



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



TESIS

Para obtener el título de Licenciado en Química Farmacéutico Biológica

PRESENTA

Salazar Alejo Nery Samuel

TEMA

Desarrollo y validación de un método analítico a microescala para cuantificar ácido ascórbico en jarabe.

DIRECTOR

M. en C. Vicente Hernández Abad

ASESOR

M. en C. Elizabeth Sánchez González

Año 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TABLA DE CONTENIDO

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 ÁCIDO ASCÓRBICO	1
1.1.1 Historia del ácido ascórbico.....	1
1.1.2 Nombres químicos	1
1.1.3 Nombres genéricos y marcas registradas	1
1.1.4 Estructura y formula química del ácido ascórbico	2
1.1.5 Propiedades físicas y químicas del ácido ascórbico.....	2
1.1.6 Propiedades farmacológicas	2
1.1.7 Farmacocinética y metabolismo	3
1.1.8 Aplicaciones terapéuticas.....	3
1.1.9 Estabilidad del ácido ascórbico en formulaciones líquidas	3
1.1.10 Métodos analíticos	5
1.2 VOLUMETRÍA	5
1.2.1 Valoraciones óxido-redox	5
1.2.2 Valoraciones yodométricas	6
1.2.3 Análisis volumétrico del ácido ascórbico.....	8
1.3 EL MATERIAL DE VIDRIO COMO SISTEMA DE MEDICIÓN	9
1.3.1 Capacidad.....	9
1.3.1.1 Microvolúmenes.....	9
1.3.1.2 Pequeños volúmenes.....	9
1.3.1.3 Grandes volúmenes.	9
1.3.2 Exactitud	9
1.3.2.1 Recipientes clase A.	9
1.3.2.2 Recipientes de clase B.....	10
1.3.3 Forma de calibración	10
1.4 LA QUÍMICA EN MICROESCALA EN MÉXICO	11
1.4.1 Antecedentes	11
1.4.2 Ventajas	12
1.4.3 Desventajas.....	12
1.4.4 Impacto ambiental.....	13
1.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	14
1.5.1 Justificación para realizar la validación de un método analítico.....	14
1.5.2 Parámetros de validación.....	15
1.5.2.1 Linealidad del sistema.....	16
1.5.2.2 Precisión del sistema.....	16
1.5.2.3 Linealidad del método.....	16
1.5.2.4 Exactitud de un método analítico.....	16
1.5.2.5 Especificidad	16
1.5.2.6 Precisión.	16
1.5.2.7 Robustez.	16

1.6 JARABE	17
1.6.1 Definición	17
1.6.2 Formulación	17
1.6.2.1 Amortiguadores	17
1.6.2.2 Correctivos de olor, color y edulcorantes	17
1.6.2.3 Antioxidantes	18
1.6.2.4 Conservadores	18
1.6.2.5 Cosolventes	18
1.6.3 Métodos de fabricación	18
1.6.3.1 Disolución por calor	18
1.6.3.2 Agitación sin calor	18
1.6.4 Problemas de fabricación	19
1.6.5 Parámetros de control en la fabricación de jarabes	19
1.6.6 Pruebas para el control de calidad del producto terminado en jarabes 19	
1.7 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (CDB)	20
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
3. OBJETIVO GENERAL	22
4. OBJETIVOS PARTICULARES	22
5. HIPÓTESIS	22
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
7. METODOLOGÍA	24
8. RESULTADOS	26
8.1 PREPARACIÓN Y FORMULACIÓN DEL JARABE DE ÁCIDO ASCÓRBICO	26
8.2 VALIDACIÓN AL 100 % DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR ÁCIDO ASCÓRBICO EN JARABE	26
8.2.1 Resultados de la validación del día 2	27
8.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA	28
8.3.1 Inferencia estadística para la regresión	29
8.3.2 Inferencia estadística para la ordenada al origen	29
8.3.3 Inferencia estadística para la pendiente	30

8.4 PRECISIÓN DEL SISTEMA	30
8.5 LINEALIDAD DEL MÉTODO	31
8.5.1 Inferencia estadística para la linealidad del método	33
8.5.2 Inferencia estadística para la ordenada al origen	33
8.5.3 Inferencia estadística para la pendiente	34
8.6 EXACTITUD DEL MÉTODO	34
8.6.1 Inferencia estadística para la exactitud del método	35
8.7 PRECISIÓN DEL MÉTODO	35
8.7.1 Repetibilidad	35
8.7.2 Inferencia estadística para la repetibilidad del método	35
8.7.2 Reproducibilidad	36
8.8 TOLERANCIA	36
8.9 ROBUSTEZ	37
8.10 ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO	37
8.11 MICROESCALAMIENTO DEL MÉTODO PARA DETERMINAR ÁCIDO ASCÓRBICO EN JARABE	38
8.12 VALIDACIÓN AL 25 % DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR ÁCIDO ASCÓRBICO EN JARABE	41
8.12.1 Resultados de la validación del día 2.	41
8.13 LINEALIDAD DE SISTEMA	41
8.13.1 Inferencia estadística para la linealidad de sistema	43
8.13.2 Inferencia estadística para la ordenada al origen	44
8.13.3 Inferencia estadística para la pendiente	44
8.14 PRECISIÓN DEL SISTEMA	45
8.15 LINEALIDAD DEL MÉTODO	45
8.15.1 Inferencia estadística para la linealidad del método	46
8.15.2 Inferencia estadística para la ordenada al origen	47
8.15.3 Inferencia estadística para la pendiente	47
8.16 EXACTITUD DEL MÉTODO	48
8.16.1 Inferencia estadística para la exactitud del método	48
8.17 PRECISIÓN DEL MÉTODO	48
8.17.1 Repetibilidad	48
8.17.2 Reproducibilidad	49
8.18 TOLERANCIA	50

8.19 ROBUSTEZ	51
8.20 ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO	51
8.21 RESUMEN DE RESULTADOS	52
9. CONCLUSIONES	55
10. RECOMENDACIONES	56
11. REFERENCIAS	57

INTRODUCCIÓN

La validación de métodos analíticos tienen como propósito determinar el analito en una muestra, primero determinando el verdadero valor, segundo la exactitud y tercero la precisión de la respuesta, quien permite demostrar si estos atributos están presentes o ausentes son los modelos estadísticos.

Estos modelos estadísticos pueden descomponerse en dos tipos de medidas asociados con los factores tanto intrínsecos como extrínsecos del método, los factores intrínsecos del método, fijan la medida de posición de la respuesta y su análisis estadístico permite inferir respecto de la exactitud. Los factores extrínsecos del método, fijan la medida de dispersión de la respuesta analítica y el análisis estadístico proporciona inferencia respecto de la precisión.

La respuesta analítica puede verse afectada por la estabilidad del fármaco dentro de un sistema farmacéutico ya que es un factor determinante en la cuantificación del analito, por lo que se tiene que realizar estudios de estabilidad que den certeza de que los excipientes no van a interferir en el análisis. Cuando es conocida la constitución cualitativa y cuantitativa de una muestra, es conveniente definir el denominado placebo analítico. El placebo analítico debe ser elaborado con ingredientes que cumplan con las especificaciones internas y procesadas de tal manera, que sea semejante en propiedades analíticas a la muestra que rutinariamente es o será analizada.

Al microescalar un método analítico, también se afecta la medición, por las condiciones de análisis, sistemas de medición, especificidad del método tanto para el tipo de reactivos (pureza, reactividad, estabilidad, caducidad) como para las cantidades tan pequeñas utilizadas. Por ello, se tiene que llevar a cabo un análisis estadístico que permita discernir que nivel de concentración a microescala es el más indicado, para desarrollar y validar un método analítico a microescala.

El propósito de este trabajo es desarrollar y validar un método analítico a microescala para cuantificar ácido ascórbico en jarabe. Se cuantifica partiendo de un estudio de estabilidad fármaco-excipiente, y después se formula un jarabe (así como el placebo) que brinde seguridad a la molécula de ácido ascórbico, manteniéndolo a un pH apropiado y protegiéndolo de la propiedad de fotosensibilidad. Se valida el método analítico al 100% y posteriormente se realiza una prueba de muestras múltiples. De esta manera se tiene la referencia del método analítico al cual se microescaló.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ÁCIDO ASCÓRBICO

1.1.1 Historia del ácido ascórbico.

Las vitaminas son compuestos orgánicos activos, que se forman en una pequeña cantidad en las plantas y son imprescindibles para el normal metabolismo del organismo humano y animal. Cuando estos catalizadores orgánicos o sustancias activas faltan en la alimentación, aparecen graves enfermedades de carencia, las avitaminosis.

El nombre de vitamina se deriva de la vitamina B, que fue la primera investigada y que C. Funk (1911) puso de manifiesto que es necesaria para la vida (vita = vida) y, además, reacciona como una amina. A pesar de que la mayoría de las vitaminas no son aminas, se ha mantenido internacionalmente el nombre para esta clase de sustancias activas.^{1,2}

El ácido ascórbico (comúnmente llamado ascorbato o vitamina C), es un importante micronutriente con varios papeles fisiológicos. Tanto en animales como en plantas su papel es de agente reductor; neutralizando peróxidos tóxicos, estabilizando radicales libres y jugando un papel normal en la fotosíntesis. El ácido ascórbico es un antioxidante citosólico que actúa en cooperación con los antioxidantes en la membrana lipídica tales como el tocoferol o carotenos, y puede incrementar la capacidad de las células para protegerse de metabolitos de oxígeno reactivos generados por la activación del aparato fagocítico de la célula.

El ácido L (+)- ascórbico (vitamina C) pertenece a las vitaminas solubles en agua y se encuentra especialmente en las frutas frescas; níspero silvestre, grosella, naranja y limón así como en los pimientos y distintas variedades de col. La falta de esta sustancia activa en la alimentación conduce al cuadro médico del escorbuto, que se reconoce por las hemorragias en la piel y en las encías y, en casos graves, conduce a la caída de los dientes. Esta vitamina también se conoce como antiescorbutina, fue aislada en 1926 por Szent-Györgyi y en el esclarecimiento de su constitución contribuyeron de forma decisiva Micheel y Hirst (1923-1933). Resultó ser la lactona de un ceto ácido, cuyo grupo cetona se encuentra, sin embargo, en la forma enol.^{1,2 y 3}

1.1.2 Nombres químicos

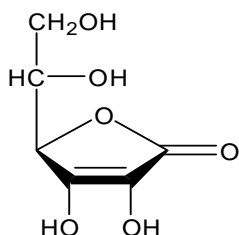
Ácido L-ascórbico
Ácido L-Xiloascórbico
3-Oxo-L-glucofuranolactona (forma de enol)
Lactona del ácido L-3-Cetotriohecurónico⁵

1.1.3 Nombres genéricos y marcas registradas

Vitamina C; Ácido ascórbico.

Vitascorbol ®, Vitacin ®, Adenex ®, Ascorbicap ®

1.1.4 Estructura y fórmula química del Ácido Ascórbico



$C_6H_8O_6$
PM 176.12

1.1.5 Propiedades físicas y químicas del ácido ascórbico

Cristales o polvo blanco ligeramente amarillos. Sin olor o casi sin olor; caracterizado por agradable sabor agrio. El ácido ascórbico funde a los 192° C con descomposición.

Es soluble a 20° C en 3.5 partes de agua y en 25 partes de alcohol (95 %), en 50 partes de alcohol absoluto, en 100 mL de glicerol, en 20 mL de propilenglicol. Es soluble en agua caliente en un 40% a 40° C y un 80% a 100° C. Insoluble en éter, cloroformo, benceno (en un rango de 40-60 ° C).⁶

El ácido ascórbico es un ácido con dos constantes de ionización; pK_{a1} de 4.17 y un pK_{a2} de 11.57.

Seco es razonablemente estable al aire, pero en solución se oxida rápidamente primero a ácido dehidroascórbico, el cual es también activo, su posterior oxidación da productos inactivos. Su oxidación se incrementa con la luz, la alcalinidad, hierro o cobre.⁴

1.1.6 Propiedades farmacológicas

Los aminoácidos tales como la tirosina y la fenilalanina no son metabolizados completamente en individuos deficientes de ácido ascórbico. Bajo estas condiciones sólo se metabolizan en parte y son excretados en orina como homogentísicos; los ácidos p-hidroxifenilpirúvico y el p-hidroxifeniláctico. Aparentemente el ácido ascórbico juega un papel como coenzima en el metabolismo de la tirosina a través de un producto aminado, pues en el hígado en donde se divide esta molécula no puede ser metabolizado en ausencia del ácido ascórbico. El ácido ascórbico en cantidades adecuadas retrasa la oxidación de la epinefrina para el cuerpo.

Además es un protector antioxidante neuronal contra la isquemia (disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo de una parte del cuerpo, producida por una alteración normal o patológica de la arteria o arterias aferentes a ella) y la toxicidad fuera de estas. Alterando el estado redox del receptor del neurotransmisor, estimulando la relajación de varios neurotransmisores, y actúa como un cofactor crítico en la síntesis de la norepinefrina.^{4y5}

1.1.7 Farmacocinética y metabolismo

El ácido ascórbico se absorbe y metaboliza rápidamente, se absorbe fundamentalmente en los segmentos superiores del intestino delgado por transporte activo de los iones de sodio. En concentraciones elevadas, la absorción es por difusión pasiva.

Después de la administración oral de una dosis de hasta 180 mg, la absorción es de 70 a 90%. Con la ingestión de 1-12 g, el porcentaje desciende de 50 a 15% aproximadamente; sin embargo, la cantidad absoluta de sustancia absorbida sigue incrementándose. Las concentraciones plasmáticas ascienden normalmente a 10 mg/L.

El ácido ascórbico es metabolizado en parte primero a ácido dehidroascórbico y después a ácido oxálico. Cuando el aporte es muy elevado, se elimina con la orina y las heces en forma inalterada. En la orina también se identifica otro metabolito, el ascorbato 2-sulfato.

La vida media de eliminación del ácido ascórbico depende de la vía de administración, de la cantidad ingerida y de la velocidad de absorción.

Después de la administración intravenosa de 500 mg de ascorbato sódico, la vida media es de aproximadamente 6 horas.

Sólo una pequeña cantidad de ácido ascórbico es excretado en orina hasta que se rebasan los niveles de ácido ascórbico en el plasma. Si se continúa con la ingestión oral, por un período largo, se rebasan las concentraciones máximas en el plasma, y la excreción en orina ocurre en grandes cantidades.⁵

1.1.8 Aplicaciones terapéuticas

Antioxidante fisiológico, coenzima de un gran número de reacciones de hidroxilación requerido para la síntesis de colágeno. La administración inadecuada de ácido ascórbico puede producir síndromes de deficiencia por escorbuto.⁵

1.1.9 Estabilidad del ácido ascórbico en formulaciones líquidas

El ácido ascórbico es muy inestable en soluciones acuosas, pero escogiendo el vehículo apropiado puede prolongarse su estabilidad en anaquel, además controlando otras variables tales como el pH, estabilizadores, temperatura, luz y oxígeno. En el cuadro 1 se muestra el efecto de varios vehículos en la estabilidad del ácido ascórbico. En el cuadro 2 se determinó la velocidad de degradación del ácido ascórbico tomando en cuenta las concentraciones iniciales de ácido ascórbico en solución.⁶

Cuadro 1. Efecto del vehículo en la estabilidad del ácido ascórbico (% de ácido ascórbico recuperado en la solución después de almacenarse a temperatura ambiente).

Vehículos	Tiempo de almacenaje en días						
	30	60	90	120	180	240	360
1. Jarabe de maíz	96.5	92.5	92.0	92.0	90.0	86.0	76.0
2. Sorbitol	99	99.0	99.0	97.0	96.0	92.5	89.0
3. 4% de Carboximetil celulosa (viscosidad media)	84	68.0	56.5	38.0	----	----	----
4. Glicerina	100	100	99.0	99.0	97.0	93.5	92.0
5. Propilenglicol	99.5	99.0	98.0	94.5	92.0	90.0	90.0
6. Jarabe USP	100	100	98.0	98.0	93.0	90.0	88.0
7. Jarabe 425 g/ L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8. Jarabe 212 g/L	88	81	77.5	74.5	64.5	59.0	44.0
9. 2.5% Tragacanto	78.5	62	51.0	32.0	----	----	----
10. Solución saturada de Dextrosa	99.0	93.5	87.5	80.0	64.0	58.0	51.0
11. Agua destilada	99.0	81.5	74.5	67.5	40.5	18.5	-----
12. 50% de Propilenglicol 50% de glicerina	98	-----	98.0	96.0	-----	93.3	-----
13. 25% de agua destilada 75% de una solución de sorbitol al 70%	95.5	95.4	-----	94.2	93.0	-----	-----
14. 50% de glicerina 50% de una solución de sorbitol al 70%	98.2	98.4	97.8	----	----	91.4	-----

Nota: En las líneas punteadas no se obtuvo el por ciento de contenido de ácido ascórbico.

Cuadro 2. Estabilidad del ácido ascórbico a varias concentraciones en agua, propilenglicol (PG), y jarabe USP a temperatura ambiente (% de ácido ascórbico recuperado en solución).⁷

Concentración (mg/ml)	Solvente	Tiempo de almacenaje en días						
		30	60	90	120	180	240	360
10	Agua	93.0	84.0	82.0	67.0	51.5	41.0	---
50	Agua	94.0	92.0	88.0	79.5	60.5	59.0	30.0
100	Agua	97.0	93.0	91.0	83.5	70.5	68.0	59.0
10	PG	100	98.5	98.0	97.5	96.0	92.0	86.0
50	PG	100	97.0	98.0	98.0	98.0	96.5	93.5
100	PG	100	100	100	100	99.0	100	92.5
10	Jarabe	100	100	98.0	99.0	97.0	96.0	84.0
50	Jarabe	100	100	100	100	99.0	100	96.0
100	Jarabe	100	100	100	100	100	100	99.5

Nota: En las líneas punteadas no se obtuvo el por ciento de contenido de ácido ascórbico.

Un estudio de estabilidad del ácido ascórbico en solución con agentes saborizantes muestra el siguiente orden en el cual se degrada: plátano < piña < cereza < chocolate < frambuesa < vainilla. Al incrementar la concentración de los saborizantes incrementaba

la velocidad de degradación. Ismaiel e Ismaiel encontraron que la formulación que contenía sorbitol (42% peso/volumen), acetato de sodio y esencia de plátano tenía buen sabor y mostraba ligera decoloración y había una pérdida despreciable de ácido ascórbico después de 18 meses de conservado a temperatura ambiente en la oscuridad.⁶

1.1.10 Métodos analíticos

Hay una gran variedad de métodos de análisis para el ácido ascórbico, entre ellos se pueden mencionar como los más importantes: volumetría; óxido-redox, espectrofotométrica; espectrofluorimétrica y turbidimétrica, por cromatografía; papel (cromatográfico), cromatografía gas-líquido, cromatografía de líquidos de alta resolución, por medio de métodos enzimáticos y polarografía.⁷

1.2 VOLUMETRÍA

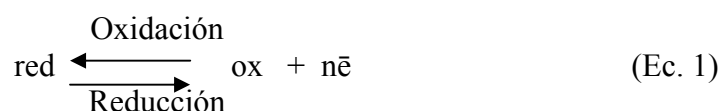
En análisis volumétrico se denomina valoración a la operación fundamental básica. En una valoración, una solución de un reactivo de concentración exactamente conocida (el valorante o solución estándar) se añade a un siguiente reactivo, la solución de la muestra cuya cantidad o concentración se va a determinar. Se añade el valorante a la muestra hasta que se ha completado exactamente la reacción, es decir, hasta que la cantidad de valorante añadido equivale químicamente a la cantidad de muestra. El estado en que se produce esta equivalencia se conoce como punto de equivalencia de la valoración y su estimación experimental, como punto final de la valoración. A partir de la cantidad de valorante empleado para alcanzar el punto final, de su concentración y del conocimiento de la estequiometría de la reacción de valoración, se puede calcular la cantidad de sustancia de la muestra.^{7 y 8}

Los métodos de análisis para detectar el punto final son diferentes para cada tipo de reacción química, por lo que a continuación se describe el método de interés, con respecto al análisis volumétrico a realizar.

1.2.1 Valoraciones oxido-redox

Es otro tipo de reacción analítica, en donde intervienen dos semireacciones; cada semireacción incluye un par conjugado redox, y el proceso neto de la reacción global es la transferencia de uno o más electrones de un par a otro.

Se presenta una semireacción redox general por la ecuación:



donde red representa la forma reducida (también llamada reductor o agente reductor); ox, la forma oxidada (oxidante, agente oxidante); n, el número de electrones transferidos; y e, al electrón. No es posible observar una semireacción redox; se requieren dos semireacciones, una para proporcionar electrones y la otra para consumirlos. La ecuación anterior muestra como la oxidación es un proceso en el

transcurso del cual una sustancia pierde electrones, y la reducción es el proceso mediante el cual una sustancia gana electrones.

Es posible describir con ayuda de las constantes de equilibrio las reacciones de valoración redox; sin embargo, se acostumbra utilizar el potencial eléctrico asociado con el proceso de transferencia electrónica como medida de la tendencia a que ocurra una reacción (figura 1), en lugar de la correspondiente constante de equilibrio. Una curva de valoración, para una valoración redox, se presenta como una gráfica del potencial (en volts) en función del volumen de valorante.^{9 y 10}

1.2.2 Valoraciones yodométricas.

El yodo es un agente oxidante medio, algunas sustancias pueden determinarse por valoración directa con yodo, pero dos de ellas, sobre todo las valoraciones de arsenito y de tiosulfato, son de gran importancia. Muchas sustancias son capaces de oxidar al yoduro hasta yodo liberado con tiosulfato; pero este es el método de valoración indirecta.

Se debe tener cuidado a la exposición del yodo: los síntomas potenciales de sobreexposición son irritación de ojos, piel, y nariz; dolor de cabeza; quemaduras superficiales, salpullido; hipersensibilidad cutánea. La ingestión en cantidad causa dolor abdominal, vómito y diarrea debido a la acción muy corrosiva de yodo en el tracto gastrointestinal.⁹

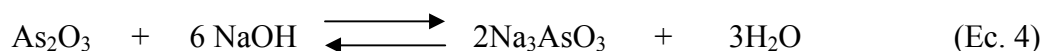
El yodo se reduce de acuerdo con la semireacción:



Se preparan las soluciones estándares de yodo pesando exactamente el reactivo puro. Es más sencillo preparar la solución a partir de un producto que sea reactivo y luego estandarizarlo. El yodo es poco soluble en agua, pero forma un ion triyoduro soluble en soluciones de yoduro:



El uso de yoduro en la solución incrementa la solubilidad del yodo y, a la vez, hace decrecer su volatilidad, con lo cual contribuye a la estabilidad de las soluciones de yodo. En presencia de agentes reductores, la reacción sucede cuantitativamente hacia la izquierda (Ec. 1), y en la reacción queda sólo el yodo en solución.



El trióxido de arsénico es el mejor patrón primario para las soluciones de yodo y es ligeramente soluble en agua fría, se disuelve más rápidamente en agua hirviendo y se solubiliza fácilmente en hidróxido de sodio con formación de arsenito de sodio, H_3AsO_3 (Ec. 2). Al utilizarse esta última, antes de añadirse el yodo debe neutralizarse con ácido clorhídrico, y después añadir un amortiguador de pH que mantenga la solución neutra, pues si el yodo se añade a la solución alcalina que contiene el H_3AsO_3 , se forman

moléculas de hipiodito de sodio, NaIO (Ec. 3), o un compuesto similar, por lo que el yodo no reaccionará con el ión arsénico.



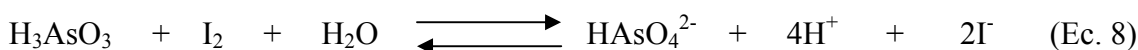
Como buffer puede añadirse el bicarbonato de sodio para neutralizar el ácido iodihídrico, HI, formado en la reacción reversible (Ec. 4).



Éste remueve rápidamente el HI formado, causando que la reacción se lleve a cabo hacia la derecha (Ec. 5), bajo estas condiciones de experimentación, el bicarbonato de sodio no reacciona con el yodo, pero si un exceso de yodo es añadido, podría reaccionar ligeramente.



La reacción del yodo y el arsénico se da cuantitativamente en una solución neutra (Ec. 6). Lo anterior se describe en la reacción:



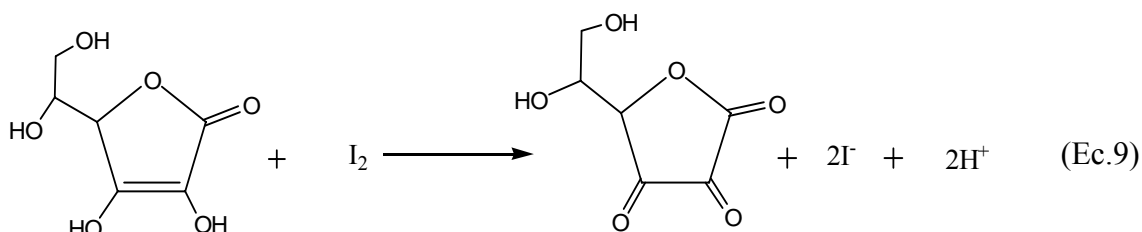
a partir de la cual se deduce que la posición de equilibrio depende del pH. Una ulterior dependencia del pH viene impuesta por la posibilidad de ionización del ácido arsenioso. Para la valoración cuantitativa del ácido arsenioso con yodo, a una velocidad conveniente, se ha comprobado que el pH debería estar en el intervalo aproximado de 6 a 9; es permisible un pH más bajo si se realiza lentamente la valoración, mientras que un pH más alto es satisfactorio si la solución contiene yoduro.

Puede detectarse el punto final de las valoraciones yodométricas mediante el color característico del yodo; el yodo, a una concentración próxima a 5×10^{-5} N producirá un color detectable. Se dobla la sensibilidad usando almidón como indicador. En presencia de yoduro, el almidón absorbe al yodo para dar un color azul característico. Si falta el yoduro, no se produce color. La sensibilidad del indicador aumenta en medio ácido, y disminuye en presencia de sustancias orgánicas o por calentamiento.

Un método diferente de detección del punto final en valoraciones yodométricas utiliza un disolvente orgánico inmiscible con el agua, especialmente cloroformo o tetracloruro de carbono, en el cual el yodo se concentra en la capa orgánica. Después de cada adición de valorante se agita bien la mezcla, detectándose el punto final por la primera o última tinción de violeta (según se esté realizando una valoración directa o indirecta) en la fase orgánica. El color violeta se debe a un complejo entre el yodo y las moléculas del disolvente orgánico. ¹¹

1.2.3 Análisis volumétrico del ácido ascórbico

El ácido ascórbico se determina con una solución de yodo 0.1 N, adicionando previamente una cantidad de agua para disolver la muestra, una cantidad de ácido para el pH apropiado del medio y finalmente se adiciona de uno a tres ml de solución indicadora de almidón para dar un color azul característico. La ecuación 9 muestra la valoración óxido-redox, donde el ácido ascórbico se oxida con el yodo hasta ácido dehidroascórbico.^{11 y 12}



Cuadro 3. Concentraciones antes y después del punto de equivalencia en la titulación del ácido ascórbico con solución de yodo 0.1 N

CI*	Co				
Agregado		XCo	XCo	2XCo	2XCo
APE*	Co(1-X)	≈ 0	XCo	2XCo	2XCo
PE*	≈ 0	≈ 0	Co	2Co	2Co
DPE*	≈ 0	Co(X-1)	Co	2Co	2Co

Donde Co es la concentración de 100mg de AA en 125 ml de agua o sea $7.09 \cdot 10^{-5}$ M

*CI= Concentración inicial

*APE= Antes del punto de equivalencia

*PE= En el punto de equivalencia

*DPE= Después del punto de equivalencia

$E^{\circ}_{DHA/AA} = 0.34$ v $E^{\circ}_{I_2/I^-} = 0.54$ v $E^{\circ}_{H^+/H_2} = -1.2$ v $E^{\circ}_{O_2/H_2O} = 1.7$ v

$i = 100$

$i = 10^3$

$i = -\infty$

$i = +\infty$

Curva Intensidad-Potencial

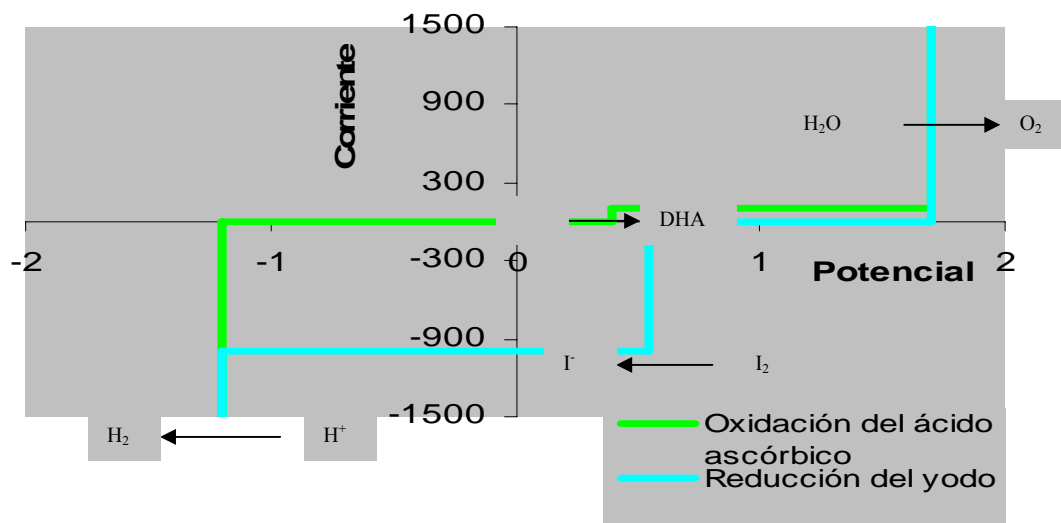


Figura 1: Muestra la óxido reducción tanto del ácido ascórbico como del I_2 con respecto al potencial eléctrico.

1.3 EL MATERIAL DE VIDRIO COMO SISTEMA DE MEDICIÓN

En la actualidad se piensa que la fabricación de los instrumentos de medición usados en la volumetría son lo suficientemente buenos para asegurar la exactitud de los volúmenes indicados, sin embargo, es conveniente someter los instrumentos a calibración.

Existe una gran variedad de recipientes volumétricos; de diferentes formas, tamaños, capacidades y materiales de fabricación.

Los materiales volumétricos se clasifican:

Dependiendo de su capacidad

Con base en su exactitud

De acuerdo con su la forma de calibración.¹³

1.3.1 Capacidad

1.3.1.1 Microvolúmenes: se consideran los recipientes para transferir o contener volúmenes menores a 1 mL. En este grupo se encuentran microjeringas utilizadas en HPLC y micropipetas de pistón.

1.3.1.2 Pequeños volúmenes: se consideran recipientes volumétricos de vidrio o plástico para laboratorio destinados a transferir o contener volúmenes entre 1 y 2000 mL. (Pipetas, matraces, buretas, etc.).

1.3.1.3 Grandes volúmenes: se consideran los recipientes para transferir o contener volúmenes mayores a 2000 mL. Normalmente fabricados en materiales metálicos, por ejemplo, jarras patrón.

1.3.2 Exactitud

Los recipientes volumétricos de vidrio deben cumplir con ciertas especificaciones y requisitos generales de fabricación y de exactitud que se encuentran detallados en Normas; (Internacional Organization Standardization) ISO 384:1978, ISO 1042:1998 y (Deutsches Institut für Normung) DIN 12600 y que deben ser cumplidas estrictamente por los fabricantes.

Los recipientes certificados son de muy buena calidad en cuanto al material utilizado en su construcción y de la más alta exactitud, son calibrados bajo especificaciones clase A y cada pieza es distribuida con un número de serie y un certificado individual que garantiza su calibración.

1.3.2.1 Recipientes clase A: son fabricados con el mismo error máximo tolerado que los recipientes certificados, pero no se distribuyen con certificado, cada instrumento debe ser marcado con la letra A que significa que cumple con los requisitos de construcción y exactitud.

1.3.2.2 Recipientes de clase B: son conocidos también como grado estudiante. El propósito general de estos recipientes es el mismo que el de los recipientes de clase A, sin embargo son fabricados y calibrados con errores que generalmente corresponden a un límite de error de dos veces el de los recipientes de clase A.

1.3.3 Forma de calibración

Los recipientes volumétricos que lo requieran deben tener marcado IN (la cantidad de líquido contenida que corresponde al volumen impreso sobre el aparato) o EX (la cantidad de líquido vertida que corresponde al volumen impreso sobre el aparato), estas notaciones son internacionalmente aceptadas, sin embargo, los recipientes volumétricos de vidrio fabricados en Estados Unidos son designados TC (Transference container) para contener, y TD (Transference dispenser) para entregar, los fabricados en México son designados PC para contener y PE para entregar.

Los recipientes deben ser calibrados en la modalidad para entregar o para contener según lo especifique el instrumento.

El vidrio se distingue por su resistencia química frente al agua, soluciones, ácidos, bases, disolventes orgánicos, sobrepasando en este aspecto a la mayoría de los plásticos. Únicamente es atacado por ácido fluorhídrico y, a elevadas temperaturas, por bases fuertes y ácido fosfórico concentrado. Otras ventajas del vidrio son la estabilidad de forma, incluso a elevadas temperaturas; y su alta transparencia.¹³

1.4 LA QUÍMICA EN MICROESCALA EN MÉXICO

1.4.1 Antecedentes

La Química a microescala es llamada también “química verde”, su definición precisa la hacen Anastas y Warner, y consiste en la utilización de una serie de principios encaminados a reducir o eliminar el uso y generación de sustancias peligrosas en el diseño, manufactura y aplicación de los productos químicos, tales principios pueden resumirse en uno: la aplicación del sentido común y la ética a los procesos de producción minimizando también la utilización de recursos energéticos y agua. Analiza si un determinado producto es necesario y si puede sustituirse por otro menos nocivo para las personas o para el ambiente (menor toxicidad, mayor biodegradabilidad). Determina qué materias primas son las más adecuadas para los procesos, con especial atención a fuentes renovables, qué modificaciones pueden introducirse en los procesos actualmente operativos para aumentar el rendimiento y la selectividad, disminuyendo los riesgos de trabajo dentro del laboratorio (nuevos tipos de reactores, eliminación o cambio de disolventes, catalizadores robustos de gran especificidad, etc.).

La microescala es una alternativa para mejorar el aprovechamiento de los recursos, ya que se caracteriza por disminuir las cantidades al mínimo (tanto lo permita el proceso) de las materias primas involucradas en determinado proceso, sin afectar la calidad del mismo, al igual que la de los productos; en consecuencia, la producción de residuos es menor.

La microescala es aplicable a todas las áreas de la química, ya que uno de sus principales objetivos es reducir las cantidades de reactivos empleados en los procesos sin afectar la calidad y eficiencia de estos; incluso puede ser usada también en el área microbiológica.

Se preocupa por prevenir la contaminación del ambiente y disminuir los riesgos a los que se expone el ser humano por el contacto con sustancias tóxicas.

Aunque aún no se tiene un rango establecido en el cual se debe trabajar en un proceso a microescala, algunos autores manejan cantidades de reactivos que van de 0.005g a 0.5g, en reactivos sólidos, los disolventes suelen estar por debajo de 5 mL; sin embargo, en la química analítica las proporciones en las que se manejan tanto reactivos como productos están delimitadas por las características de cada método, el equipo, material y las propiedades químicas, físicas, y fisicoquímicas de cada una de las especies que intervienen en los diferentes procesos analíticos.

Dentro de la industria el concepto de microescala puede ser introducido en proyectos de investigación, en el área de desarrollo analítico, siempre y cuando se cuente con métodos previamente estudiados y validados.^{14, 15 y 16}

1.4.2 Ventajas

Reducción en el uso de productos químicos y, por tanto, reducción de residuos en su origen.

Permite realizar experimentos que implican la utilización de reactivos más costosos.

Reducción en los costos de compra, recolección y reciclado de productos.

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.

- Menor riesgo al producirse un derrame.

Reducción en la duración del experimento:

- Reducción del gasto de agua, energía eléctrica y gas.

- Aumento en el repertorio de experimentos.

Menor cantidad de vidrio roto.

Mayor espacio disponible de almacenamiento de reactivos y materiales, por lo tanto, mejor aprovechamiento de laboratorios.

Ahorro de tiempo en la preparación de reactivos.

Promueve el principio de las tres R's: 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 menor 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 se adquieren operando a escala normal.¹⁷

1.4.3 Desventajas.

En algunos casos es complicado controlar algunos factores dentro de la reacción, como por ejemplo mantener baja la temperatura en una reacción exotérmica, a escala convencional esto se dificulta, en microescala es aún más complicado.

El escrupuloso cuidado en el manejo de sustancias para evitar pérdidas significativas en los procesos o bien evitar la contaminación de las mismas.

Es necesario considerar que cualquier porción de sustancia ajena al proceso por mínima que sea su concentración afecta el estudio (cuantitativo y/o cualitativo), ya sea a microescala o a escala convencional, esta variable debe ser controlada

independientemente de la técnica usada, dentro de la formación del alumno en el laboratorio.

En ocasiones es necesario adquirir equipos más precisos, lo que representan una mayor inversión monetaria.

La resistencia por parte de los docentes y laboratoristas a cambios en los programas y formas de trabajo al implementar el modelo de microescala, la mayoría de las veces por desconocimiento del mismo.¹⁷

1.4.4 Impacto ambiental.

Hoy en día la protección del ambiente lleva implícitas las palabras "recuperación" y/o "reciclado". Los países industrializados son grandes productores de desechos que no se pueden destruir de una manera sencilla y rápida. Los altos costos de eliminación de residuos obligan a los gobiernos a tomar medidas encaminadas a minimizar dichos residuos y reducir su dependencia de las materias primas.

En la Química verde se han diseñado cambios en los procesos industriales, elaboración de productos, prácticas escolares y de investigación que ayuden a la reducción o eliminación de sustancias tóxicas involucradas en los procesos. Es fundamental para la "Química Verde" el cuidado de la salud humana, al igual que la protección del ambiente por medio de un método económico y eficaz.

La "Química Verde" propone enfocar sus tecnologías en los tres siguientes puntos:

1. La utilización de rutas sintéticas alternativas basadas en la "Química Verde".
2. El uso de condiciones de reacciones basadas en "Química Verde".
3. El empleo de sustancias menos tóxicas y más seguras en cuanto a su manejo dentro del laboratorio.

Es importante saber que la "Química Verde" introduce el concepto de prevención contra la contaminación al evitar generar o usar productos tóxicos nocivos para la salud humana y el ambiente. Esta es una mejor opción para el control de la contaminación, puesto que en algunos casos la producción nula de residuos tóxicos elimina la posibilidad de dañar a la ecología. El promover una cultura de prevención a favor del cuidado del ambiente es uno de los objetivos primordiales de la "Química Verde", así como explicar sus fundamentos en los programas escolares, favorece la formación de los alumnos al inducir en ellos la preocupación de mejorar la preservación del ambiente, así como prevenir, promover y realizar acciones que lleven implícitos los principios de la "Química Verde". De esta forma los alumnos, profesores y empleados de la institución se encuentran inmersos en una cultura ecológica, a la vez, se ven comprometidos a cumplir con dichos lineamientos.¹⁸

1.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Todo método analítico tiene como propósito el determinar el analito en una muestra y es un procedimiento que involucra un proceso de medición que da como resultado una respuesta analítica. El atributo esencial que debe cumplir la respuesta es la confiabilidad y los modelos que permiten demostrar si el atributo está ausente o presente, son los modelos estadísticos.

Los criterios de validación a evaluar en un método analítico volumétrico según la FDA son: especificidad, linealidad, precisión y robustez. Y se debe reportar las especificaciones del equipo, el procedimiento completo de la valoración y los cálculos realizados.¹⁹

1.5.1 Justificación para realizar la validación de un método analítico

Un método analítico está identificado como un sistema crítico en el aseguramiento de la calidad, ya que impacta de manera directa en la calidad de un producto. La constante intención de las empresas por alcanzar una productividad mayor a menores costos, está determinada, entre otros factores, por el dictamen del producto y de sus materias primas en menor tiempo, utilizando métodos de prueba de menor costo, mantenimiento o método de análisis. De esta forma, el profesional farmacéutico es responsable de la calidad de los procesos farmacéuticos, por lo que todo producto debe satisfacer los requisitos mediante la validación de los métodos analíticos.^{20 y 21}

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas de análisis, en donde el químico se da cuenta si el estudio, en el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos.

La validación de métodos a microescala es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos (linealidad, exactitud y precisión) para la aplicación del método a microescala en la cuantificación de fármacos.

Además, existe justificación legal para realizar la validación de un método analítico:

El reglamento de insumos para la salud referente a los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos, (medicamentos, fármacos, materias primas y aditivos), que 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: los controles de laboratorio e inspecciones deben apoyarse en normas, procedimientos normalizados de operación, 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 farmacopeicos o farmacopeicos.

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993. Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimientos de la Industria Químico-Farmacéutica dedicados a la fabricación de Medicamentos; establece entre otros, los siguientes puntos para la validación de métodos analíticos:

Los métodos analíticos deben ser validados, de acuerdo a lo establecido en el apartado de control del laboratorio analítico.

Contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la FEUM.^{22 y 23}

1.5.2 Parámetros de validación

Cuadro 4. Parámetros requeridos en la validación de un método analítico.²³

Parámetro de desempeño	Contenido/ Potencia/ valoración	Prueba de impureza Contenido/ valoración	Prueba límite para el control de impurezas	Pruebas de Identificación
Precisión/adecuabilidad del sistema	Si	Si	Si	*
Linealidad del sistema	Si	Si	No	No
Especificidad ⁽¹⁾	Si	Si	Si	Si
Exactitud y repetibilidad	Si	Si	No	No
Precisión del método o precisión intermedia ⁽²⁾	Si	Si	No	No
Estabilidad analítica de la muestra ⁽³⁾	*	*	No	No
Límite de detección	No	No	Si	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	No
Robustez	*	*	*	No
Tolerancia	*	*	*	No

NOTA:

*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método

(1) La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina.

(2) También es definido como un estudio de tolerancia.

(3) Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

1.5.2.1 Linealidad del sistema: se basa en la determinación analítica ya sea física, química o biológica del analito; como por ejemplo los sistemas volumétricos que determinan el volumen consumido por el analito, los sistemas espectrofotométricos que determinan la luz absorbida por el analito, entre otros. Por lo tanto, la linealidad del sistema del método analítico es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.^{23 y 24}

1.5.2.2 Precisión del sistema: se basa en el grado de concordancia entre los resultados de cada prueba obtenidos a partir de estándares primarios o secundarios por repetición aplicando el método analítico a múltiples muestras de una muestra homogénea. También se refiere a la distribución de los resultados individuales alrededor de su promedio.^{23 y 24}

1.5.2.3 Linealidad del método: se expresa como la habilidad (en un rango dado) para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de la muestra del analito.^{23 y 24}

1.5.2.4 Exactitud de un método analítico: se expresa como el grado de concordancia entre los valores aceptados convencionalmente como verdaderos o de referencia y los valores encontrados experimentalmente.²⁴

1.5.2.5 Especificidad: se expresa como la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida única y exclusivamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra. La definición implica lo siguiente:

Identificación: asegurar la identidad del analito.

Prueba de pureza: asegurar que todo método analítico realizado establezca el volumen exacto del contenido de impurezas de un analito, por ejemplo: sustancias extrañas, metales pesados, residuos de solventes, etcétera.

Valoración (contenido o potencia): proporcionar los resultados que establezcan el volumen exacto del contenido o potencia de un analito en una muestra.^{23 y 24}

1.5.2.6 Precisión: se expresa como el grado de concordancia (grado o dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de un muestreo múltiple de una misma muestra homogénea y bajo las mismas condiciones de trabajo. La precisión debe ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.^{23 y 24}

1.5.2.6.1 Repetibilidad: se expresa como la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. La repetibilidad solo es un término de precisión intra-ensayo.^{23 y 24}

1.5.2.6.2 Precisión intermedia: se expresa como la variación del método analítico al reproducir el método, en diferente día, con diferente analista, diferentes equipos, etcétera.^{23 y 24}

1.5.2.7 Robustez: es la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método. La evaluación se considera durante la fase de desarrollo y depende del tipo de procedimiento bajo estudio.^{23 y 24}

1.6 JARABE

1.6.1 Definición.

Los jarabes son formas farmacéuticas con uno o varios principios activos en soluciones acuosas concentradas de sacarosa, otros azúcares o agentes edulcorantes, a los cuales se les puede adicionar pequeñas cantidades de alcoholes polihídricos para retardar la cristalización o para incrementar la solubilidad de otros ingredientes. Los jarabes normalmente contienen componentes aromáticos o saborizantes. Estos componentes normalmente no contienen principios activos.¹²

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none">➤ Fácil absorción del principio activo➤ Enmascaramiento del sabor y olor➤ Aceptación por niños y adultos➤ Retarda el desarrollo de microorganismos➤ Producción económica	<ul style="list-style-type: none">➤ No recomendable para diabéticos y obesos➤ Dosis variable➤ Cristalización con el tiempo➤ Susceptibles a la luz

1.6.2 Formulación.

Principio activo	Dosis terapéutica
Correctivos de sabor, olor y color.....	0.1-0.2 %
Edulcorantes.....	65-85%
Amortiguador.....	***
Conservadores.....	0.1-0.2 %
Cosolventes.....	5-10 %
Antioxidantes.....	0.1-0.2 %
Vehículo (agua).....	c. b. p. ²⁵

***Cantidad necesaria para mantener o amortiguar el pH.

1.6.2.1 Amortiguadores

Se adicionan cuando el principio activo es muy sensible y para que el fármaco no se degrade en función del pH, se utilizan: amortiguador ácido/base, por ejemplo: fosfatos, citratos, acetatos, etc.,

1.6.2.2 Correctivos de olor, color y edulcorantes.

Estos se utilizan en concentraciones de 0.1-0.2% y deben ser solubles en agua: por lo general, se utilizan esencias ya sean líquidas o en polvo como saborizantes y a la vez como agentes que le proporcionan olor a la forma farmacéutica, pueden ser naturales o sintéticas por ejemplo: piña, uva, limón, naranja, cereza, manzana, etc. Para colorantes se utilizan aquellos que son autorizados por el Reglamento de Insumos para la salud o normas mexicanas para la fabricación de medicamentos e insumos para la salud. Los edulcorantes son agentes que le dan la propiedad viscosa y también tiene la propiedad

de autoconservador (por la alta concentración de azúcar), a la forma farmacéutica: por ejemplo: sacarosa (65-85%), sacarina, aspartame, sorbitol, etc.

1.6.2.3 Antioxidantes.

Son agentes que mantienen la estabilidad molecular del principio activo, manteniéndolo libre de oxidación o hidrólisis. Se seleccionan antioxidantes solubles en agua y se utilizan en concentraciones del 1-2 %. Ejemplos: EDTA, ácido cítrico, ácido ascórbico, etc.

1.6.2.4 Conservadores.

Son agentes que mantienen los niveles bajos de microorganismos o retardan la contaminación, para ello se realizan los controles de calidad correspondientes (límites microbianos), estos agentes se utilizan de 0.1-0.2%, ejemplos de ellos son: parabenos (nipagin, nipazol), ácido benzóico, benzoato de sodio, etc.

1.6.2.5 Cosolventes.

Modifica la solubilidad del principio activo, favoreciéndola. Se utilizan en concentraciones del 5-10% y los principales son: Glicerina, propilenglicol, alcohol etílico (no más del 10%).^{26 y 27}

1.6.3 Métodos de fabricación.

1.6.3.1 Disolución por calor.

Este método se realiza cuando el componente principal no es volátil ni termolábil y cuando se desee una preparación rápida. La sacarosa por lo común se agrega al agua purificada o a la solución acuosa y se calienta hasta obtener la solución; luego se filtra la solución y se agrega una cantidad suficiente de agua purificada hasta completar el peso o el volumen deseados.

El calentamiento excesivo de los jarabes a temperatura de ebullición es indeseable debido a que invariablemente se produce un cierto grado de inversión de la sacarosa, con una mayor tendencia a la fermentación. Los jarabes no pueden esterilizarse en autoclave sin que se produzca cierto grado de caramelización. Este fenómeno se refleja por una coloración amarillenta o pardusca resultante de la formación de caramelo por la acción del calor sobre la sacarosa.

1.6.3.2 Agitación sin calor

Este proceso se utiliza en casos en los cuales el calor se asociaría con la pérdida de componentes volátiles importantes. Cuando se elaboran cantidades mayores de 2000 ml, la sacarosa debe agregarse a la solución acuosa en un frasco cuyo tamaño sea aproximadamente el doble del recipiente utilizado para el jarabe. Esta precaución

posibilita la agitación activa con una solubilización rápida. Es importante tapar el frasco para evitar contaminación y la pérdida de solución sobre el proceso. Para la elaboración de jarabes en grandes cantidades se utilizan tanques revestidos de vidrio con agitadores mecánicos especialmente adaptados para la disolución de la sacarosa.^{27 y 28}

1.6.4 Problemas de fabricación.

Cristalización. Se lleva a cabo principalmente por la evaporización del vehículo y además por la inestabilidad fisicoquímica del principio activo (por ejemplo: polimorfismo).

La variación de la densidad del jarabe cuando se ha utilizado el método de disolución por calor.

Inversión de la sacarosa (dextrosa mas levulosa). Se observa este problema porque las soluciones de sacarosa son dextrorrotatorias, la velocidad de la inversión aumenta significativamente en presencias de ácidos: el ión hidrógeno actúa como catalizador en esta reacción hidrolítica. El azúcar invertida es más fácilmente fermentable que la sacarosa y el color es más oscuro. Sin embargo, los dos azúcares reductores presentes en el azúcar invertido contribuyen a retardar la oxidación de otras sustancias.

Caramelización. Cambia la densidad y viscosidad del jarabe, aumentando significativamente, además también sus propiedades físicas como el color, el cual cambia a un color ámbar, debido a que, cuando se ha hidrolizado la sacarosa, la levulosa es sensible al calor y se oscurece rápidamente.²⁸

1.6.5 Parámetros de control en la fabricación de jarabes

Mezclado {
Velocidad de mezclado
Tiempo de mezclado
Temperatura a la cual se lleva a cabo el mezclado

Filtración {
Tipo de filtro
Tamaño de filtro^{27 y 28}

1.6.6 Pruebas para el control de calidad del producto terminado en jarabes

Apariencia (organolépticas)
pH
Viscosidad
Límites microbianos
Azúcares reductores
Rotación óptica
Valoración del principio activo
Variación del volumen.²⁹

1.7 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (CDB)

1.7.1 Antecedentes

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica de análisis térmico en la que se miden las diferencias en la cantidad de calor entre una sustancia y una referencia en función de la temperatura de la muestra cuando las dos están sometidas a un programa de temperatura controlado.

La CDB depende de diversos factores, unos relacionados con el instrumento y otros directamente con las propiedades de la muestra. Estos factores son:

Velocidad de calentamiento. En general, un incremento en la velocidad de calentamiento incrementará la temperatura de transición, de esta manera, un incremento en la velocidad de calentamiento resultará en un aumento del área bajo la curva.

Tipo de atmósfera. Los calorímetros diferenciales de barrido utilizan un gas de purga, como el argón y el nitrógeno, existiendo así condiciones de flujo dinámico. De manera general, bajo condiciones de flujo dinámico, al incrementar el flujo del gas de purga se reduce la temperatura a la cual se observa el fenómeno de transición siempre y cuando el gas de purga no interfiera con la muestra.

Cantidad de la muestra. El área bajo la curva de un pico es proporcional al calor de reacción o transición, y este a su vez de la cantidad de la muestra.

Tamaño de partícula. El área del pico es inversamente proporcional a la conductividad térmica, la cual es dependiente del tamaño de partícula, distribución del tamaño de partícula y del empaque de la muestra.

La CDB tiene numerosas aplicaciones en el área farmacéutica dentro de las cuales se encuentran:

Determinación de polimorfismo
Determinaciones de pureza mediante puntos de fusión
Determinaciones de humedad
Estudios de cinética
Estudios de estabilidad
Interacción fármaco-fármaco y fármaco-excipientes en estudios de preformulación.^{7, 8 y 30}

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día, las exigencias en la cuantificación de fármacos en la industria farmacéutica tienden al mejoramiento de métodos y sistemas apegados a la normatividad del país y a las exigencias del mercado, por ello se buscan y se desarrollan nuevas técnicas de cuantificación de fármacos para llegar a ser más eficiente en cada una de ellas. La reducción de tiempos, costos, materias primas, de desechos tóxicos incluso la reducción del recurso humano para llevar a cabo un análisis, es una de las metas para alcanzar los objetivos planteados, es decir, producir el máximo con el mínimo de recursos.

Por lo tanto, surge la necesidad de desarrollar métodos a microescala; utilizando un método ya establecido, pero gastando cantidades menores de reactivos de las que normalmente se toman, previamente llevando a cabo un análisis estadístico para poder decidir el nivel al cual se microescalará el método, y cuantificar no solo materia prima sino también fármacos en formas farmacéuticas en el control de calidad de productos terminados, así como mejorar las técnicas para la determinación de fármacos que se señalan en las monografías de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª edición (FEUM 8ª edición), y si no las contiene, desarrollarlas con ayuda de las técnicas ya establecidas, teniendo como herramienta la estadística y la validación de métodos, que es la forma de tener una evidencia documentada de que los métodos sirven para lo que fueron diseñados.

3. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método a microescala para cuantificar ácido ascórbico en jarabe.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

Validar el método y sistema para determinar ácido ascórbico en jarabe utilizando el método que señala la FEUM 8ª edición para la determinación de ácido ascórbico como materia prima.

Microescalar el método al 10, 25, 50 y 100% determinando seis muestras en cada nivel.

Seleccionar el nivel que más se asemeja a la población del 100% para llevar el método a microescala.

Validar el método y sistema a microescala para determinar ácido ascórbico en jarabe.

5. HIPÓTESIS

El método analítico desarrollado a microescala es útil para cuantificar el ácido ascórbico en la forma farmacéutica de jarabe, con base en los resultados de la validación.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Materiales necesarios para la elaboración del proyecto

Cantidad	Descripción	Capacidad
2	Frascos de vidrio	
4	Probeta	500, 100 y 50 ml
1	Baño de inmersión	
5	Gotero	50ml
1	Espátula	
1	Papel encerado	1 pliego
2	Pinzas dobles para bureta	
4	Bureta Kimax	100, 50, 25, 10 y 5 ml
4	Matraz Volumétrico	1000ml
1	Varilla de agitación	
2	Vaso de precipitado	250 y 100ml
1	Mortero con pistilo	chico
30	Matraz Erlenmeyer	250ml
1	Tramo de jerga	
1	Frasco de jabón líquido	

Reactivos

Nombre	Marca	Lote
Trióxido de arsénico	Baker analyzed	A41664
Almidón SI	Merck	F1357752 517
Bicarbonato de sodio GR	Baker analyzed	A53335
Ioduro de potasio GR	Baker analyzed	39483
Ácido sulfúrico 2N	Baker analyzed	39519
Ácido clorhídrico 1M	Baker analyzed	C37456
Hidróxido de sodio 2N	Baker analyzed	B14C70
Ácido ascórbico GR	SIN MARCA*	
Yodo 0.1 N	Merck	B597061 524
Agua destilada libre de dióxido de carbono		Sin marca

Equipos

Calorímetro	Perkin Elmer Diferencial Scanning
Balanza analítica	Ohaus Mod Explorer Pro
Parrilla de calentamiento-agitación	Mettler
Microbalanza Analítica	Mettler MT5
Balanza granataria	Ohaus

7. METODOLOGÍA

Se realizó un estudio calorimétrico para evaluar la interacción fármaco-excipientes y se formuló el jarabe de ácido ascórbico. Se llevó a cabo un muestreo de varios excipientes (según la formulación para jarabes), tales como saborizantes (esencia de cereza, polvo de piña, polvo de lima-limón, polvo de naranja, polvo de manzana), colorantes (amarillo N°6, color rojo N°6, índigo, rojo N°3), conservadores (benzoato de sodio, metilparabeno, ácido benzoico), amortiguadores (acetato de sodio pH 4, citratos pH 4.5, fosfatos pH 4.5), cosolventes (propilenglicol), antioxidantes (ácido cítrico) y posteriormente se mezcló en un mortero con pistilo de forma circular cada excipiente en una proporción 1:1 con el ácido ascórbico. Se pesó de 3 a 5mg de cada mezcla y se colocaron las muestras en el calorímetro. Se obtuvieron los termogramas y se evaluó si hubo o no interacción con el excipiente, dependiendo si el punto de fusión del ácido ascórbico en la mezcla fue modificado $\pm 5^{\circ} \text{C}$.

Se fabricaron dos litros de jarabe con el principio activo, empleando el método de disolución por calor. Para ello se mezclaron los excipientes en un vaso de acero inoxidable de 4 L y se calentó, después de que se disolvieron totalmente los excipientes, se enfrió esta mezcla, se adicionaron 20 g de ácido ascórbico y la cantidad del vehículo necesaria para dos litros de jarabe, para obtener una concentración de 10 mg/ml de ácido ascórbico. Al mismo tiempo se fabricó un jarabe placebo tal como se describió anteriormente, pero sin ácido ascórbico. Esto para evaluar la especificidad del método.

Se validó el método analítico para determinar ácido ascórbico en jarabe basándose en la monografía de la FEUM 8ª edición para determinar ácido ascórbico como materia prima; se disolvieron 100 mg de ácido ascórbico (contenidos en una alícuota de 10 ml de jarabe [10 mg/ml de ácido ascórbico]) en una mezcla de 100 ml de agua libre de dióxido de carbono y 25 ml de una solución de ácido sulfúrico 2.0 N. Se tituló la solución inmediatamente con solución de yodo 0.1 N (previamente estandarizada con trióxido de arsénico como patrón primario); se agregaron 3 ml de solución indicadora (SI), cuando se acercó al punto final.

En la validación del método al 100% para cuantificar ácido ascórbico en jarabe se evaluaron los parámetros tales como:

Linealidad del sistema: se construyó una curva de concentración vs. la respuesta analítica, se sometieron los datos obtenidos a una regresión lineal y se calculó el coeficiente de determinación, la pendiente y la ordenada al origen de la curva. A la vez se sometieron los resultados a un análisis de varianza con un nivel de confianza del 99% para la regresión lineal de la curva para lo cual se verificó si hubo dependencia o no entre las variables. Con la prueba t con un nivel de confianza del 95% se evaluó si la pendiente es igual o diferente a 0 y si la ordenada al origen es igual o diferente de cero.

Precisión de sistema: se calculó el promedio seis datos del por ciento de contenido de ácido ascórbico al 100%, así como la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Linealidad del método: se determinó el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación del % de recobro y se construyó una curva de la cantidad adicionada vs.

cantidad recuperada con tres muestras de 5 niveles; 80, 90, 100, 110 y 120 respectivamente. Se calculó el coeficiente de determinación, la pendiente y la ordenada al origen de la curva.

Exactitud del método: se determinó el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación de la respuesta analítica de seis muestras al 100%; se llevó a cabo la inferencia estadística utilizando la prueba chi-cuadrada para evaluar si la varianza poblacional es igual o diferente del dos por ciento y se evaluó si el por ciento de recobro es igual o diferente del 100% utilizando la prueba t con un nivel de confianza del 95%.

Precisión del método.

Repetibilidad: se comparó el resultado del % de contenido de seis muestras al 100% determinadas en días diferentes y se realizó un análisis de varianza para evaluar si las poblaciones del día 1 y 2 son iguales.

Reproducibilidad: se verificó si hay o no efecto en la respuesta analítica obtenidas en días y con analistas diferentes, con un análisis de varianza de un modelo cruzado de 2 factores, con un nivel de confianza del 95%, con 12 muestras al 100% determinadas independientemente. El modelo se evaluó por factores fijos y factores aleatorios.

Tolerancia: se determinó ácido ascórbico en seis muestras al 100%, se modificaron las condiciones internas del método; se calculó el promedio, desviación estándar y coeficientes de variación del contenido de ácido ascórbico en cada alícuota. Finalmente, se comparó el valor de los coeficientes de variación de cada condición de ensayo.

Robustez: se determinó ácido ascórbico en seis muestras al 100%, se modificó las condiciones externas del método; se calculó el promedio, desviación estándar y coeficientes de variación de cada condición modificada.

Especificidad del método: se verificó que no había interferencia de los excipientes en la cuantificación del ácido ascórbico y para ello se realizaron tres ensayos con un jarabe placebo.

Se determinó ácido ascórbico en jarabe en 6 muestras para cada nivel a microescala; 50, 25 y 10 % (utilizando el método descrito arriba, con la diferencia de que se utiliza el 50, 25 y 10 % de lo indicado en el método) y se realizó una comparación con 6 muestras al 100 %, analizándose estadísticamente por comparación de muestras múltiples con un nivel de confianza del 95%, para escoger cual de los niveles a microescala tuvo semejanza estadística con el 100 %.

Se validó el método analítico para determinar ácido ascórbico en jarabe a microescala (al nivel que se microescaló), utilizando la metodología que se describió anteriormente y de igual forma se evaluaron los parámetros en la validación de métodos analíticos, estos son: linealidad del sistema, precisión de sistema, exactitud del método, linealidad del método, precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad), robustez, tolerancia y especificidad del método.

8. RESULTADOS

8.1 PREPARACIÓN Y FORMULACIÓN DEL JARABE DE ÁCIDO ASCÓRBICO.

Se prepararon dos litros de jarabe de ácido ascórbico y dos litros de jarabe placebo, para ello se preparó una solución amortiguadora de fosfatos-citratos pH 4.5 (Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado-ácido cítrico; en un matraz volumétrico de 1000 ml, se disolvieron 21.02 g de ácido cítrico en 800 ml de agua. Se ajustó el pH a 4.5 con una solución que contiene 35.82 g de fosfato dibásico de sodio dodecahidratado en 1000 ml de agua. Y se llevó a volumen con agua) tal como lo señala la FEUM 8ª edición. Se llevó a cabo un estudio de interacción fármaco-excipientes y se tomó la decisión de hacer una formulación con los siguientes excipientes

Formulación para un litro de jarabe:

Principio activo al 1%.....	.10g
Color rojo #3 al 0.1%.....	1g
Sabor lima-limón al 0.1%.....	1g
Metilparabeno al 0.2%.....	2g
Propilenglicol al 8%.....	80 ml
Amortiguador fosfatos-citratos pH 4.5.....	C. b. p.

8.2 VALIDACIÓN AL 100 % DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR ÁCIDO ASCÓRBICO EN JARABE

Día 1 se estandarizó el yodo para lo cual se obtuvo una N = 0.109

El % de contenido de ácido ascórbico en cada alícuota para cada nivel se indica en el siguiente cuadro de resultados (cuadro 5). También se presentan los promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación.

Cuadro 5: Por ciento de contenido para cada nivel.

Nivel	80%	90%	100%	110%	120%
Valores obtenidos en %	101.70	100.67	98.00	101.70	101.70
	101.70	98.62	98.37	101.70	103.24
	101.70	98.62	99.11	102.54	103.24
	101.70	96.57	98.37	100.86	103.24
	101.70	100.67	99.11	100.02	101.70
	99.39	96.57	98.74	101.70	100.93
Suma	607.90	591.72	591.72	608.53	614.06
Promedio	101.32	98.62	98.62	101.42	102.34
Desvest*	0.943	1.83	0.447	0.868	1.02
CV**	0.931 %	1.86 %	0.454 %	0.855 %	1.00 %

Notas

8.806 mg de ácido ascórbico es equivalente a 0.1 N de Yodo

Todos los volúmenes de jarabe fueron medidos independientemente

Calculando el peso equivalente del ácido ascórbico dada la normalidad del yodo de 0.109, se tiene que 9.626 mg de ácido ascórbico son equivalentes a esta normalidad.

*Desviación estándar

**coeficiente de variación

8.2.1 Resultados de la validación del día 2. Se estandariza solución de yodo N= 0.109. Los volúmenes medidos de jarabe y el volumen gastado de yodo para cada nivel se presentan en las siguientes tablas.

En el siguiente cuadro (cuadro 6) se presentan los porcentajes de contenido de ácido ascórbico en cada alícuota medida, así como los promedios, desviaciones estándar y los coeficientes de variación.

Cuadro 6: Por ciento de contenido de ácido ascórbico para cada nivel.

Nivel	80%	90%	100%	110%	120%
Valores obtenidos	97.61	99.16	98.16	100.56	102.26
en %	99.93	99.16	98.35	98.879	102.26
	99.93	101.22	98.72	100.56	100.71
			98.91		
			97.98		
			97.98		
Suma	297.48	299.54	295.25	300.01	305.23
Promedio	99.16	99.84	98.41	100.00	101.74
Desvest	1.34	1.19	0.28	0.9758	0.89
CV	1.35 %	1.19 %	0.28 %	0.9758 %	0.87 %

Notas

8.806 mg de ácido ascórbico es equivalente a 0.1 N de Yodo

Todos los volúmenes de jarabe fueron medidos independientemente

Calculando el peso equivalente del ácido ascórbico dada la normalidad del yodo de 0.109, se tiene que 9.59854 mg de ácido ascórbico son equivalentes a esta normalidad

*Desviación estándar

**coeficiente de variación

Con estos resultados se puede determinar linealidad del método, precisión del sistema, exactitud del método, precisión del sistema, robustez, tolerancia y especificidad del método.

8.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Cuadro 7: Nivel de concentración vs. respuesta analítica (% contenido de ácido ascórbico).

X	Y	X*Y	X ²	Y ²	
80	81.36	6508.91	6400.00	6619.68	
80	81.36	6508.91	6400.00	6619.68	
80	81.36	6508.91	6400.00	6619.68	
80	81.36	6508.91	6400.00	6619.68	
80	81.36	6508.91	6400.00	6619.68	
80	79.51	6360.98	6400.00	6322.21	
90	90.61	8154.63	8100.00	8209.64	
90	88.76	7988.21	8100.00	7877.97	
90	88.76	7988.21	8100.00	7877.97	
90	86.91	7821.79	8100.00	7553.14	
90	90.61	8154.63	8100.00	8209.64	
90	86.91	7821.79	8100.00	7553.14	
100	98.00	9800.35	10000.00	9604.69	
100	98.37	9837.34	10000.00	9677.32	
100	99.11	9911.30	10000.00	9823.39	
100	98.37	9837.34	10000.00	9677.32	
100	99.11	9911.30	10000.00	9823.39	
100	98.74	9874.32	10000.00	9750.22	
110	111.87	12305.91	12100.00	12515.33	
110	111.87	12305.91	12100.00	12515.33	
110	112.80	12407.62	12100.00	12723.05	
110	110.95	12204.21	12100.00	12309.32	
110	110.02	12102.51	12100.00	12105.02	
110	111.87	12305.91	12100.00	12515.33	
120	122.04	14645.06	14400.00	14894.28	
120	123.89	14866.95	14400.00	15349.04	
120	123.89	14866.95	14400.00	15349.04	
120	123.89	14866.95	14400.00	15349.04	
120	122.04	14645.06	14400.00	14894.28	
120	121.12	14534.11	14400.00	14669.47	n=30
3000.00	3016.84	308063.92	306000.00	310246.96	

Nota: X = nivel de concentración, Y = Respuesta analítica en % de contenido.

Se calcula, la ordenada (b), la pendiente (m), la suma de cuadrados totales (SCT), la suma de cuadrados de los residuales (SCR), la suma de cuadrados del error (SCE), el coeficiente de determinación (r^2) y las desviaciones estándar (S_x y S_y) apartir de los resultados mostrados en el cuadro 7.

$$(\Sigma X)^2 = 9000000.00 \quad (\Sigma Y)^2 = 9101350.64 \quad \bar{X}^2 = 10200.00$$

$$b = \frac{\Sigma y - b \Sigma x}{n} = -5.76 \quad SCE = SCT - SCR = 85.6581$$

$$m = \frac{n \Sigma xy - \Sigma x * \Sigma y}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} = 1.06 \quad SCR = b^2 \left[\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n} \right] = 6782.95$$

$$SCT = \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n} = 6868.60 \quad r^2 = SCR / SCT = 0.9875$$

$$S_Y = 15.39 \quad S_Y^2 = 236.85$$

$$S_X = 14.38 \quad S_X^2 = 206.90$$

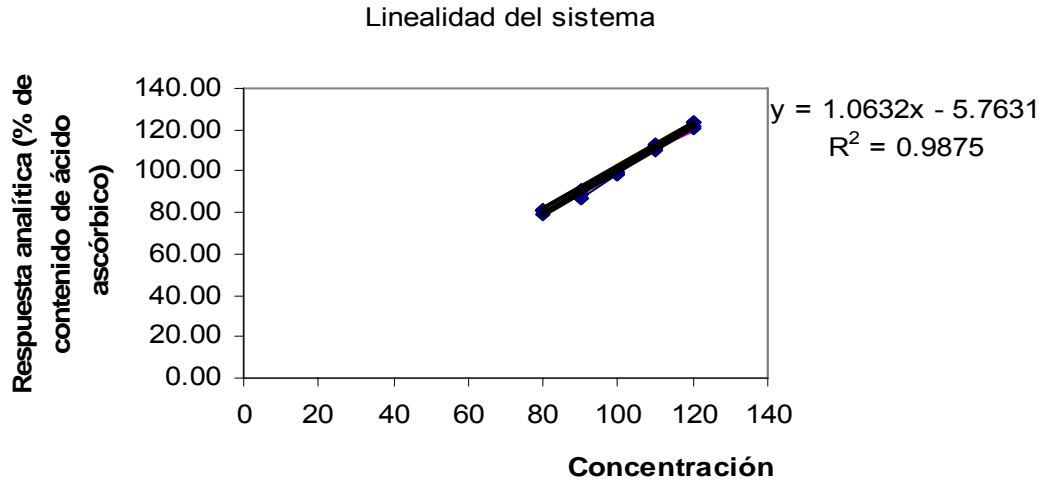


Figura 2: Linealidad de sistema. Respuesta analítica vs. Nivel de concentración

8.3.1 Inferencia estadística para la regresión

Ho: Y no depende de X

Ha: Y depende de X

Tabla ANAdeVA

Fuente de Variación	SC	gl	MC	F cal	F tablas
MODELO	6782.9502	1	6782.95022	2217.21775	4.19597171
ERROR	85.6580759	28	3.059217		
TOTAL	6868.6083				

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula por lo que Y depende significativamente de X.

8.3.2 Inferencia estadística para la ordenada al origen

Ho: A = 0

Ha: A ≠ 0

$$t = \frac{a - A_0}{S_{Y/X} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{(n-1)S_X^2}}}, \text{ gl} = n-2 \quad S_{\frac{Y}{X}} = \frac{\sum y^2 - m(\sum xy) - b(\sum y)}{n}$$

$$S_{Y/X} = 2.8552692$$

$$t_{\text{tablas}} = 2.36845173$$

$$t_{\text{calculada}} = -1.533091574$$

Conclusión: Se acepta la hipótesis nula por lo que la ordenada es igual a cero
Intervalo de confianza para la ordenada

$$P\left(a - t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} S_{\frac{Y}{X}} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{(n-1)S_X^2}} < A < a + t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} S_{\frac{Y}{X}} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{(n-1)S_X^2}}\right) = 0.95$$

$$P(7.3135 < A < -18.8397) = 0.95$$

8.3.3 Inferencia estadística para la pendiente

$$H_0: B=0$$

$$H_a: B \neq 0$$

$$t = \frac{b - \beta_0}{S_B} \quad \text{gl} = n-2 \quad \text{donde; } S_b^2 = \frac{S_Y^2}{\sum X^2 - \left[\frac{(\sum X)^2}{n} \right]}$$

$$S_b^2 = 0.00135876 \quad S_b = 0.036861367$$

$$t_{\text{tablas}} = 2.36 \quad t_{\text{calculada}} = 28.84$$

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula por lo que B es diferente de cero

Intervalo de confianza para la pendiente

$$P \left(b - t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} \frac{S_Y}{\sqrt{n-1} * S_x} < B < b + t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} \frac{S_Y}{\sqrt{n-1} * S_x} \right) = 0.95$$

$$P(1.0621 < B < 1.0644) = 0.95$$

8.4 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Cuadro 8: Datos de seis muestras al 100% de contenido de ácido ascórbico

No. de muestra	% de contenido
1	98.00
2	98.37
3	99.11
4	98.37
5	99.11
6	98.74
Suma	91.72
Promedio	98.62
Desvest*	0.447
CV**	0.454 %

Nota: *Desviación estándar, **Coeficiente de variación

Conclusión: La precisión es evaluada con el valor del coeficiente de variación el cual nos indica ser menor del 2%, por lo tanto el sistema es preciso. Se observa un coeficiente de determinación de 0.996 (fig. 1), por tanto al ser mayor a una r^2 mayor de 0.98 quiere decir que el sistema es lineal, y que presenta error sistemático probablemente al volumen medido, ya que se obtiene una ordenada al origen diferente de cero.

8.5 LINEALIDAD DEL MÉTODO

En el cuadro 9 se muestran los datos de tres muestras para el nivel 80, 90, 100, 110 y 120 %, se calcula el por ciento de recobro para cada nivel, así como el coeficiente de variación de los datos.

Cuadro 9: Datos para obtener el por ciento de recobro.

Nivel de Conc.	Cantidad Adicio.	Cantidad recup.	% de recobro
80.00	80.00	78.09	97.61
80.00	80.00	79.95	99.94
80.00	80.00	79.95	99.94
90.00	90.00	89.25	99.16
90.00	90.00	89.25	99.16
90.00	90.00	91.10	101.23
100.00	100.00	98.17	98.17
100.00	100.00	98.36	98.36
100.00	100.00	98.73	98.73
110.00	110.00	110.63	100.57
110.00	110.00	108.77	98.88
110.00	110.00	110.63	100.57
120.00	120.00	122.71	102.26
120.00	120.00	122.71	102.26
120.00	120.00	120.85	100.71
		Suma	1497.53
		Promedio	99.83
		Desvest*	1.42
		CV**	1.42 %

Nota: Conc= Concentración, Adicio =Adicionada, Recup= Recuperada, CV**= Coeficiente de variación, desvest*= Desviación estándar

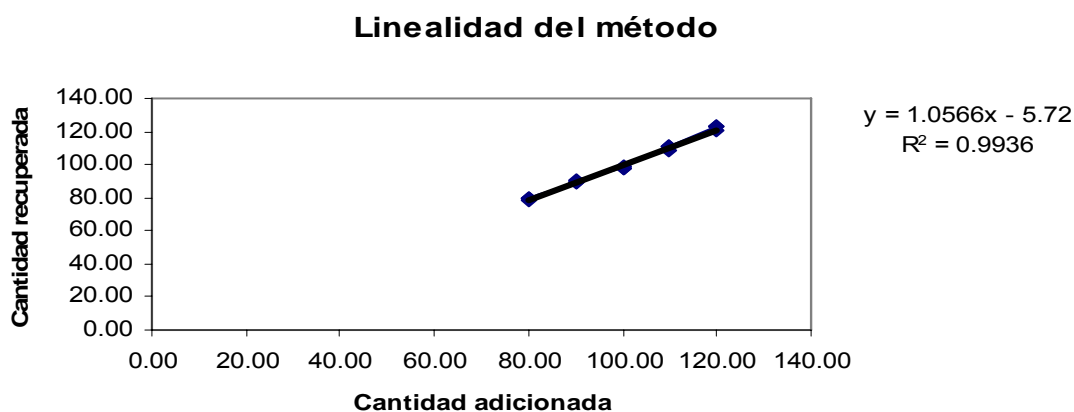


Fig. 3: Linealidad del método. Cantidad recuperada vs. Cantidad adicionada

$$(\Sigma X)^2 = 2250000 \quad n = 15$$

$$(\Sigma Y)^2 = 2247396.52$$

$$b = \frac{\Sigma y - b \Sigma x}{n} = -5.73$$

$$m = \frac{n \Sigma xy - \Sigma x * \Sigma y}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} = 1.06$$

$$SCT = \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n} = 3371.50$$

$$SCR = b^2 \left[\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n} \right] = 3349.76$$

$$SCE = SCT - SCR = 21.74$$

$$r^2 = SCR / SCT = 0.99$$

8.5.1 Inferencia estadística para la linealidad del método

Ho: Y no depende de X

Ha: Y depende de X

Tabla de ANAdeVA

FV	SC	gl	MC	F cal	F tablas
MODELO	3349.76	1.00	3349.76	2003.04	4.67
ERROR	21.74	13.00	1.67		
TOTAL	3371.50				

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula, por lo que Y depende de X, con un nivel de confianza del 95%. Se acepta que hay una fuerte correlación entre las variables.

8.5.2 Inferencia estadística para la ordenada al origen

$$H_0: A = 0$$

$$H_a: A \neq 0$$

$$t = \frac{a - A_0}{S_{Y/X} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{(n-1)S_X^2}}}, \text{ g l} = n-2$$

$$S_{\frac{Y}{X}} = \frac{\sum y^2 - m(\sum xy) - b(\sum y)}{n} = 1.45$$

$$t_{\text{tablas}} = 2.16$$

$$t_{\text{calculada}} = -2.4$$

Intervalo de confianza para la ordenada

$$P\left(a - t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} S_{\frac{Y}{X}} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{(n-1)S_X^2}} < A < a + t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} S_{\frac{Y}{X}} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{(n-1)S_X^2}}\right) = 0.95$$

$$P(-11.55 < A < 0.103) = 0.95$$

Conclusión: Se acepta la hipótesis alterna y la ordenada al origen es diferente de cero. Con un nivel de confianza del 95%. Se debe aceptar por tanto un error sistemático

8.5.3 Inferencia estadística para la pendiente

$$H_0: B=0$$

$$H_a: B \neq 0$$

$$t = \frac{b - \beta_0}{S_B}$$

$$\text{g l} = n-2$$

$$\text{donde; } S_b^2 = \frac{S_{\frac{Y}{X}}^2}{\sum X^2 - \left[\frac{(\sum X)^2}{n} \right]}$$

$$S_b^2 = 0.00070022$$

$$S_b = 0.03$$

$$t_{\text{tablas}} = 2.16$$

$$t_{\text{calculada}} = 44.8$$

Intervalo de confianza

$$P\left(b - t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} \frac{S_{\frac{Y}{X}}}{\sqrt{n-1} * S_X} < B < b + t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} \frac{S_{\frac{Y}{X}}}{\sqrt{n-1} * S_X}\right) = 0.95$$

$$P(0.99 < B < 1.1139) = 0.95$$

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula por lo que la pendiente es diferente de cero, con un nivel de confianza del 95%. Se acepta que no hay problemas de proporcionalidad con respecto a las variables.

8.6 EXACTITUD DEL MÉTODO

Cuadro 10: Datos de seis muestras al 100% para calcular el % de recobro

No. De muestra	Cant. adicio	Cant. recup	% de recobro
1	100	98.00	98.00
2	100	98.37	98.37
3	100	99.11	99.11
4	100	98.37	98.37
5	100	99.11	99.11
6	100	98.74	98.74
$S_x = 0.45$		Suma	591.71
$S^2_x = 0.20$		Promedio	98.619
$\sigma^2_x = 0.17$		Desvest*	0.447
		CV**	0.454

Nota: Conc= Concentración, Cant. Adicio = cantidad adicionada, Cant Recup= Cantidad Recuperada, Desvest*= Desviación estándar, CV**= Coeficiente de variación.

8.6.1 Inferencia estadística para la exactitud del método

$$\chi^2_{CALC} = \frac{(n-1)S_x^2}{\sigma_0^2}$$

$$X^2_{calculada} = 6.00$$

$$X^2_{tablas} = 12.83$$

Conclusión: Se acepta H_0 por lo que la varianza poblacional es igual al 2% y el coeficiente de variación es menor del 2%.

8.7 PRECISIÓN DEL MÉTODO

8.7.1 Repetibilidad

Se evalúa la repetibilidad del método por comparación de medias del día 1 y del día 2. Para ello se obtiene el % de contenido de seis muestras al 100% de ácido ascórbico, para cada día. Se calculan las sumas respectivas para realizar el análisis de varianza y posteriormente se concluye.

	Día 1	Día 2
% de contenido de ácido ascórbico	98.17	98.00
	98.36	98.37
	98.73	99.11
	98.91	98.37
	97.98	99.11
	97.98	98.74
Suma	590.13	591.72
Promedio	98.36	98.62
Desvest*	0.390	0.447
CV**	0.396	0.454

Desvest*= Desviación estándar, CV**= Coeficiente de variación.

Modelo	$Y_{ij} = m_i + \tau_i + e_{ij}$		
$\Sigma Y_{i.}^2$	698389.17	$\Sigma \Sigma Y_{ij}^2$	116399.96
$Y_{..}^2$	1396775.83	$\Sigma Y_{i.}^2 / r$	116398.20
r	6.00	$Y_{..}^2 / t * r$	116397.99
t	2.00	r-1	5.00

8.7.2 Inferencia estadística para la repetibilidad del método

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

FV	SC	gl	MC	Fcal	F (0.05,gl1,gl2)
Modelo	0.20	1	0.209	1.18	4.96
Error	1.76	10	0.176		
TOTAL	1.973				

Conclusión: No hay evidencia suficiente para rechazar que las medias son diferentes, por lo tanto el método es repetible, con un coeficiente de determinación menor del 2%.

8.7.2 Reproducibilidad

Se evalúa la reproducibilidad del método evaluando analista, el día y la interacción día analista. Para ello se obtienen tres datos; para la condición día 1- analista1, día 2-analista 1, día 1-analista 2 y día 2-analista 2 respectivamente, en % de contenido de ácido ascórbico al 100%, así como las sumas que se utilizarán para realizar el análisis de varianza y finalmente se concluye.

	Día 1	Día 2	SUMA	SUMA		
Analista 1	99.11	101.70	200.81		$\Sigma Y^2_{k..}$	711694.91
	99.11	99.85	198.97	598.38	$\Sigma Y^2_{.l}$	711676.56
	98.74	99.85	198.60		$\Sigma \Sigma Y^2_{kl}$	355851.69
Analista 2	98.36	99.85	198.21		$\Sigma \Sigma \Sigma Y^2_{klj}$	118620.45
	98.73	99.94	198.66	594.66	$Y^2_{...}$	1423339.32
	98.91	98.88	197.79			
SUMA	592.97	600.07	1193.04			

ANDeVA para la reproducibilidad del método

Fuente de V*	SC	gl	MC	Fact fijos*	F aleato*	F teórica
Analista (a)	4.21	1.00	4.21	0.00	10.46	5.32
día (b)	1.15	1.00	1.15	0.00	2.86	5.32
Analista-día	118613.02	1.00	118613.02	294661.56	294661.56	5.32
Error	3.22	8.00	0.40			

Nota : Fact fijos = Factores fijos, F aleato = Factores aleatorios

Conclusión: Por factores fijos hay evidencia suficiente para decir que hay efecto en la interacción analista-día.

8.8 TOLERANCIA

Se tomaron en cuenta factores como el cambio de reactivos y el factor de concentración del yodo, esto es cambiando el peso de 80 mg que había que pesar según FEUM 8^a Edición por 100 mg de trióxido de arsénico para determinar la concentración de yodo 0.1 N

	Condiciones	
Diferente pesada de Trióxido de arsénico (80 mg).		normal
		Se pesan 100 mg de As ₂ O ₃
	84.90	81.41
	84.90	81.41
	84.56	81.90
Suma	254.36	244.72
Promedio	84.78	81.57
Desvest	0.195	0.281
CV	0.230	0.345

Desvest* = Desviación estándar
CV**= Coeficiente de variación

Conclusión: Se obtiene una diferencia entre los coeficientes de variación mínima y las condiciones en que se varió muestran que hay tolerancia del método, teniendo una pesada de trióxido de arsénico de 100 mg no cambia significativamente el coeficiente de variación.

8.9 ROBUSTEZ

Para evaluar la robustez del método se determinaron 3 muestras al 100 % evaluando el efecto del yodo.

	Yodo. Técnica química No. Lote 643-1-02. 1995	Yodo. Merck. No. de lote B597061 524 2006
	103.94	98.37
	102.45	99.11
	103.45	98.74
Suma	309.84	296.23
Promedio	103.28	98.74
Desvest*	0.76	0.37
CV**	0.74	0.37

Desvest* = Desviación estándar
CV**= Coeficiente de variación

El método es robusto con respecto a los coeficientes de variación, disminuye el contenido de ácido ascórbico significativamente, con la solución titulante preparada con yodo de reciente compra.

8.10 ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

La especificidad del método se realizó determinando tres muestras del jarabe placebo; determinando solo los reactivos que participan en la formulación, para lo cual obtuvimos un gasto de la solución de yodo de 0.02 ml, adicionado después de que se agregó la solución indicadora de almidón soluble. Se obtuvo un color azul característico inmediatamente después del volumen de yodo gastado, por lo cual se concluye que el método es específico para la determinación del ácido ascórbico y que no hubo interferencia de los excipientes.

8.11 MICROESCALAMIENTO DEL MÉTODO PARA DETERMINAR ÁCIDO ASCÓRBICO EN JARABE

Se determinó ácido ascórbico por sextuplicado para cada nivel; 10, 25, 50 y 100%. El siguiente cuadro (cuadro 11) muestra los resultados en por ciento de contenido de AA, además de la suma, promedio, desviación estándar y los coeficientes de variación para cada nivel.

Tabla 11: Por ciento de contenido de ácido ascórbico para cada nivel.

Nivel	10%	25%	50%	100%
Datos obtenidos en %	80.52	84.76	83.08	84.42
	78.69	85.52	84.18	86.27
	78.69	83.23	86.38	86.27
	80.52	85.52	86.01	84.42
	82.35	87.81	82.72	86.27
	78.69	84.00	84.18	84.42
Suma	479.48	510.84	506.56	512.08
Promedio	79.91	85.14	84.43	85.35
Desvest*	1.49	1.58	1.49	1.00
CV**	1.86%	1.85%	1.76%	1.18%

Desvest* = Desviación estándar CV** = Coeficiente de variación

Se llevó a cabo un análisis estadístico comparando las muestras de los niveles 10, 25 y 50 % contra el nivel al 100%, con un 0.95 de nivel de confianza, y así tomar la decisión a que nivel microescalar el método para cuantificar ácido ascórbico en jarabe.

Cuadro 12: Prueba de muestras múltiples.

Método: con un 95% de nivel de confianza

	No. de muestras	Media	Homogeneidad entre los grupos
Escala del 10%	6	79.91	X
Escala del 50%	6	84.42	X
Escala del 25%	6	85.14	X
Escala del 100%	6	85.34	X
Contraste entre los grupos		Diferencia	Limites +/-
Escala del 10% - Escala del 100%		*-5.43	1.70
Escala del 10% - Escala del 25%		*-5.23	1.70
Escala del 10% - Escala del 50%		*-4.51	1.70
Escala del 100% - Escala del 25%		0.205	1.70
Escala del 100% - Escala del 50%		0.92	1.70
Escala del 25% - Escala del 50%		0.715	1.70

* Presenta una diferencia estadística significativa con un nivel de confianza del 95%.

Conclusión: En el cuadro 12 de anterior se aplicó un procedimiento de comparación múltiple de muestras para determinar que medias son significativamente diferentes una de otra, además de presentar en la segunda tabla la diferencia estimada entre cada par de medias. Un asterisco se ha puesto al lado de tres pares, indicando que estos pares muestran diferencias estadísticas significativas con un nivel de confianza del 95%. Además en la parte de arriba se muestra que los grupos de escalamiento del 25, 50 y 100% están dentro de la misma columna indicados con X, lo que indica que estos grupos son homogéneos. Sin embargo podemos observar que en la diferencia de contrastes se tiene un menor valor para el par de 100 y 25 %. Los siguientes gráficos apoyan este análisis.

Gráfico de cajas y bigotes

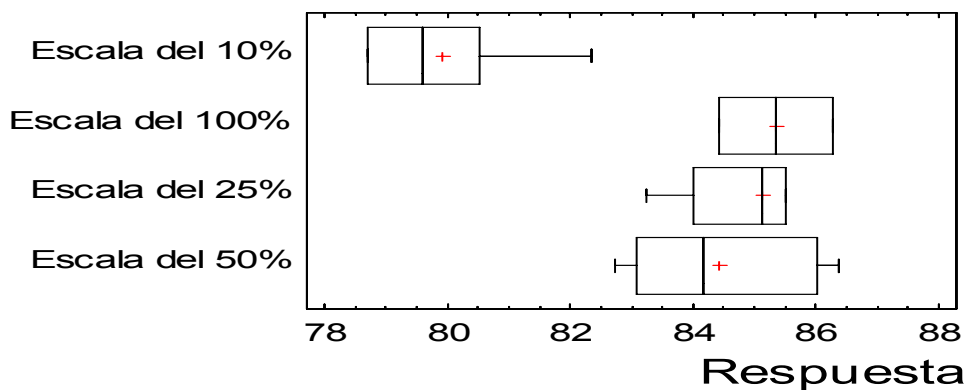


Fig. 4: Comparación entre los grupos contra la respuesta analítica

Gráfico de Análisis de Medias

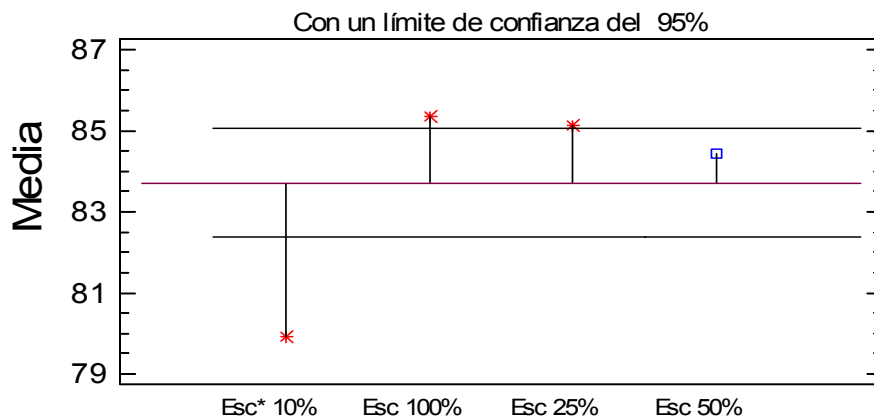


Fig. 5: Análisis de la media para la escala del 10, 25, 50 y 100%.

*escalamiento

Tomando en cuenta el análisis demuestras múltiples, así como los gráficos de cajas y análisis de medias (fig. 3 y 4), el nivel más confiable para reproducir el método a microescala es al 25% con un nivel de confianza del 95%.

8.12 VALIDACIÓN AL 25 % DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR ÁCIDO ASCÓRBICO EN JARABE.

Día 1, se presentan los valores para el % de contenido de ácido ascórbico (cuadro 13)

Cuadro 13: Por ciento de contenido para cada nivel en cada alícuota de jarabe

Nivel	20%	22.5%	25%	27.5%	30%
Datos obtenidos en %	97.62	97.62	101.37	96.25	98.87
	100.90	95.95	98.37	95.57	98.24
	99.02	95.11	98.37	94.89	96.37
	99.02	95.11	99.87	95.57	101.37
	99.96	95.11	98.37	96.93	98.24
	98.56	94.28	99.12	96.93	98.24
Suma	595.09	573.18	595.46	576.14	591.33
Promedio	99.18	95.53	99.24	96.02	98.56
Desvest*	1.14	1.15	1.20	0.83	1.62
CV**	1.15	1.20	1.21	0.86	1.64

Notas

8.806 mg de ácido ascórbico es equivalente a 0.1 N de Yodo

Todos los volúmenes de jarabe fueron medidos independientemente

Calculando el peso equivalente del ácido ascórbico dada la normalidad del yodo de 0.110, se tiene que 9.77 mg de ácido ascórbico son equivalentes a esta normalidad.

Desvest*= Desviación estándar, CV**= Coeficiente de variación

8.12.1 Resultados de la validación del día 2. Se estandariza solución de yodo N= 0.11 % de contenido de ácido ascórbico en cada nivel se presentan en la siguiente tabla.

Cuadro 14: Por ciento de contenido para cada nivel en cada alícuota de jarabe

Nivel	20%	22.5%	25%	27.5%	30%
Datos obtenidos en %	94.49	95.87	97.74	95.80	100.54
	94.49	96.72	98.50	95.10	99.27
	91.63	96.72	96.21	96.49	99.90
			98.50		
			100.79		
			97.74		
Suma	280.62	289.32	589.49	287.39	299.71
Promedio	93.54	96.44	98.25	95.80	99.90
Desvest*	1.65	0.49	1.50	0.69	0.64
CV**	1.77	0.51	1.53	0.72	0.64

Notas

8.806 mg de ácido ascórbico es equivalente a 0.1 N de Yodo

Todos los volúmenes de jarabe fueron medidos independientemente

Calculando el peso equivalente del ácido ascórbico dada la normalidad del yodo de 0.112, se tiene que 9.93 mg de ácido ascórbico son equivalentes a esta normalidad.

Desvest*= Desviación estándar, CV**= Coeficiente de variación

8.13 LINEALIDAD DE SISTEMA

Cuadro 15: Datos del nivel de concentración vs respuesta analítica (%de contenido de ácido ascórbico)

X	Y	X*Y	X ²	Y ²	
20	19.52	390.47	400.00	381.16	
20	20.18	403.61	400.00	407.25	
20	19.80	396.10	400.00	392.23	
20	19.80	396.10	400.00	392.23	
20	19.99	399.85	400.00	399.70	
20	19.71	394.22	400.00	388.52	
22.5	21.96	494.18	506.25	482.40	
22.5	21.59	485.74	506.25	466.05	
22.5	21.40	481.51	506.25	457.98	
22.5	21.40	481.51	506.25	457.98	
22.5	21.40	481.51	506.25	457.98	
22.5	21.21	477.29	506.25	449.98	
25	25.34	633.57	625.00	642.25	
25	24.59	614.80	625.00	604.76	
25	24.59	614.80	625.00	604.76	
25	24.97	624.18	625.00	623.37	
25	24.59	614.80	625.00	604.76	
25	24.78	619.49	625.00	614.03	
27.5	26.47	727.90	756.25	700.61	
27.5	26.28	722.74	756.25	690.71	
27.5	26.09	717.58	756.25	680.88	
27.5	26.28	722.74	756.25	690.71	
27.5	26.66	733.06	756.25	710.59	
27.5	26.66	733.06	756.25	710.59	
30	29.66	889.81	900.00	879.74	
30	29.47	884.18	900.00	868.64	
30	28.91	867.29	900.00	835.76	
30	30.41	912.34	900.00	924.85	
30	29.47	884.18	900.00	868.64	
30	29.47	884.18	900.00	868.64	
Suma	750.00	732.69	18682.76	19125.00	18257.76

Nota: X=Nivel de concentración, Y = Respuesta analítica (% de contenido de ácido ascórbico)

$$(\Sigma X)^2 = 562500.00 \quad n = 30 \quad (\Sigma Y)^2 = 536830.061$$

$$b = \frac{\Sigma y - b \Sigma x}{n} = 0.050 \quad m = \frac{n \Sigma xy - \Sigma x * \Sigma y}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} = 0.974$$

$$\begin{aligned} SCT &= b^2 \left[\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n} \right] = 363.42 \\ SCR &= \left[\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n} \right] = 356.42 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{SCE} &= \text{SCT} - \text{SCR} = 7.00 \\
 r^2 &= \text{SCR} / \text{SCT} = 0.9807 \\
 S_Y &= 3.54 & S^2_Y &= 12.53 \\
 S_X &= 3.60 & S^2_X &= 12.93 \\
 b^2 &= 0.0025 & S^2_b &= 0.033 \\
 S_b &= 0.18280641
 \end{aligned}$$

Linealidad del sistema

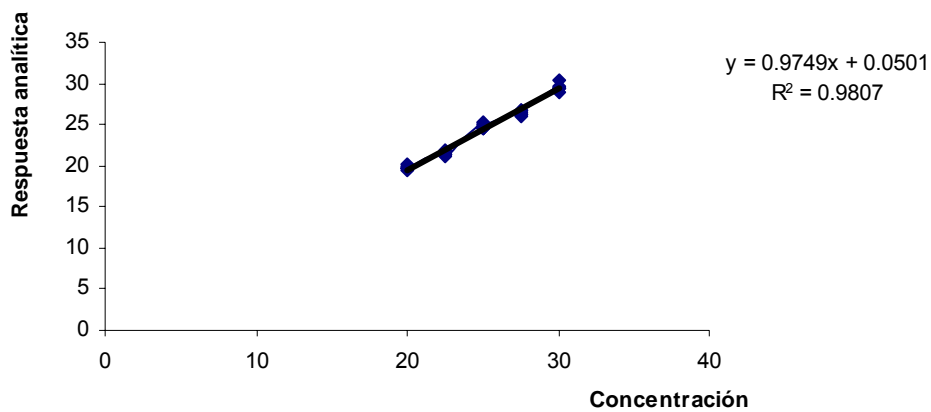


Figura 6: Linealidad de sistema. Nivel de concentración vs. Respuesta analítica

8.13.1 Inferencia estadística para la linealidad de sistema

Ho: Y no depende de X

Ha: Y depende de X

Tabla ANAdeVA

FV	SC	gl	MC	F cal	F tablas
MODELO	356.42	1	356.42	1425.34	4.19
ERROR	7.00	28	0.25		
TOTAL	363.42				

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula por lo que Y depende de X

8.13.2 Inferencia estadística para la ordenada al origen

$$H_0: A = 0$$

$$H_a: A \neq 0$$

$$t = \frac{a - A_0}{S_{Y/X} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{(n-1)S_X^2}}}, \quad g.l = n-2$$

Donde:

$$S_{\frac{Y}{X}} = \frac{\sum y^2 - m(\sum xy) - b(\sum y)}{n} = 0.23$$

$$t_{\text{tablas}} = 2.04$$

$$t_{\text{calculada}} = 0.162$$

Conclusión: Se acepta la hipótesis nula por lo que la ordenada al origen es igual a cero.

Intervalo de confianza para la ordenada

$$P \left(a - t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} S_{\frac{Y}{X}} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{(n-1)S_X^2}} < A < a + t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} S_{\frac{Y}{X}} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{(n-1)S_X^2}} \right) = 0.95$$

$$P(-5.57 < 0.05 < 5.67) = 0.95$$

8.13.3 Inferencia estadística para la pendiente

$$H_0: B=0$$

$$H_a: B \neq 0$$

$$S_b^2 = \frac{\frac{S_Y^2}{X}}{\sum X^2 - \left[\frac{(\sum X)^2}{n} \right]}, \quad g.l = n-2$$

$$S_b^2 = 0.00014525$$

$$S_b = 0.012052143$$

$$t_{\text{tablas}} = 2.36845173$$

$$t_{\text{calculada}} = 80.89129486$$

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula por lo que B es diferente de cero.

Intervalo de confianza

$$P \left(b - t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} \frac{S_Y}{X} \sqrt{n-1} * S_X < B < b + t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} \frac{S_Y}{X} \sqrt{n-1} * S_X \right) = 0.95$$

$$P(0.95 < B < 1.00) = 0.95$$

8.14 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Cuadro 16: Datos de seis muestras al 100% de contenido de ácido ascórbico.

No. de muestra	% de contenido
1	101.37
2	98.36
3	98.36
4	99.86
5	98.36
6	99.11
Suma	595.46
Promedio	99.24
Desvest*	1.20
CV**	1.21

Nota: Desvest*= Desviación estándar, CV**= Coeficiente de variación

Conclusión: La precisión es evaluada con el valor del coeficiente de variación (cuadro 16) el cual nos indica ser menor del 2%, por lo tanto el sistema es preciso.

Se observa un coeficiente de determinación de 0.98 (fig. 1), por tanto al ser igual a una r^2 de 0.98 quiere decir que el sistema es lineal, y que presenta un error sistemático no significativo, ya que se obtiene una ordenada al origen casi igual a cero.

8.15 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Los siguientes datos muestran la cantidad adicionada, la cantidad recuperada y el % de recobro así como la suma, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para el % de recobro.

Cuadro 17: Datos para obtener el por ciento de recobro.

Nivel de conc	cantidad Adicionada	cantidad recuperada	% de recobro
20	20	19.80	99.02
20	20	19.99	99.96
20	20	19.71	98.56
22.5	22.5	21.40	95.11
22.5	22.5	21.40	95.11
22.5	22.5	21.21	94.28
25	25	24.97	99.87
25	25	24.59	98.37
25	25	24.78	99.12
27.5	27.5	26.28	95.57
27.5	27.5	26.66	96.93
27.5	27.5	26.66	96.93
30	30	30.41	101.37
30	30	29.47	98.24
30	30	29.47	98.24
		Suma	1466.70
		Promedio	97.78
		Desves*	2.06
		CV**	1.21

Nota: Desvest*= Desviación estándar, CV**= Coeficiente de variación, Nivel de conc = Nivel de concentración

$$\begin{aligned} (SX)^2 &= 140625.00 & n &= 15 \\ (SY)^2 &= 134542.24 \end{aligned}$$

$$b = \frac{\Sigma y - b \Sigma x}{n} = -0.64 \quad \text{SCE} = \text{SCT} - \text{SCR} = 3.57$$

$$m = \frac{n \Sigma xy - \Sigma x * \Sigma y}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} = 1.00 \quad r^2 = \text{SCR} / \text{SCT} = 0.98$$

$$\text{SCT} = \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n} = 192.52$$

$$\text{SCR} = b^2 \left[\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n} \right] = 188.95$$

Linealidad del método

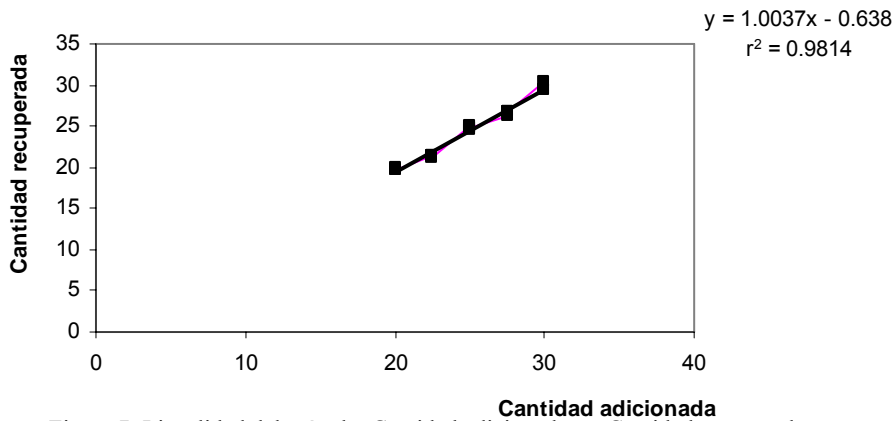


Figura 7: Linealidad del método. Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada

8.15.1 Inferencia estadística para la linealidad del método

Ho: Y no depende de X
Ha: Y depende de X

Tabla ANAdeVA para linealidad del método

FV	SC	gl	MC	F cal	F tablas
MODELO	188.95	1.00	188.95	688.12	4.67
ERROR	3.57	13.00	0.27		
TOTAL	192.52				

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula por lo que Y depende de X

8.15.2 Inferencia estadística para la ordenada al origen

Ho: A = 0
Ha: A ≠ 0

$$t = \frac{a - A_0}{S_{Y/X} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{(n-1)S_X^2}}}, \text{ gl} = n-2 \quad \text{donde; } S_{\frac{Y}{X}} = \frac{\sum y^2 - m(\sum xy) - b(\sum y)}{n}$$

$t_{\text{tablas}} = 2.16$ $t_{\text{calculada}} = -0.66$

Intervalo de confianza para la ordenada

$$P\left(a - t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} S_{\frac{Y}{X}} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{(n-1)S_X^2}} < A < a + t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} S_{\frac{Y}{X}} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{(n-1)S_X^2}}\right) = 0.95$$

$-1.60 < b < 0.31 = 0.95$

Conclusión: Se acepta la hipótesis nula y la ordenada al origen es igual a cero. Con un nivel de confianza del 95%.

8.15.3 Inferencia estadística para la pendiente

$$H_0: B=0$$

$$H_a: B \neq 0$$

$$t = \frac{b - \beta_0}{S_B} \quad ; \quad gl = n-2 \quad \text{donde; } S_b^2 = \frac{S_{\frac{Y}{X}}^2}{\sum X^2 - \left[\frac{(\sum X)^2}{n} \right]}$$

$$S_b^2 = 0.00030206$$

$$S_b = 0.02$$

$$t_{\text{tablas}} = 2.16$$

$$t_{\text{calculada}} = 26.23$$

Intervalo de confianza

$$P \left(b - t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} \frac{S_{\frac{Y}{X}}}{\sqrt{n-1} * S_X} < B < b + t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} \frac{S_{\frac{Y}{X}}}{\sqrt{n-1} * S_X} \right) = 0.95$$

$$(0.96 < B < 1.04) = 0.95$$

Conclusión: Se rechaza la hipótesis nula por lo que la pendiente es diferente de cero con un nivel de confianza del 95%. Se acepta que no hay problemas de proporcionalidad con respecto a las variables.

8.16 EXACTITUD DEL MÉTODO

Cuadro 18: Datos de seis muestras al 100% para calcular el % de recobro.

No. De muestras	Cant. Adicionada	Cant. Recuperada	% de recobro
1	25	24.43	97.74
2	25	24.63	98.50
3	25	24.05	96.21
4	25	24.63	98.50
5	25	25.20	100.79
6	25	24.43	97.74
		Suma	589.49
		Promedio	98.25
		Desvest	1.50
		CV	1.53
		$S_X^2 =$	2.25

Nota: Conc= Concentración, Cant. Adicio = cantidad adicionada, Cant Recup= Cantidad Recuperada, Desvest*= Desviación estándar, CV**= Coeficiente de variación.

8.16.1 Inferencia estadística para la exactitud del método

$$\chi^2_{CALC} = \frac{(n-1)S_x^2}{\sigma_0^2} \quad ; \quad n-1 = 5$$

$$X^2_{calculada} = 2.82 \quad X^2_{tablas} = 11.07$$

Conclusión: Se acepta H_0 por lo que la varianza poblacional es igual al 2% y el coeficiente de variación es menor del 2%.

8.17 PRECISIÓN DEL MÉTODO

8.17.1 Repetibilidad

Se evalúa la repetibilidad del método por comparación de medias del día 1 y del día 2. Para ello se obtiene el % de contenido de seis muestras al 100% de ácido ascórbico, para cada día. Se calculan las sumas respectivas para realizar el análisis de varianza y posteriormente se concluye.

	Día 1	Día 2
% de contenido	101.37	97.74
de ácido	98.37	98.50
ascórbico	98.37	96.21
	99.87	98.50
	98.37	100.79
	99.12	97.74
Suma	595.46	589.49
Promedio	99.24	98.25
Desvest	1.20	1.501
CV	1.21	1.528

Desvest* = Desviación estándar, CV** = Coeficiente de variación

Modelo	$Y_{ij} = \mu_i + t_j + e_{ij}$		
ΣY_i^2	702076.18	$\Sigma \Sigma Y_{ij}^2$	117031.21
$Y_{..}^2$	1404116.76	$\Sigma Y_i^2 / r$	117012.70
r	6	$Y_{..}^2 / t * r$	117009.73
t	2	r-1	5

Inferencia estadística para la repetibilidad del método

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

FV	SC	gl	MC	Fcal	F (0.05, gl1, gl2)
Modelo	2.96	1	2.96	1.60	4.96
Error	18.50	10	1.85		
TOTAL	21.47				

Nota: Fcal = F calculada

Conclusión: No hay evidencia suficiente para rechazar que las medias son diferentes con un nivel de confianza del 95%.

8.17.2 Reproducibilidad

Se avalúa la reproducibilidad del método evaluando analista, el día y la interacción día analista. Para ello se obtienen tres datos; para la condición día 1- analista1, día 2-analista 1, día 1-analista 2 y día 2-analista 2 respectivamente, en % de contenido de ácido ascórbico al 100%, así como las sumas que se utilizarán para realizar el análisis de varianza y finalmente se concluye.

	Día 1	Día 2	SUMA	SUMA
Analista 1	97.74	99.87	197.61	589.81
	98.50	98.37	196.87	
	96.21	99.12	195.33	
Analista 2	98.87	100.54	199.41	593.19
	98.24	99.27	197.51	
	96.37	99.90	196.27	
SUMA	585.93	597.07	1183.00	
$\Sigma Y^2_{k..} =$	699802.19		$a =$	2
$\Sigma Y^2_{.l.} =$	699745.91		$b =$	2
$\Sigma \Sigma Y^2_{kl.} =$	349904.39		$r =$	3
$\Sigma \Sigma \Sigma Y^2_{klj} =$	116642.85		$a*b*r =$	12
$Y^2_{...} =$	1399480.43		$a*r =$	6
$b*r =$	6			

Tabla AnadeVA para la reproducibilidad del método

F V	SC	gl	MC	F fijos	F alacto	F teorica
Analista (a)	10.33	1	10.33	0.00	10.26	5.32
Día (b)	0.95	1	0.95	0.00	0.94	5.32
Analista-día	116624.47	1	116624.47	115870.74	115870.74	5.32
Error	8.05	8	1.01			

Conclusión: Por factores fijos hay evidencia suficiente para decir que hay efecto en la interacción analista-día.

8.18 TOLERANCIA

Se evaluó la tolerancia del método determinando tres muestras al 25% evaluando la presencia de dióxido de carbono en el agua.

Condiciones

	Con agua sin hervir	Con agua hervida
	25.34	25.80
	24.59	25.70
	24.59	25.80
Suma	74.52	77.31
Promedio	24.84	25.77
Desvest	0.43	0.056
CV	1.74	0.217

Conclusión: el método es tolerante a los cambios de condiciones tales como el agua que se utiliza para disolver la muestra de jarabe, lo cual, según el método debe utilizarse agua libre de dióxido de carbono, sin embargo siguiendo el método se disminuye significativamente el coeficiente de variación.

8.19 ROBUSTEZ

Se evaluó la robustez determinando tres muestras al 25% con diferente bureta para titular el jarabe con la solución de yodo, una de 10 ml graduada 1/50 clase A, la otra bureta de 5 ml graduada 1/100 clase A. los resultados del contenido de ácido ascórbico en tres determinaciones para cada condición son los siguientes.

Condiciones

	Bureta de 10 ml graduada 1/50	Bureta de 5 ml graduada 1/100
	25.417	25.455
	25.239	25.375
	25.529	25.255
Suma	76.18	76.08
Promedio	25.39	25.361
Desvest	0.146	0.100
CV	0.575	0.396

Conclusión: el método se muestra robusto con el cambio de bureta utilizada para determinar el ácido ascórbico en jarabe, los coeficientes de variación son menores al 2% aunque con la bureta de 5 ml disminuye el coeficiente de variación pero no es significativo.

8.20 ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

La especificidad del método se realizó determinando tres muestras del jarabe placebo; determinando solo los reactivos que participan en la formulación, para lo cual obtuvimos un gasto de la solución de yodo de 0.01 ml, adicionado después de que se agregó la solución indicadora de almidón soluble. Se obtuvo un color azul característico inmediatamente después del volumen de yodo gastado, por lo cual se concluye que el método es específico para la determinación del ácido ascórbico y que no hubo interferencia de los excipientes.

8.21 RESUMEN DE RESULTADOS

Cuadro 19: Validación al 100% de jarabe

	Valor esperado	Valor obtenido
Linealidad de sistema	$r^2 \geq 0.98$ Pendiente $\neq 0$ Ordenada = 0	$r^2 = 0.987$ Pendiente $\neq 0$ Ordenada = 0
Precisión de sistema	$CV < 2\%$	$CV = 0.45\%$
Linealidad del método	$r^2 \geq 0.98$ Pendiente $\neq 0$ Ordenada = 0	$r^2 = 0.993$ Pendiente $\neq 0$ Ordenada $\neq 0$
Exactitud del método	$\sigma^2 = 2\%$	$\sigma^2 = 2\%$
Precisión		
Repetibilidad	$\mu_1 = \mu_2$	$\mu_1 = \mu_2$
Reproducibilidad	No presenta efecto Día, analista e interacción Analista día	Presenta efecto de la interacción analista-día
Tolerancia	Tolerante	Tolerante
Robustez	Robusto	Robusto
Especificidad del método	Específico	Específico

Microescalamiento

Se microescala a un 25% del método para cuantificar ácido ascórbico en jarabe según el análisis estadístico de pruebas múltiples con un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro 20: Validación al 25% para cuantificar ácido ascórbico

	Valor esperado	Valor obtenido
Linealidad de sistema	$r^2 \geq 0.98$ Pendiente $\neq 0$ Ordenada = 0	$r^2 = 0.980$ Pendiente $\neq 0$ Ordenada = 0
Precisión de sistema	CV < 2%	CV = 1.21%
Linealidad del método	$r^2 \geq 0.98$ Pendiente $\neq 0$ Ordenada = 0	$r^2 = 0.981$ Pendiente $\neq 0$ Ordenada = 0
Exactitud del método	$\sigma^2 = 2\%$	$\sigma^2 = 2\%$
Precisión		
Repetibilidad	$\mu_1 = \mu_2$	$\mu_1 = \mu_2$
Reproducibilidad	No presenta efecto Día, analista e interacción Analista-día	Presenta efecto de la interacción analista-día
Tolerancia	Tolerante	Tolerante
Robustez	Robusto	Robusto
Especificidad del método	Específico	Específico

Las validaciones del 100 y 25% se llevaron a cabo al obtener una respuesta analítica debido a la presencia de ácido ascórbico en el jarabe, que al reaccionar con el yodo, este se oxidó hasta ácido dehidroascórbico.

Contrastando los parámetros de la validación al 100 y al 25% se puede observar varias diferencias en los resultados (cuadros 19 y 20), si bien la discusión del tema se centra en la validación a microescala del método para cuantificar ácido ascórbico en jarabe, la validación al 100% del método es la referencia inmediata de la validación a microescala.

En la validación a microescala se redujeron las cantidades de jarabe así como las cantidades de yodo para cuantificar ácido ascórbico. Se obtuvo el por ciento de contenido de ácido ascórbico, para cada nivel, en cada alícuota de jarabe (cuadros 5 y 13), y se observa una mayor varianza de los datos en la validación al 25 % aunque cabe mencionar que todos los niveles tienen un coeficiente de variación menor del 2%, por lo tanto está dentro de límites especificados (es menor del 3%). La variación de los datos también se observan con respecto al día 2; para cada una de las validaciones, donde al 25% aumentan los valores de coeficiente de variación (cuadros 13 y 14), sin embargo en la validación al 100% los valores de los coeficientes de variación se mantienen (cuadros 5 y 6). La diferencia no es significativa para decir que no está dentro de límites sin embargo esa dispersión se debió seguramente porque se cambiaron ciertas condiciones al microescalar como son los sistemas de medición así como la exigencia visual del analista para poder tomar la decisión del punto de equilibrio en la valoración oxido-redox entre el jarabe titulado y el titulante.

Se observan los parámetros de validación, varias diferencias tales como una mayor dispersión de los datos entre una validación y otra, el coeficiente de determinación

explica la linealidad del sistema (cuadros 7 y 15) pero además la dependencia de los datos entre los niveles de concentración analizados y su respuesta analítica, para lo cual se observó una fuerte correlación, mientras que el coeficiente de determinación muestra las distancias elevadas al cuadrado del valor real con respecto al valor estimado y de esta manera se describe la mejor recta con la ecuación $mx + b$ (figuras 2 y 6).

Sin embargo, la validación al 25% presenta menor error, lo que quiere decir que la desviación estándar de la recta estimada para la linealidad de sistema es menor para esta regresión, esto se puede explicar debido a la exactitud del volumen de jarabe medido, a la sensibilidad y a la especificidad del método.

Se observa que en ambas validaciones se obtuvo una varianza igual al 2% lo que significa que la variación de los datos está dentro de los límites pero, podemos observar que el % de recobro en cada muestra, para la validación al 25% disminuye significativamente, esto se asocia a la inestabilidad del ácido ascórbico en un sistema acuoso.

Las dos validaciones según el análisis de varianza presentaron un efecto en la interacción analista-día para la cuantificación del ácido ascórbico en jarabe, esto se debió probablemente a la diferencia para visualizar el punto de equilibrio en la valoración ácido ascórbico -yodo, ya que en el punto de equilibrio existe un exceso de yodo, pero este exceso pudo ser significativo. Esto se debió a que uno de los analistas pudo no estar familiarizado con el método, lo que le restó habilidad tanto visual como técnica para el manejo del sistema de medición.

La tolerancia y robustez del método, son parámetros que evalúan el efecto de los cambios internos y externos del método, respectivamente. En ambas validaciones se observa que el método es robusto y tolerante a cambios internos y externos, esto quiere decir que podemos cambiar ciertas condiciones dentro del método, el agua hervida fue eliminada de dióxido de carbono, el cual afecta en las valoraciones de yodo y esta se observa cuando tenemos un valor de coeficiente de variación mayor, pero menor del 2%. Cuando el material de medición es diferente, en este caso el sistema de medición, es de menor escala, observamos un efecto contrario, se obtiene un coeficiente de variación menor, esto se debió a que se utilizó una bureta de mayor exactitud, una gota en una bureta de de 1/50 ml podría representar 0.04 ml sin embargo en una bureta 1/100 podría representar un volumen de 0.01 ml.

9. CONCLUSIONES

El método volumétrico permitió cuantificar y llevar a cabo el desarrollo y validación tanto al 100 % como a microescala (al 25%) para determinar ácido ascórbico en jarabe. El microescalamiento se realizó con base al análisis estadístico de muestras múltiples y se toma la decisión de cuantificar ácido ascórbico a microescala al 25 %. Se logra la validación a microescala, aunque se presentó el problema en la reproducibilidad del método, se concluye por lo tanto que a cantidades pequeñas la reproducibilidad del método estará sujeto a la experiencia del analista en el manejo del método así como a visualizar el punto de equivalencia, esto es definir el color del vire, donde ambos analistas del día 1 y del día 2, estén de acuerdo en que se ha finalizado la titulación del jarabe con el yodo.

Al microescalar, las condiciones del equipo del laboratorio fueron diferentes y este es el punto clave para que se cuantificara al 25%. Sin el equipo necesario como fue la microbureta graduada 1/100 con la que se tituló el jarabe, y buretas graduadas 1/20 con la que se midieron los volúmenes de jarabe, no se hubiera mantenido el error e incluso disminuirlo.

10. RECOMENDACIONES

Se recomienda:

Desarrollar y validar el método analítico a microescala para cuantificar ácido ascórbico en jarabe, utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución, métodos espectrofotométricos y calorimétricos, y proponer con base a los modelos estadísticos el mejor sistema para la cuantificación de ácido ascórbico en jarabe.

Modelos estadísticos para evaluar la concentración del ácido ascórbico en jarabe, en diferentes formulaciones.

11. REFERENCIAS

1. Beyer H. Walter W. Manual de Química Orgánica. Editorial Reverté España (1987) pp. 473-476
2. Avila M. Troncoso T. Soberón E. Guerrero M. E. Garzón A. Estudio de Estabilidad del ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico y Cianocobalamina sustancias de referencia. *Rev. Mex. de Ciencias Farmacéuticas*. México (1984): 15(1): 25-34
3. Vural Gökmen, Kahraman N. Dermir N. Acar J. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables., *Journal of Chromatography A*. 881 (2000): 309-316.
4. Klaus Florey. Analytical Profiles of drug substances. Vol. II, Academic Press. USA (1982). pp. 42-78
5. Kim Won-Suk, Dalhlgren R. Moroz L. and Sweedler J. Ascorbic Acid Assays of Individual Neurons and Neuronal Tissues Using Capillary Electrophoresis with Laser- Induced Fluorescence Detection. *Anal. Chem.* (2002) 74: 5614-5620.
6. Connors Kenneth A. , Gordon L. Amidon, Valentino J. Stella. Chemical Stability of Pharmaceuticals. 2a edición. John Wiley and Sons Editores. USA (1987). Pp 473-476.
7. Connors A. K. Curso de Análisis Farmacéutico. 2ª Edición. Editorial Reverté. USA (1991): 109-120 y 370-371
8. Skoog A. D. West M. D. Química Analítica. 7ª Edición. Editorial McGraw-Hill. México (2000): 463-464
9. Valcárcel M. Principios de Química Analítica. Springer- Verlag Ibérica Editores. España (1999): 293-324
10. Dean A. J. Analytical Chemistry Handbook. Editorial McGraw-Hill. USA (1995): 3.65-3.75
11. Jenkins Gleen Llewellyn. Quantitative Pharmaceutical Chemistry. 7ª Edición. Editorial McGraw-Hill. USA (1977): 174-177
12. Secretaría de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8ª edición. México (2004): 74,102 y 1360
13. Contreras M. Vázquez. Calibración de Material Volumétrico. *Rev. Informacéutico*. México (2002). 9(5): 26-29

14. Richhoff M.M. Promoting green engineering through green chemistry. *Environ Sci Technol*, 2002 Dec 15;36(24): 5517-20.
15. Hjeresen, D.L., Schutt, D.L.; Boese, J.M. *Journal of Chemical Education*. 2000, 77, 1543-1547.
16. Elsevier Inc. Microscale Chemistry Overview. División of Chemical Health and Safety of the American. *Chemical Society*. 2004, 03, 011
17. Ibáñez J.G. Centro Mexicano de Química en microescala, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Iberoamericana. La química a Microescala en México Hacia un Panorama General. *Educación Química, Segunda Época* Enero, 2000; 11: (1).
18. Torres E. Esperanza, Castellón S. Juan P. Minimización del Impacto Ecológico Empleando Microescala en Laboratorios de Enseñanza Química. *Educación Química, Segunda Época* Enero, 2000; 11: (2).
19. Lual.Métodos Estadísticos y Validación de métodos Analíticos. *Pharma News, USA* (1993). 4(7):32-34.
20. Lual.Métodos Estadísticos y Validación de Métodos Estadísticos. *Pharma News, USA* (1993). (10)10:16-19
21. Lual.Métodos Estadísticos y Validación de Métodos Estadísticos. *Pharma News, USA* (1993). 4(9):24-25
22. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993. Buenas prácticas de Fabricación para establecimientos de la Industria Químico-Farmacéutica dedicados a la fabricación de Medicamentos.
23. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use (ICH-Q2A). Guideline for Industry: Text on Validation of analytical Procedores. USA (1995): A1-A3
24. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use (ICH-Q2B). Validation of analytical Procedores: Methodology USA (1995): 2-8
25. Lachman Leon, Herbert Lieberman Kanig Joseph. The theory and Practice of Industrial Pharmacy. 3ª Edición. Lea and Febiger editores. USA (1986): 457-476
26. Kebbe H. A. Handbook of pharmaceutical Excipients. 3ª Edición. American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press. USA (2000): 21, 140, 320, 365 y 392.

27. Gennaro R. Alfonso. Farmacia. 20^a Edición. Médica Panamericana Editores. Argentina (1998): 848-847
28. Parrott L. Eugene. Pharmaceutical Technology. Burgess Publishing Company Editores. USA (1970): 70-74.
29. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2002. Estabilidad de Medicamentos.
30. Martin Alfred, Swarbrick James, Cammarata Arthur. 3a Edición. Lea and Febiger Editores. USA (1983): 84-90