Métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (ej. Disolución, liberación de fármacos).<sup>13</sup>

Categoría IV: Pruebas de identificación.<sup>13</sup>

---

---

### 1.5.6. Parámetros de desempeño en la validación de un método analítico.

En función de la aplicación analítica del método, se indican los siguientes parámetros de desempeño a estudiar.<sup>11</sup>

<sup>11</sup> **TABLA 2.** Parámetros de desempeño a estudiar en validación.

Característica	Identificación	Pruebas de impurezas		Contenido/ potencia/ valoración
		Cuantitativo	Limite	
Exactitud	No	Si	No	Si
Precisión				
Repetibilidad	No	Si	No	Si
Reproducibilidad	No	Si	No	Si
Especificidad	Si	Si	Si	Si

<b>Limite de detección</b>	No	No	Si	No
<b>Limite de cuantificación</b>	No	Si	No	No
<b>Linealidad</b>	No	Si	No	Si
<b>Rango</b>	No	Si	No	Si

#### 1.5.6.1. Especificidad.

La especificidad es la habilidad de evaluar el analito inequívocamente en la presencia de componentes que puede esperarse que esté presente. Típicamente éstos pueden ser impurezas, degradantes, la matriz, etc.,<sup>11</sup>

La carencia de especificidad de un procedimiento analítico individual puede ser compensada por otro procedimiento (s) analítico de apoyo.<sup>11</sup>

Esta definición tiene las implicaciones siguientes:

Identificación: Asegura la identidad de un analito.<sup>11</sup>

Pruebas de Pureza: Asegura que todos los procedimientos analíticos realizados permitan una afirmación exacta del contenido de las impurezas de un analito, p. ej., prueba de sustancias relacionada, metales pesados, contenido de residuos de solvente, etc.<sup>11</sup>

Ensayo (contenido o potencia): Proporcionar un resultado exacto que permite conocer el contenido o potencia del analito en la muestra.<sup>11</sup>

#### 1.5.6.2. Exactitud.

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la cercanía existente entre el valor verdadero que es aceptado como un valor

---

---

convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado.<sup>11</sup>

### **1.5.6.3. Precisión.**

La precisión de un procedimiento analítico expresa la cercanía de los valores (grado de concordancia) entre una serie de medidas obtenidas de varias pruebas de la misma muestra homogénea en las condiciones preestablecidas.<sup>11</sup>

La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.<sup>11</sup>

La precisión debe analizarse utilizando muestras homogéneas, puras. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea que pueda ser analizada se puede realizar preparando muestras simuladas o una solución de la muestra.<sup>11</sup>

La precisión de un procedimiento analítico por lo general es expresada como la variación, desviación estándar o coeficiente de variación de una serie de medidas.<sup>11</sup>

**1.5.6.3.1. Repetibilidad.** La repetibilidad expresa la precisión del funcionamiento en un periodo corto de tiempo bajo las mismas condiciones. La repetibilidad también es llamada intramétodo.<sup>11</sup>

**1.5.6.3.2. Precisión intermedia.** La precisión intermedia expresa las variaciones que existen dentro del laboratorio en diferentes días, con diferentes analistas, equipo diferente, etc.<sup>11</sup>

**1.5.6.3.3. Reproducibilidad.** La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (por lo general en la colaboración de los estudios aplicados a la estandarización de la metodología).<sup>11</sup>

### **1.5.6.4. Límite de detección.**

---

---

El límite de detección de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto. <sup>11</sup>

#### **1.5.6.5. Límite de cuantificación.**

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito en una muestra que cuantitativamente puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptables.

El límite de cuantificación es un parámetro cuantitativo para las pruebas de los niveles más bajos de compuestos en la muestra original, y es usado en lo particular para determinar impurezas y/o productos de degradación. <sup>11</sup>

#### **1.5.6.6. Linealidad.**

La linealidad de un procedimiento analítico es su habilidad (dentro de un rango dado) a obtener de la prueba resultados que son directamente proporcional a la concentración (la cantidad) de analito en la muestra. <sup>11</sup>

#### **1.5.6.7. Rango.**

El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre los niveles superior y más bajo de concentración (cantidad) de analito en la muestra (incluyendo éstos) para los que se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel aceptable de precisión, exactitud y linealidad. <sup>11</sup>

#### **1.5.6.8. Robustez.**

La robustez de un procedimiento analítico es la medida de su capacidad de permanecer normal por las variaciones pequeñas, pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal. <sup>11</sup>

---

---

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Para realizar la valoración de benzoil metronidazol utilizando el método analítico descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, se emplean cantidades elevadas de ácido acético glacial, anhídrido acético y ácido perclórico, lo cual ocasiona que se produzca una gran cantidad de desechos y se tenga que realizar un gasto en el tratamiento de estos ya que son reactivos tóxicos. Por tal motivo se pretende reducir la escala del método oficial con la finalidad de disminuir el costo de la práctica, la generación y tratamiento de los desechos producidos, así como el aumento en la seguridad dentro del laboratorio, además de un beneficio ecológico. La disminución de las cantidades para el experimento se desarrollarán partiendo del método oficial hasta asegurar que se siguen manteniendo los mismos parámetros de validación que en el método oficial, ofreciendo el método desarrollado calidad y veracidad.

---

---

### **3. OBJETIVOS.**

#### **3.1. Objetivo general.**

- ♦ Diseñar, desarrollar y validar un método analítico para la valoración de benzoil metronidazol aplicando la técnica de microescala, que satisfaga los parámetros de desempeño de calidad de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

#### **3.2. Objetivos particulares.**

- ♦ Optimizar el consumo de recursos materiales al desarrollar la técnica de valoración para benzoil metronidazol en microescala.
- ♦ Analizar y comparar el costo de los dos métodos así como la cantidad de productos de desecho producidos tanto por el método convencional como el realizado a microescala.
- ♦ Colaborar en la mejora continua de la enseñanza experimental de la Química en los laboratorios de Química Analítica y de Control de Calidad.



---

---

#### **4. HIPÓTESIS.**

Al aplicar la técnica de microescala en el desarrollo de un método analítico para cuantificar benzoil metronidazol, podrá observarse que al validar el método diseñado y desarrollado, se obtienen los mismos resultados que con el método analítico farmacopéico.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL.

### 5.1. Materiales.

**Tabla 3.** Lista de reactivos, marca y lote.

Nombre del reactivo.	Marca.	Lote.
Ácido acético glacial.	J. T. Baker.	A36C77
Anhídrido acético.	J. T. Baker.	Y28C56, A34C52
Ácido perclórico.	J. T. Baker.	39465
Biftalato de potasio, cristal.	J. T. Baker.	Y09598
Metronidazol, benzoil.	HELM	-----
Cristal violeta.		-----

**Tabla 4.** Lista de material, características y volumen.

Material.	Características.	Marca	Volumen.
Bureta	Vidrio.	PIREX	50 mL, 25 mL, 10 mL
Bureta.	Vidrio.	KIMAX.	10ml.
Matraz volumétrico.	Vidrio.	PIREX.	1000 mL.
Pipeta graduada.	Vidrio.	PIREX.	10 mL, 5 mL y 1 mL.
Probeta.	Vidrio.	PIREX.	50 ml y 25 mL.
Probeta.	Vidrio.	KIMAX.	10mL.
Pinza para bureta.	Acero inoxidable	FELISA.	
Vaso de precipitado.	Vidrio.	KIMAX.	250 mL, 150 mL, 100 mL, 50mL, 30 mL
Vaso de precipitado	Vidrio.	PYREX.	10mL.
Soporte universal.	Acero inoxidable		

**Tabla 5.** Lista de equipos e instrumentos, marca y modelo.

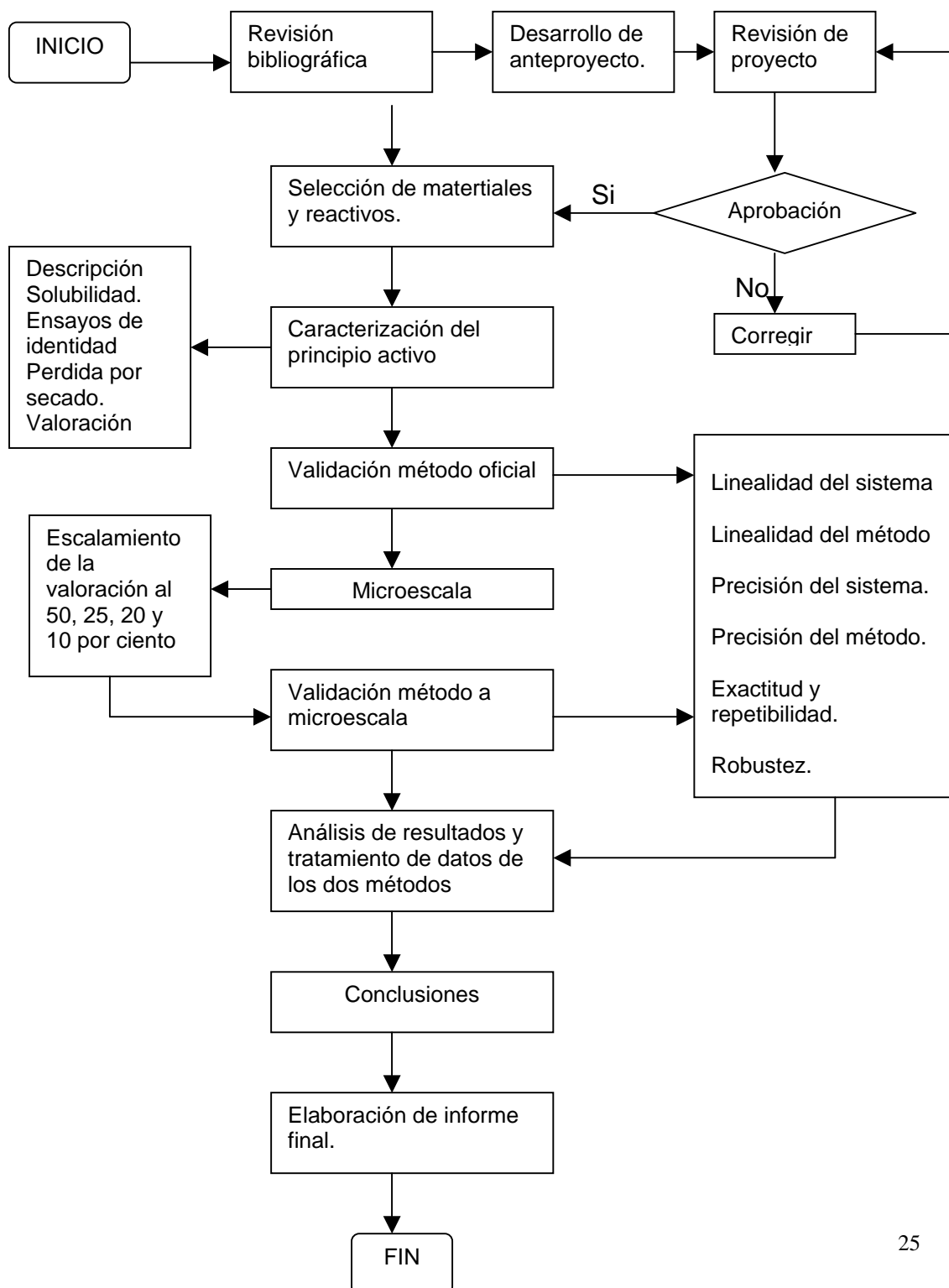
Equipo e instrumentos.	Marca.	Modelo.
Balanza analítica.	OHAUS EXPLORER®PRO	EP214
Campana de humos.	SEV	SP46925
Estufa de secado.	NATIONAL APPLIANCE Co.	5836
Parrilla de agitación.	BARNSTEAD INTERNACIONAL S.A.	CH76
Potenciómetro.	Cole Parmer	

---

---

## 5.2. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

### 5.2.1. Diagrama de flujo.



---

---

## **6. DESARROLLO.**

### **6.1. Caracterización de benzoil metronidazol.**

#### **6.1.1. Sustancia de referencia.**

Se secaron 2 g de benzoil metronidazol durante 4 horas a 60°C, con vacío.

#### **6.1.2. Descripción.**

Polvo cristalino, blanco o amarillo claro.

#### **6.1.3. Ensayo de identidad.**

Se pesó 1 mg de benzoil metronidazol y se disolvió en 100 mL de etanol, la muestra se leyó en el espectro UV, exhibiendo máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que las de una solución similar de la SRef de benzoil metronidazol.

#### **6.1.4. Temperatura de fusión.**

Se colocaron en un cubreobjetos algunos cristales de la muestra, determinando su punto de fusión utilizando el aparato de Fisher-Jhons, la temperatura de fusión fue de 99°C.

#### **6.1.5. Solubilidad.**

Se pesaron por separado 3 muestras de 100 mg de benzoil metronidazol.

Se solubilizó cada muestra en 2.5 mL de ácido acético glacial, en 2.2 mL de acetona o en 2.0 mL de cloroformo.

---

---

Siempre que se menciona la solubilidad, debe entenderse que se toma la temperatura de 25°C y esta propiedad se expresa con los siguientes términos:

**Tabla 6.** Tabla de solubilidad.

Términos.	Partes de disolvente en volumen requeridas para 1 parte de soluto.
Muy soluble.	Menos de una parte.
Fácilmente soluble.	De 1 a 10 partes.
Soluble.	De 11 a 30 partes.
Poco soluble.	De 31 a 100 partes.
Ligeramente soluble.	De 101 a 1000 partes.
Muy ligeramente soluble.	De 1001 a 10000 partes.
Casi insoluble.	Más de 10000 partes.

#### **6.1.6. Pérdida por secado.**

Se pesaron 2 g de benzoil metronidazol, los cuales se secaron durante 3 horas a 80°C en una estufa de desecación. La pérdida no fué de más de 0.5 por ciento.

#### **6.1.7. Valoración.**

Se pesaron 250 mg de la muestra y se disolvieron en 50 mL de ácido acético glacial y 10 mL de anhídrido acético, se titularon con solución 0.1 N de ácido perclórico, determinado el punto final potenciométricamente. Se realizó una determinación en blanco para realizar las correcciones necesarias. Cada mililitro de solución 0.1 N de ácido perclórico equivale a 27.53 mg de benzoil metronidazol.

---

---

## **6.2. Realización a microescala del método analítico farmacopéico.**

### **6.2.1. Microescala a un 50 por ciento.**

Se pesaron 125 mg de la muestra y se disolvieron en 25 mL de ácido acético glacial y 5 mL de anhídrido acético, se titularon con solución 0.1 N de ácido perclórico, determinado el punto final potenciométricamente. Se efectuó una determinación en blanco para realizar las correcciones necesarias. Cada mililitro de solución 0.1 N de ácido perclórico equivale a 27.53 mg de benzoil metronidazol.

### **6.2.2. Microescala a un 25 por ciento.**

Se pesaron 62.5 mg de la muestra y se disolvieron en 12.5 mL de ácido acético glacial y 2.5 mL de anhídrido acético, se titularon con solución 0.1 N de ácido perclórico, determinado el punto final potenciométricamente. Se efectuó una determinación en blanco para realizar las correcciones necesarias. Cada mililitro de solución 0.1 N de ácido perclórico equivale a 27.53 mg de benzoil metronidazol.

### **6.2.3. Microescala a un 20 por ciento.**

Se pesaron 50 mg de la muestra y se disolvieron en 10 mL de ácido acético glacial y 2 mL de anhídrido acético, se titularon con solución 0.1 N de ácido perclórico, determinado el punto final potenciométricamente. Se efectuó una determinación en blanco para realizar las correcciones necesarias. Cada mililitro de solución 0.1 N de ácido perclórico equivale a 27.53 mg de benzoil metronidazol.

### **6.2.4. Microescala a un 10 por ciento.**

Se pesaron 25 mg de la muestra y se disolvieron en 5 mL de ácido acético glacial y 1 mL de anhídrido acético, se titularon con solución 0.1 N de ácido perclórico, determinado el punto final potenciométricamente. Se efectuó una determinación en blanco para realizar las correcciones necesarias.

Cada mililitro de solución 0.1 N de ácido perclórico equivale a 27.53 mg de benzoil metronidazol.

---

---

## **7. Selección del método en microescala a validar.**

Es necesario hacer un estudio estadístico para seleccionar el método a menor escala que no presente una respuesta analítica significativamente diferente al método oficial.

Para obtener la muestra analítica se realizó por sextuplicado la escala de trabajo (100, 50, 25, 20 y 10 por ciento). Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de un solo factor para proceder a validar a la menor escala, que no represente diferencias significativas a un 5 por ciento con respecto a las respuestas analíticas de cada escala del método analítico.

---

---

## 8. Metodología de validación.

### 8.1. Linealidad del sistema.

Se prepararon 5 niveles de concentración. El nivel de concentración central debe ser el 100 por ciento, y deben de prepararse dos niveles de concentración inferiores (80 por ciento y 90 por ciento) y 2 superiores (110 por ciento y 120 por ciento). Cada nivel de concentración fue preparada por triplicado por pesadas separadas. Midiéndose la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportando la relación concentración contra respuesta analítica.

Se calcularon, el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de correlación y el coeficiente de variación (CV) para la señal analítica contra la concentración.

Los criterios de aceptación son:  $r^2 \geq 0.98$ , pendiente mayor a cero, ordenada al origen igual a cero. Se determinaron los intervalos de confianza para los parámetros estipulados. Con estos datos, se dictamina si todo el sistema (potenciómetro) analítico funciona correctamente.

Linealidad del sistema:

m (pendiente)

b (ordenada al origen)

$r^2$  (coeficiente de determinación)

### 8.2. Precisión del método.

#### 8.2.1. Repetibilidad.

Se determinó el CV considerando los valores que corresponden al 80, 100 y 120 por ciento de la concentración obtenidos en la linealidad del método.

El CV del por ciento de recobro, debe ser menor a 2 por ciento.



---

---

### **8.2.2. Precisión intermedia.**

Se analizó por triplicado una muestra homogénea del producto que contenía un nivel igual al 100 por ciento en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Cumpliendo con el método analítico.

Reportándose el contenido de cada muestra y se calculó el promedio aritmético, desviación estándar y el coeficiente de variación total (CV).

El CV debe ser menor o igual al 2 por ciento si el método es volumétrico o no mayor del 3 por ciento si el método es químico o espectrofotométrico.

### **8.3. Linealidad del método.**

Se graficó una curva de concentraciones de 80, 90, 100, 110 y 120 por ciento a partir de pesadas separadas, haciendo el análisis por triplicado para cada una de las concentraciones.

Fue reportada la relación de cantidad adicionada contra cantidad recuperada como por ciento de cada muestra.

Se calculó 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 la regresión.

Los criterios de aceptación de el coeficiente de determinación de la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada fueron mínimo 0.98, el intervalo de confianza de la pendiente debe de incluir la unidad, el intervalo de confianza para la ordenada al origen debe incluir el cero, el coeficiente de variación de la regresión no debe ser mayor de 2 por ciento si el método es volumétrico o no mayor del 3 por ciento si el método es químico o espectrofotométrico.

---

---

#### **8.4. Exactitud y repetibilidad.**

Fueron preparadas 6 muestras por pesadas separadas determinándose las concentraciones bajo las mismas condiciones de operación. Reportando el recobro de cada muestra.

Para el recobro se reporto el promedio aritmético, la desviación estándar, el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza del recobro. El intervalo de confianza del recobro incluyo el 100 por ciento o que el promedio aritmético del por ciento de recobro se incluya en el intervalo.

El coeficiente de variación del recobro no debe ser mayor al 2 por ciento si el método es volumétrico o no mayor del 3 por ciento si el método es químico o espectrofotométrico.

#### **8.5. Robustez.**

Se desarrolló tomando en tres condiciones distintas, empleando en la condición normal el ácido acético glacial y el anhídrido acético utilizado en la validación de los dos métodos, en el segundo caso se cambia el lote de ácido acético glacial utilizado y en la tercer condición se cambia el lote de anhídrido acético.

Reportar el contenido para cada condición y calcular el promedio aritmético de cada condición establecida y de la condición normal de operación. La diferencia absoluta entre el promedio de cada condición respecto a la condición normal de operación, no debe exceder el 2 por ciento para métodos volumétricos y cromatográficos, y no más del 3 por ciento para métodos químicos o espectrofotométricos.

---

---

## 9. Resultados y análisis de resultados.

### 9.1. Identificación de materia prima.

Se realizaron los análisis correspondientes para benzoil metronidazol como materia prima de acuerdo a la monografía reportada en la FEUM, séptima edición, obteniendo los siguientes resultados,

**Tabla 7.** Resultados obtenidos en la identificación de benzoil metronidazol.

<b>Análisis</b>	<b>Especificación</b>	<b>Resultado.</b>
Descripción.	Polvo cristalino, blanco o amarillo claro	Cumple
Solubilidad	Soluble en ácido acético, cloroformo, acetona y benceno. Poco soluble en alcohol, y en eter dietílico; casi insoluble en agua.	Cumple
Ensayo de identidad	El espectro UV de una solución al 0.001 por ciento de la muestra en etanol, exhibe máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que una solución similar de la SRef de benzoil metronidazol.	Cumple
Temperatura de fusión	Entre 98 °C y 102 °C	Cumple
Pérdida por secado	No más de 0.5 por ciento. Secar durante 3 horas a 80 °C	Cumple
Valoración.	Contiene no menos del 98.0 por ciento y no más del 102.0 por ciento.	99.548 por ciento

Se llevaron a cabo los ensayos de identidad de la materia prima para corroborar que se trataba de benzoil metronidazol, cada prueba se realizó por triplicado, por lo que se continuó con la técnica de escalamiento del método oficial, ya que la materia prima cumplió con lo especificado en la FEUM.

---

---

## 9.2. Validación del método analítico farmacopéico.

### 9.2.1. Precisión del sistema.

**Tabla 8.** Precisión del sistema, respuesta analítica y parámetros estadísticos.

<b>Muestra</b>	<b>Respuesta analítica.</b>
1	99.447
2	98.917
3	99.032
4	99.11
5	98.993
6	98.459
<b>Parámetros estadísticos.</b>	
Sumatoria de y	593.958
Promedio de Y	98.993
Desv. estándar	0.32008061
Coeficiente de variación	0.32333661

Se realizó por sextuplicado la preparación a la concentración del analito, determinándose la respuesta analítica y calculándose los parámetros estadísticos de desempeño para el sistema, obteniéndose un coeficiente de variación menor al 1.5 por ciento, por lo que el sistema es preciso al tener los criterios de aceptación favorables.

---

---

### 9.2.2. Exactitud y repetibilidad.

**Tabla 9.** Cantidad recuperada, parámetros estadísticos y criterios de aceptación para exactitud y repetibilidad.

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad recuperada</b>
1	250.402026
2	249.069096
3	248.9602
4	246.37029
5	249.041574
6	248.98698
<b>Parámetros estadísticos.</b>	
Promedio	248.805028
Desv. estándar	1.3161476
Coefficiente de variación.	0.52898754
Intervalo de confianza para la media poblacional	247.423591 a 250.186465

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para la exactitud y repetibilidad del método cuando se desarrolla de manera convencional. El intervalo de confianza del recobro incluye dentro de los intervalos de confianza calculados con el estadígrafo de contraste  $t$  de student al promedio aritmético.

El coeficiente de variación de la cantidad recuperada no excede el 2 por ciento por lo que se cumple con los criterios de aceptación para la exactitud y repetibilidad.

---

---

### 9.2.3. Precisión del método.

**Tabla 10.** Parámetros estadísticos, criterios de aceptación y contenido de analito para precisión del método.

Día	Analista 1	Analista 2
	Contenido de analito (%)	Contenido de analito (%)
1	99.447	99.526
	98.917	100.009
	99.032	99.537
2	99.11	99.486
	98.993	99.558
	98.459	99.508
<b>Parámetros estadísticos</b>		
Suma	1191.582	
Número de datos	12	
Promedio	99.2985	
Desviación estándar	0.40810816	
Coeficiente de variación	0.41099127	

Se analizó por triplicado las muestras cercanas a 250 mg de analito, en dos días diferentes por dos analistas diferentes, bajo las mismas condiciones.

Como se observa en la tabla 10, se reportó la valoración (contenido del analito) de las muestras, calculándose el promedio aritmético, la desviación estándar y el coeficiente de variación el cual cumple con los requisitos señalados para la precisión del método.

---

---

#### 9.2.4. Linealidad del método.

**Tabla 11.** Cantidad recuperada, cantidad adicionada, porcentaje de recobro, parámetros estadísticos y criterios de aceptación para linealidad del método.

Muestras	Recobro (%)	Cantidad adicionada	Cantidad recuperada.
1	99.4011	200.4	199.2
2	99.6063	200.2	199.41
3	99.806	200	199.61
4	99.3777	250.3	248.74
5	99.2085	250.5	248.51
6	99.2085	250.5	248.51
7	99.2827	300.3	298.14
8	99.3487	300.2	298.24
9	99.3307	300.2	298.19
<b>Parámetros estadísticos</b>			
Suma		894.5702	
Suma cuadrados		88917.6182	
Promedio		99.3966889	
Intervalo de confianza para la pendiente		98.9853592 a 99.87212969	
Desviación estándar		0.19440084	
Coefficiente de variación		0.1955808	

Se preparó por triplicado una muestra correspondiente al 80 por ciento, 100 por ciento y 120 por ciento, las cuales fueron analizadas en igualdad de condiciones por un mismo analista, utilizando como referencia la muestra del 100 por ciento (250 mg).

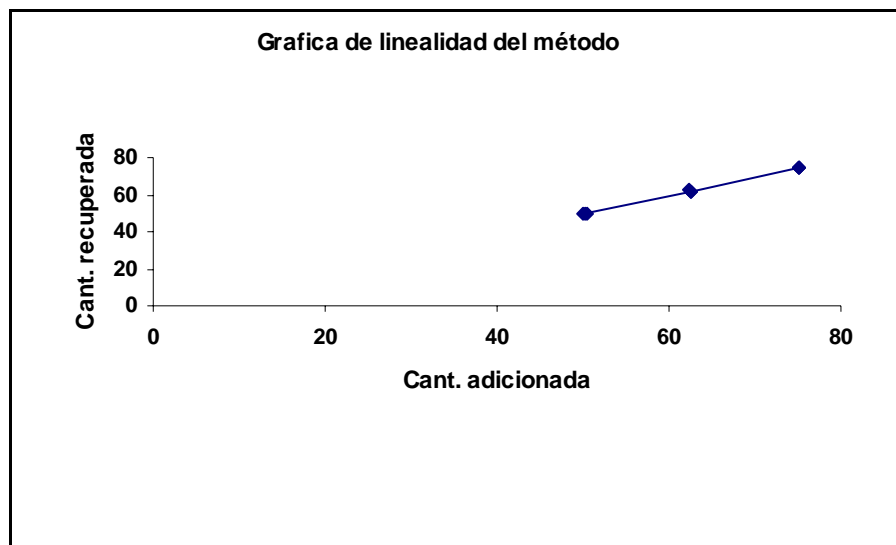
En la tabla 11 como se puede observar se determinó la cantidad de analito recuperada y la cantidad adicionada, el intervalo de confianza

---

---

para la pendiente, el cual incluye la unidad, y el coeficiente de variación menor al por ciento especificado para esta prueba.

**Gráfica 1.** Linealidad del método al 100 por ciento.



En la gráfica se observa la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada con un coeficiente de correlación de 0.999678177 y un coeficiente de determinación de 0.999356457. Por lo tanto el método es lineal y cumple con los criterios de aceptación especificados.



---

---

### 9.2.5. Linealidad del sistema

**Tabla 12.** Concentración teórica respuesta analítica y criterios de aceptación para linealidad del sistema.

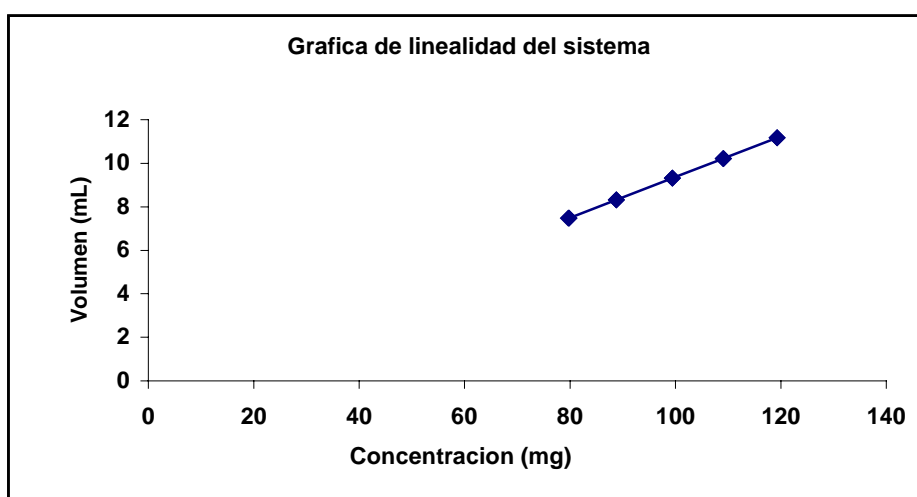
<b>Concentración.</b>	<b>Vol. titulante</b>
79.68	7.475
79.7648	7.475
79.8448	7.475
88.8057	8.325
88.8453	8.325
88.7661	8.325
99.497	9.326
99.407	9.325
99.407	9.325
109.0496	10.224
109.1288	10.224
109.01	10.224
119.2584	11.176
119.298	11.176
119.2764	11.174
<b>Parámetros estadísticos.</b>	
Coeficiente de correlación	0.99999234
Coeficiente de determinación	0.99998467
Pendiente	0.09366348
Ordenada al origen	0.00525
Intervalo de confianza para la ordenada al origen	0.091986289 a 0.09403371

---

---

Se prepararon por triplicado niveles de concentración equivalentes al 80 por ciento, 90 por ciento, 100 por ciento, 110 por ciento y 120 por ciento. Se determinó la respuesta analítica bajo las mismas condiciones a cada una de las concentraciones, calculándose pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación el cual es mayor de 0.98 y el intervalo de confianza para la ordenada al origen.

**Grafica 2.** Linealidad del sistema al 100 por ciento.



La gráfica 2 corresponde a la concentración contra la respuesta analítica, de donde se obtuvieron el coeficiente de correlación y de determinación, así como de la pendiente. Por lo tanto el sistema se considera lineal, ya que cumple con los criterios de aceptación especificados.

---

---

### 9.2.6. Robustez.

**Tabla 13.** Concentración en porcentaje, promedio aritmético de la concentración en por ciento y criterios de aceptación para robustez.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (%)</b>	<b>Promedio aritmético de la concentración en por ciento</b>
1) Condición normal	100.16081	99.7908429
2) Condición normal	99.6276384	
3) Condición normal	99.58408	
1) Cambio de ácido acético glacial	99.0712608	99.23877
2) Cambio de ácido acético glacial	99.0502272	
3) Cambio de ácido acético glacial	99.594822	
1) Cambio de anhídrido acético	99.5953712	99.5951881
2) Cambio de anhídrido acético	99.5953712	
3) Cambio de anhídrido acético	99.594822	
<b>Criterios de aceptación.</b>		
di 1		0.55207293
di 2		0.1956548

Se desarrolló el método en tres condiciones distintas a la normal, variando el número de lote de ácido acético glacial en una y en la otra el número de lote del anhídrido acético. Como se observa en la tabla 13 se reportó la valoración para las tres condiciones. La diferencia absoluta entre ambas condiciones no es mayor al 2 por ciento, por lo tanto el método mantiene su desempeño con respecto a las variaciones propuestas.

---

---

## 10. Resultados del escalamiento del método oficial.

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

Los resultados obtenidos en el escalamiento del método analítico farmacopéico para valorar benzoil metronidazol al 100 por ciento, 50 por ciento, 25 por ciento y 15 por ciento, se utilizaron para realizar la siguiente tabla de análisis de varianza en la cual se divide la variación de los datos en dos componentes; el primero entre grupos y el segundo dentro del grupo para realizar análisis.

**Tabla 14.** Tabla de análisis de varianza considerando los 4 niveles de concentración.

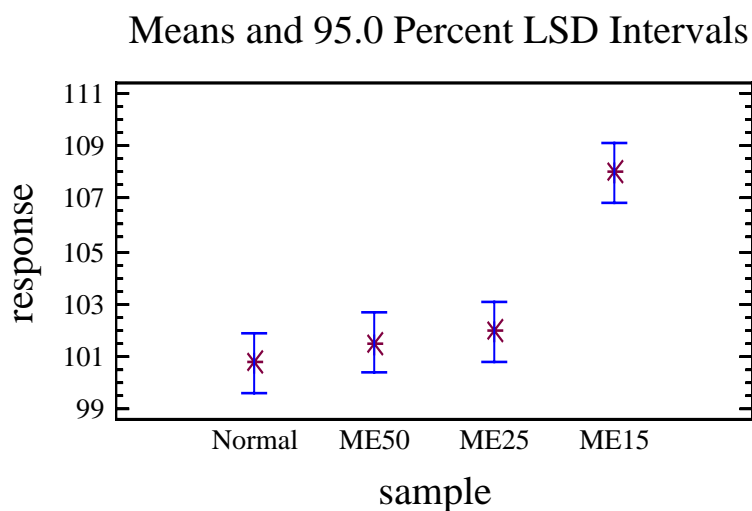
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	196.459	3	65.4863	18.67	0.0000
Within groups	70.1499	20	3.50749		
Total (Corr.)	266.609	23			

En la tabla 14 de análisis de varianza se observa que el valor de P es menor a 0.05 se dice que hay una diferencia significativa al 5 por ciento entre las cantidades medias de las respuestas analíticas para los 4 tratamientos. De acuerdo a esto el propósito de escalar la técnica farmacopéica a una escala menor en la cual se utilice la menor cantidad de reactivos y se obtengan los mismos resultados que en la técnica oficial, se elegiría trabajar con la técnica al 25 por ciento.

---

---

**Grafica 3.** Gráfica de valores medios con un intervalo de confianza del 95 por ciento de la respuesta analítica.



En la gráfica 3 se muestra la media para cada grupo de datos y el error normal de cada media que es una medida de su variabilidad. El nivel 1 es la valoración de benzoil metronidazol al 100 por ciento, el nivel 2 representa la valoración del benzoil metronidazol a un 50 por ciento, el nivel 3 representa la valoración de benzoil metronidazol a un 25 por ciento y en nivel 4 representa la valoración de benzoil metronidazol a un 15 por ciento. Al realizar el microescalamiento del método analítico farmacopéico se va reduciendo el volumen de material utilizado así como de las cantidades de los reactivos, con lo cual solo hasta el nivel 3 se obtuvo una media semejante al nivel 1.

---

---

## 11. Validación del método analítico de valoración a la escala de 25 por ciento.

### 11.1. Precisión del sistema.

**Tabla 15.** Respuesta analítica, parámetros estadísticos y criterios de aceptación para precisión del sistema.

<b>Muestras</b>	<b>Respuesta analítica</b>
62.8	2.349
62.6	2.349
62.5	2.33
62.6	2.33
62.7	2.33
62.7	2.329
<b>Parámetros estadísticos</b>	
Suma	14.017
Promedio	2.33616667
Desviación estándar	0.0099482
Coeficiente de variación	0.42583431

Se pesaron por sextuplicado muestras con las cantidades especificadas para el método al 25 por ciento, como se puede observar en la tabla 14 se determinó la respuesta analítica, calculando los parámetros estadísticos de desempeño, dando resultados dentro de las especificaciones por lo cual se dice que el método es preciso.

---

---

## 11.2. Exactitud y repetibilidad

**Tabla 16.** Exactitud y repetibilidad, por ciento de recobro, parámetros estadísticos y criterios de aceptación.

<b>Muestras</b>	<b>Cantidad recuperada</b>
62.8	62.72778
62.6	62.727704
62.5	62.22
62.6	62.220018
62.7	62.220345
62.7	62.193384
<b>Parámetros estadísticos</b>	
Promedio	62.3848718
Desviación estándar	0.265787
Coefficiente de variación	0.42604546
Intervalo de confianza para la media poblacional	62.66 a 62.10

Se prepararon seis muestras pesadas por separado de acuerdo con las especificaciones del método escalado a un 25 por ciento, las muestras fueron analizadas bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia la muestra y se determinó la cantidad recuperada de analito. Como se observa en la tabla 15 se calculó el intervalo de confianza para la media poblacional que incluye al 100 por ciento, se calculó el promedio del por ciento de recobro y el coeficiente de variación que es menor al especificado.

---

---

### 11.3. Precisión del método

**Tabla 17.** Contenido del analito, parámetros estadísticos y criterios de aceptación para precisión del método.

Día	Analista 1	Analista 2
	Contenido del analito en (%)	Contenido del analito en (%)
1	99.447	99.526
	98.917	100.009
	99.032	99.537
2	99.11	99.486
	98.993	99.558
	98.459	99.508
<b>Parámetros estadísticos</b>		
Promedio	99.4198333	
Desviación estándar	0.15949834	
Coefficiente de variación	0.16033023	

Se analizó por triplicado la muestra con cantidades cercanas a 62.5 mg de analito en dos días diferentes por dos analistas diferentes bajo las mismas condiciones de análisis. Como se observa en la tabla 16 se reportó la valoración (concentración del analito) de las muestras, calculándose el promedio aritmético, desviación estándar y el coeficiente de variación, dando los resultados obtenidos dentro de lo especificado para precisión del método por lo que se dice que el método es preciso y cumple con su diseño.



---

---

#### 11.4. Linealidad del método.

**Tabla 18.** Cantidad recuperada, cantidad adicionada, por ciento de recobro y criterios de aceptación para la linealidad del método.

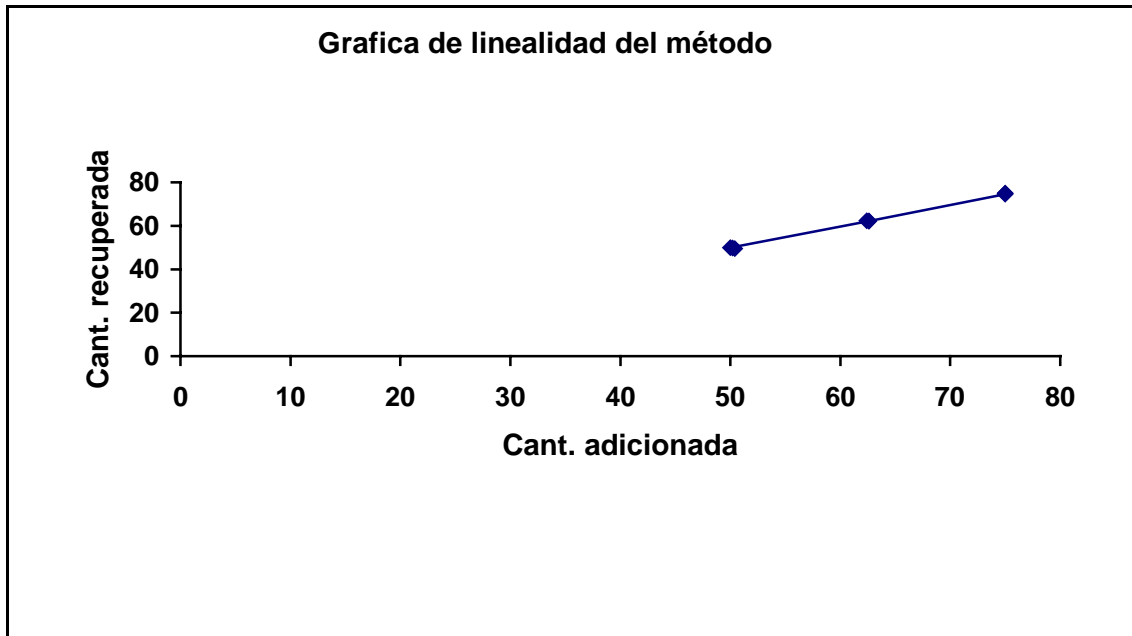
Muestra	Cantidad adicionada	Cantidad recuperada	Por ciento de recobro (%)
1	50.2	49.73	99.0786
2	50.4	49.51	98.241
3	50	49.93	99.873
4	62.6	62.12	99.2342
5	62.4	62.29	99.8287
6	62.6	62.12	99.2342
7	75	74.5	99.339
8	75	75.01	100.015
9	75	75.01	100.015
<b>Parámetros estadísticos.</b>			
Suma		894.8587	
Suma cuadrados		88977.3388	
Promedio		99.4287444	
Desviación estándar		0.57682382	
Coeficiente de variación		0.58013789	
Coeficiente de correlación		0.99967818	
Coeficiente de determinación		0.99935646	
Pendiente		0.98697822	
Intervalo de confianza para la pendiente		98.45867 a 99.56239	

Se preparó por triplicado una muestra correspondiente al 80 por ciento, al 100 por ciento y al 120 por ciento, de acuerdo al método escalado al 25 por ciento. Como se puede observar en la tabla 17 se hicieron las determinaciones para ver la linealidad del sistema, por lo que los valores obtenidos con respecto a lo especificado para linealidad del método son confiables por lo que se dice que el método a un 25 por ciento es lineal.

---

---

**Grafica 4.** Linealidad del método a un 25 por ciento.



En la gráfica 4 se puede observar la linealidad del método en cuanto a la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada. Por lo cuál el método es lineal.

---

---

### 11.5. Linealidad del sistema.

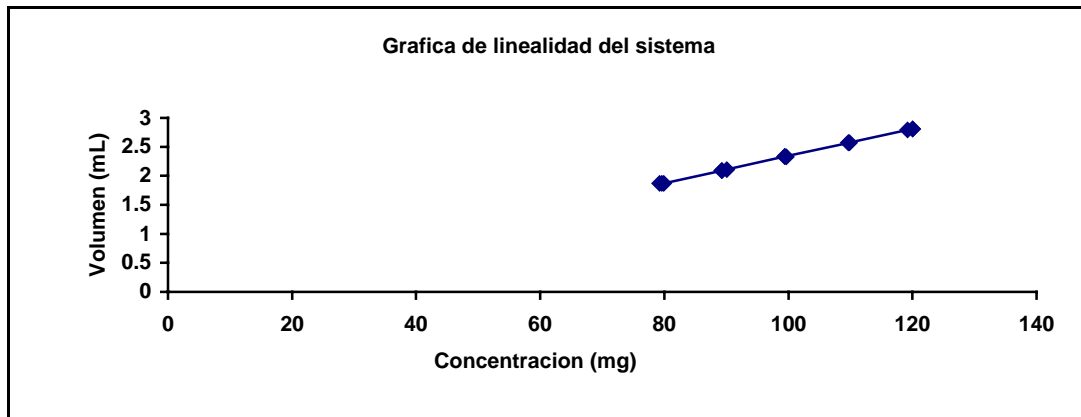
**Tabla 19.** Concentración teórica, respuesta analítica y criterios de aceptación para linealidad del sistema.

<b>Concentración</b>	<b>Vol. gastado</b>
79.58	1.87
79.2216	1.869
79.8984	1.87
90.0774	2.109
89.2818	2.09
89.2557	2.089
99.393	2.33
99.669	2.329
99.393	2.33
109.8867	2.57
109.6843	2.569
109.7272	2.57
119.2068	2.79
120.018	2.809
120.018	2.809
<b>Criterios de aceptación.</b>	
Coeficiente de correlación	0.99993705
Coeficiente de determinación	0.9998741
Pendiente	0.02325778
Intervalo de confianza para la pendiente	0.02268743 a 0.02336792

---

---

**Grafica 5.** Linealidad del sistema a un 25 por ciento



Se prepararon por triplicado niveles de concentración al 80, 90, 100, 110 y 120 por ciento, con las especificaciones del método escalado al 25 por ciento. Como se observa en la tabla 18 se determinó la respuesta analítica bajo las mismas condiciones, calculando la pendiente, el intervalo de confianza para la pendiente y el coeficiente de determinación el cual es mayor a 0.98, así los criterios de aceptación se cumplen por lo cual se puede decir que el sistema es lineal.

En la grafica 5 se puede observar la respuesta analítica contra la concentración, en donde se puede ver la linealidad del sistema.

---

---

## 11.6. Robustez.

**Tabla 20.** Concentración en porcentaje, promedio aritmético de la concentración en porcentaje y criterios de aceptación para robustez.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración expresada en porcentaje</b>	<b>Promedio aritmético de la concentración en porcentaje</b>
1 Condición normal	100.364448	100.093591
2 condición normal	100.364326	
3 Condición normal	99.552	
1 Cambio de ácido acético Glacial	99.552	99.7628635
2 Cambio de ácido acético Glacial	100.184038	
3 Cambio de ácido acético Glacial	99.552552	
1 Cambio de anhídrido acético	98.697664	98.9969205
2 Cambio de anhídrido acético	98.698	
3 Cambio de anhídrido acético	99.5950976	
<b>Criterios de aceptación.</b>		
di 1	0.330728	
di 2	1.09667093	

Se desarrolló el método en tres condiciones distintas a la normal, variando en una el número de lote de ácido acético glacial en una y en la otra el número de lote del anhídrido acético, conforme a lo especificado para el método al 25 por ciento. Como se observa en la tabla 19 se reportó la valoración para las tres condiciones. La diferencia absoluta entre ambas condiciones no es mayor al 2 por ciento, por lo tanto el método mantiene su desempeño con respecto a las variaciones propuestas

---

---

## 12. Comparación de costos de los métodos.

**Tabla 21.** Comparación de costos del método al 100 por ciento y del método al 25 por ciento.

<b>Reactivo</b>	<b>Costo en dólares al 100 %</b>	<b>Costo en dólares al 25 %</b>
Ácido acético glacial	4.60	1.15
Anhídrido acético.	5.80	1.45
Ácido perclórico	0.6	0.15
Total	11	2.75

Realizando la valoración por triplicado en el análisis de materia prima por el método analítico farmacopéico que equivale al 100% se produce en gasto económico de 11 dólares aproximadamente, en cambio si se realiza la valoración al 25 por ciento se reduce hasta en un 75 por ciento el gasto de reactivos correspondiendo a un total de 2.75 dólares

Siendo por lo tanto, benéfico para una mejor administración y crecimiento de cualquier laboratorio o empresa.

---

---

### 13. Comparación de la generación de desechos entre ambos métodos.

**Tabla 21.** Comparación de la generación de desechos del método al 100 por ciento y del método al 25 por ciento.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad utilizada al 100 %</b>	<b>Cantidad utilizada al 25 %</b>
Ácido acético glacial	150 mL	37.5 mL
Anhídrido acético.	15 mL	3.75 mL
Ácido perclórico	27.9 mL	6.975 mL
Total	192.9 mL	48.225 mL

Al realizar la valoración por triplicado en un análisis de materia prima por el método analítico farmacopéico se generarían 192.9 mL de desechos, en cambio si se realiza la valoración al 25 por ciento se reduciría hasta en un 75 por ciento la generación de dichos desechos.

Los beneficios de esta reducción en la generación de desechos y en el consumo de reactivos se pueden ver reflejados en distintos ámbitos como el económico, tendría un impacto ecológico considerable, menor riesgo de trabajo y un ambiente de trabajo en el laboratorio al tener una menor cantidad de compuestos contaminantes.

---

---

## 14. Conclusiones

Se diseñó desarrolló y validó el método analítico para la valoración de benzoil metronidazol aplicando la técnica en microescala, cumpliendo con los parámetros de desempeño de calidad de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Se optimizó el consumo de recursos materiales al desarrollar la técnica de valoración para benzoil metronidazol en microescala. Analizándose y comparándose el costo de los dos métodos así como la cantidad de productos de desecho producidos tanto por el método convencional como el realizado a microescala.

Se colaboró en la mejora continua de la enseñanza experimental de química en los laboratorios de química analítica y de control de calidad en donde puede ser aplicado este método como proyecto experimental docente.



---

---

## 15. Referencias

1. Alvarez, Querol. Fundamentos de Química Analítica en Micro y Ultramicroescala. España, Madrid, Ediciones Aguilar S.A.. 1950: 1-115
2. Ventajas de la Química a Microescala. Lycos. 10:00 a.m. México D.F. a 15 de Octubre de 2004:  
<http://www.uv.es/~tcliment/microes/ventajas.htm>.
3. Szafran Zvi, Pike, Ronald M; Singh, Mono M. Microscale Inorganic Chemistry, U.S.A. JOHN WILEY Y SONS, 1991: 15 – 28.
4. Esperanza Torres Espinoza y Juan Pedro Castellón Santana. "Minimización del impacto Ecológico Empleando Microescala en Laboratorios de Enseñanza Química. Educación Química, Segunda Época, Enero, 2000; 11: (2)
5. Secretaria de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Séptima Edición. México. Secretaria de Salud, 2000: 414-418, 870.
6. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 49 edición. México: Thompson; PLM, 2004: 1253-1255, 2000-2001, 2611-2612.
7. Skoog, DA. Principios de Análisis instrumental. España. Quinta edición. Madrid: McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A.U; 2001: 639-668.
8. Christian, GD. Química Analítica. México. Limusa Noriega Editores; 1993: 388-395.
9. Watty, BM. Química Analítica. México. Alhambra Mexicana. 1982.: 233-241.

- 
- 
10. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. Capítulos "Validación" y "Control del laboratorio Analítico"; Incisos 9.11.1 a 9.11.7 y 9.12.3.
  11. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Text on validation of Analytical Procedures Q2A. October 1994.
  12. The United States Pharmacopeial Convention, The National Formulary 20, United States Pharmacopeial, Validación of Compendial Methods. 23 edition. Printed by Mack Printing Company, 1995: 1982,1983.
  13. Asociación Farmacéutica Mexicana. Validación de Métodos Analíticos. Informacéutico. México; Julio 2001. Vol. 8. (3): 45-51.
  14. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methods Q2B. November 1996.
  15. Singh, M. M.; Szafran, Z.; Pike, R. M. Microscale Chemistry and Green Chemistry: Complementary Pedagogies. J. Chem. Educ. 1999, 76(12); 1684-1696.
  16. G. C. Hokanson. " A life Cycle Approach to the validation of Analytical Methods during Pharmaceutical Development, Part I: The Initial Meted Validation Process." Pharm. Technol. 1994, 18 (9); 118-130.
  17. G. C. Hokanson. " A life Cycle Approach to the validation of Analytical Methods during Pharmaceutical Development, Part II: Changes and Need for additional Validati6n.. 1994, 18 (10); 92-100.

- 
- 
18. Richardson, J. N.; Stauffer, M. T.; Henry, J. L. Microscale Quantitative Analysis of Hard Water Samples Using an Indirect Potassium Permanganate Redox Titration. *J. Chem. Educ.* 2003, 80(1); 65-67.
  19. Flint, E. B.; Kortz, C. L.; Taylor, M. A. Microscale pH Titrations Using an Automatic Pipet. *J. Chem. Educ.* 1999, 79(6); 705-706.
  20. East, G. A.; Nascimento, E. C. Microscale Determination of Vitamin C by Weight Titrimetry. *J. Chem. Educ.* 2002, 79(1); 100-102.
  21. Singh, M. M.; McGowan, C. B.; Szafran, Z. Precision in Microscale Titration. *J. Chem. Educ.* 2002, 79(8); 941.
  22. Joling, E.; Goedhart, M. J. Van der Derg, B. A Low-Cost and Timesaving Microscale Heater. *J. Chem. Educ.* 2002, 79(9); 1109-1110.
  23. Guideline for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation. August 2000. FDA.
  24. Goodman, G. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Ninth Edition. U.S.A. Mc Graw Hill, 1996.
  25. Marques de Cantú, MJ. *Probabilidad y Estadística*. Segunda edición. México. Mc Graw Hill. 2004: 361-395.
  26. Douglas C, Montgomery. *Design and Analysis of Experiments*. New York, U.S.A. LIMUSA WESLEY, 2004: 13-20, 51-65.

- 
- 
- 27.** Jay L. Devore. Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias. Quinta edición. México. THOMSON LEARNING, 2001: 399-451.
- 28.** Connors, K. Curso de Análisis Farmacéutico (ensayo del medicamento). España. Reverte, S.A. 1981.
- 29.** Budavari, Susan. THE MERCK INDEX. Thirteen editions. U.S.A. Whitehouse NJ. 2001: 11-12, 1283.