

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA

UNAN- León

FACULTAD CIENCIAS QUIMICAS

CARRERA DE FARMACIA



“A la libertad por la Universidad”

Validación de un método volumétrico para la cuantificación de yodo en muestras de yodopovidona en solución al 10% aplicado a un estudio de estabilidad.

Autores:

- ❖ **Br.** Melida Carolina Báez Espinoza.
- ❖ **Br.** Sergio Eduardo Chávez Uriarte.
- ❖ **Br.** Viviam Edith Díaz Munguía.

Tutor:

Lic. Yader Benito Salgado Mercado.

León, Nicaragua julio del 2012

“ 2012: Año del Bicentenario y Refundación de la Universidad”



Agradecimiento

Doy gracias a Dios, nuestro padre celestial, por haberme protegido y guiado en toda mi vida, y por bendecirme con el don de la sabiduría e inteligencia necesarias para realizar con éxito el presente trabajo monográfico.

Agradezco también el apoyo incondicional tanto económico como emocional que recibí de mi familia, en especial de mis madres: mi abuelita Mélida Benigna Espinoza y mi madre María Mercedes Espinoza, que siempre se preocuparon por mi bienestar y se esforzaron por hacer de mí una persona de bien.

A nuestros profesores por ser una guía de aprendizaje, por brindarnos los conocimientos que nos forjaron como profesionales exitosos, en especial al Lic. Yader Salgado por transmitir sus enseñanzas con paciencia.

Mélida Carolina Báez Espinoza



Agradecimiento

Quiero agradecer a Dios por permitirme culminar mis estudios y especialmente a mi madre **Johanna del Carmen Uriarte Puerto** quien gracias a su enorme esfuerzo, amor y dedicación he logrado concluir esta etapa y cumplir su sueño de convertirme en profesional, quien ha dado todo por mí en esta vida y ha sido mi modelo a seguir, nunca estaré suficientemente agradecido por su sacrificio e inmenso amor y convertirme en la persona que soy, por esto e incontables cosas más GRACIAS MAMÁ.

A mis abuelos Sergio Chávez y Salvadora Baldizón quienes siempre estuvieron a mi lado cuidándome y han ayudado a convertirme en un hombre de bien con sus consejos y cariño.

A mis tías Dolores Chávez y especialmente Eliette Chávez que me han tratado como un hijo y me han apoyado en todo cuanto pudieron y han sido parte esencial de este gran logro.

Mi novia Vivian Díaz quien con su amor, especial compañía, paciencia y regaños me ayuda a ser mejor persona cada día, mis amigas Maryurie Escoto, Kenia Dávila y Norma Flores con quienes compartí tardes de risas y diversión.

A mi tía Genoveva Puerto que con sus innumerables consejos y apoyo a contribuido en mi formación personal. Y por último pero no menos importante a nuestro tutor Yader Salgado que con su paciencia, vocación, amistad y conocimiento ha sido parte fundamental en la realización de este trabajo.

Sergio E. Chávez Uriarte.



Agradecimiento

Agradezco a Dios, nuestro Señor, por ser el creador y motor de mi vida. Por haberme brindado la fortaleza necesaria a lo largo de estos años para salir adelante y permitirme cumplir con éxito una meta más.

A mis padres, Javier Díaz Montalván y Edith Munguía, por el apoyo incondicional y consejos brindados, por motivarme cada día a ser mejor y representar pilares fundamentales en mi vida, ya que su esfuerzo y ejemplo fue la base principal para terminar este ciclo.

A mi abuelita Lilliam Montalván por ser mi maestra, por el cariño y esfuerzo de toda la vida.

A mi hermana Silvia Elena Díaz Munguía de quien he recibido animo y me ha apoyado a la largo de este período gracias por estar ahí siempre.

A mi novio Sergio Eduardo Chávez por tu infinita paciencia, tierna compañía y tu inagotable apoyo. A mis amigas Kenia, Maryurie y Norma por todos los momentos compartidos y por esas vivencias inolvidables que marcaron mi vida a lo largo de la carrera.

Al Lic. Yader Salgado por su dedicación, paciencia y conocimientos compartidos que fueron clave en la realización de nuestra tesis como la parte conocedora de la misma.

Y por último pero no menos importante todas y cada una de las personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de esta meta incluyéndolos a ustedes tíos Alejandro Cajina y Ligia Munguía gracias por su apoyo.

Vivíam Edith Díaz Munguía.



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PNT: Procedimientos Normalizados de Trabajo

LCCM: Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos (LCCM) UNAN-León

USP: United States Pharmacopoeia

BP: British Pharmacopoeia

AENOR: Asociación Española de Normalización y Acreditación

EURACHEM: Asociación de Química Europea

UNE-EN: Una Norma Española

IEC: Comisión Electrotécnica Internacional

AOAC: Association of Official Analytical Chemist

ICH: International Conference Harmonization

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

BIPM: Oficina Internacional de Pesas y Medidas

IFCC: Federación Internacional de Química Clínica

IUPAP: Unión Internacional de Física Pura y Aplicada

OIML: Organización Internacional de Metrología Legal

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano.

**Índice**

1. Introducción	1
2. Planteamiento del problema	3
3. Objetivo general y específicos	4
4. Consideraciones importantes de los métodos analíticos	5
5. Validación	8
5.1. Necesidades de una validación	10
6. Parámetros de desempeño analítico	13
6.1. Exactitud	12
6.2. Precisión	14
6.3. Límite de detección	16
6.4. Límite de cuantificación	18
6.5. Linealidad y rango	19
6.6. Robustez	21
6.7. Sensibilidad	22
6.8. Selectividad	23
7. Incertidumbre	24
8. Muestreo en el proceso analítico	27
9. Estudio de Estabilidad	28
11.1. Definiciones y Terminología	28
11.2. Condiciones para realizar estudios de estabilidad	32
11.3. Modificaciones posteriores al registro	33
11.4. Evaluaciones del Estudio de Estabilidad de un medicamento	34
11.5. Información a incluir en el formato para presentar resultados de estudios de estabilidad	36
11.6. Metodología analítica validada para cada parámetro evaluado	38
10. Fundamentos generales del análisis volumétrico	38
10.1. Límites de cuantificación y precisión del análisis volumétrico	41
10.2. Clasificación de los métodos volumétricos de análisis	42
10.3. Fundamentos generales de la volumetría redox	43
10.4. Métodos con yodo	55
11. Propiedades físico-químicas de yodopovidona	60



11.1. Estructura química.....	60
11.2. Sinónimos.....	60
11.3. Nombre químico.....	60
11.4. Contenido.....	60
11.5. Estado físico.....	60
11.6. Solubilidad.....	60
11.7. Densidad.....	60
11.8. Punto de ebullición.....	60
12. Monografía terapéutica	60
13. Relación estructura actividad	62
14. Métodos de análisis	62
15. Material y Método	63
16. Resultados	73
17. Estimación de Incertidumbre	74
18. Pureza patrón primario	76
19. Estabilidad de solución de Tiosulfato	77
20. Determinación de la exactitud	78
21. Determinación de la precisión	79
22. Determinación de la linealidad	80
23. Determinación de la robustez	84
24. Determinación del LD y LC	85
25. Análisis de Resultados	87
26. Conclusión	90
27. Recomendaciones	91
28. Bibliografía.....	92
29. Anexos.....	94



INTRODUCCIÓN

En el ámbito de las ciencias de la medida o metrología, las variables físicas y químicas, o de cualquier otro tipo, se miden mediante “procedimientos de ensayo”. En química analítica, los procedimientos de ensayo se suelen denominar “métodos analíticos”. Validar un procedimiento de ensayo es documentar su calidad, para lo cual es necesario verificar experimentalmente que dicho procedimiento cumple los criterios de calidad establecidos por el cliente o usuario del procedimiento.

La validación de métodos analíticos es parte esencial del programa de aseguramiento de la calidad de un laboratorio. El aseguramiento de la calidad está regulado por diversos de organismos nacionales e internacionales. Para obtener el respaldo de dichos organismos, entre otras actividades es necesario; detallar los métodos analíticos como “procedimientos normalizados de trabajo” (PNT), y validar los PNT mediante los experimentos adecuados (incluida la aplicación de ensayos estadísticos), y reflejar los resultados en documentos normalizados.¹

Existe diversos métodos para la cuantificación de yodo en diferentes matrices de muestra descritos en la USP y la Farmacopea Británica (BP) tanto para materia prima como en productos terminados que involucran titulaciones bien sea utilizando métodos directos o indirectos.

Se pretende seguir la metodología analítica descrita en la Farmacopea Británica pero realizando una adaptación al procedimiento en la determinación del punto final de la valoración introduciendo un indicador visual que permita identificar el final del ensayo debido a que no se cuenta con la disposición de un potenciómetro para dicho fin. La metodología analítica descrita proporciona un análisis rápido, sencillo, eficaz y de bajo costo utilizando instrumentación de sencilla manipulación y reactivos cotidianos presentes en toda área de control de calidad, facilitando su aplicación en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos UNAN-LEÓN (LCCM) para su implementación como ensayo de rutina, y su posterior aplicación en el análisis de lotes de muestra de yodopovidona en solución sometidas a un estudio de estabilidad acelerado.



Planteamiento del problema

¿Es apto el método volumétrico planteado y sus adaptaciones para la determinación de yodo en muestras de yodopovidona en solución?



Objetivo General

- Validar el método volumétrico planteado para la determinación de yodo en muestras de yodopovidona en solución 10% mediante parámetros de validación establecidos para su implementación como método de rutina y su aplicación a un Estudio de Estabilidad Acelerado.

Objetivos Específicos

- Desarrollar la metodología volumétrica planteada para la cuantificación de yodo en muestras de yodopovidona en solución.
- Evaluar los parámetros de desempeño, mediante el análisis estadístico y establecer los criterios de aceptación.
- Aplicar la metodología validada en la determinación de yodo en muestra de yodopovidona sometidas a un Estudio de Estabilidad Acelerado.



HIPÓTESIS

El método volumétrico establecido con las adaptaciones planteadas cumple los parámetros de validación y es apto para la cuantificación de yodo en muestras de yodopovidona en solución.



MARCO TEÓRICO

Consideraciones importantes en los métodos analíticos

Aunque muchas veces el instrumento es el elemento más visible e impresionante del método analítico solo es uno de los componentes de análisis total. Antes de enfocar la instrumentación de un método analítico, el analista debe considerar otras etapas importantes para la determinación.

La primera tarea es definir el problema analítico. Cuando es posible, lo anterior se hace a través de una interacción directa con las personas que desean el análisis.

El analista debe determinar la naturaleza de la muestra, el uso final de los resultados analíticos, la especie que debe analizarse y la información requerida. La información cualitativa debe incluir la composición elemental, los estados de oxidación y la identificación completa de todas las especies presentes en la muestra. Los datos cuantitativos incluyen la exactitud y precisión requerida, el intervalo de concentraciones esperados para el analito (la sustancia que se está analizando) y sus límites de detección. Otras consideraciones son las propiedades físicas y químicas únicas del analito las propiedades de la matriz de la muestra, la presencia de interferencias probables que eliminan el curso de ciertas propiedades del analito como indicadores de medición y, finalmente, un costo estimado del análisis. Un componente principal en el costo es el tiempo requerido para efectuar el análisis; cuando resulta apropiado deben compararse los costos de los métodos manuales y de los métodos automatizados.

Una vez que el problema se ha definido, la siguiente tarea es seleccionar el (los) métodos (s) apropiado (s). Algunos factores a considerar son las posibilidades y limitaciones de la técnica cuando se aplica al problema en consideración las restricciones impuestas al método por las interferencias presentes en la muestra y la calidad de la información obtenida contra su costo de adquisición.

La siguiente área a considerar es el muestreo. A menudo es el paso más importante en todo el análisis. ¿Qué medidas deben tomarse a fin de obtener las muestras requeridas para proporcionar la información deseada? En algunos casos se buscan mezclas homogéneas representativas, mientras que en otros la heterogeneidad de la muestra es el interés



principal. ¿Los procedimientos de toma de muestra en el campo y en el laboratorio aseguran la integridad de los resultados analíticos? ¿Se han usado procedimientos adecuados para almacenar y preservar las muestras y los estándares? ¿Las muestras se han etiquetado y registrado correctamente?

A menudo es necesario realizar algunas operaciones sobre la muestra, física o química previas al análisis. Estas operaciones pueden reducir o eliminar las interferencias, llevar la concentración del analito a intervalos de análisis deseado, o producir – a partir del (de los) analito (s) – especies con propiedades cuantitativamente medible. Tales operaciones incluyen la disolución, la fusión, la separación, la dilución, la concentración y la formación de derivados químicos. La instrumentación compleja no elimina la necesidad de las destrezas de laboratorio fundamentales; más bien, aumenta su importancia. La limpieza adecuada, el uso y los conocimientos de las tolerancias de las balanzas analíticas, del material volumétrico y de los aparatos de filtrado siguen siendo destrezas básicas necesarias en los análisis.

Es esencial definir con claridad la naturaleza del problema analítico:

1. ¿Qué exactitud y precisión se requiere?
2. ¿De cuanta muestra se dispone?
3. ¿Cuál es el intervalo de concentración del analito?
4. ¿Qué componentes de la muestra interferirían?
5. ¿Cuáles son las propiedades Físicas y químicas de la matriz de la muestra?
6. ¿Cuántas muestras deben analizarse?

La norma UNE 82009 utiliza dos términos para describir la exactitud de un método de medición. La “veracidad” se refiere al grado de concordancia existente entre la medida aritmética de un gran número de resultados y el valor verdadero aceptado por la referencia. La “precisión” se refiere al grado de concordancia existente entre los resultados obtenidos.

Existen diferentes factores que contribuyen a la variabilidad de los resultados de un método de medición entre ellos puede incluirse:

- a. El operador



- b. Los equipos de medición utilizados
- c. La calibración de los equipos de medición
- d. El ambiente (temperatura, humedad, contaminación del aire, etc.)
- e. El lote del reactivo
- f. El tiempo transcurrido entre las mediciones

Los objetivos de una validación analítica son:

- Garantizar la coherencia entre los resultados obtenidos y las necesidades.
- Asegurar la calidad y constancia de la información obtenida.
- Caracterizar métodos y herramientas analíticas.
- Facilitar las auditorías de la calidad.
- Fundamentar la transferencia (de métodos y herramientas) y la armonización de los resultados entre los laboratorios, con el objetivo de conseguir el reconocimiento mutuo.

Validar un procedimiento de ensayo es documentar su calidad para lo cual es necesario verificar experimentalmente que dicho procedimiento cumple los criterios de calidad establecidos por el cliente o usuario.

La validación de métodos analíticos es una parte esencial del programa de aseguramiento de la calidad de un laboratorio. El aseguramiento de la calidad está regulado por diversos organismos nacionales o internacionales. Para obtener el respaldo de dichos organismos, entre otras actividades es necesario:

- a. Detallar los métodos analíticos como “Procedimientos Normalizados de Trabajo” (PNT).
- b. Validar los PNT mediante los experimentos adecuados (incluida la aplicación de ensayos estadísticos).



VALIDACIÓN

Según la USP XXXII validación de un procedimiento analítico es el proceso por el cual se establece, por estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumple los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas.

De acuerdo con la norma UNE-EN ISO 9000:2000 (UNE 2000a), desde un punto de vista general, la validación puede definirse como “la confirmación mediante el examen y la aportación de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para una utilización específica prevista”.

Según el documento *The Fitness for Purpose of Analytical Methods* (EURACHEM, 1998) es “un proceso, basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante el cual se pone de manifiesto que un método analítico determinado posee unas características de funcionamiento adecuadas a la aplicación que se le quiere dar”. Estas características de funcionamiento se concretan en unos parámetros de calidad como son la exactitud, la precisión, los límites de detección y cuantificación, el intervalo dinámico, la sensibilidad, la selectividad y la robustez.²

La validación de metodologías analíticas se fundamenta en la determinación de estos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan. Según la USP 29 las metodologías se clasifican en cuatro categorías para su validación y esta nos indicará que parámetros deberán evaluarse:³

Categoría I

Métodos analíticos para la cuantificación de principios activos en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II

Métodos analíticos para la determinación de impurezas o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados.



Categoría III

Métodos analíticos para la determinación de características de desempeño de productos farmacéuticos (disolución, liberación de principio activo).

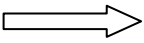
Categoría IV

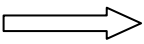
Pruebas de identificación.

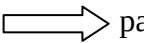
Tabla 1: Parámetros de desempeño requeridos para la validación de los métodos analíticos³

Parámetro de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativa	Cualitativa		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Selectividad	Si	Si	Si	*	Si
L. de Detección	No	No	Si	*	No
L. de Cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No

Según la metodología de análisis que se realice, las validaciones pueden ser:

Prospectivas  para metodías nuevas

Retrospectivas  para metodías muy utilizadas que no han sido validadas y de las cuales se posee suficiente información para ser validadas.

Revalidaciones  para metodías validadas en las cuales se han inducido cambios.

Para llevar a cabo la validación de un método analítico, es preciso tener en cuenta tres aspectos básicos que, por su importancia, Massart (1997) denomina *las reglas de oro de la validación*²

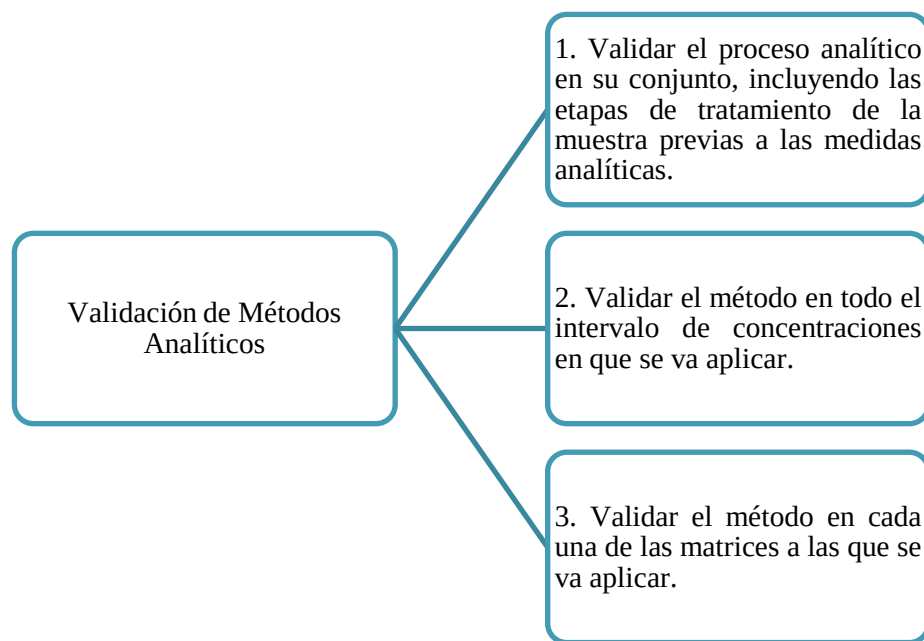


Figura 1: Reglas para validar un método analítico

Necesidad de una Validación

El grado de validación a que debe someterse un método analítico puede variar de forma significativa dependiendo de su origen, su ámbito de aplicación y características. A continuación se analizan algunas de las situaciones más comunes²:

- Cuando se trata de un método nuevo, desarrollado enteramente en un laboratorio, o de un método basado en la modificación significativa de otro ya existente, el laboratorio debe someter el nuevo método a una validación exhaustiva.
- Cuando un laboratorio adopta un método normalizado (ISO, UNE) o un método de referencia propuesto por algún organismo de solvencia reconocida (AOAC, FChC, USP, etc.), no es preciso llevar a cabo la validación del mismo. En este caso, el laboratorio comprueba que lo aplica correctamente evaluando la exactitud y la precisión de sus medidas, así como verificando otras propiedades analíticas de interés para la aplicación prevista.
- En el caso cuando un laboratorio adopta un método validado por otro laboratorio. Sería por ejemplo, el caso de transferencia de métodos entre laboratorios de una misma empresa o de una asociación de empresas.



- En el ámbito de la industria farmacéutica se habla con frecuencia de *system suitability check*, que se puede traducir como *control de funcionamiento global del sistema*. Se trata de comprobar que el método previamente validado, junto con los equipos y los consumibles utilizados, las condiciones de laboratorio y el personal encargado de su aplicación conducen a unos buenos resultados. Este tipo de control resulta necesario cuando se aplica un método después de un período de tiempo sin haberlo utilizado o cuando se incorpora nueva instrumentación o reactivos.

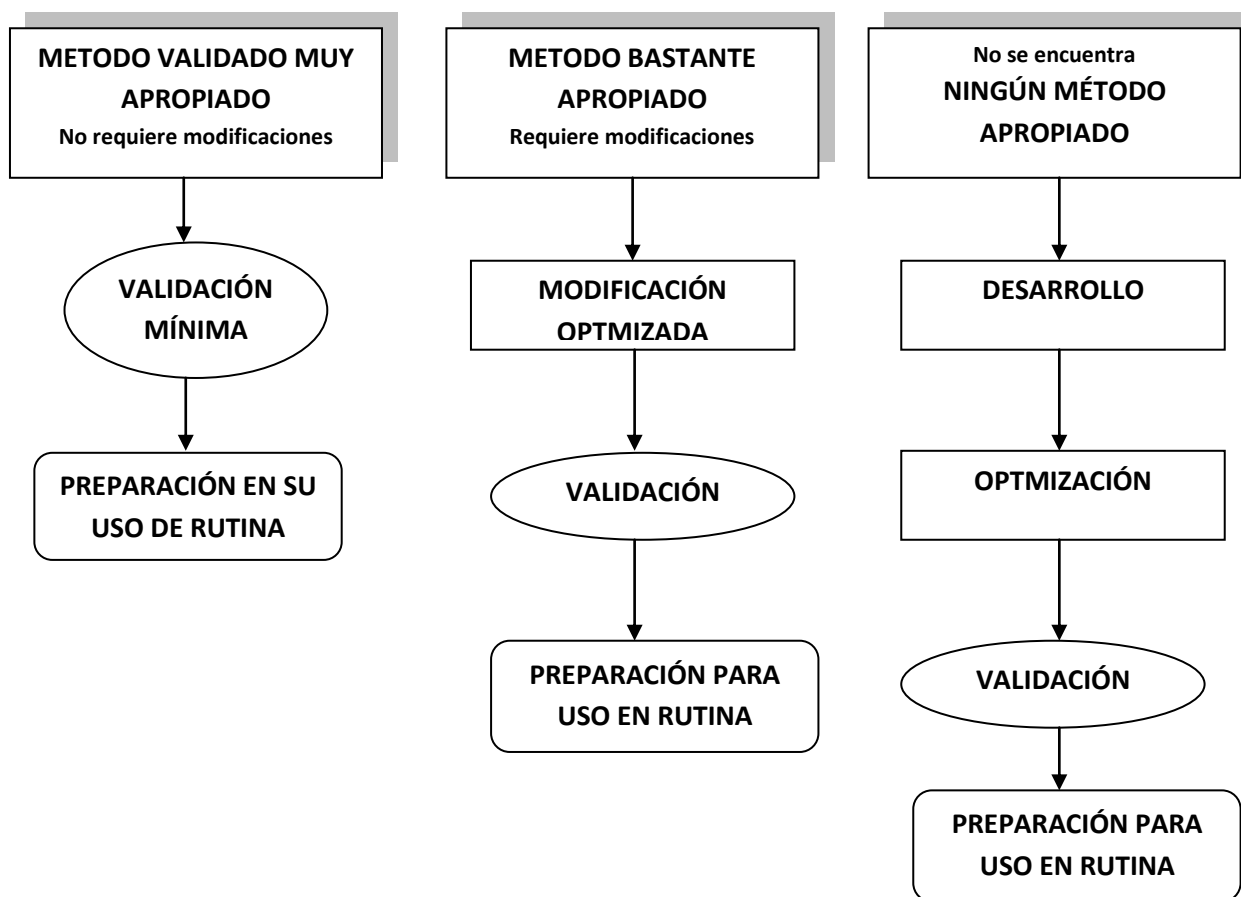


Figura 2: Requerimientos de validación para distintos métodos analíticos²

Requisitos para la selección y validación de métodos según ISO/IEC 17025:2005

Para garantizar la calidad de los resultados a los clientes, la norma establece que el laboratorio debe utilizar métodos normalizados. Es decir, validados y verificados. En el diagrama de Ishikawa se presenta de manera resumida los componentes:⁴

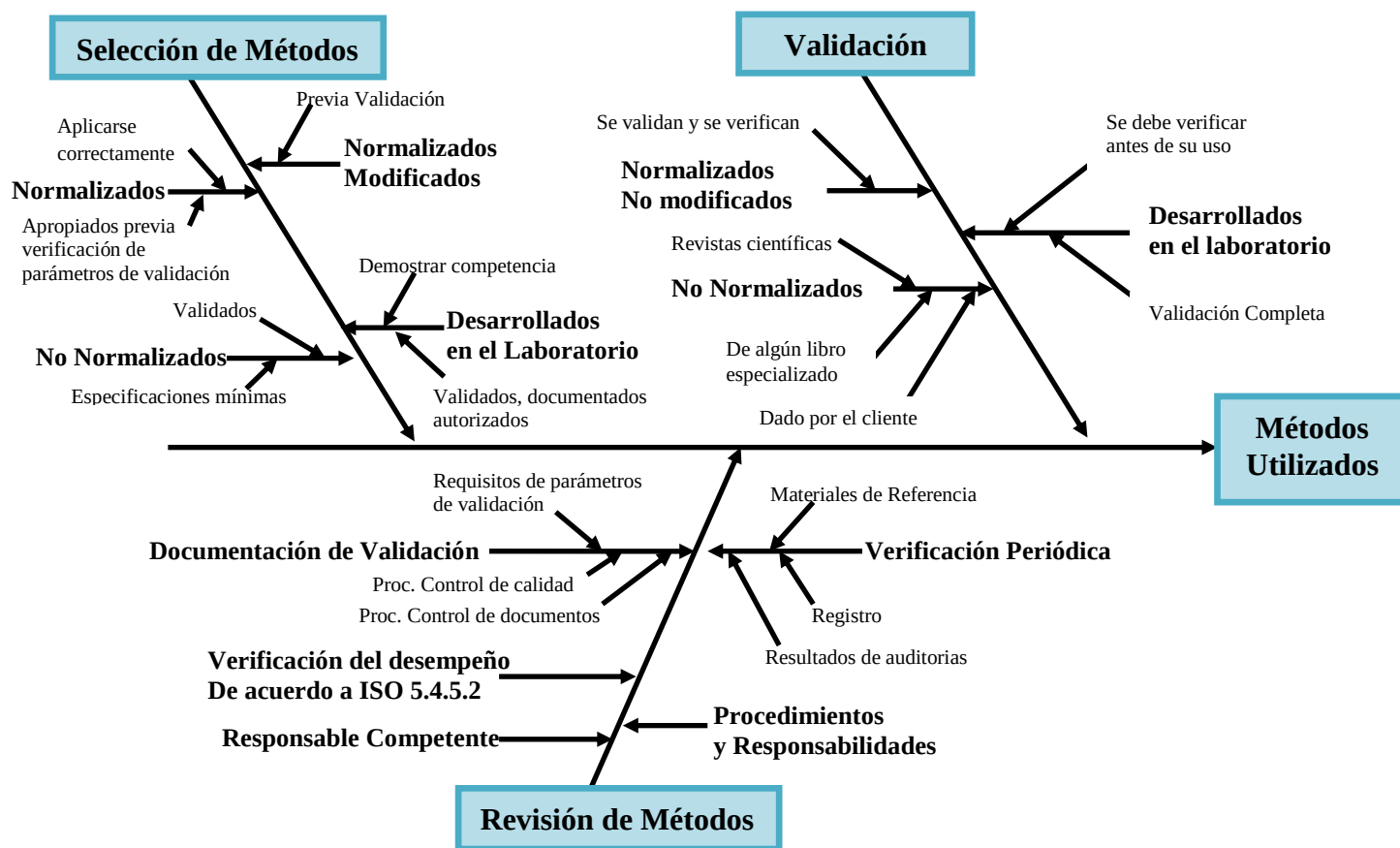


Figura 3. Requisitos para la selección y validación de métodos de ensayo

PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICOS

Exactitud

La exactitud de un método analítico es la cercanía de los resultados obtenidos de un ensayo al valor considerado como verdadero.⁵ La exactitud de una metodología se expresa como porcentaje de recuperación en un método analítico de una cantidad conocida de analito o como la diferencia entre el valor medio obtenido en la valoración y el valor aceptado como real.

$$\%R = \frac{x_m}{u} * 100$$

Xm: valor medio obtenido.

u: valor aceptado como verdadero

Determinación de Exactitud

Existen diferentes maneras de determinar la exactitud, los siguientes son los más frecuentes en la literatura, y pueden ser utilizados en todos los tipos de análisis⁶.

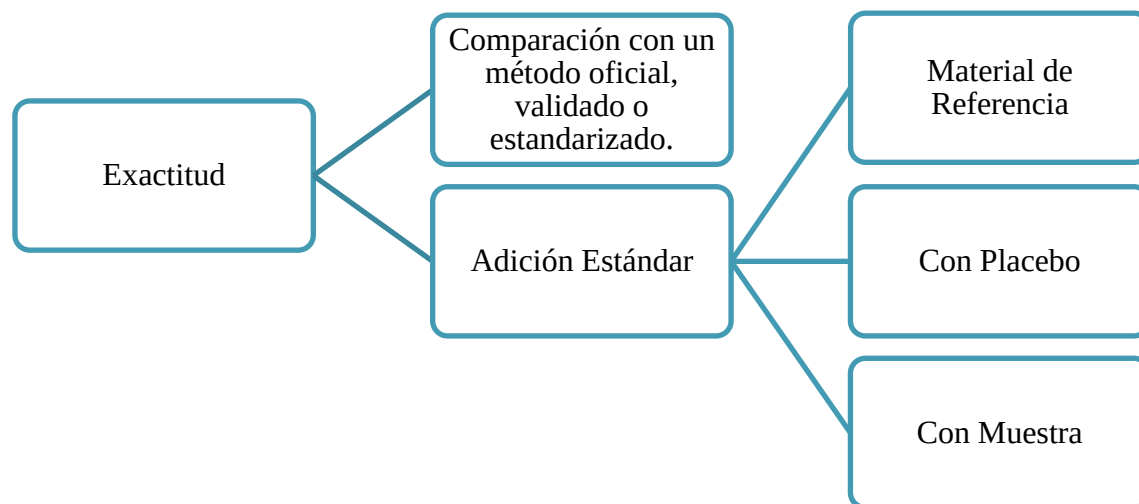


Figura 4. Determinación experimental de la exactitud

➤ Comparación con un estándar o material de referencia certificado

El material de referencia puede ser obtenido en el mercado por algún suplidor o puede ser preparado internamente en el laboratorio. Se analiza por replicado el material, por el método a validar y se compara el resultado obtenido con el valor verdadero declarado, este método se encuentra limitado por la disponibilidad y la estabilidad del material de referencia, así como por el grado de certidumbre que se tenga del valor verdadero de la concentración del material de referencia.

➤ Comparación con un método oficial, validado o estandarizado

La muestra debe ser analizada, utilizando el método a validar y un segundo método bien caracterizado, el cual debe tener una exactitud bien definida y establecida. Se analizan 6 muestras por replicado a la concentración normal de trabajo por ambos métodos. Se lleva a cabo un análisis de varianza (ANOVA), del porcentaje de recuperación o del error relativo en porcentaje, para determinar si hay o no diferencia significativa entre la exactitud de los métodos comparados.



➤ **Adición Estándar**

- **Con Placebo**

Se utiliza una mezcla preparada en el laboratorio de todos los componentes de la matriz de la muestra sin el principio activo a determinar, luego el placebo se enriquece con estándar.

- **Con Muestra**

Cuando no es posible contar con un placebo, se determina por replicado el contenido promedio del analito en la muestra con el método a validar; una vez conocido el contenido promedio se procede a enriquecer las muestras con estándar. Para preparar las soluciones, en este caso se mantiene constante la cantidad de muestra tomada y se agregan cantidades variables del estándar.

En ambos casos se preparan soluciones de placebo o de muestras enriquecidas a tres niveles de concentración diferentes, valores sugeridos en la literatura son 80, 100 y 120 % de la concentración normal de trabajo del método. ICH (International Conference Harmonization), recomienda preparar muestras independientes por triplicado a cada nivel de concentración. En el caso en que se trabaje con muestra enriquecida, para llevar a cabo el cálculo del porcentaje de recuperación, se requiere contar con los datos de contenido del principio activo en la muestra antes de la adición estándar.

Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados individuales de un ensayo cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a múltiples muestras de una muestra homogénea.⁵ La precisión de un método analítico es usualmente expresado como desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones.

La precisión puede ser medida tanto como grado de reproducibilidad o repetibilidad bajo condiciones de trabajo normales. En este contexto, reproducibilidad se refiere a la aplicación del método analítico en diferentes laboratorios. Precisión intermedia expresa la variación intra-laboratorio, en diferentes días o diferentes analistas utilizando el mismo



equipo de laboratorio. Repetibilidad se refiere al uso del método analítico dentro de un laboratorio en un corto periodo de tiempo usando el mismo analista con el mismo equipo.⁵

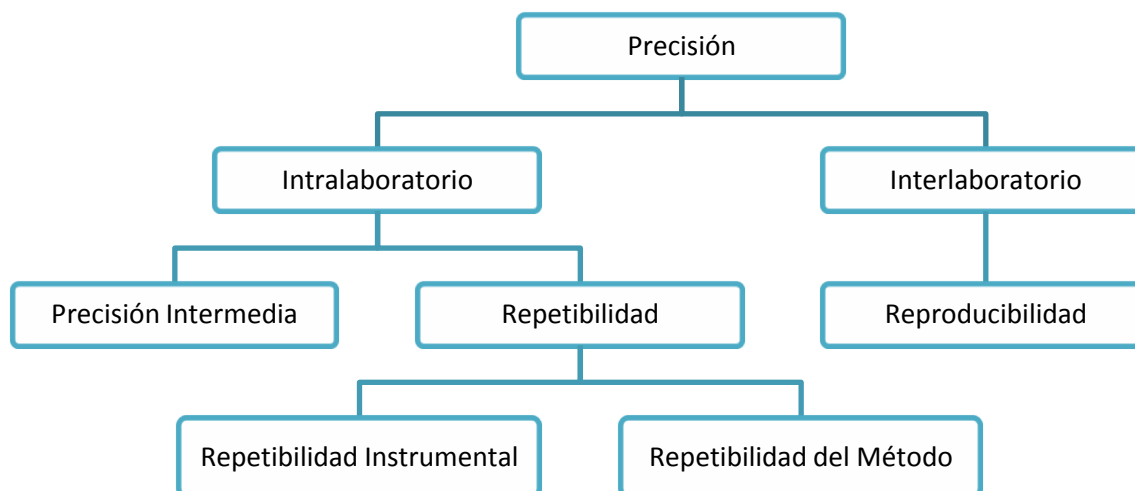


Figura 5: Jerarquía de los Niveles de precisión.⁷

➤ **Repetibilidad**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.⁵

➤ **Precisión Intermedia**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) en un mismo laboratorio.⁵

➤ **Reproducibilidad**

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.⁵

Determinación de la Precisión

En términos generales la precisión, debe determinarse, analizando un número suficiente de alícuotas, que permitan calcular estadísticamente la desviación estándar y la desviación



estándar relativa. La ICH, recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones, que cubran el intervalo especificado en el procedimiento. Para ello se pueden trabajar tres niveles diferentes de concentración (80, 100, 120 %), con tres muestras independientes de cada nivel. Datos con los que se cuenta si al evaluar la exactitud, se llevó a cabo por el método de Adición estándar. Otra forma de evaluarlo es, analizando por lo menos seis muestras independientes a la concentración normal de trabajo.⁵

Límite de Detección

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, dentro de las condiciones experimentales establecidas. El límite de detección es usualmente expresado como la concentración de analito (porcentaje, partes por millón) en la muestra.⁵ Es importante evitar la confusión de límite de detección de una técnica con su sensibilidad. La sensibilidad de una muestra se define correctamente como la recta de la pendiente de calibración y, siempre que la representación sea lineal, puede ser medida en cualquier punto de ella. Por el contrario, el límite de detección de un método se calcula con la ayuda prestada por la zona de representación cercana al origen, utiliza tanto la pendiente como la ordenada en el origen.⁶

Determinación del Límite de Detección

Aun no existe un acuerdo total entre investigadores, editores y asociaciones profesionales en la definición del límite de detección. Sin embargo va en aumento la tendencia a definir el límite de detección como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco mas 3 veces la desviación estándar del blanco:⁸

$$LOD = y_B + 3s_B$$

LOD: límite de detección

y_B : señal del blanco

s_B : desviación estándar del blanco



➤ Métodos no Instrumentales

Por comparación de blanco y blanco enriquecido a una sola concentración.

Para metodologías no instrumentales, el límite de detección es generalmente determinado por el análisis de muestras de concentración conocida de analito y estableciendo el mínimo nivel en el cual el analito puede ser confiablemente detectado. Se compara el comportamiento de las muestras con el blanco y se establece el nivel mínimo al cual el analito puede ser realmente detectado. En el caso del límite de detección del sistema, el blanco está constituido por los solventes utilizados en el análisis. En el caso del método, el blanco está constituido por los solventes y por la matriz de la muestra.⁸

Método basado en el examen visual

En este caso, según ICH Q2B, tanto el LD podrían determinarse a partir del análisis de muestras con concentraciones conocidas y decrecientes de analito, estableciéndose visualmente la mínima concentración detectable.⁷

➤ Métodos Instrumentales

En el caso de procedimientos instrumentales, se puede utilizar la misma aproximación. En el caso de métodos oficiales de rutina, casi nunca es necesario determinar el límite de detección real. En su lugar, se demuestra que el límite de detección es lo suficientemente bajo, por análisis de muestras de concentración conocida de analito por encima y por debajo del límite de detección requerido. Por ejemplo, si es requerido detectar una impureza a un nivel de 0.1%, debe ser demostrado que el método detectara la impureza a ese nivel.

En el caso de métodos instrumentales que presentan ruidos de fondo, los documentos de la ICH describen una aproximación común, la cual consiste en comparar la señal medida de muestras de baja concentración de analito con las respuestas obtenidas por el blanco. La proporción señal-ruido típicamente aceptada es 2:1 o 3:1.⁵

$$\frac{S}{R} = \frac{\text{media}}{\text{desviación estándar}} = \frac{\bar{x}}{s}$$



Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación es característico de ensayos cuantitativos para bajos niveles de compuestos en matrices de muestras, como impurezas presentes en materia prima y productos de degradación en formulaciones farmacéuticas terminadas. Se define como la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptable dentro de las condiciones experimentales establecidas. El límite de cuantificación es expresado como la concentración de analito (porcentaje, partes por millón) en la muestra.⁵

Determinación del Límite de Cuantificación

- **Métodos No Instrumentales**

El límite de cuantificación es generalmente determinado por el análisis de muestras de concentración conocida de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser determinado con una exactitud y precisión aceptable.⁵

Métodos Instrumentales

Se puede utilizar la misma aproximación para métodos instrumentales utilizada en los métodos no instrumentales. En el caso de métodos oficiales de rutina, casi nunca es necesario determinar el límite de cuantificación real. En su lugar, se que el límite de cuantificación es lo suficientemente bajo por análisis de muestras de concentración conocida de analito por encima y por debajo del límite de cuantificación. Por ejemplo, si es requerido que un analito sea ensayado a un nivel de 0.1 mg por tableta, debe ser demostrado que el método cuantificara confiablemente al analito a ese nivel.

En el caso de métodos analíticos que presentan ruido de fondo, los documentos de la ICH describen una aproximación común, la cual consiste en comparar la medida de la señal de las muestras con una concentración baja conocida de analito con las señales emitidas por el blanco. La relación señal ruido típicamente aceptada es 10:1. Otras aproximaciones dependen de la determinación de la pendiente calculada en la curva de calibración y las desviaciones estándar de las respuestas.⁵



Linealidad y Rango

Definición

Linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por una transformación matemática bien definida) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.⁶

El rango de un método analítico es el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para la cual se ha demostrado que puede ser determinado con un aceptable nivel de precisión, exactitud y linealidad del procedimiento descrito.⁶

Se entiende por intervalo dinámico de un método analítico al intervalo de concentraciones en el que el método es apropiado a la utilización que del mismo se quiere hacer. Por otra parte, se entiende como intervalo de linealidad el intervalo de concentraciones en que el método presenta una sensibilidad constante.

Existen diversos métodos para evaluar la linealidad de una función de calibración el valor del coeficiente de correlación, que algunas veces se utiliza como criterio de linealidad, no es apropiado para ello, ya que funciones claramente curvadas pueden conducir a valores de “r” superiores a 0.99. Cuando se dispone de medidas replicadas de los patrones, el análisis de varianza, en el que se compara la varianza debida a los errores aleatorios con la debida a la imperfección del ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto, es una herramienta muy útil.⁹

Función Respuesta

La función respuesta de un método analítico es, dentro de un intervalo de concentraciones, la relación existente entre la respuesta o la señal y la concentración o cantidad de analito en la muestra.⁶

Calibración

Una curva de calibrado representa la respuesta de un método analítico a concentraciones conocidas de analito. Para construir una curva de calibrado se adopta el siguiente procedimiento:⁹



1. Se preparan muestras conocidas de analito que cubran un intervalo adecuado de concentraciones (3 muestras a 6 niveles de concentración), y se mide la respuesta del procedimiento analítico a estos patrones.
2. Se resta la respuesta media de los blancos de cada medida para obtener la respuesta corregida. El blanco mide la respuesta del procedimiento cuando no hay analito presente.
3. Se traza un gráfico con la respuesta corregida frente a la cantidad de analito analizada. Se halla la recta que “mejor” se ajusta a los datos (incluido el blanco) que se encuentran dentro del tramo lineal. Se halla la pendiente y la ordenada en el origen con sus incertidumbres.
4. Si se analiza después una disolución desconocida, también se mide la respuesta correspondiente a su blanco. Se resta la respuesta del nuevo blanco de la respuesta de la muestra para obtener la respuesta corregida.

Linealidad e Intervalo del Sistema

1. Preparar en forma independiente soluciones de estándar al menos 5 niveles de concentración, las cuales deben encontrarse dentro de los intervalos establecidos para cada tipo de análisis.
2. Este procedimiento debe repetirse en forma independiente por lo menos 3 veces, para evaluar estadísticamente la regresión lineal del sistema.
3. Con estos datos se grafica la respuesta de la medición, contra la concentración del analito. Se verifican datos con comportamiento atípico mediante mediciones adicionales.
4. Realizar un análisis de varianza de la regresión lineal
5. Calcular el coeficiente de regresión (calcular por lo menos tres curvas independientes)
6. Calcular y graficar los residuos (valor real de la concentración – el cálculo por la ecuación de regresión para cada valor de X).



Linealidad e Intervalo del Método

1. Preparar soluciones de muestra o placebo enriquecidos a cinco niveles de concentración, los cuales deben encontrarse dentro de los intervalos establecidos por la USP para cada tipo de análisis, y que fueron verificados previamente al llevar a cabo la determinación de la linealidad del sistema.
2. Este procedimiento debe repetirse en forma independiente por lo menos 3 veces, para evaluar estadísticamente la regresión lineal del método.
3. Con estos datos se grafica la respuesta de la medición, contra la concentración del analito. Se verifican datos con comportamiento atípico mediante mediciones adicionales.
4. Realizar un análisis de varianza de la regresión lineal.
5. Calcular el coeficiente de regresión con la totalidad de los datos (por los menos tres curvas independientes).
6. Calcular y graficar los residuos (valor real de la concentración – el calculado por la ecuación de regresión para cada valor de X).

Robustez

La robustez es la cualidad de un método analítico que mide su capacidad de resistir pequeños cambios en las condiciones operatorias sin que su funcionamiento se vea alterado. Así pues, al evaluar la robustez de un método, se trata de identificar las variables que habrá que controlar más durante la aplicación de rutina del mismo.²

Al planificar el estudio de la robustez de un método hay que tener en cuenta los aspectos siguientes:²

1. Elegir los factores cuya influencia se desee evaluar. Algunos factores típicos serían:
 - pH del medio.
 - Concentración de alguno de los reactivos.
 - Orden de adición de los reactivos.
 - Composición de la fase móvil en cromatografía.
 - Caudal de la fase móvil en cromatografía.
 - Temperatura.



-Longitud de onda o potencial al cual se realizan las medidas.

2. Elegir los valores de dichos factores. Generalmente se estudian dos valores situados alrededor del valor indicado en el procedimiento (valor nominal), situados a una distancia del mismo como la que se podría producir durante la utilización rutinaria del método en el laboratorio.
3. Elegir la respuesta cuya variación se quiere controlar. Por ejemplo:
 - La exactitud del resultado
 - La precisión
 - La resolución de la separación cromatográfica
4. Planificar y llevar a cabo los análisis
5. Evaluar los efectos de los distintos factores. Una vez realizados los análisis y obtenidas las respuestas, es necesario tratar estadísticamente los datos obtenidos con objeto de ver que factores producen unos efectos significativos sobre la respuesta. El análisis de varianza es una herramienta muy útil para llevar a cabo este tipo de tratamiento.

Sensibilidad

La IUPAC define la sensibilidad de un método analítico como su capacidad de diferenciar dos cantidades o dos concentraciones de analitos muy parecidas. El concepto de sensibilidad, tal a como se acaba de definir, es aplicable a cualquier técnica analítica, ya sea clásica o instrumental y a cualquier nivel de concentración.²

Deteminación de la sensibilidad

Un aumento en la sensibilidad conlleva a un aumento de ruido asociado a la señal, por esta razón, se propone una medida de la sensibilidad, denominada sensibilidad analítica, que incluye la influencia de la presición de la senal:

$$\gamma = b/s_s$$



Siendo b la pendiente de la recta de calibrado y S_s la desviación estándar de la señal.

Otra opción que permitiría disponer de una estimación de la sensibilidad, normalizada respecto a la precisión y a la vez libre del efecto de la concentración, consistiría en la utilización del cociente entre la pendiente y su propia desviación estándar:²

$$\phi = \frac{b}{S_b}$$

Ambos parámetros se obtienen del análisis de regresión de los datos de calibración.

Pasos para el cálculo de la sensibilidad ²

1. Preparar estándares a diferentes concentraciones, mínimo 3 puntos para respuestas lineales y mínimo 5 para polinómicas, preferiblemente usando alícuotas de una misma solución.
2. Analizar las muestras y graficar la curva de calibración.
3. Realizar una regresión lineal o polinómica según el caso.
4. Registrar la pendiente para una regresión lineal, o las derivadas evaluadas para cada punto de la calibración.

Selectividad

La selectividad se define como el medio de expresar cualitativamente la extensión en que otra sustancia interfiere en la determinación de un analito con un método determinado. La selectividad extrema o perfecta, en el sentido de que únicamente el analito es el responsable de la señal medida, se denomina especificidad. Así pues, la selectividad admite graduaciones (método poco selectivo, método muy selectivo), mientras que la especificidad no.²

Como se observa en la definición anterior, el concepto de selectividad va ligado al concepto de interferencia, entendiendo por interferencia aquella sustancia que causa un error sistemático en la determinación del analito de una magnitud relativa de igual o superior a un valor establecido. Las interferencias pueden clasificarse de acuerdo con criterios diversos. Desde un punto de vista práctico, el criterio más útil es el que distingue entre las



interferencias que causan un error absoluto constante y las que causan un error absoluto proporcional a la concentración de analito.

Incertidumbre

Cualquier proceso de medida esta sujeto a una variabilidad inherente que se podrá minimizar hasta cierto nivel, pero no eliminar totalmente. Así, la ISO, en colaboración con otros organismos, define la incertidumbre como *el intervalo dentro del cual se espera encontrar el valor real de aquello que se mide*. La incertidumbre se expresa como un intervalo y engloba tanto errores aleatorios como sistemáticos.²

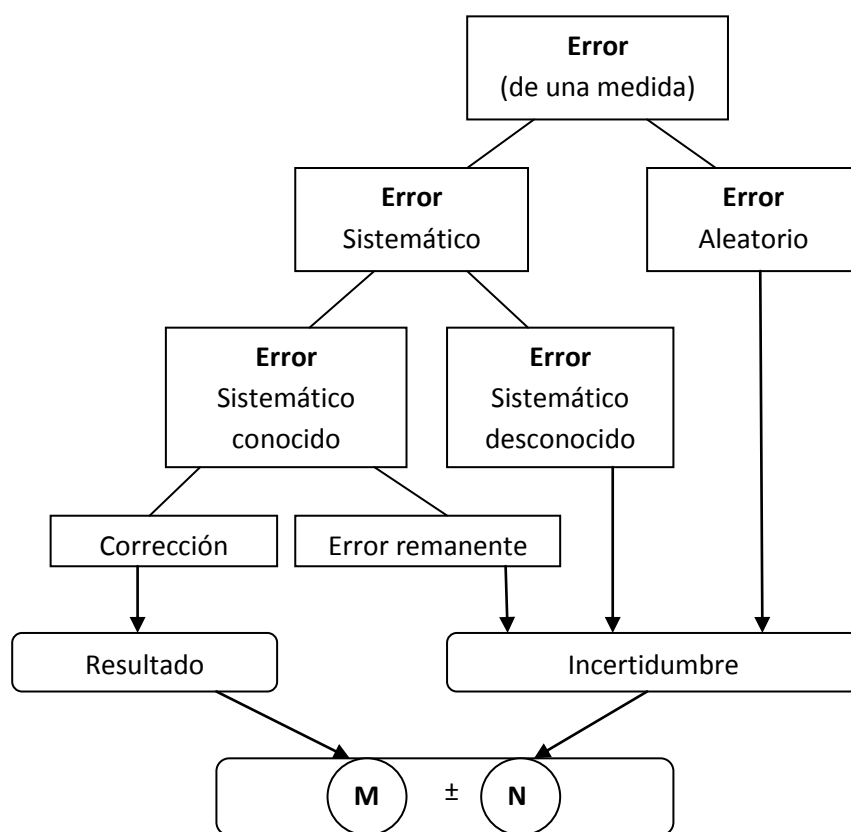


Figura 6: Ilustración gráfica de los componentes aleatorios y sistemáticos de la incertidumbre.

Tipos de Incertidumbre

De acuerdo al documento *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, una guía general, avalada por los organismos BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML, señala que existe dos tipos de incertidumbre, que designa con las letras A y B, dependiendo



de la forma como se han obtenido sus valores para incorporarlos en los cálculos de la incertidumbre combinada o expandida ²

- Incertidumbre tipo A: representa componentes que pueden ser evaluados a partir de distribuciones estadísticas de serie de resultados (por tanto, experimentalmente en un laboratorio y generalmente expresadas por desviaciones estándar).
- Incertidumbre tipo B: también pueden caracterizarse por desviaciones estándar, son aquellas que se evalúan a partir de distribuciones de probabilidad supuestas, basadas en la experiencia o en otro tipo de información. Son valores que generalmente no se han obtenido en el propio laboratorio; por ejemplo a través de certificados que acompañan al material volumétrico, a los materiales de referencia, etc.

Parámetros para expresar incertidumbres

La guía mencionada anteriormente señala parámetros característicos para expresar incertidumbres²:

- *Incertidumbre estándar.* Incertidumbre del resultado de una medida, expresada como una desviación estándar, Se representa por $u(x_i)$.
- *Incertidumbre estándar combinada.* Incertidumbre estándar de una medida cuando dicho resultado se obtiene a partir de los valores de otras magnitudes. Se calcula a partir de las incertidumbres estándar de dichas magnitudes, aplicando la propagación de la ley de errores aleatorios. Se expresa por $u_c(y)$.
- *Incertidumbre expandida.* Magnitud que define un intervalo alrededor del resultado, que puede esperarse que incluya una fracción elevada de la distribución de valores que pueden atribuirse razonablemente al medido. Se obtiene mediante la expresión:

$$U = k u_c(y)$$

Donde k es un factor de cobertura o seguridad que adopta, generalmente, valores iguales a 2 o 3 (para unos niveles de confianza aproximadamente del 95% y el 99%, respectivamente).



Procedimiento para evaluar y expresar incertidumbres

En el año de 1995, EURACHEM, que es un foro para la discusión de cuestiones relacionadas con la química analítica en Europa, publicó un documento sobre el cálculo de incertidumbres en las medidas analíticas (*Quantifying uncertainty in analytical measurement*). En dicho documento se matizan las etapas a seguir para estimar incertidumbres en los laboratorios analíticos:²

1. Etapa. *Especificación* (identificación clara), tanto del mesurado como del procedimiento experimental de medida.
2. Etapa. *Identificación de las fuentes de incertidumbre*. Se trata de enumerar las fuentes potenciales de incertidumbre de un proceso analítico concreto (por ejemplo, el muestreo, la extracción, los equipos de medida, la pureza de los reactivos, etc.). Algunas de estas fuentes de incertidumbre pueden no ser totalmente independientes y sería necesario establecer covarianzas.
3. Etapa. *Cuantificación de la incertidumbre*. Se trata de simplificar al máximo el problema. Para ello se hace primero una estimación preliminar del orden de magnitud de cada componente de la lista para eliminar aquellos no significativos y agrupar otros componentes que puedan estimarse globalmente. Se señalan cuatro formas básicas para estimar los componentes individuales:
 - Cuantificación experimental.
 - Empleo de materiales de referencia.
 - Estimaciones basadas en resultados o datos previos.
 - Estimaciones basadas en el criterio del analista.
4. Etapa. *Cálculo de la incertidumbre combinada*, a través de las leyes de propagación de incertidumbres.
5. Etapa. *Cálculo de la incertidumbre expandida* para un cierto nivel de confianza (generalmente, el 95%, en cuyo caso el factor de cobertura es $k=2$).



Muestreo en el Proceso Analítico

La toma de muestra o muestreo puede definirse como el proceso de obtención de una fracción de material con objeto de que represente o proporcione información de una cantidad mayor del mismo.² La muestra es precisamente la fracción obtenida en dicho proceso, que debe llevarse a cabo de acuerdo con un plan de muestreo perfectamente establecido. En la figura se muestra un esquema global del proceso analítico, convenientemente simplificado con objeto de destacar la posición de la toma de la muestra en el conjunto del proceso.

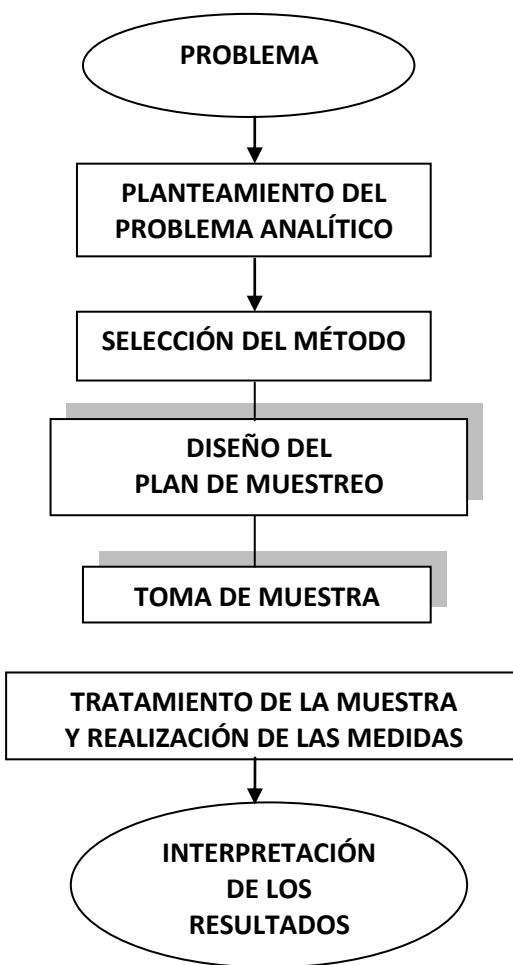


Figura 7. La toma de la muestra dentro del proceso Analítico

La toma de la muestra constituye el nexo de unión entre el cliente y el analista, entre el problema y el resultado analítico que puede contribuir a solucionarlo. Por esta razón, el



éxito de la toma de muestra, al igual que el del conjunto del proceso analítico, depende de una clara definición o planteamiento del problema.

Estrategias de muestreo

- Modalidad *at-line*. Un operador obtiene la muestra y la introduce en el sistema de medida.
- Modalidad *on-line*. La muestra entra automáticamente en el sistema de medida.
- Modalidad *in-line*. El sistema de medida es introducido en el material objeto de las medidas.
- Modalidad *no invasiva*. Las medidas se realizan sin que se establezca un contacto mecánico entre la muestra y el sistema de medida.

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Definiciones y terminología(11)

Bracketing: (Diseño de análisis de extremos): diseño de un programa de estabilidad en el cual sólo las muestras de los extremos de ciertos factores del diseño (por ejemplo concentración y tamaño de empaque), son analizados en todos los tiempos como en un diseño completo. El diseño asume que la estabilidad de cualquiera de los niveles intermedios está representada por los resultados de los extremos analizados. En otras palabras, cuando un medicamento tiene la misma forma cualitativa en el mismo material de envase, en presentaciones con diferentes concentraciones de fármaco, se puede presentar los resultados del estudio de estabilidad de las presentaciones con la menor y mayor concentración del fármaco.

Condiciones definidas de almacenamiento: condiciones específicas, diferentes a las condiciones normales de almacenamiento, que rotulan en el envase de los productos inestables a determinadas temperaturas y humedades o al contacto con la luz.

Condiciones de almacenamiento controlado: temperatura y humedad relativa establecidas para realizar los estudios de estabilidad.



Condiciones de almacenamiento extremas: condiciones que no cumplen con las condiciones normales o naturales de almacenamiento.

Dictamen: resolución que emite una autoridad reguladora con base a evidencias técnicas objetivas.

Estabilidad: capacidad que tiene un producto o un principio activo de mantener por determinado tiempo sus propiedades originales dentro de las especificaciones de calidad establecidas, para la zona climática IV.

Estudios de estabilidad: pruebas que se efectúan para obtener información sobre las condiciones en las que se deben procesar y almacenar las materias primas o los productos semi-elaborados o los productos terminados, según sea el caso. Las pruebas de estabilidad también se emplean para determinar periodo de validez del medicamento en su envase primario original y en condiciones de almacenamiento especificadas.

Estudios acelerados de estabilidad: estudios diseñados con el fin de aumentar la tasa de degradación química o física de un medicamento, empleando condiciones extremas de almacenamiento. Estos estudios tienen como objeto determinar los parámetros cinéticos de los procesos de degradación o predecir periodo de validez del medicamento, en condiciones normales de almacenamiento. El diseño de estos estudios puede incluir temperaturas elevadas, altas humedades y exposición a la luz intensa. Los resultados de los estudios acelerados de estabilidad deben ser complementados por los estudios efectuados en condiciones de almacenamiento normales o en condiciones definidas de almacenamiento.

Envase /empaque primario: todo material que tiene contacto directo con el producto, con la misión específica de protegerlo de su deterioro, contaminación o adulteración y facilitar su manipulación.

Envase/empaque secundario: todo material que tiene contacto con uno o más envases primarios, con el objeto de protegerlos y facilitar su comercialización hasta llegar al consumidor final.



Fecha de expiración: aquella que señala el final del período de eficacia del o los principios activos del medicamento y a partir de la cual no deben administrarse; basándose en estudios de estabilidad.

Lote: cantidad específica de cualquier material que haya sido manufacturado bajo las mismas condiciones de operación y durante un periodo determinado, que asegura características y calidad uniforme dentro de ciertos límites especificados y es producido en un ciclo de manufactura.

Lote piloto: aquel producido para fines experimentales, generalmente de menor tamaño que el lote de producción. Un lote piloto puede elaborarse para destinarlo a estudios de estabilidad o estudios clínicos. El lote piloto no será menor del 10% del tamaño del lote de producción.

Matrixing (Diseño de análisis de matriz): técnica estadística que se emplea para llevar a cabo estudios de estabilidad en los que en cada tiempo de toma de muestras, solamente se analiza una fracción del total de muestras sometidas a las condiciones definidas para el estudio, de manera tal que en el siguiente tiempo de análisis se selecciona otro grupo de muestras diferentes y así sucesivamente hasta el final del estudio.

Medicamento o producto farmacéutico: toda sustancia simple o compuesta, natural o sintética, o mezcla de ellas, con forma farmacéutica definida, destinada al diagnóstico, prevención, tratamiento, alivio o cura de enfermedades o síntomas asociados a ellas en los seres humanos.

Número de lote: cualquier combinación de letras, números o símbolos que sirven para la identificación de un lote.

Período de validez: intervalo de tiempo en que se espera que un medicamento, después de su producción, permanezca dentro de las especificaciones aprobadas. Este período es utilizado para establecer la fecha de expiración individual de cada lote.

Período de validez comprobado: lapso de tiempo determinado mediante estudios de estabilidad en condiciones controladas de almacenamiento, realizados con el producto envasado en su sistema envase-cierre para comercialización.



Período de validez tentativo: período establecido con carácter provisional no mayor a dos (2) años, estimado por proyección de datos provenientes de estudios acelerados de estabilidad, efectuados con el producto envasado en el sistema de envase-cierre utilizado para su comercialización. Este período de validez está sujeto a comprobación mediante estudios de estabilidad en condiciones controladas de almacenamiento. El período de validez tentativo es aplicable para productos farmacéuticos de nuevo desarrollo, para aquellos todavía no comercializados y los ya comercializados en el país para los cuales no existía el respaldo de estudios de estabilidad en condiciones controladas de almacenamiento.

Principio o ingrediente activo: toda sustancia natural, sintética o semi-sintética, que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifica por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presente en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento.

Protocolo de estudio de estabilidad: plan detallado que describe la forma como se generan y analizan los datos de estabilidad para la sustentación de un período de validez.

Sistema envase-cierre: conjunto de materiales de empaque que contienen y protegen la forma farmacéutica, incluye tanto el empaque primario como el secundario, si este último tiene la función de proporcionar protección adicional al producto.

Zona Climática IV: para fines de este reglamento se utilizará la clasificación de la Organización Mundial de la Salud.

Zona climática IVa: Cálida / Húmeda: Condiciones de Almacenamiento a temperatura y humedad relativa de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\% \pm 5\%$, respectivamente.

Zona climática IVb: Cálida / Húmeda: Condiciones de Almacenamiento a temperatura y humedad relativa de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $75\% \pm 5\%$ respectivamente.

Condiciones para realizar Estudios de Estabilidad

Se aplica para el registro de un medicamento o modificaciones a las condiciones de registro; se deben llevar a cabo en tres lotes piloto o tres lotes de producción o su



combinación con la formulación y el material de empaque / envase primario sometido a registro.

Condiciones para realizar Estudios de Estabilidad de los Medicamentos que no requieren refrigeración ni congelación^a	
Tiempo 6 Meses (180 días)	
Condiciones de Almacenamiento	Frecuencia de Análisis
40 °C ± 2 °C con 75% ± 5% de humedad relativa para formas farmacéuticas sólidas.	Inicial 90 días 180 días
40 °C ± 2 °C para formas farmacéuticas líquidas y semi-sólidas.	Inicial 90 días 180 días

Tabla 2: Estabilidad de medicamentos que no requieren refrigeración

Condiciones para realizar estudios de estabilidad de los medicamentos que requieren refrigeración		
Condiciones de Almacenamiento	Período Mínimo	Frecuencia de Análisis
25 °C ± 2 °C con 60% ± 5% de humedad relativa.	No menor de 6 meses	Inicial, 6 y 3 meses

Tabla 3: Estabilidad de medicamentos que requieren refrigeración

El empaque primario de un medicamento fotosensible debe proporcionar protección a la luz y demostrar que el producto es estable. Para esto debe conservar un lote bajo condiciones de luz natural o luz artificial que simulen condiciones normales, durante 3 meses, con un análisis inicial y otro final. En el caso que el producto lleve un empaque que lo proteja de la luz se requerirá únicamente la presentación de documentación técnica que avale dicha protección.

Si el medicamento en estudio no cumple con los requisitos de tiempo, humedad o temperatura descritas en los numerales anteriores, deben realizar estudios de estabilidad a largo plazo bajo condiciones controladas y el tiempo en que se propone conservar o usar el

^a

- También puede recomendarse el almacenamiento a temperaturas más altas, por ejemplo: 3 meses 45°C . 50°C y 75 % de Humedad Relativa para la zona IV.
- Se acepta para objeto de este Reglamento Técnico, como mínimo (3 intervalos analíticos: Inicial, final y uno intermedio de los cuales éste último, puede presentarse a un tiempo menor o mayor de 90 días. Se aceptan también 4 ó más intervalos para apoyar el estudio.



producto, presentando resultados a tiempo inicial, a los 12 meses y el compromiso de presentar los resultados al finalizar los 2 años del estudio.

Cuando en el curso de estudios acelerados se producen cambios significativos se deben efectuar otras pruebas en condiciones intermedias, por ejemplo $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $60\% \pm 5\%$ de humedad relativa. En este caso, la solicitud inicial de registro farmacéutico incluirá datos de al menos 6 meses, provenientes de un estudio de un año.

Se permitirá presentar estudios de estabilidad, utilizando las técnicas de bracketing y matrixing con muestras de 3 lotes.

Modificaciones posteriores al registro

Toda solicitud de modificación posterior al registro requiere la presentación de estudios de estabilidad, cuando se haya modificado uno o más de los siguientes puntos:¹⁰

- El material de envase o empaque primario.
- La fórmula en términos cualitativos y cuantitativos. No será necesario presentar estudios de estabilidad del producto con una nueva fórmula cuali-cuantitativa en el caso de modificaciones en las cantidades de excipiente(s) de un máximo de 10% con respecto al peso total de la fórmula (en el caso de líquidos puede ser tanto con respecto al peso como al volumen), siempre y cuando no se le agreguen nuevos excipientes al producto ni se suprima alguno que sea fundamentalmente necesario para su estabilidad, como preservantes, antioxidantes u otros^b.
- El método de fabricación del producto.
- El sitio de manufactura: En el caso de un cambio en el sitio de manufactura, hacia una localización diferente de la original, como cambio de país o ciudad, deben realizarse nuevos estudios de estabilidad acelerados mínimo de dos lotes, por un período mínimo de tres meses con muestras del nuevo sitio de fabricación y con el

^b **Nota:** De acuerdo con las Buenas Prácticas de Manufactura, será responsabilidad del titular del medicamento el llevar a cabo estudios que demuestren que la estabilidad del producto no se ha alterado al cambiar un proveedor de materia prima o alguna característica física de presentación de la materia prima.



compromiso de realizar el estudio de estabilidad en condiciones controladas de almacenamiento, por parte del titular o el fabricante y presentarlo ante la autoridad de salud competente. Se otorgará el mismo período de validez aprobado anteriormente al producto siempre y cuando los resultados sean satisfactorios. Si el cambio de sitio de manufactura, se da en la misma planta o en la misma área climática dentro del mismo país, no será necesario presentar resultados de nuevos estudios de estabilidad, siempre y cuando se mantengan condiciones similares en cuanto a la fórmula, el método de manufactura, los equipos empleados y el sistema envase-cierre.

- Todos aquellos factores que pueden afectar la estabilidad del producto a criterio del titular.

Evaluaciones del estudio de estabilidad de un medicamento.

El estudio de estabilidad de un medicamento, debe incluir las pruebas requeridas para cada forma farmacéutica. Cuando el medicamento no requiere de alguna de las pruebas indicadas, deberá sustentarse técnicamente.

La determinación de las sustancias relacionadas o los productos de degradación o ambas, se realizará cuando la monografía lo establezca.

Los parámetros a evaluar en el caso de soluciones o suspensiones comprende: concentración de principio activo, características organolépticas, pH, límites microbianos y cuando proceda de acuerdo a las características propias del producto suspendibilidad (en suspensiones), pérdida de peso (envase de plástico), prueba de eficacia de conservadores y valoración de los mismos, esterilidad, materia particulada. Todos los estudios deben de llevarse a cabo en muestras en contacto con el empaque primario para determinar si existe alguna interacción, que afecte la estabilidad del producto.

Para obtener un período de vencimiento tentativo, se requiere que los datos analíticos de los estudios acelerados de estabilidad demuestren que los resultados no se salgan de las



especificaciones de estabilidad. Se considera que un medicamento sometido a este tipo de estudio ha sufrido cambios significativos cuándo: ¹⁰

- El porcentaje de pérdida de potencia inicial esta fuera de las especificaciones del producto.
- Los productos de degradación o sustancias relacionadas exceden el criterio oficial de aceptación u otro establecido por el fabricante, si no existiera un criterio oficial.
- El pH del producto está fuera de las especificaciones aceptadas por el fabricante, en los casos que sea aplicable.
- La disolución esta fuera del criterio de aceptación oficial hasta un máximo de 12 unidades ensayadas, en los casos que sea aplicable.
- Si el producto no cumple los parámetros establecidos en el RTCA 11.03.47:07 Productos farmacéuticos. Medicamentos para uso humano. Verificación de la calidad, se aceptarán desviaciones en la calidad de los parámetros evaluados, siempre que estén sustentados y respaldados por el titular del registro.
- Se excede el límite microbiano según el caso.

Estos datos anteriormente expresados deben ser confirmados con Estudios de estabilidad y en condiciones de almacenamiento especificadas por este Reglamento. El período de validez será asignado por el fabricante o titular y autorizado por la Autoridad Reguladora.

El período de validez asignado por el fabricante o titular, puede ser modificado cuando se justifique con la presentación del estudio de estabilidad a largo plazo. Sin embargo no puede ser mayor de 5 años.

Para un medicamento con la misma fórmula cualitativa en el mismo material de envase, en presentaciones con diferentes concentraciones de principio activo, pueden presentarse los resultados del estudio de estabilidad de las presentaciones con menor y mayor concentración del principio activo.



Información a incluir en el formato para presentar resultados de estudios de estabilidad.

Las conclusiones de los estudios de estabilidad deben presentarse firmados por el profesional responsable del estudio o por el profesional técnico designado por el titular. Se pueden admitir también estudios de estabilidad de un laboratorio de referencia firmados por el director técnico de dicho laboratorio.

Un estudio de estabilidad debe contar con la siguiente información: ¹⁰

- Información General
 - a. Nombre comercial y genérico del producto.
 - b. Forma farmacéutica y concentración del principio activo.
 - c. Nombre del fabricante y el país.
 - d. Tamaño del lote de producción.
 - e. Fecha de inicio del estudio y cuando aplique fecha de finalización.
 - f. Condiciones del estudio.
 - g. Se debe incluir las conclusiones del estudio indicando el período de validez solicitado y las condiciones de almacenamiento definidas para el producto, se presentarán las justificaciones, en caso que se requieran. Podrán aceptarse condiciones de almacenamiento, en el etiquetado, indicando una temperatura entre 25 °C y 30 °C (Zona IV) o de la temperatura aprobada para el estudio.
 - h. El nombre y la firma del profesional responsable del estudio de estabilidad o pro el profesional técnico designado por el titular, así como el nombre del laboratorio y el país donde se llevo a cabo dicho estudio.
- Información relativa de lotes evaluados
 - a. Fórmula cuali-cuantitativa del producto.
 - b. Número de lote.
 - c. Fecha de fabricación.
 - d. Tamaño del lote.



- Descripción del material de envase y empaque
 - a. Empaque primario.
 - b. Sistema de envase-cierre.
- Especificaciones del producto.
- Otros datos que deben de presentarse en el estudio de estabilidad.
 - a. Los valores de temperatura y humedad relativa correspondiente a cada grupo de datos cuando aplique.
 - b. Los datos de potencia obtenidos correspondientes a cada lote, expresados en términos de valor absoluto o porcentajes.
 - c. Ensayo de disolución (cuando aplique), los resultados deben de ser expresados en porcentaje sobre lo etiquetado como el promedio del número de unidades según etapa del ensayo y como un rango que incluya el valor mínimo y el máximo.
 - d. Si las concentraciones no son cuantificables, los resultados deben de ser referidos a los límites de sensibilidad del método expresados en función de la concentración estándar. Cuantificación de los productos de degradación, cuando existan especificaciones de límites.
 - e. Los resultados de los estudios de desafío a los preservantes con el fin de demostrar que su actividad se mantiene al final de la vida útil de los medicamentos en los cuales la concentración de preservante (s) es un parámetro crítico (ej. colirios, inyectables de dosis múltiple).
 - f. Los demás parámetros indicativos de la estabilidad física, química o microbiológica del producto (según la forma farmacéutica), relevantes a la estabilidad.
 - g. Se debe incluir las conclusiones del estudio indicando el período de validez solicitado y las condiciones de almacenamiento definidas para el producto, se presentarán las justificaciones, en caso que se requieran. Podrán aceptarse condiciones de almacenamiento, en el etiquetado, indicando una temperatura entre 25 °C y 30 °C (Zona IV) o de la temperatura aprobada para el estudio.



- h. El nombre y la firma del profesional responsable del estudio de estabilidad o pro el profesional técnico designado por el titular, así como el nombre del laboratorio y el país donde se llevo a cabo dicho estudio. Debe indicarse los criterios de aceptación, de conformidad con los mismos ya la disposición final.

Metodología analítica validada para cada parámetro evaluado

Método analítico validado cuando se requiera de acuerdo con el Reglamento Técnico Centroamericano de validación de Métodos Analíticos vigente.

Cuando se cambie el método analítico durante el estudio de estabilidad, debe demostrarse que los dos métodos son equivalentes mediante un proceso de validación de acuerdo con el Reglamento Técnico Centroamericano de validación de métodos analíticos vigente.

Fundamentos Generales del Análisis Volumétrico

El procedimiento general y esencial empleado en los métodos volumétricos de análisis se denomina “valoración”, y puede definirse como “el procedimiento operativo consistente en hacer reaccionar dos disoluciones: una en la cual se encuentra la sustancia que se desea cuantificar, convenientemente disuelta en un disolvente adecuado, y otra de la cual se conoce exactamente su concentración”. A esta última disolución se le denomina “disolución patrón valorante” (también, disolución valorante) y a la de concentración desconocida “disolución a valorar” o “disolución valorada”. Una de las dos, generalmente la valorante, deberá colocarse en una bureta para ir añadiendo volúmenes sucesivos de la misma hasta finalizar la valoración. El volumen exacto de la otra disolución debe ser previamente fijado y medido exactamente con una pipeta. La concentración de la disolución patrón se expresa, usualmente, en mol por litro de disolución (mol/L), y representa la concentración de cantidad de sustancia de equivalentes o normalidad de dicha disolución. Debe recordarse que la cantidad de sustancia de equivalentes para un compuesto dado depende del tipo de reacción en la que participe. En algunos casos, la concentración de las disoluciones valorantes también puede ser expresada como concentración de cantidad de sustancia.¹¹



En determinadas ocasiones la valoración puede ser realizada utilizando una masa exacta de un patrón primario, disuelta en un volumen aproximado de disolvente, en lugar de una disolución de concentración exactamente conocida del mismo.

La valoración culmina cuando se alcanza el punto estequiométrico o punto de equivalencia, es decir, cuando la cantidad de equivalentes de la especie que se valora ha reaccionado completamente con una idéntica cantidad de sustancia de equivalentes del patrón (o agente) valorante adicionado. Por tanto, la valoración se detiene cuando:

$$m_{\text{especie que se valora}} = m_{\text{patrón valorante}}$$

De la expresión anterior se deriva la Ley Fundamental de la Volumetría o Ley de Ritcher:

$$(V * C)_{\text{disolución a valorar}} = (V * C)_{\text{disolución valorante patrón}}$$

Como puede apreciarse, conocido el volumen exacto de la disolución a valorar que se toma para el análisis y el volumen consumido de la disolución patrón valorante (de concentración exactamente conocida), puede entonces calcularse fácilmente la concentración de la disolución que se valora, según:

$$C_{\text{disolución a valorar}} = \frac{(V * C)_{\text{valorante patrón}}}{V_{\text{disolución a valorar}}}$$

Y si se desea calcular directamente la masa de sustancia valorada, la expresión de la Ley Fundamental de la Volumetría toma la forma:

$$m_{\text{valorada}} = \frac{(V * C)_{\text{patrón valorante}} * P_{eq}}{V_{\text{disolución a valorar}}}$$

El punto de equivalencia de la valoración es un concepto teórico; en la práctica, sólo se puede apreciar una aproximación a este punto a la que se denomina *punto final de la valoración*. La detección del punto final de la valoración se realiza con ayuda de los *indicadores*, nombre con el cual se identifican aquellas sustancias que provocan un cambio físico visible (variación de color, aparición de un precipitado u otras señales perceptibles al ojo humano) en la disolución que se valora. Este cambio físico apreciable es el que indica



que debe detenerse la adición de la disolución patrón valorante, es decir, que debe darse por concluida la valoración.

La diferencia que existe entre el volumen de valorante que corresponde al punto final y el que corresponde al punto de equivalencia constituye el error de valoración. En realidad, el error de valoración tiene tres causas fundamentales: a) el error químico, debido a la diferencia entre el punto final y el punto de equivalencia; b) el error visual, que es una medida de la dispersión causada por la limitada capacidad del ojo para recordar o comparar colores; y c) el error del indicador, debido al consumo de valorante por el propio indicador. La causa (a) es la que mayor incidencia tiene en el error de valoración. Muchas veces es posible calcular teóricamente el error de valoración o, en su defecto, evaluarlo experimentalmente. Obviamente, el cambio físico producido por los indicadores debe tener lugar en las cercanías del punto de equivalencia para afectar al mínimo la exactitud y precisión del análisis.

Es importante tener en cuenta que en algunas valoraciones no es posible emplear indicadores para la determinación del punto final, aún cuando teóricamente se conozca que el cambio físico ocurre muy cerca del punto de equivalencia. Tal es la situación que se presenta con las valoraciones de disoluciones intensamente coloreadas o turbias, en las que la observación del cambio de coloración se hace difícil o imposible de apreciar. En tales casos debe recurrirse a métodos instrumentales de detección del punto final, pero estos no serán tratados en el presente libro porque serán objeto de estudio en cursos posteriores.

Ahora bien, no todas las reacciones químicas pueden ser empleadas en análisis volumétrico, pues las características de éste exigen el cumplimiento de determinados requisitos que garantizan la fiabilidad de los resultados que se obtengan. Los requisitos que deben cumplir las reacciones que se emplean en los métodos volumétricos de análisis son: ¹¹

- La sustancia que se valora debe reaccionar cuantitativamente con la disolución patrón valorante, es decir *la reacción debe ser completa*, lo que se traduce en una constante de equilibrio suficientemente elevada que garantice el desplazamiento de la reacción hacia la formación de los productos.



- La reacción debe ocurrir a una velocidad tal que permita que la cantidad adicionada del patrón valorante reaccione inmediatamente con la sustancia presente en la disolución que se valora. De lo contrario, cuando sea detectado el punto final, se habrá añadido más valorante del necesario, es decir, se habrá añadido un volumen mayor que el que contiene la cantidad de sustancia equivalente necesaria para completar la reacción, quedando un exceso en la disolución que se valora. Cuando esto ocurre se produce una sobrevaloración y se obtienen resultados erróneos. Entonces, para evitar tales inconvenientes, *la reacción debe ser rápida*.
- Es indispensable que el reaccionante que se agrega (el patrón valorante) se consuma, exclusivamente, en la reacción con la sustancia que se valora. En otras palabras, durante la valoración no deben producirse reacciones secundarias que afecten la estequiometría de la reacción analítica, pues de ocurrir aquéllas, imposibilitarían la interpretación correcta de los resultados obtenidos. Los elementos expuestos se traducen en la necesidad de que *la reacción pueda describirse mediante una ecuación química balanceada*.
- Por último, es imprescindible para la aplicación de los métodos volumétricos de análisis, la *posibilidad de detectar el punto final de la valoración* mediante un cambio físico visible que tenga lugar lo más cercanamente posible al punto de equivalencia.

Límite de cuantificación y precisión del análisis volumétrico

Por lo general, la concentración mínima determinable (límite de cuantificación) por análisis volumétrico convencional es de 10^{-6} M ($\cong 10 \mu\text{g}$). La concentración mínima de la disolución valorante puede ser 10^{-3} M. El uso de micro y ultra-micrométodos puede reducir el límite de cuantificación en 1 ó 1,5 órdenes de magnitud. En condiciones óptimas, usualmente es posible determinar concentraciones del analito de 1 ppm; y en algunos pocos casos, de 0,1 ppm. Se considera sin fundamento, intentar disminuir esta cantidad mínima determinable tratando de utilizar nuevos indicadores, mejorando la exactitud de las medidas de volúmenes, de masas, o mediante alguna otra modificación.¹¹

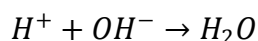


En cuanto a la precisión, suele ser no menor de $\pm 0,1 \%$, cuando el análisis es realizado por analistas experimentados. Cuando se desarrollan técnicas muy refinadas, puede lograrse una precisión de hasta $\pm 0,0015 \%$.

Clasificación de los métodos volumétricos de análisis

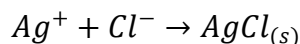
Los métodos de análisis volumétrico se pueden clasificar, atendiendo al tipo de reacción química que tiene lugar entre el patrón valorante y la sustancia presente en la disolución a valorar, en cuatro grandes grupos identificados como: ¹¹

1. *Volumetría de Neutralización (o Volumetría Ácido-Base)*: Comprende las determinaciones basadas en reacciones entre ácidos y bases. La ecuación química general que caracteriza a la volumetría de neutralización es:

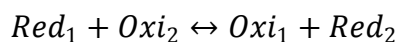


Estos métodos poseen una enorme aplicación en el campo del análisis de las materias primas, y productos farmacéuticos para la determinación de compuestos con características ácidas o básicas.

2. *Volumetría de Precipitación*: Se basa en reacciones en las que ocurre la formación de un compuesto escasamente soluble. Los métodos más usados son los argentométricos que emplean una disolución de nitrato de plata como patrón valorante.
3. La determinación cuantitativa de iones cloruro es uno de los análisis que con frecuencia se realiza para el control de la calidad de algunas materias primas y medicamentos que los contienen, teniendo lugar la siguiente reacción:



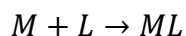
4. *Volumetría de Oxidación-Reducción*: Se basa en reacciones donde ocurre una transferencia de electrones de una sustancia a otra, debido a que la oxidación de una especie va siempre acompañada de la reducción de la otra especie. La ecuación general puede ser representada de la siguiente forma:





Los métodos volumétricos basados en este principio encuentran también una notable aplicación en el análisis de aquellos compuestos de interés farmacéutico capaces de oxidarse o reducirse.

5. *Volumetría de Formación de Complejos*: Se fundamenta en reacciones que dan lugar a la formación de un complejo estable (compuesto de coordinación) entre un átomo central (generalmente un metal) y una sustancia que posee pares de electrones no compartidos denominada ligando. La reacción general puede escribirse:



donde M es el metal, L es el ligando y ML es el complejo formado.

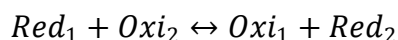
La Complexometría, como también se conoce la Volumetría de Formación de Complejos, es muy utilizada en el análisis de aquellas sustancias que presentan iones metálicos, con excepción de los de metales alcalinos. Este tipo de sustancias también son de interés analítico en el campo farmacéutico.

Fundamentos Generales de la Volumetría Redox

La volumetría de oxidación-reducción, también conocida como volumetría redox, se basa en reacciones que llevan implícita una transferencia de electrones entre dos sustancias, una de las cuales se reduce (acepta electrones), mientras que la otra, simultáneamente, se oxida (cede electrones). La sustancia que se reduce o acepta electrones se denomina agente oxidante, y la que se oxida o cede electrones, agente reductor.¹¹

Los métodos volumétricos basados en procesos de oxidación-reducción son más numerosos y diversos que los basados en cualquier otro tipo de reacción.

En su forma más sencilla, una reacción de oxidación-reducción se puede escribir:



en la cual las especies que reaccionan están identificadas como 1 y 2 y las abreviaturas Red y Oxi, representan las formas reductoras y oxidante de tales especies, respectivamente.

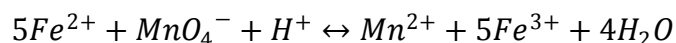
El equilibrio de una reacción de oxidación-reducción está determinado por la facultad que tienen los reaccionantes de donar o aceptar electrones. Si se considera la mezcla de un



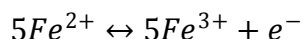
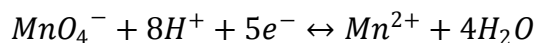
oxidante fuerte (Oxi_2), con alta capacidad para aceptar electrones, con un reductor fuerte (Red_1), con alta disposición para cederlos, al alcanzarse finalmente el equilibrio, la formación de los productos de reacción (Oxi_1 y Red_2) estará ampliamente favorecida. Por supuesto, una reacción menos completa ocurrirá cuando esta capacidad de las sustancias reaccionantes para aceptar o ceder electrones sea menor o no se encuentre tan favorecida.

Semi-reacciones de Oxidación-Reducción

A menudo, es útil desglosar una ecuación de oxidación-reducción en dos semirreacciones, una de las cuales describe el proceso de oxidación y la otra, el proceso de reducción. Considérese por ejemplo, la ecuación para la oxidación de los iones hierro (II) por los iones permanganato, en una disolución ácida:



Las dos Semi-ecuaciones serían:



Estas ecuaciones muestran claramente que el ion permanganato es el agente oxidante, al ganar electrones y reducirse a ion Mn^{2+} ; mientras que el ion Fe^{2+} es el agente reductor, al ceder electrones y oxidarse a Fe^{3+} . Obsérvese que, antes de sumar las dos semiecuaciones, fue necesario multiplicar la segunda por cinco pues, si bien el hierro(II) cede sólo un electrón para oxidarse a hierro (III), el anión permanganato necesita ganar cinco electrones para reducirse a manganeso (II), al cambiar su número de oxidación de +7 hasta +2. Esto significa que un mol de permanganato requiere cinco moles de hierro(II) para completar la reacción.

Por tales razones, en esta reacción el número de equivalencia del permanganato es cinco, mientras que el del hierro (II), es uno. Debe recordarse que, en los procesos de oxidación-reducción el número de equivalencia puede inferirse del número de electrones ganados o cedidos por una especie dada, es decir, del cambio en su número de oxidación.



Así, las masas molares del equivalente, para los iones permanganato y hierro (II) serán, respectivamente:

$$M \left[\frac{MnO_4^-}{5} \right] = \frac{118.936 \text{ g/mol}}{5} = 23.75 \text{ g/mol}$$

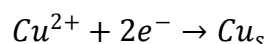
$$M \left[\frac{Fe^{2+}}{1} \right] = \frac{55.845 \text{ g/mol}}{1} = 55.845 \text{ g/mol}$$

La magnitud de la transferencia electrónica puede ser medida, y los valores de esta medición resultan muy útiles, porque permiten asignar valores numéricos a la constante de equilibrio de una reacción de oxidación-reducción.

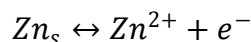
Ahora bien, para poder comprender adecuadamente los principios que rigen la volumetría redox, resulta imprescindible comentar algunos conceptos, términos y procesos electroquímicos.

Reacciones de Oxidación-Reducción en Celdas Electroquímicas

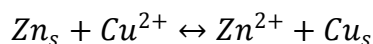
Las reacciones de oxidación-reducción pueden ser el resultado de una transferencia directa de electrones de un dador a un aceptor. Así, si se sumerge zinc metálico en una disolución que contenga sulfato de cobre, los iones cobre (II) migran hacia la superficie del zinc y se reducen a cobre metálico.



A la vez que se oxida una cantidad equivalente de zinc



La ecuación global se obtiene sumando las 2 semi-reacciones



Un aspecto interesante de muchas reacciones de oxidación-reducción es que las dos semi-reacciones que la constituyen se pueden llevar a cabo en zonas que están aisladas físicamente una de otra. Por ejemplo, la figura muestra como las semi-reacciones que se

acaban de considerar, pueden producirse en compartimientos separados, constituyendo en conjunto lo que se conoce como pila o celda electroquímica.

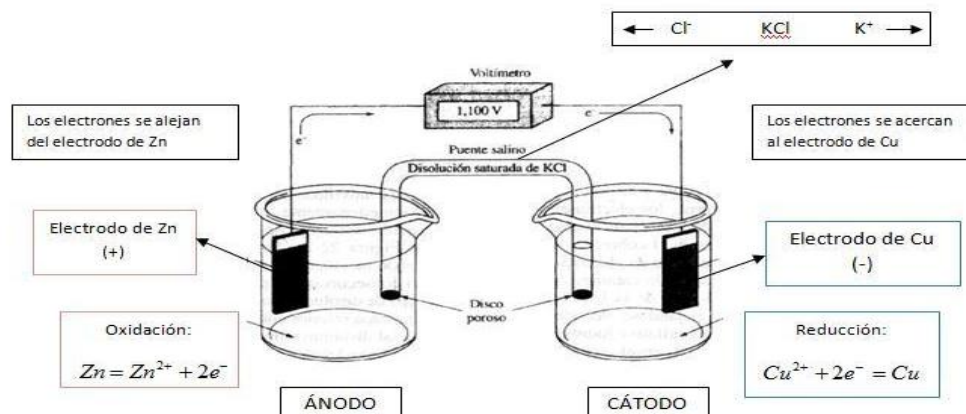


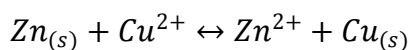
Figura 8: Celda Electroquímica

El compartimiento de la izquierda contiene una lámina de zinc sumergida en una disolución de sulfato de zinc; el de la derecha, cuenta con una lámina de cobre en una disolución de sulfato de cobre. Un conductor externo proporciona un medio por el cual los electrones se transfieren desde el zinc al cobre. Sin embargo, este flujo de electrones no puede producirse de manera significativa a menos que el desequilibrio de carga, creado por el movimiento de electrones, se pueda compensar; es decir, el movimiento de electrones del zinc al cobre crearía un exceso de iones positivos en la superficie del zinc que, por atracción electrostática, evitaría que continuase la migración de electrones. Similarmente, la disolución inmediatamente adyacente al cobre, se cargaría negativamente debido a la eliminación de los iones Cu^{2+} . Sin embargo, estos desequilibrios de carga no ocurren, puesto que el disco poroso (que impide la mezcla de las dos disoluciones) proporciona una trayectoria por la cual los iones Zn^{2+} pueden circular desde la superficie en que se originan hasta el compartimiento que contiene los iones Cu^{2+} y el exceso de los iones SO_4^{2-} puede moverse, desde la superficie del cobre, hasta la del zinc.

El equilibrio que se establece en esta celda, es idéntico, en todos los aspectos, al descrito más arriba. Sin embargo, en este caso los electrones se transfieren de una especie a otra como una corriente eléctrica. La transferencia de electrones continuará hasta que las



concentraciones de zinc (II) y cobre (II), alcancen los niveles que correspondan al equilibrio de la reacción:



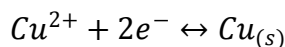
Una vez alcanzado ese equilibrio, ya no se observará un flujo neto de electrones, y la correspondiente corriente producida, bajará a cero. Es esencial tener presente que, tanto el proceso en su conjunto, como las concentraciones que existen en el equilibrio son totalmente independientes del camino que ha sido seguido para alcanzar el mismo; el cual pudiera estar caracterizado por un contacto directo entre los reaccionantes o por una reacción indirecta, como la representada en la figura. Es igualmente importante reconocer que la ecuación para la reacción y la constante numérica asociada a ella son también independientes del modo como se haya alcanzado la condición de equilibrio.

Potencial de Electrodo

Debe recordarse que el potencial eléctrico absoluto de un electrodo aislado no se puede medir ya que, como se observa de la figura anterior, el circuito exterior sólo nos da el valor del potencial que se desarrolla entre los dos electrodos. Es por ello que el potencial de un electrodo es relativo y está referido al de otro electrodo que sirve como patrón y con el cual se encuentra en contacto. Como potencial de electrodo se define, entonces, la diferencia de potencial generada por una pila formada por un electrodo de un elemento dado y el electrodo normal de hidrógeno, el cual se toma como referencia para medir todos los potenciales de electrodos. Al electrodo normal de hidrógeno se le asigna, por convenio, el valor de 0,00 V. Éste exhibe un comportamiento reversible, dando potenciales constantes y reproducibles en las condiciones experimentales dadas.¹¹

Su construcción es sencilla y consta de una lámina de platino sumergida en una disolución de una actividad iónica de H^+ constante (1 mol/L), que se mantiene saturada, haciendo burbujear hidrógeno gaseoso (H_2), continuamente, a una presión del gas de 1 atmósfera (100 kPa) y temperatura de 298 K.

La pila de la figura ilustra la definición del potencial de electrodo para la semi-reacción:



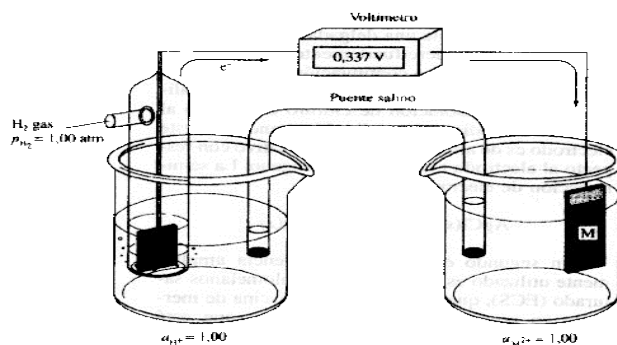
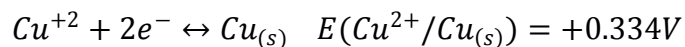


Figura 9: Potencial de electrodo de una celda electroquímica

El potencial medido en esta pila es por definición el potencial de electrodo de la semi-reacciones de reducción del cobre y expresa la capacidad de los iones $\text{Cu}(\text{II})$ de ganar electrones a las moléculas de H_2 , oxidándolas a iones H^+ .

Teniendo en cuenta el convenio adoptado en 1953 por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), que expresa: “el término potencial de electrodo se reservará exclusivamente para describir las semi-reacciones de reducción”; al potencial del par $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}_{(\text{s})}$ se le asigna un signo positivo, de manera que:



Cuando todos los reaccionantes y productos poseen una concentración de cantidad de sustancia (más exactamente actividad) igual a la unidad (1 mol/L), en una semi-pila (contra el electrodo normal de hidrógeno), el potencial de electrodo se define como **potencial normal de electrodo (E°)**, el cual es una constante física importantísima que proporciona una descripción cuantitativa de la fuerza relativa que gobierna una reacción de oxidación-reducción.



Semi-reacciones	E^0 (V) a 25 ⁰ C
$Cl_{2(g)} + 2e^- \leftrightarrow 2Cl^-$	+1,359
$O_{2(g)} + 4H^+ + 4e^- \leftrightarrow 4H_2O$	+1,229
$Br_{2(ac)} + 2e^- \leftrightarrow 2Br^-$	+1,087
$Ag^+ + 1e^- \leftrightarrow Ag_{(s)}$	+0,799
$Fe^{3+} + 1e^- \leftrightarrow Fe^{2+}$	+0,771
$I_3^- + 2e^- \leftrightarrow 3I^-$	+0,536
$Cu^{2+} + 2e^- \leftrightarrow Cu_{(s)}$	+0,337
$2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_{2(g)}$	0,000
$AgI_{(s)} + 2e^- \leftrightarrow Ag_{(s)} + I^-$	-0,151
$Cd^{2+} + 2e^- \leftrightarrow Cd_{(s)}$	-0,403
$Zn^{2+} + 2e^- \leftrightarrow Zn_{(s)}$	-0,763

Tabla 4: Potencial estándar de electrodo de algunos sistemas electroquímicos

Influencia de las concentraciones sobre el potencial de electrodo

La relación entre el potencial de reducción (E) de un par dado y las concentraciones de cantidad de sustancia (más exactamente, actividades) de las formas oxidada y reducida correspondientes, se expresa por la ecuación de Nernst:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c(F.O.)}{c(F.R.)}$$

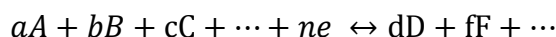
Donde E^0 , es el potencial normal de reducción del par redox (V); R, la constante de los gases [8,314 J / mol.K]; T, la temperatura absoluta (K); F, la constante de Faraday (96500 culombios); c(F.O.), es la concentración de cantidad de sustancia de la forma oxidada; c(F.R.), la concentración de cantidad de sustancia de la forma reducida; y n, el número de electrones involucrados en la semi-reacción balanceada.

Sustituyendo los valores numéricos de las constantes y pasando de logaritmos naturales a logaritmos de base 10, a la temperatura ambiente (25°C) se obtiene:



$$E = E^{\circ} + \frac{0.0591}{n} \log \frac{c(\text{F.O.})}{c(\text{F.R.})}$$

En general, si en la semi-reacción que ocurre en el electrodo, participan paralelamente otros componentes que no cambian su grado de oxidación, lo que pudiera representarse según:



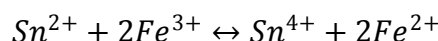
Entonces, la ecuación de Nernst se expresaría de la forma siguiente:

$$E = E^{\circ} + \frac{0,0591}{n} \log \frac{c(A)^a \times c(B)^b \times c(C)^c}{c(D)^d \times c(F)^f}$$

Constantes de equilibrio de las reacciones de Oxidación- Reducción

La posibilidad de invertir la dirección de las reacciones de oxidación-reducción es, evidentemente, una consecuencia de la reversibilidad de estas reacciones. Las reacciones reversibles, como se sabe, conducen al establecimiento del equilibrio químico. Por tanto, no es difícil calcular la constante de equilibrio de una reacción, conociendo los potenciales normales de ambos pares de oxidación-reducción.

Así, si se considera la reacción:



Su constante de equilibrio sería:

$$K_{eq} = \frac{c(Sn^{4+}) \times c^2(Fe^{2+})}{c(Sn^{2+}) \times c^2(Fe^{3+})}$$

Utilizando el cálculo citado de la constante de equilibrio K, se obtiene que para cualquier proceso de oxidación-reducción reversible (a 25°C), la ecuación general es la siguiente:

$$\log K = \frac{(E_{Ox}^{\circ} - E_{Red}^{\circ}) \times n}{0,0591}$$



Donde $E^{\circ}\text{Ox}$ y $E^{\circ}\text{Red}$ son los potenciales normales de los pares correspondientes a la especie oxidante y reductora, respectivamente, y n , es el número de electrones intercambiados.

En efecto, si el oxidante y el reductor que actúan como reaccionantes, son más fuertes, respectivamente, que los formados durante la reacción, entonces $E^{\circ}\text{Ox} - E^{\circ}\text{Red} > 0$. En tal caso, $\log K > 0$ y $K > 1$. Esto demuestra que el producto de las concentraciones de las sustancias formadas durante la reacción, una vez alcanzado el equilibrio, es mayor que el producto de las concentraciones de los reaccionantes. En otras palabras, la reacción se produce en la dirección planteada (de formación de los productos); y, si la diferencia entre los potenciales normales es suficientemente grande, será prácticamente completa.

Por el contrario, si el oxidante y el reductor iniciales son más débiles que los que se deben obtener como producto de la reacción, entonces $\log K < 0$ y $K < 1$. Esto significa que la reacción tiende a efectuarse en dirección opuesta a la planteada y que, además, será tanto más completa, cuanto mayor sea la magnitud absoluta de la diferencia de potenciales normales de ambos sistemas.

Curvas de valoración de Oxidación- Reducción

En el transcurso de una valoración de oxidación reducción, las concentraciones de las sustancias o iones que participan en la reacción se modifican constantemente. Por consiguiente, también el potencial del sistema (E_{sist}) debe cambiar de la misma manera que, en una valoración ácido base cambia todo el tiempo el pH o en una valoración de precipitación cambia el pX. Así, si los valores del potencial del sistema, para diferentes momentos de una valoración, se llevan a un gráfico en función del volumen añadido de la disolución valorante, se obtendrán curvas de valoración análogas a las obtenidas para los restantes métodos volumétricos estudiados, las que también están caracterizadas por los cuatro momentos que las tipifican, es decir: punto inicial, puntos intermedios, punto de equivalencia y puntos posteriores al punto de equivalencia.

Punto de equivalencia

Cuando la cantidad de sustancia de equivalentes de Ce^{4+} añadida se iguala a la cantidad de sustancia de equivalentes de Fe^{2+} , se alcanza el punto de equivalencia de la valoración.



Como las concentraciones iniciales de las disoluciones de Ce^{4+} y Fe^{2+} son idénticas (0,1 mol/L), el punto de equivalencia se alcanza al añadir 50 mL del valorante (disolución de Ce^{4+}).

Puntos posteriores al punto de equivalencia

Después del punto de equivalencia cualquier adición de disolución valorante de Ce^{4+} conducirá a la presencia de un exceso del mismo en la disolución.

Factores que influyen sobre la forma de las curvas de valoración

El salto de potencial de las curvas de valoración redox depende, en primera instancia, de la diferencia de potencial entre ambos sistemas reaccionantes. Si se tiene en cuenta el valor del potencial normal de electrodo de cada uno de los pares redox involucrados en la reacción, puede establecerse que “a mayor diferencia de potencial entre los sistemas reaccionantes, mayor será el salto de potencial en la curva de valoración”. Pero desde luego, la influencia decisiva la ejerce la constante de equilibrio (cuantitividad de la reacción), aunque esta última puede ser afectada, en muchos casos, por fenómenos cinéticos, catalíticos, reversibles, irreversibles, etc.

Otro factor que afecta el salto de potencial es la presencia de sustancias formadoras de complejos, el salto de potencial es el pH o sea, la concentración de H^+ , lo que desde luego no ocurre en la misma magnitud en todos los sistemas reaccionantes.

Indicadores empleados en la volumetría de Oxidación-Reducción

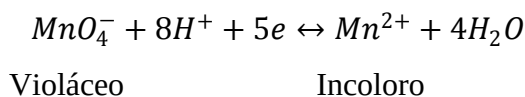
La detección del punto final de una valoración gobernada por procesos de oxidación-reducción está asociada de una forma u otra a los cambios del potencial del sistema en la disolución que se valora. Al igual que en los anteriores métodos volumétricos, el punto de final se detecta mediante una sustancia química que produce un cambio visible en la disolución, generalmente un cambio de color.

En general, los indicadores empleados en la volumetría de oxidación-reducción pueden clasificarse en tres grupos: auto-indicadores, indicadores específicos e indicadores de oxidación-reducción verdaderos.

**Auto-indicadores.**

Los auto-indicadores son sustancias participantes de la reacción que poseen un color en su forma oxidada y otro color en su forma reducida.

El auto-indicador más conocido y empleado en reacciones de oxidación-reducción es el permanganato de potasio (KMnO_4). Como se sabe, el ion MnO_4^- es de color violáceo, mientras que, el ion Mn^{2+} , producto de la reducción del primero, es incoloro. Como se ha mencionado antes, la reacción que tiene lugar es la siguiente:



Cuando todo el reductor ya ha sido valorado, una gota en exceso de MnO_4^- dará a la disolución un color rosa nítido, indicando el punto final de la valoración.

Se pueden valorar también, sin indicador, algunas sustancias reductoras cuando se utiliza como agente oxidante una disolución de yodo (I_2), puesto que su color pardo oscuro desaparece debido a su reducción a iones yoduro (I^-); y con una disolución de Cerio (IV), por cuanto éste presenta un color amarillo, mientras que su producto de reducción (Ce^{3+}), es incoloro. Sin embargo, los resultados de estas valoraciones son menos precisos que cuando se utiliza el permanganato de potasio.

Indicadores específicos.

Son sustancias que se añaden a la disolución que se valora y que no intervienen en la reacción que se produce durante la valoración, pero son capaces de reaccionar con una de las especies involucradas en la misma, dando lugar a la formación de compuestos (generalmente complejos) de color intenso.¹¹

Quizás el indicador específico más conocido sea el almidón, que forma un complejo azul oscuro con el yodo (I_2). La aparición o desaparición de este complejo señala el punto final de las valoraciones en las que se produce o consume yodo.

Otro indicador específico común es el ion tiocianato (SCN^-) que forma un complejo de color rojo con el ion Fe^{3+} . Así, el ion SCN^- puede utilizarse como indicador en la valoración de Fe^{3+} con Sn^{2+} puesto que, en el punto de equivalencia de esta valoración, la

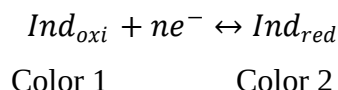


concentración de Fe^{3+} se hace extremadamente pequeña y el color rojo del complejo desaparece.

Indicadores de oxidación-reducción verdaderos.

Estos indicadores son sustancias que se añaden a la disolución que se valora y permiten detectar el punto final de la valoración porque son sensibles a los cambios del potencial del sistema.¹¹

Los indicadores redox verdaderos son sustancias fácil y reversiblemente oxidables o reducibles, que poseen un color en su forma oxidada y otro, en su forma reducida. Por lo tanto, constituyen de por sí, un par redox que esquemáticamente puede representarse de la siguiente forma:



A este par de oxidación-reducción puede aplicársele la ecuación de Nernst, resultando:

$$E = E^0 + \frac{0,0591}{n} \log \frac{c(\text{Ind}_{\text{oxi}})}{c(\text{Ind}_{\text{red}})}$$

donde E^0 es el potencial normal de electrodo del sistema redox propio del indicador.

$$E = E^0 + \frac{0,0591}{n} \log \frac{10}{1}$$

Y como $\log 10 = 1$

$$E = E^0 + \frac{0,0591}{n}$$

y cuando la $c(\text{Ind}_{\text{oxi}})$ es 10 veces menor que la $c(\text{Ind}_{\text{red}})$, entonces:

$$E = E^0 + \frac{0,0591}{n} \log \frac{1}{10}$$

$$E = E^0 + \frac{0,0591}{n} \log 10^{-1}$$

$$E = E^0 - \frac{0,0591}{n}$$

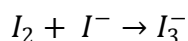


Luego el intervalo útil de viraje de un indicador redox será:

$$E = E^0 \pm \frac{0,0591}{n}$$

Métodos con yodo

El yodo es soluble en agua en la proporción de 0.001 moles por litro a la temperatura ambiente. Sin embargo, en presencia de yoduros solubles, como el de potasio, aumenta su solubilidad por formación del complejo triyoduro.¹²



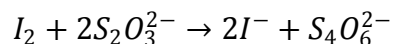
El ion triyoduro constituye la especie principal que existe en las disoluciones de "yodo", tanto en las utilizadas como reactivo valorante en método directo, como en las formadas por oxidación del ion yoduro en métodos indirectos. (por conveniencia en la representación de las ecuaciones, se escribirá normalmente I_2 en lugar del complejo I_3^-).

El potencial normal del sistema

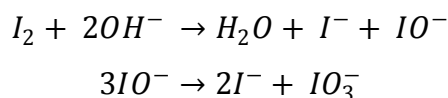


Lo hace muy utilizable en volumetría. Los oxidantes fuertes oxidan el I^- a I_3^- y los reductores fuertes reducen el I_3^- a I^- . Por esta razón, los métodos se dividen en dos grupo:¹²

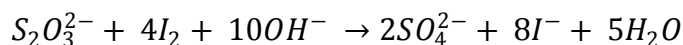
1. Métodos directos (yodimetría), en que se utiliza una disolución patrón de yodo para valorar reductores fuertes normalmente en disolución neutra o débilmente ácida.
2. Método indirecto (yodometría), en que los oxidantes se determinan haciéndolos reaccionar con un exceso de yoduro; el yodo liberado se valora en disolución débilmente ácida con reductor patrón, como tiosulfato o arsenito sódicos; el primero de estos compuestos se utiliza con más frecuencia:



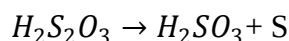
Los métodos en que intervienen el yodo no son aplicables en disolución fuertemente alcalina a causa de las siguientes reacciones de desproporcionamiento (Redox internas):



Además, la valoración del yodo con tiosulfato no transcurre según la reacción sencilla; parte del tiosulfato se oxida a sulfato;



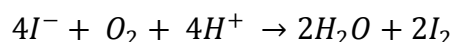
la cantidad de tiosulfato que se oxida a sulfato aumenta con la alcalinidad de la disolución. El tiosulfato no puede utilizarse en disoluciones altamente ácidas a menos que dichas soluciones estén sometidas a una agitación intensa para que se oxide en seguida. El ácido tiosulfurico sufre un desproporcionamiento:¹²



Pero esta reacción es muy lenta respecto a la oxidación con yodo. El H_2SO_3 es también un reductor del Yodo pero su equivalencia es diferente de la del tiosulfato.

En los métodos que utilizan yodo existen dos fuentes principales de error.¹²

1. El yodo es algo volátil, pudiendo la disolución perder parte de él esta fuente de error se minimiza añadiendo a la disolución un exceso de KI, para que se forme el triyoduro complejo I_3^- . Además, las valoraciones con yodo, sean directas o indirectas, no se efectúan nunca en caliente ya que ello incrementa la pérdida de yodo por volatilización.
2. El ion yoduro se oxida con el oxígeno del aire:



Esta oxidación no es perceptible en disolución neutra, pero se hace más apreciable a medida que aumenta la concentración de ion hidrógeno. La luz intensa acelera la oxidación atmosférica del ion yoduro y lo mismo actúan algunos catalizadores tales como Cobre (1),



nitrito y óxidos de nitrógenos. El agua que se utiliza para la dilución y para disolver el yoduro potásico en los métodos indirectos, debe estar recientemente hervida para eliminar el oxígeno disuelto, y el yodo liberado debe valorarse en seguida. Si no se opera de esta forma, debe conservarse en un matraz en que se desaloja el aire con dióxido de carbono o por adición de pequeñas cantidades de bicarbonato sódico a la disolución ácida, o bien añadiendo un trocito de "*hielo seco*" (dióxido de carbono sólido).

Indicador

Una de las ventajas de los métodos en que interviene el yodo es la facilidad y sensibilidad con que se detecta el punto final: en los métodos directos por aparición del primer exceso del yodo que se utiliza como reactivo valorante; en los métodos indirectos por la desaparición del yodo que se valora.

1. **Yodo como autoindicador.** Una gotita de disolución de yodo 0.1N comunica un color amarillo bien perceptible en 100-200 ml de agua. Cuando los otros componentes de la mezcla reaccionante son incoloros el yodo puede servir como su propio indicador. Sin embargo, este método de detectar el punto final no es tan sensible como los que se indican a continuación.
2. **Almidón.** Cuando se calienta en agua gránulos de almidón estos se rompen y originan diversos productos de descomposición, entre ellos β -amilosa, que da lugar a un color azul intenso con yodo en presencia de yoduro. El material coloreado es probablemente un complejo de adsorción de yodo, β -amilosa y yoduro. Dejada bastante tiempo en reposo la disolución de almidón sufre descomposición y se hace insensible al yodo. A menos que se utilice un aditivo para evitar esta descomposición, la disolución de almidón debe prepararse en el mismo día de su utilización; un poco de yoduro mercúrico conserva la sensibilidad durante semanas y aun meses.

El almidón no puede utilizarse como indicador en disolución fuertemente ácida, pues su descomposición hidrolítica se ve acelerada por ácido la sensibilidad del



yodo disminuye también por acción del alcohol y el color azul no aparece en presencia de concentraciones alcohólicas superiores al 50%. El color azul desaparece a temperaturas ligeramente superiores a la ambiente, pero vuelve a formarse al enfriarse la mezcla. Una disolución indicadora de almidón bien preparada debe detectar el yodo en disolución 10^{-5} N a la temperatura ambiente. En los métodos indirectos no debe añadirse el indicador hasta que se haya valorado la mayor parte del yodo; una concentración elevada de yodo da con el almidón un complejo con propiedades indicadoras disminuidas.

3. **Color en disolventes orgánicos.** El yodo se disuelve en tetracloruro de carbono, cloroformo y algunos otros disolventes orgánicos formando disoluciones rojo violeta, que constituyen a veces ensayos más sensibles al yodo que la reacción con almidón; pueden detectarse concentraciones del orden 10^{-6} N. Una cantidad de yodo inferior al límite de visibilidad en medio acuoso puede concentrarse por extracción con un pequeño volumen de un disolvente no miscible, con lo cual se hace perceptible. Este método para detectar el yodo es especialmente útil cuando se utilizan en las valoraciones disoluciones muy diluidas o en los casos en que las condiciones de trabajo impiden la utilización de almidón, como sucede en medios fuertemente ácidos.

Disoluciones patrón

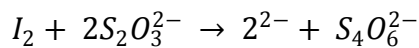
Yodo. El yodo es suficientemente puro para poderse utilizar como patrón primario; no obstante es un poco volátil, incluso a la temperatura ambiente y su pesada exacta es dificultosa. Por ello se suele preparar una disolución de yodo de concentración aproximada y después se normaliza. La cantidad necesaria de yodo se mezcla con un peso 3 o 4 veces superior de yoduro potásico y se tritura (en un mortero) con pequeñas porciones de agua vertiendo luego cada una de estas porciones en el frasco en que se vaya a conservar y continuando el tratamiento hasta que todo el yodo este disuelto. Después de diluir la disolución al volumen deseado, se somete a enérgicas y frecuentes agitaciones para



conseguir la disolución total del yodo. Es recomendable preparar la disolución 1 o 2 días antes de su utilización y someterla a agitación frecuente en dicho período.¹²

Tiosulfato sódico. Se prepara una disolución de concentración aproximada a la necesaria en agua destilada recién hervida y luego se normaliza la disolución. El dióxido de carbono disuelto en el agua (H_2CO_3) puede ser suficiente para originar una descomposición incipiente en ácido tiosulfúrico y azufre; además, ciertas bacterias actúan sobre el tiosulfato y dan lugar a disoluciones turbias estas acciones se retardan mediante adición de pequeñas cantidades de álcali y bórax.

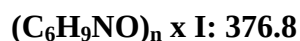
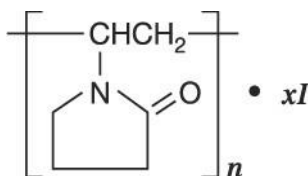
La reacción entre tiosulfato sódico y el yodo es cuantitativa a lo largo de un amplio intervalo de pH. El yodo puede valorarse con tiosulfato en disoluciones bastante ácidas (pH:1) si se agita enérgicamente durante la valoración. El límite superior de pH es 9, apartir del cual el yodo reacciona con los iones hidróxido tal como antes de ha indicado. La única aplicación del tiosulfato sódico es la valoración del yodo en disolución más o menos ácida.





PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS

Estructura Química



Sinónimos: Complejo 1 -vinil - 2 pirrolidona - yodo , Complejo de yodo - polivinilpirrolidona , Complejo de yodo – Povidona, Complejo de yodo - poli (1 -(2 oxo - 1 -1 - pirrolidinil) etileno).

Nombre Químico: 1-vinil-2-pilmero de pirrolidona.

Contenido: yodopovidona es un complejo de yodo con Povidona. Contiene no menos de 85% y no más de 120% yodo disponible (I) calculado sobre la base anhidra.

Estado físico, color y olor: Líquido viscoso de color café, rojizo y olor característico a yodo, libre de material extraño, partículas en suspensión y sedimentación.

Solubilidad: Soluble en agua, alcohol.

Densidad: 1.05g/ml

Punto de Ebullición: 93 °C

Monografía Terapéutica

Yodóforos.

Los Yodóforos son la combinación de yodo con agentes tensoactivos, poseen propiedades antisépticas y desinfectantes ya que tienen amplio espectro de actividad contra bacterias y hongos. Debido a sus cualidades, cubren un número importante de indicaciones terapéuticas.¹³



Mecanismo de acción de la yodopovidona

El compuesto en sí es inactivo, pero lentamente va liberando yodo orgánico, que es el que posee la actividad bactericida. El mecanismo de acción es más complejo que el del yodo. Su acción biocida se debe a la penetración del yodo a través de la pared celular y su combinación con diferentes sustratos orgánicos; mediante reacciones de óxido-reducción se oxidan carbohidratos, lípidos, aminoácidos y proteínas, destruyendo así al microorganismo.¹³

Mecanismo De Acción

En general, el mecanismo de acción de los antisépticos y desinfectantes depende de tres mecanismos básicos:

1. Capacidad de coagular y precipitar proteínas.
2. Alterar las características de permeabilidad celular
3. Toxicidad o envenenamiento de los sistemas enzimáticos de las bacterias, que a su vez dependen del grupo químico. Éstos pueden producir la muerte o inhibición celular de las bacterias por oxidación, hidrólisis o inactivación de enzimas, con pérdida de los constituyentes celulares.

Farmacocinética

Acción de amplio espectro sobre gérmenes gram positivo y gram negativo, mycobacterium tuberculosis, hongos y virus, su efectividad es afectada en presencia de materia inorgánica.

La efectividad de su acción germicida al entrar en contacto con la piel se alcanza alrededor de los dos minutos. Tiene buen efecto residual de 2-3 minutos. Se absorbe por piel y mucosas, puede llevar a una sensibilización de los tejidos. Es tóxico si se utiliza en peritoneo y/o quemaduras. El tiempo de acción tiene un inicio intermedio con efecto máximo desde los 2 minutos. No se une a las proteínas plasmáticas y por lo mismo carece de efecto tirotóxico y es eliminado íntegramente por el riñón.¹³



Relación Estructura-Actividad

La povidona que es combinado con el yodo para formar yodopovidona, es el responsable de la solubilidad, ya que es un polímero soluble en agua y fisiológicamente aceptable tanto para los seres humanos como para otros animales. El yodo representa las dos terceras partes del complejo yodopovidona que le confieren la actividad microbicida.

Método de Análisis

- **Determinación de yoduro total:** disolver 500 mg de yodopovidona, exactamente pesado, en 100 ml de agua en una fiola de 250 ml. Anadir solución de bisulfito de sodio hasta que el color del yoduro desaparezca. Anadir 25 ml de nitrato de plata 0.1 N y 10 ml de ácido nítrico y mezclar. Valorar el exceso de nitrato de plata con tiocianato de amonio 0.1 N utilizando sulfato de amonio férrico como indicador. Cada ml de nitrato de plata 0.1 N equivale a 12.69 mg de I.⁵
- **Determinación de yoduro disponible:** pesar exactamente 5 g de yodopovidona, en un beaker de 400 ml, y añadir 200 ml de agua. Cubrir el beaker, y agitar mecánicamente por no más de una hora hasta disolver la mayor cantidad posible. Valorar inmediatamente con tiosulfato de sodio 0.1 N, añadir 3 ml de solución de almidón como indicador. Realizar una determinación blanco, y realizar las correcciones necesarias. Cada ml de tiosulfato de sodio 0.1 N es equivalente a 12.69 mg de I.⁵
- **Determinación de I Solución de yodopovidona:** Transferir en un beaker de 100 ml un volumen exactamente medido de solución equivalente a 50 mg de yoduro, añadir agua hasta alcanzar un volumen de no menos de 30 ml. Valorar inmediatamente con tiosulfato de sodio 0.02 N, determinar el punto final el punto final potenciométricamente, utilizando un electrodo de calomelano de platino. Realizar una determinación blanco, realizar las correcciones necesarias. Cada ml de tiosulfato de sodio es equivalente a 2.538 mg de I⁻.⁵



MATERIAL Y MÉTODO

Tipo de Estudio:

Experimental

Población:

Cuatro recipientes de 3.78 correspondiente a los lotes de producción 01111000, 01021100, 01051100, 01121100.

Muestra:

Se tomo un recipiente de 3.78 litros correspondiente a cada lote de estudio (4 recipientes).

Alcance:

Cuantificación de iodo en soluciones tópicas de iodopovidona al 10 % por volumetría Redox y aplicación del método validado a un estudio de estabilidad.

Plan de Análisis

Se utilizaron los programas Excel 2007 para el procesamiento de los datos obtenidos, la creación de tablas y gráficos necesarios y Mapple 15 para la estimación de incertidumbres asociadas al método analítico.

Reactivos y Materiales:

Tabla de Reactivos			
Nombre	Grado	Descripción	Formula química
Dicromato de potasio	Patrón primario 99.9% de pureza	Solido color naranja. Marca: Fisher scientific	$K_2Cr_2O_7$
Bicarbonato de sodio	Reactivo 100.3 % de pureza	Polvo Marca: J.T.Baker	$NaHCO_3$
Tiosulfato de sodio, 5-hidrato, cristal	Reactivo 100 % de pureza	Cristales incoloros Marca: J.T.Baker	$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$
Carbonato de sodio, anhidro granular	Reactivo 100.2 % de pureza	Polvo blanco Marca: J.T.Baker	Na_2CO_3
Yoduro de potasio, Granular	Reactivo 99.5 % de pureza	Gránulos Marca: J.T.Baker	KI
Almidón, soluble	Reactivo para iodometría	Marca: J.T.Baker	-----
Ioduro de mercurio	Reactivo 99.6 % de	Polvo rojo	HgI_2



rojo	pureza	Marca: Fisher Scientific	
Iodo resublimado	Reactivo 99.5 % de pureza	Cristales purpura Marca: MERCK	I_2
Acido clorhídrico	Reactivo 37% de pureza	Líquido viscoso incoloro o ligeramente amarillento muy corrosivo	HCl
Acido acético glacial	Reactivo 100 % de pureza	Densidad. 1.05 g/ml	CH_3COOH
Acido sulfúrico	Reactivo 97% de pureza	Líquido viscoso incoloro altamente corrosivo. Densidad: 1.84 g/ml	H_2SO_4
Acido perclórico	Reactivo 69. 72 % de pureza	Líquido incoloro altamente inflamable. Densidad: 1,67 g/ml	<u>$HClO_4$</u>
Agua	Destilada	Agua destilada densidad 1g/ml	H_2O

Tabla de Materiales	
Nombre	Descripción
Espectrofotómetro UV- vis	Espectrofotometro UV-Vis; marca: Varian Inc; modelo: Cary 50; Lámpara de Xenón, índice de escaneo 24000 nm/min.
Celda	Celda de cuarzo rectangular de 10mm; marca: Varian.
Balanza analítica	Balanza analítica marca: A&D; modelo: GH-120; capacidad: máx.: 120g, min.: 0.0001g; Desviación: 0.1mg. Balanza analítica marca: A&D; modelo: HM-120; capacidad: máx.: 120g, min.:0.0001g; Desviación: 0.1mg
Bureta de 50ml	Bureta de 50ml marca Borosil® tipo A
Bureta 25ml	
Balones	Balones de 2L, 1L, 500ml, 250ml, 200ml, 100ml, 50ml y 25ml marca Pyrex® tipo A
Pipetas Aforadas	Pipetas aforadas de 1, 2, 3,4,5,10 y 25ml marca FISHERbrand, Kimax y Pyrex® tipo A.
Pipetas volumétricas	Pipetas de 5 y 10ml, Marca:Clay Adams.



Micropipeta	Micropipeta de 500-5000 μ L; marca: Eppendorf
Pera de succión	Dispensador 20 ml, Marca: Glasfirn.
Erlenmeyer	Erlenmeyer de 250ml marca Kimax, Pyrex®; tolerancia de $\pm 5\%$.
Beaker	Beaker marca Kimax uUSA de 100 y 250ml.
Probeta	Probeta de 50ml marca Kimax USA.
Agitador	Agitador magnetico, Marca Sybron; modelo: 2 thermoly type 7200 Stir-light.
Pizeta	Pizeta de polietileno 500ml de capacidad, Marca: FISHERbrand.
Ultrasonic cleaner	Ultrasonic cleaner, Marca: Brasonic; modelo: B3-R. Baño ultrasónico para aclarar solución.
Soporte	Soporte Universal para buretas volumétricas.
Magneto	Magnetos agitador de titulaciones
Espátula	Espátula de acero inoxidable utilizadas para pesar reactivos y patrones
Capsula de porcelana	Capsula de porcelana utilizada para pesar sustancias altamente reactivas.
Destilador	Marca: Fistreem; Modelo: Barnstead.

Procedimiento analítico para la cuantificación de Iodopovidona en solución.

- Preparación y Estandarización del estándar de Dicromato**

Pesar exactamente 40 mg de $K_2Cr_2O_7$ patrón primario, y disolver en 50 ml de agua en una fiola de 250 ml cerrada. Agitar hasta disolver, remover el tapón y añadir 0.6 gramos KI, 0.4 gramos de $NaHCO_3$ y 1 ml de HCl concentrado. Insertar suavemente el tapón en la fiola y agitar hasta mezclar, dejar reposar en la oscuridad 5-7 minutos exactos. Lavar el tapón y las paredes interiores de la fiola con agua y valorar el yodo liberado con la solución de Tiosulfato 0.02N hasta que la solución torne color amarillento. Añadir 3 ml de solución de almidón y continuar valorando hasta viraje color esmeralda.



- **Preparación de la muestra**

Tomar una alícuota de 10 ml utilizando una pipeta aforada, lavar las paredes de la pipeta con agua destilada con la ayuda de una pizeta para este fin, depositando el líquido de lavado en el recipiente que contiene la muestra y posteriormente añadir 10 ml de HCl 0.1 M y suficiente agua hasta obtener un volumen de 150 ml.

- **Preparación de la solución de Tiosulfato**

Pesar aproximadamente 5 gramos de Tiosulfato de sodio y 200 mg de carbonato de sodio y disolver en un balón volumétrico de 1000 mL y aforar con agua destilada recientemente hervida y enfriada

- **Preparación de la solución de yodo**

Pesar aproximadamente 2.78 gramos de yodo resublimado asegurándose de evitar pérdidas por volatilización y disolver en una solución de 7 gramos de KI en 100 ml de agua, trasvasar cuantitativamente la disolución a un balón volumétrico de color ámbar de 250 mL, asegurándose de protegerla del contacto con luz directa. Añadir 3 gotas de HCl concentrado y diluir con agua hasta aforar y obteniendo una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml de yodo.

- **Preparación de la solución de almidón**

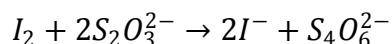
Mezclar 1 gramo de almidón soluble con 10 mg de yoduro de mercurio rojo, la mezcla de sólidos debe pesarse en cápsula de porcelana o un beaker, verter suficiente agua fría hasta lograr una pasta delgada. Añadir 200 ml de agua hirviendo y calentar con agitación constante hasta que la solución se torne completamente incolora.

Valoración de la Muestra:

1. Tomar con una pipeta volumétrica una alícuota de 10 ml de muestra y transferir a un erlenmeyer de 250 mL, lavar las paredes de la pipeta utilizando una pizeta hasta asegurarse de que no exista residuo de muestra.
2. Añadir con una pipeta volumétrica una alícuota de 10 ml de HCl 0.1 M y suficiente agua hasta obtener un volumen de 150 ml.



3. Tapar el erlenmeyer que contiene la muestra con un tapón de vidrio, o bien, con papel aluminio durante el proceso de titulación.
4. Colocar el recipiente que contiene la muestra sobre un agitador magnético.
5. Transferir la solución de Tiosulfato de sodio 0.02 N a un bureta de 50 mL.
6. Titular la muestra de yodopovidona con la solución de Tiosulfato de sodio 0.02 N gota a gota hasta que la solución torne un color amarillento. Añadir inmediatamente 3 ml de la solución de almidón (no detener el proceso de titulación) y continuar valorando hasta obtener una solución incolora según la reacción:



7. Realizar los cálculos necesarios para determinar el porcentaje de yodo obtenido en la titulación, mediante el modelo matemático.

Modelo Matemático:
$$\%I_2 = \frac{V_2 * N * Peq}{W_m * V_1} * 100$$

Donde:

%I₂: porcentaje de yodo en la muestra.

V₂: volumen práctico gastado por la bureta durante la titulación expresado en litro.

N: Normalidad de la solución de Tiosulfato de sodio.

Peq: peso equivalente de yodo expresado en miligramos

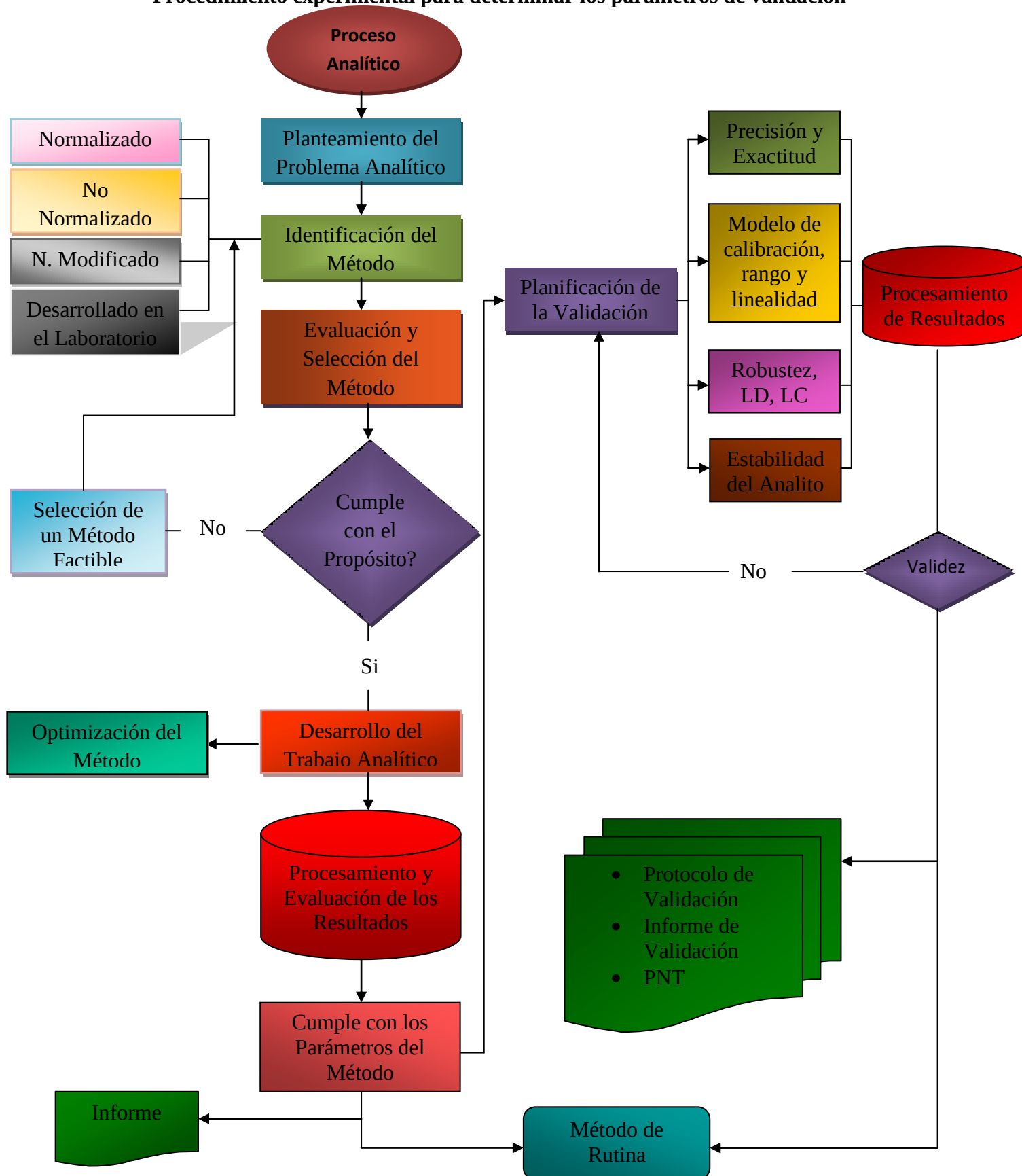
W_m: masa de yodo tomada en la alícuota de muestra expresada en gramos equivalente a 0.1g.

V₁: alícuota de muestra tomada expresada en litros equivalente a 0.01 litros.

100: constante que expresa porcentaje.



Procedimiento experimental para determinar los parámetros de validación





- **Exactitud**

La exactitud se determinó a través del método de adición patrón. Se prepararon muestras a 3 niveles de concentración 80%, 100% y 120% de la concentración nominal de la muestra, se tomaron alícuotas de 4 ml de solución de Yodopovidona y se adicionaron cantidades crecientes de solución estándar de yodo hasta lograr el porcentaje teórico previamente descrito. Para determinar la exactitud se hayan las respuestas experimentales netas para cada nivel de concentración y se comparan con los resultados obtenidos por interpolación en la recta de calibración de la solución estándar de yodo para las mismas concentraciones de analito.

Criterios de aceptación:

- El intervalo de recuperación para cada nivel de concentración y la recuperación media debe estar en el rango de 98-102 %.
- CV menor al 2 %.
- Prueba t para la recuperación media $t_{cal} < t_{tab}$.

- **Precisión**

- Repetibilidad del sistema instrumental

Se determino analizando repetidamente una misma muestra de solución estándar de yodo 10 veces a la concentración nominal.

Criterio de aceptación:

- CV menor al 2 %.

- Repetibilidad del método:

Se prepararon 3 muestras a 3 niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado analizando cada uno por triplicado (un total de 9 muestras). La estimación de la repetibilidad del método se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas y con los intervalos de confianza a cada nivel de concentración estudiado.



Criterios de aceptación:

- CV menor a 5.81 %.

➤ Precisión intermedia

Se realizó un estudio matricial en donde se analizaron por triplicado muestras preparadas a la concentración nominal utilizando una bureta de 50 ml y otra de 25 ml realizadas por analistas diferentes durante 2 días para estudiar la variabilidad de los datos mediante el coeficiente de variación global de las respuestas obtenidas.

Criterios de aceptación:

- CV global y de cada grupo de análisis debe ser menor al 4 %.

• **Linealidad**

Para la linealidad del sistema se prepararon 6 soluciones de estándar de dicromato analizadas por triplicado a la concentración de 40%, 75%, 100%, 125%, 150% y 175% de la concentración nominal establecida para la estandarización de la solución de tiosulfato. Cada muestra se prepara y se analiza de la manera descrita en el acápite de preparación de estándar de dicromato y se grafica la concentración versus la respuesta obtenida (volumen gastado). La linealidad del método fue estimada analizando 5 muestras por triplicado a 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de la concentración nominal. En ambos casos el gráfico de calibración representa el promedio de 5 curvas individuales realizadas durante 5 días.

Criterios de aceptación:

- Coeficiente de correlación para el sistema instrumental y el método debe ser mayor o igual a 0.999.
- El CV de los factores respuesta debe ser menor al 2 % para el sistema instrumental y del 3 % para la linealidad del método.
- El coeficiente de determinación tanto para el sistema instrumental como para la linealidad del método debe ser mayor o igual a 0.998.
- Prueba t para la pendiente $t_{cal} > t_{tab}$.
- Prueba t para el intercepto $t_{cal} < t_{tab}$.
- Prueba F $F_{cal} > F_{tab}$.



- Robustez**

La determinación de la robustez se llevo a cabo mediante una comparación de la incidencia en la variabilidad de los resultados obtenidos a través de la representación de un diagrama de Pareto en donde y la aplicación de un diseño factorial completo de ocho experimentos (2^3) para evaluar la influencia de 3 factores tomando en cuenta también las posibles interacciones entre estos. Se crea una matriz del análisis factorial en donde se detallan las condiciones en las cuales se llevarán a cabo los ensayos.

	Temperatura (A)	Bureta (B)	Concentración (C)
+	TA 30 °C	50 mL	0.01 N
-	TC 25 °C	25 mL	0.05 N

A	B	C	AB	AC	BC	ABC
-	-	-	+	+	+	-
+	-	-	-	-	+	+
-	+	-	-	+	-	+
+	+	-	+	-	-	-
-	-	+	+	-	-	+
+	-	+	-	+	-	-
-	+	+	-	-	+	-
+	+	+	+	+	+	+

- Determinación Límite de Detección**

Se utilizo el método descrito por la IUPAC en cual se calcula el límite de detección a partir del conocimiento de la desviación estándar atribuible a la respuesta de una muestra placebo (muestra + estándar) y la pendiente de la recta de calibrado de adición estándar, método en el cual se multiplica una constante con un valor equivalente a 3.3 por el cociente de la división de la desviación estándar entre la pendiente de la recta de calibrado de adición estándar.

$$LD = 3.3 \frac{s_L}{b}$$



- **Determinación Límite de Cuantificación**

Se utilizó el mismo método descrito para el límite de detección modificando el valor de la constante por un valor de 10.

$$LC = 10 \frac{S_L}{b}$$

- **Pureza del Estándar de Dicromato (Patrón Primario)**

Se determino la pureza del estándar de Dicromato de Potasio mediante espectrofotometría uv-vis a una concentración de 60 ug/ml a una longitud de onda de 350 nm y analizando la muestra 10 veces consecutivamente. Se realizo el mismo procedimiento descrito para una solución preparada con estándar secado durante cuatro horas en un horno a 120 °C, contrastando ambos resultados seco y no seco mediante una prueba de t student de una cola. Se realizo una curva de calibración a 5 niveles de concentración 20, 40, 60, 80, 100 ug/ml y se determino el análisis de regresión.

- **Material de Referencia (Patrón Secundario)**

La estabilidad de la solución patrón de tiosulfato se determinó estandarizando por triplicado durante cinco días dicha solución utilizando dicromato de potasio patrón primario, los recipientes contenedores fueron almacenados bajo diferentes condiciones; temperatura controlada y temperatura ambiente. Se determina el porcentaje recuperado de la solución durante los 5 días de análisis de manera que se garantice que esta se mantiene inalterada y bajo control estadístico.



Resultados



Estimación de incertidumbre en la determinación de porcentaje de yodo en muestras de yodopovidona.

Modelo Matemático

$$\%I_2 = \frac{V_2 * N * P_{eq}}{W_m * V_1} * 100$$

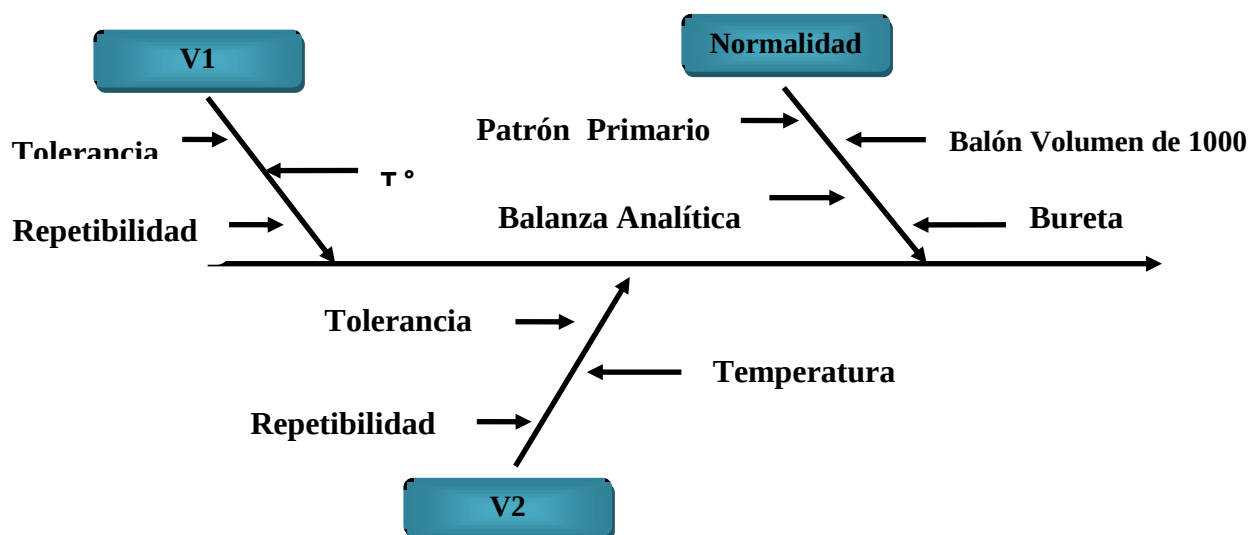


Diagrama de “Causa-Efecto” en los componentes de la incertidumbre

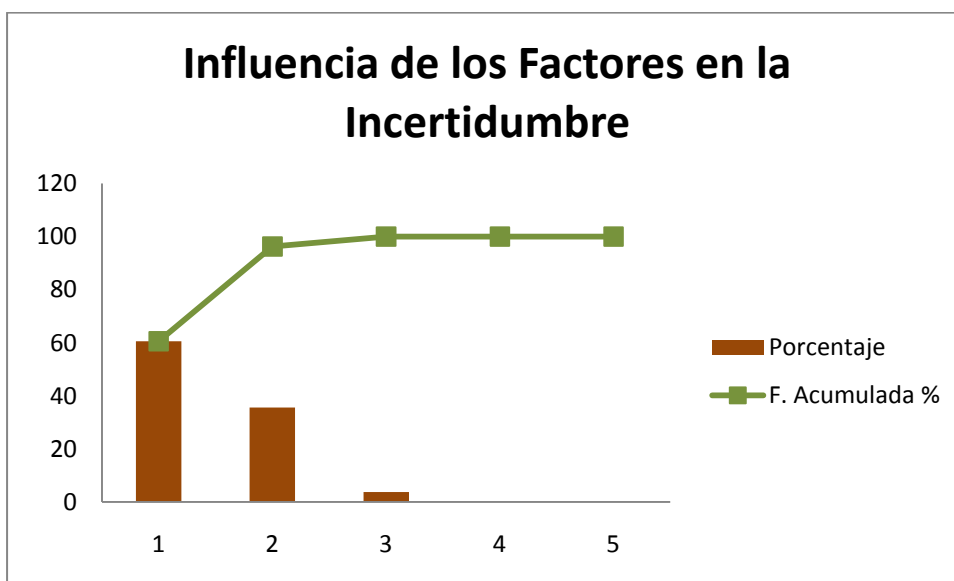
Tabla 5: Coeficientes de sensibilidad estimado para cada componente

Coeficientes de Sensibilidad	
Derivadas Parciales	Magnitud
$cV_2 = \frac{100NP_{eq}}{W_m V_1}$	4.999860000
$cN = \frac{100V_2 P_{eq}}{W_m V_1}$	6.345000000
$cP_{eq} = \frac{100V_2 N}{W_m V_1}$	1.970000000
$cW_m = \frac{100V_2 NP_{eq}}{W_m^2 V_1}$	-0.0249993000
$cV_1 = \frac{100V_2 NP_{eq}}{W_m V_1^2}$	-24.99930000



Tabla 6: Balance de la incertidumbre en la medición del porcentaje de yodo en muestras de yodopovidona en solución.

Parámetro	Valor (x_i)	u_{x_i}	C_{x_i}	$C_{x_i}u_{x_i}$	$(C_{x_i}u_{x_i})^2$	%	FA %
V2	0.04	0.072394326	4.99986	0.361961495	2.08294246	60.5757346	60.58
N	0.02	0.174408705	6.345	1.106623233	1.22461498	35.6140189	96.19
Peq	126.9	0.00000346	1.97	6.8162E-06	0.13101612	3.81018588	100.00
Wm	0.1	0.057731227	-0.0249993	-0.00144324	2.0829E-06	6.0576E-05	100.00
V1	0.01	0.057731227	-24.9993	-1.44324026	4.6461E-11	1.3512E-09	100.00
Suma					3.43857564	100	



Ecuación para calcular la incertidumbre combinada

$$Uc\%I = 100 \sqrt{\frac{N^2 Peq^2 uV_2^2}{W_m^2 V_1^2} + \frac{V_2^2 Peq^2 uN^2}{W_m^2 V_1^2} + \frac{V_2^2 N^2 uPeq^2}{W_m^2 V_1^2} + \frac{V_2^2 N^2 Peq^2 uW_m^2}{W_m^4 V_1^2} + \frac{V_2^2 N^2 Peq^2 uV_1^2}{W_m^2 V_1^4}}$$

$$Uc\%I = 1.854339679$$

$$U_{exp} = K * Uc\%I$$

$$U_{exp} = 2 * 1.854339679$$

$$U_{exp} = \pm 3.708679358\%$$

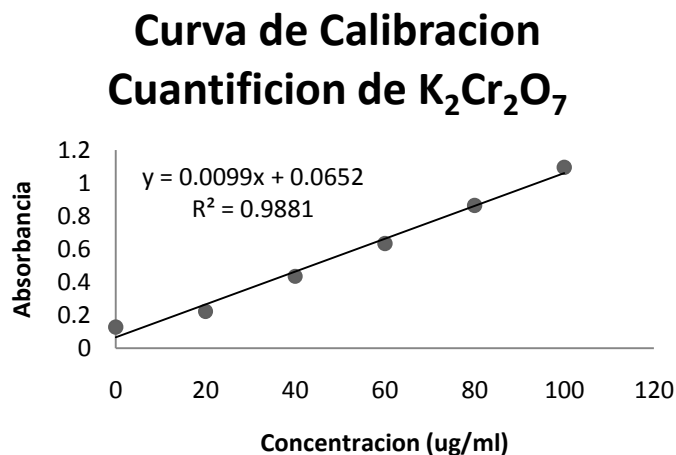
Pureza del Estándar de Dicromato (Patrón Primario)

Tabla 7: Cuantificación de solución estándar de Dicromato por espectrofotometría UV-Vis

Concentración Estándar de Dicromato [60 ug/ml] 350 nm														
Estándar de Dicromato												Estándar de Dicromato Seco		
[ug/ml]					% recuperado									
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Promedio	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4		Promedio		[ug/ml]	% recuperado
	58.79	59.27	59.97	59.4	59.36	97.98	98.78	99.95	99.00		98.93		61.41	102.35
	58.12	59.21	59.98	59.97	59.32	96.87	98.68	99.97	99.95		98.87		60.63	101.05
	58.78	59.28	60.42	59.76	59.56	97.97	98.80	100.70	99.60		99.27		60.89	101.48
	58.11	59.16	60.52	60.05	59.46	96.85	98.60	100.87	100.08		99.10		60.98	101.63
	58.08	58.98	60.69	59.59	59.34	96.80	98.30	101.15	99.32		98.89		60.71	101.18
	58.97	59.35	60.65	59.63	59.65	98.28	98.92	101.08	99.38		99.42		61.09	101.82
	59.41	59.25	60.96	59.49	59.78	99.02	98.75	101.60	99.15		99.63		60.79	101.32
	59.63	59.11	60.95	59.66	59.84	99.38	98.52	101.58	99.43		99.73		60.96	101.60
	59.68	60.79	60.65	59.42	60.14	99.47	101.32	101.08	99.03		100.23		60.99	101.65
	60.37	60.25	60.92	59.22	60.19	100.62	100.42	101.53	98.70		100.32		61.16	101.93
Desvest	0.7753	0.5795	0.3620	0.2571	0.3188	1.2922	0.9659	0.6033	0.4285	0.5313	Promedio	Desvest	0.23	0.38
Promedio	58.994	59.465	60.571	59.619	59.66225	98.32	99.11	100.95	99.37	99.44	99.44	Promedio	60.961	101.6016667
t student											3.97165E-07			

Tabla 8: Resultados de curva de calibración del estándar de $K_2Cr_2O_7$

	[ug/ml]	Absorbancia
	0	0.1266
Std 1	20	0.2225
Std 2	40	0.4349
Std 3	60	0.6327
Std 4	80	0.8644
Std 5	100	1.0946
R	0.999510686	

**Estabilidad de la solución de Tiosulfato**

No	Na ₂ S ₂ O ₃			Promedio	Rango
1	99.52	99.26	98.01	98.9300	0.9500000
2	99.75	99.27	98.8	99.2733	0.5100000
3	100.03	99.52	99.52	99.6900	1.5100000
4	100.53	100.28	100.28	100.3633	0.2500000
5	100.78	100.53	100.28	100.5300	0.5000000
Promedio				99.7573	0.7440
				S	0.6869
				A2	1.023
				LSC	100.5184453
				LC	99.75
				LIC	98.99622133

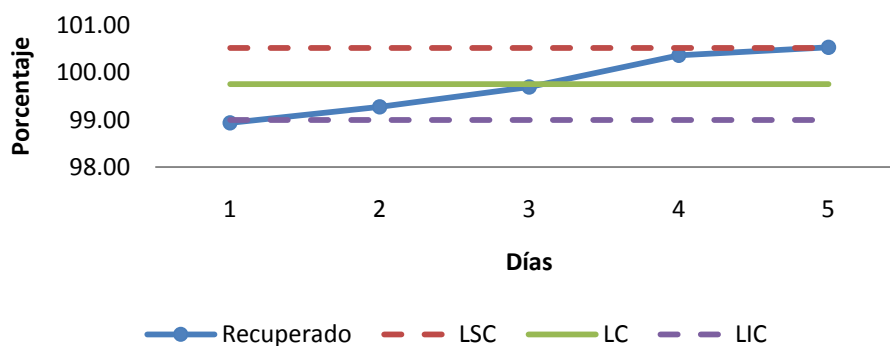
Estabilidad de la Solución de Tiosulfato**Exactitud**



Tabla 9. Resultados curva adición patrón de yodo

Soln Estándar de I ₂	
mg I ₂	Vol Na ₂ S ₂ O ₃
0	0
40	15.1
50	19.06
70	26.6
100	37.9
120	45.23
150	56.56
R	0.99998438
M	0.37587339
A	0.20618349
S _{y/x}	0.4180

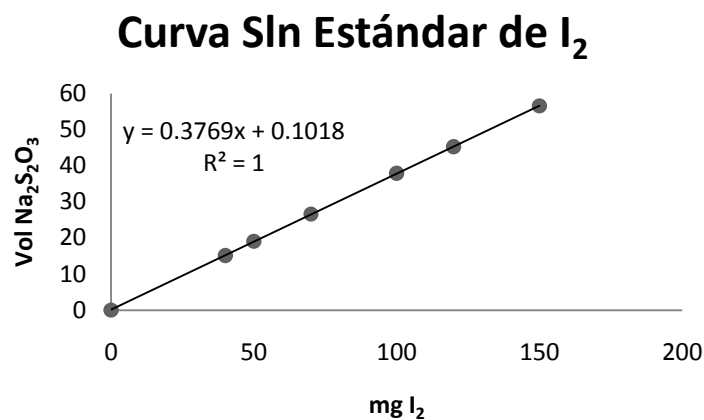


Tabla 10: Adición patrón para el cálculo de la exactitud

	Concentración Teórica			
	X	x + 40mg	x + 60mg	x + 80mg
Respuesta	14.5	29.5	37.1	44.5
	14.2	29.2	37.3	44.6
	14.2	29.7	37.4	44.5
Promedio	14.3	29.5	37.3	44.5
S	0.1732	0.2516	0.1527	0.0577
CV	1.2112	0.8540	0.4098	0.1296

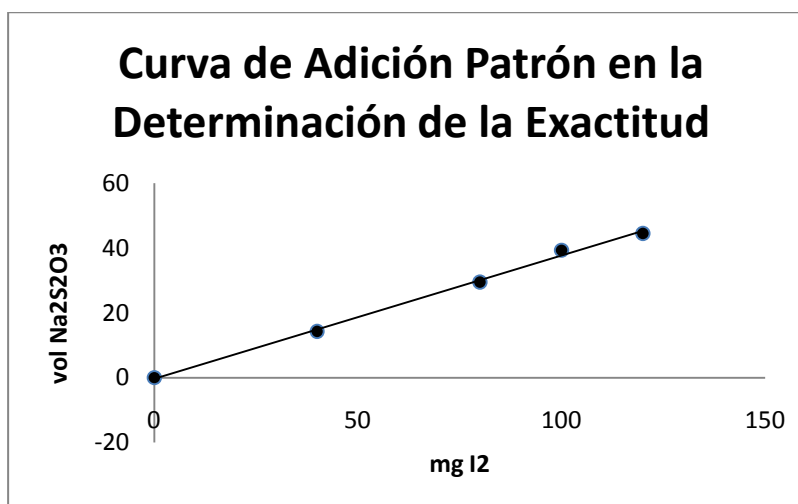


Tabla 11. Resultados adición patrón para el cálculo de la exactitud



Concentración Std	Respuesta Exp. Neta – Blanco	Interpolación	Recuperación (%)
40	29.5 - 14.3 = 15.2	15.0	101.3
60	37.3 - 14.3 = 23	22.6	101.8
80	44.5 - 14.3 = 30.2	29.6	102.0
Promedio			101.7
S			0.3507
CV			0.3448
t _{exp}			3.04

Precisión

Tabla 12: Análisis de repetibilidad instrumental

	Repetibilidad Instrumental	
	mg I ₂	% recuperado
	94.02	94.02
	94.02	94.02
	94.02	94.02
	93.51	93.51
	94.02	94.02
	93.51	93.51
	93.51	93.51
	93.51	93.51
	93.51	93.51
	92.73	92.73
Promedio	93.636	93.636
Desvst	0.40689065	0.406890649
CV	0.4345451	0.434545099

Tabla 13: Desarrollo de la repetibilidad de método

Repetibilidad del Método						
	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	(50 mg)		(100 mg)		(150 mg)	
No de Análisis	Volumen	C _{calculada}	Volumen	C _{calculada}	Volumen	C _{calculada}
1	17.6	45.6	35.3	91.4	52.7	136.4
2	17.4	45.0	34.9	90.3	52.2	135.1
3	17.3	44.8	35.1	90.9	53	137.2
Promedio		45.1		90.9		136.3
S		0.3954		0.5178		1.0462
C.V.		0.8762		0.5698		0.7679
I.C.		45.76 - 44.43		91.77 - 90.03		138.06 - 134.53

Tabla 14: Matriz de desarrollo de la precisión intermedia



Precisión Intermedia							
		Dia 1	Dia 2		Dia 1	Dia 2	
		ml de Na2S2O3			ml de Na2S2O3		
Analista 1	Bureta 25 ml	36	35.8	Bureta 50 ml	36	35.8	
		36.1	35.7		36.1	35.6	
		36.1	35.7		36.1	35.7	
		$\bar{x} = 36.1$	$\bar{x} = 35.7$		$\bar{x} = 36.1$	$\bar{x} = 35.7$	
		$s = 0.0577$	$s = 0.0577$		$s = 0.0577$	$s = 0.1$	
		$C.V. = 0.16$	$C.V. = 0.16$		$C.V. = 0.16$	$C.V. = 0.28$	
Analista 2		35.9	36		35.7	35.4	
		35.6	36.1		35.9	35.5	
		35.6	36.1		35.7	35.6	
		$\bar{x} = 36.7$	$\bar{x} = 36.1$		$\bar{x} = 35.8$	$\bar{x} = 35.5$	
		$s = 0.1732$	$s = 0.0577$		$s = 0.1154$	$s = 0.1$	
		$C.V. = 0.48$	$C.V. = 0.16$		$C.V. = 0.32$	$C.V. = 0.28$	
C.V. Precisión Intermedia = 0.61							

Linealidad

Tabla 15: Linealidad del sistema de cuantificación (5 curvas promedio)

		Vol. De Na ₂ S ₂ O ₃					
mg K ₂ Cr ₂ O ₇		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Promedio
0		0	0	0	0	0	0
20		19.9	20.3	19.2	19.9	20.3	19.9
30		29.73	29.9	29.6	29.4	29.6	29.6
40		39.6	39.1	40.1	39.7	40	39.7
50		49.2	49.2	50	49.6	49.4	49.5
60		59.1	59.6	58.3	59.8	59.3	59.2
70		69.5	69.1	69.1	69	69.7	69.3
Promedio	45	44.5	44.52	44.36	44.58	44.7	44.5
	R	0.99997	0.99990	0.99972	0.99995	0.99994	0.99999
	M	0.9877	0.9932	1.0061	0.9998	0.9985	0.9868
	A	0.0432	0.3341	-0.4424	0.2260	0.2036	0.1248

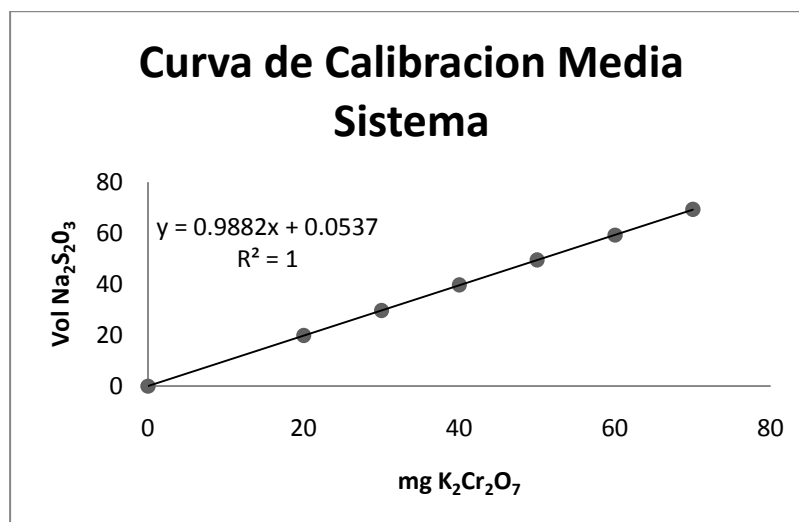
Tabla 16: Análisis de regresión lineal del sistema



Suma de Cuadrados									
	x^2	y^2	xy	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$\hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$	Residual	$f(y/x)$
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	400	396.01	158404	625	606.7	19.9	0.0015	0.0388	0.995
	900	878.29	790463.25	225	221.9	29.7	0.0087	-0.0934	0.9879
	1600	1574.98	2519965.75	25	23.5	39.6	0.0078	0.0884	0.9922
	2500	2448.67	6121665.64	25	24.5	49.5	0.0003	0.0182	0.9897
	3600	3506.06	12621819.4	225	215.5	59.3	0.0149	-0.1219	0.9869
	4900	4798.61	23513188.9	625	612.1	69.2	0.0049	0.0699	0.9896
Suma	13900	13602.6183	45725507	1750	1704.2	267.2	0.0381	3.5527E-15	5.9412
Promedio									0.9902
S									0.0030
CV									0.2997
Sx/y									0.0975
Sb									0.00233
Sa									0.1121
									t_{exp}
									I.C.
									423.52
									0.9891 - 0.9844
									0.3637 - (-0.1141)

Tabla 17: ANOVA para la validez del modelo de linealidad del sistema

	<i>G.L</i>	<i>S.C.</i>	<i>Promedio Cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico</i>
Regresión	1	1704.164129	1704.164129	178770.262	7.709
Residuos	4	0.038130819	0.009532705		
Total	5	1704.202259			



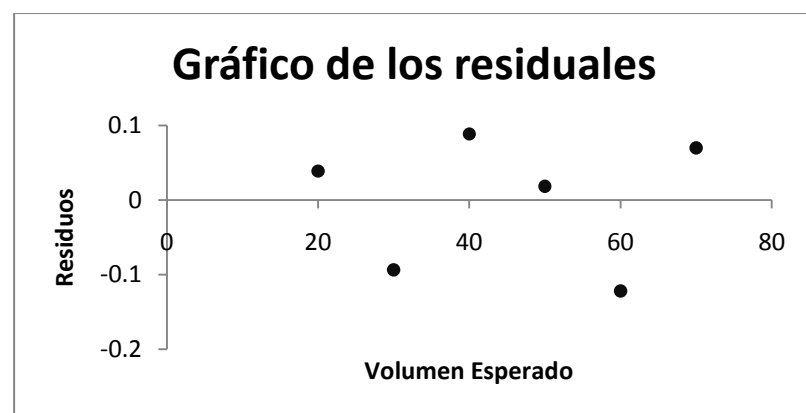
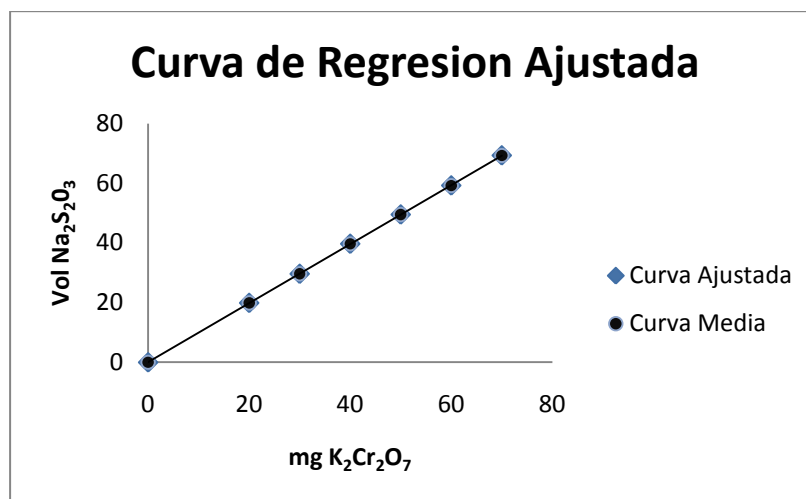


Tabla 18: Linealidad del Método (5 curvas promedio)

		Vol. De Na ₂ S ₂ O ₃					
	mg I ₂	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	promedio
	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
	50	18.0	18.3	18.4	17.8	18.1	18.11
	70	25.4	25.7	25.9	25.1	25.4	25.51
	100	35.7	36.4	36.8	36.4	36.5	36.38
	120	43.0	43.6	44.0	43.8	43.5	43.57
	150	54.4	54.6	55.6	53.9	53.9	54.46
	Promedio	98	35.3	35.7	36.1	35.4	35.5
	r	0.999923	0.999987	0.999953	0.999875	0.999941	0.999997
	m	0.3614	0.3615	0.3702	0.3633	0.3583	0.3630
	a	-0.1317	0.2821	-0.1582	-0.2057	0.3604	0.0293

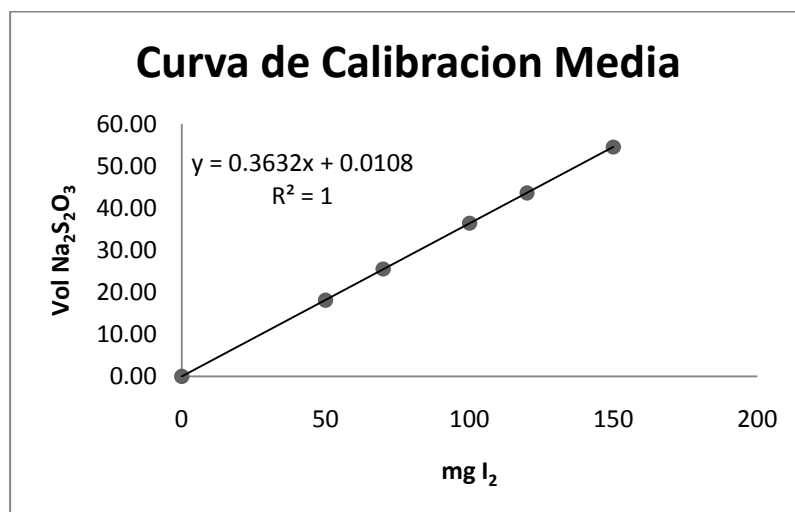
Tabla 19: Análisis de regresión lineal del método

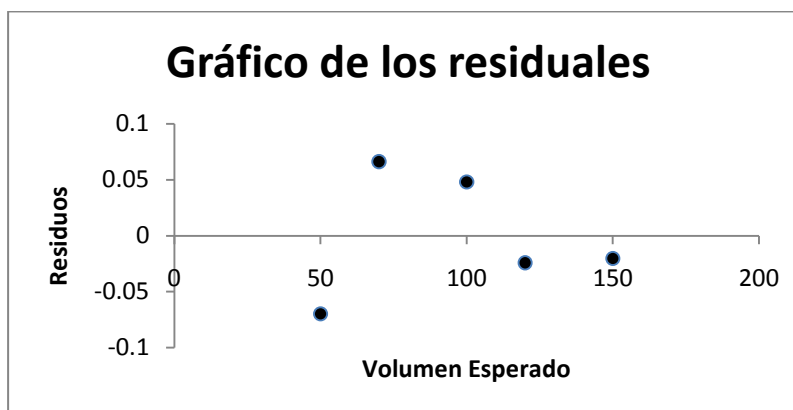
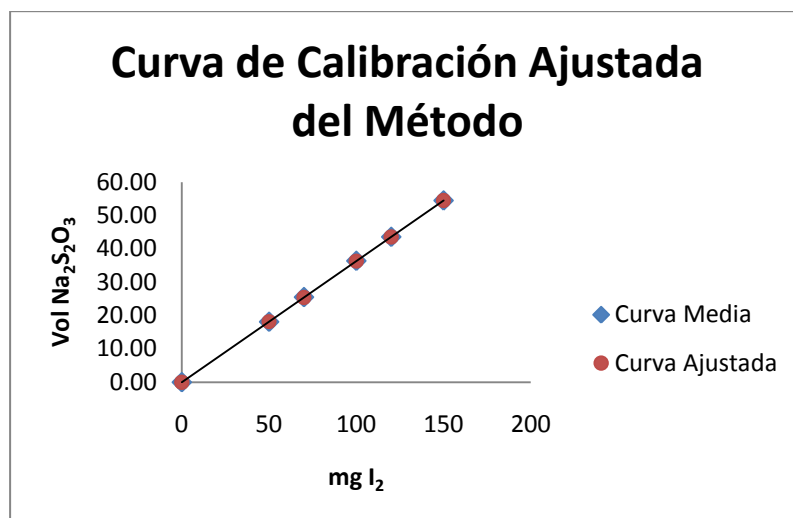


Suma de Cuadrados									
	x^2	y^2	xy	$(xi-\bar{x})^2$	$(yi-\bar{y})^2$	$\hat{y}$	$(yi-\hat{y})^2$	Residual	$f(y/x)$
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2500	328.0	905.5	2304	306.0	18.2	0.00485729	-0.07	0.3622
	4900	650.6	1785.42	784	102.0	25.4	0.00437957	0.07	0.3644
	10000	1323.4	3637.8	4	0.6	36.3	0.00230278	0.05	0.3638
	14400	1898.0	5227.92	484	63.4	43.6	0.00058275	-0.02	0.3631
	22500	2965.9	8169	2704	355.5	54.5	0.00041336	-0.02	0.3631
Suma	54300.0	7165.8	19725.6	6280.0	827.6	178.0	0.0	0.0	1.8
Promedio									0.3633
S									0.00082236
CV									0.2263622
Sx/y									0.0646
Sb									0.0008
Sa									0.085
									t_{exp}
									I.C.
									445.02
									0.3611-0.3648
									(-0.017)-
									0.2293

Tabla 20: ANOVA para la validez del modelo de linealidad del método

	G.L.	S.C.	Promedio C.	F	Valor Crítico
Regresión	1	827.53836	827.53836	198042.88	10.13
Residuos	3	0.01253575	0.00417858		
Total	4	827.550896			

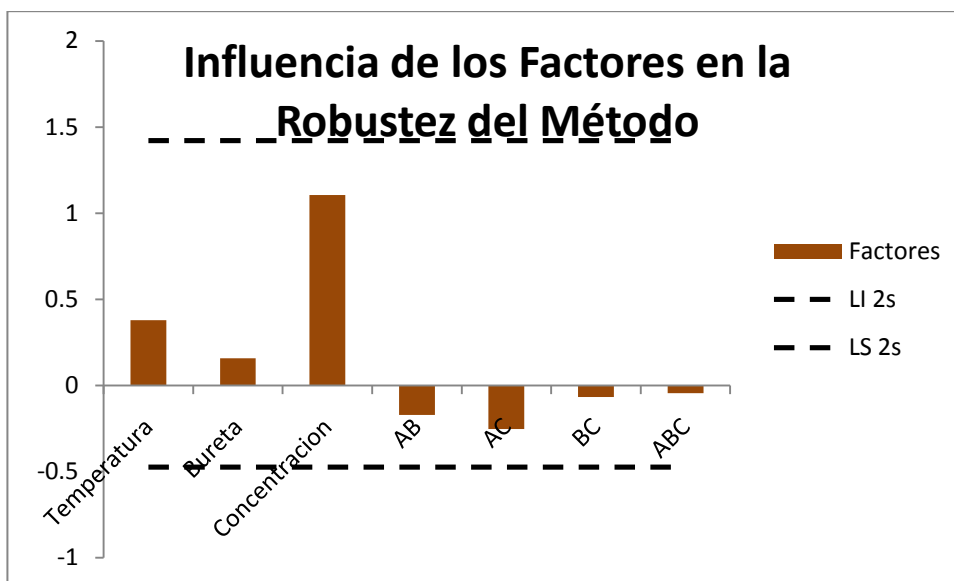




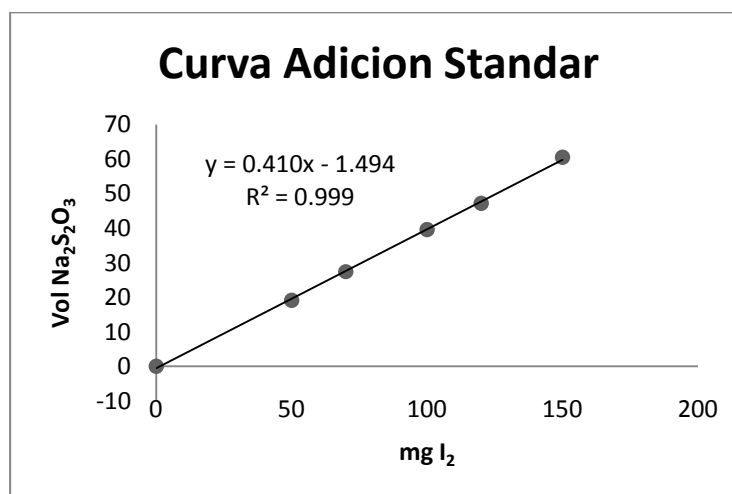
Robustez

Tabla 21: Resultados expresados en porcentaje de la matriz de diseño factorial para el estudio de robustez

	T°	bureta	[I]	AB	AC	BC	ABC
	99.05	99.79	98.8	99.42	98.93	99.30	99.21
	100.31	99.79	99.66	100.05	99.99	99.73	99.92
	98.79	99.3	100.2	99.045	99.50	99.75	99.43
	99.55	99.54	99.79	99.545	99.67	99.67	99.63
	99.04	99.29	100.52	99.165	99.78	99.91	99.62
	98.79	99.42	101.47	99.105	100.13	100.45	99.89
	99.54	100.53	100.44	100.035	99.99	100.49	100.17
	99.29	99.55	100.44	99.42	99.87	100.00	99.76
Influencia	0.38	0.1575	1.105	-0.17125	-0.25	-0.07	-0.04



Determinación de LD y LC



Parámetro	Valor
Desviación Estándar	0.4180
Pendiente	0.4107
LD (mg)	3.3586399
LC (mg)	10.1776967

}



INFORME FINAL DE ESTABILIDAD

Tipo de estudio: Estabilidad Acelerada ☒ Estabilidad a largo plazo ☐

Nombre del producto: Yodopovidona 10%	Forma Farmacéutica: Líquida	Presentación: Recipiente 3.78 L		
Numero de Lote en Estudio 01111000	Tamaño de Lote -----	Justificación del estudio: Registro Sanitario		
Propiedades Organolépticas	Especificaciones	TIEMPO DEL ESTUDIO Resultados		
		0 Meses	3 Meses	6 Meses
Aspecto	Líquido uniforme	Líquido U.	Líquido U.	Líquido U.
Color	Marrón	Marrón	Marrón	Marrón
Sabor	-----	-----	-----	-----
Olor	Característico	Característico	Característico	Característico
Propiedades Físico-Químicas	Especificaciones	TIEMPO DEL ESTUDIO Resultados		
		0 Meses	3 Meses	6 Meses
Cuantificación	85-120%	90.63%	85.86%	83.46%
Numero de Lote en Estudio 01051100	Tamaño de Lote -----	Justificación del estudio: Registro Sanitario		
Propiedades Organolépticas	Especificaciones	TIEMPO DEL ESTUDIO Resultados		
		0 Meses	3 Meses	6 Meses
Aspecto	Líquido uniforme	Líquido U.	Líquido U.	Líquido U.
Color	Marrón	Marrón	Marrón	Marrón
Sabor	-----	-----	-----	-----
Olor	Característico	Característico	Característico	Característico
Propiedades Físico-Químicas	Especificaciones	TIEMPO DEL ESTUDIO Resultados		
		0 Meses	3 Meses	6 Meses
Cuantificación	85-120%	97.2%	92.82%	88.35%
Numero de Lote en Estudio 01121100	Tamaño de Lote -----	Justificación del estudio: Registro Sanitario		
Propiedades Organolépticas	Especificaciones	TIEMPO DEL ESTUDIO Resultados		
		0 Meses	3 Meses	6 Meses
Aspecto	Líquido uniforme	Líquido U.	Líquido U.	Líquido U.
Color	Marrón	Marrón	Marrón	Marrón
Sabor	-----	-----	-----	-----
Olor	Característico	Característico	Característico	Característico
Propiedades Físico-Químicas	Especificaciones	TIEMPO DEL ESTUDIO Resultados		
		0 Meses	3 Meses	6 Meses
Cuantificación	85-120%	107.13%	98.94%	93.45%



ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se estimaron las incertidumbres relacionada a cada uno de los componentes que intervienen en el cálculo del mesurado reflejadas en el diagrama de “Causa y Efecto” los cuales son: la alícuota tomada con la pipeta volumétrica, la normalidad de la solución estándar de Tiosulfato y el volumen gastado con la bureta durante la titulación. Se aplicó la ley de propagación de incertidumbre para determinar la incertidumbre combinada y posteriormente utilizar esta en el cálculo la incertidumbre expandida considerando un factor de cobertura de 2 (95% de confianza), obteniéndose un resultado de $\pm 3.7\%$. En el diagrama de Pareto se muestra la contribución de cada uno de estos componentes a la incertidumbre global de las mediciones.

Se determinó la pureza del estándar de Dicromato de Potasio mediante espectrofotometría UV-Vis a una concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$ a una longitud de onda de 350 nm y analizando la muestra 10 veces consecutivamente durante un período de 4 días. Se realizó el mismo procedimiento descrito para una solución preparada con estándar secado durante cuatro hrs en un horno a 120 $^{\circ}\text{C}$, contrastando ambos resultados seco y no seco mediante una prueba de t student de una cola no difiriendo estadísticamente ambos resultados por lo tanto se obtienen resultados equivalentes ya que este no supera el valor crítico 1.8331 para n-1 grados de libertad encontrándose un alto grado de pureza de 99.44%. Se realizó una curva de calibración a 5 niveles de concentración 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/ml}$ se determinó el análisis de la regresión demostrando un carácter lineal “r” 0.9995 en el intervalo estudiado. Se realizó el análisis durante 5 días de la solución de Tiosulfato estandarizándola por triplicado utilizando dicromato de potasio patrón primario y registrando el porcentaje de patrón primario recuperado. Se creó un gráfico de control con los datos de porcentaje recuperado registrados encontrándose la solución bajo condiciones estables en el periodo de 5 días establecidos, no realizándose un estudio más largo debido a que estas soluciones preparadas eran consumidas en un lapso no mayor del estudiado por lo cual se garantiza su estabilidad en período establecido.

El cálculo de la recuperación media de analito en la determinación de la exactitud es 101.7% lo cual demuestra que el porcentaje recuperado se encuentra dentro del intervalo establecido de 98%-102% al restar la señal del blanco a la respuesta neta obtenida del



ensayo. De igual manera el coeficiente de variación de la medida se encuentra por debajo 2% evidenciando que no existe gran variabilidad en los resultados obtenidos. El análisis de *t* student evidencia que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el valor aceptado como verdadero del 100% ya que el valor encontrado de 3.04 no supera el valor crítico de 4.303.

Los coeficientes de variación de la repetibilidad del sistema instrumental, repetibilidad de método y precisión intermedia de las respuestas globales obtenidas para cada parámetro, se encuentran significativamente por debajo del criterio de aceptación establecido, por lo que no existe una dispersión apreciable de los resultados siendo el método analítico descrito preciso.

El análisis de regresión lineal del sistema como del método supone aumento proporcional en la respuesta del método al aumentar la concentración del analito dato corroborado por el coeficiente de correlación mayor a 0.999, el CV de los factores respuesta se encuentra muy por debajo del criterio de aceptación establecido lo que indica poca variación de las respuestas obtenidas y valores del coeficiente de determinación que sobrepasan el criterio de 0.998 lo que justifica la validez del modelo. La prueba de significación estadística para la pendiente como para el intercepto cumplen el valor crítico establecido para $n-2$ grados de libertad no difiriendo la pendiente estadísticamente de 1 que demuestra la proporcionalidad del sistema y el intercepto de 0 lo que indica que no presenta sesgo. El análisis de varianza del factor *F* es mucho mayor que el valor crítico por lo tanto se demuestra una linealidad altamente satisfactoria.

Los tres parámetros evaluados en el ensayo de robustez no demostraron tener influencia significativa aplicando la matriz de diseño factorial, para cada parámetro individual y sus interacciones entre si debido a que no superan los límites inferior y superior a 2 desviaciones estándar, por lo cual se demuestra que el método es robusto dentro de estos parámetros.

La mínima cantidad de analito que puede ser detectada y cuantificada mediante el método descrito corresponde a 3.35 y 10.17 mg respectivamente.



Se aplicó la metodología validada a muestras de yodopovidona 10% (equivalente 1% I₂) a los lotes correspondientes detallados con anterioridad, demostrando que las muestras analizadas cumplen en su mayoría con el rango de porcentaje contenido de principio activo especificado en la farmacopea (85-120%) en un tiempo de 0, 3 y 6 meses a una temperatura de 40 ± 2 °C por lo tanto se consideran aptas para su distribución.



CONCLUSIÓN

Se estableció y validó la metodología analítica planteada para la cuantificación de yodo en muestras de yodopovidona 10% equivalente 1% de yodo, la cual demostró que cumple los parámetros descritos en los libros normalizados que hacen referencia a métodos analíticos. El método respondió satisfactoriamente a cada uno de los ensayos realizados, con lo cual se tiene la certeza que los resultados obtenidos son confiables dentro de las condiciones de trabajo descritas en este documento y su utilización como método de rutina en el laboratorio se encuentra justificada y documentada.

Los resultados de los parámetros de validación resultaron altamente satisfactorios, la exactitud del método se encuentra dentro de los límites establecidos para el porcentaje de recobro (98-102%) el cual tiene un valor medio de 101.7% y se comprobó mediante un contraste de significación estadístico que el resultado no difiere significativamente de 100%. El estudio de la precisión indica que los resultados obtenidos son precisos tanto para la repetibilidad como para la precisión intermedia ya que los C.V. no superan el 2% y 11.62% respectivamente.

La metodología resulta ser lineal dentro del intervalo de concentraciones establecido, debido a que el valor obtenido de coeficiente de correlación es de 0.9999, el C.V. de los factores respuesta no supera el 2%, y se corroboró que la pendiente difiere significativamente de 0 mediante un contraste de significación, así como también se comprueba la validez del modelo lineal a través de un análisis de varianza.

Se determinó la mínima cantidad detectada y cuantificada de analito en la muestra encontrándose ambos alejados del intervalo de trabajo establecido.

Dentro de las condiciones establecidas los componentes ensayados en el estudio de robustez no sobrepasan el criterio de 2 desviaciones estándar, razón por la cual, se deduce que la alteración de estos factores no afectan significativamente en los resultados obtenidos por el método siendo este robusto.

Se aplicó la metodología a un estudio de estabilidad acelerado reportando datos confiables que garantizan la calidad de las muestras analizadas con este método.



RECOMENDACIONES

1. Tomar precauciones, durante el proceso de pesada del yodo resublimado para evitar pérdidas por volatilización que disminuyan la concentración de la solución patrón, así como asegurar los recipientes que contienen las muestras desde su preparación hasta la titulación de la misma para evitar el problema antes mencionado.
2. Tener presente la rápida degradación de las soluciones patrones de yodo, ya que consumen una mayor cantidad de titulante y producen datos erróneos, por lo cual se recomienda titular al menos una vez al día la solución patrón para garantizar que esta se encuentra dentro de un rango de concentración aceptable.
3. Añadir la alícuota del indicador de almidón al menos 2ml antes de alcanzar el volumen teórico calculado para el punto final en las titulaciones que involucran la utilización de patrón primario de $K_2Cr_2O_7$ y de 4-5ml antes del volumen teórico calculado para la titulación de muestra de yodopovidona.
4. Titular las muestras preparadas con patrón primario de $K_2Cr_2O_7$ a una velocidad aproximada de una gota por segundo, debido a que una rápida titulación produce un viraje prematuro del indicador retornando a su color original una vez que la solución se deja en reposo. Las muestras de yodopovidona se deben titular a una velocidad aproximada de dos gotas por segundo, disminuyendo la velocidad una vez que se ha añadido el indicador.



Bibliografía

1. Ramis Ramos, G., & Alvarez - Coque, M. C. (2001). Quimiometría. Madrid;España: Síntesis.
2. Compañó, R., & Ríos, A. Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos. Madrid;España: síntesis S.A.
3. Oleksiuk Hernández, A. D. (2006). Validación de la metodología analítica por HPLC para la cuantificación de losartán potásico en comprimidos recubiertos. Facultad de ciencias Químicas y Farmacéuticas. Chile: Med Cell.
4. Delgado, G. (2009). Validación y Verificación de métodos de ensayo. Un dilema en los laboratorios de ensayos y en las auditorías de la acreditación. León,Nicaragua: Universitaria.
5. The United States Pharmacopeia XXX. (2007). Estados Unidos de América.
6. Parajón, E., Parajón, C., & Peralta, J. (2010). Validación de la Metodología Analítica en la Cuantificación de un Para-aminofenol (ACETOMINOFEN); en solución oral por cromatografía de alta resolución (CLAR o HPLC). León,Nicaragua: (LCCM) Unan-león.
7. Aguirre, O. L., & “et al”. (2001). Validación de Métodos Analíticos . Barcelona;España.
8. Miller, J. N., & Miller, J. N. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica (4 ed.). Madrid;España: Pearson Educación.
9. Skoog, Holler, & Crouch. (2005). Fundamentos de Química Analítica (8va ed.). México: Internacional Thomson Editores S.A.
10. (2011). Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 11.01.04.:09 Productos Farmacéuticos. Estudio de Estabilidad de Medicamentos para Uso Humano.
11. Marchante Castellanos, P., & et-al. Análisis Químico Farmacéutico Métodos Clásicos Cuantitativos. Habana,Cuba: Universidad de la Habana.
12. Ayres, G. H. (1970). Análisis Químico Cuantitativo (2da ed.). Madrid,España: Ediciones del Castillo.
13. Flores, J., Armijo, J. A., & Mediavilla, Á. (2005). Farmacología Humana (4ta ed.). Barcelona,España: Masson S.A.
14. Harris, D. C. (2007). Análisis Químico Cuantitativo (6ta ed.). Barcelona,España: Reverté S.A.



15. Meier, P. C., & Zund, R. E. *Statistical Methods in Analytical Chemistry* (Vol. 123). E.E.U.U: John Wiley and Sons, Inc.
16. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. España: McGraw-Hill/interamericana de España.



ANEXOS

**Tabla A.3.** Valores críticos de F para un contraste de una cola ($P = 0.05$).

v_2	v_1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124

v_1 = número de grados de libertad del numerador y v_2 = número de grados de libertad del denominador.

**Tabla A.4.** Valores críticos de F para un contraste de dos colas ($P = 0.05$).

v_2	v_1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1	948.2	956.7	963.3	968.6	976.7	984.9	993.1
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39	39.40	39.41	39.43	39.45
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47	14.42	14.34	14.25	14.17
4	12.22	10.65	9.979	9.605	9.364	9.197	9.074	8.980	8.905	8.844	8.751	8.657	8.560
5	10.01	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978	6.853	6.757	6.681	6.619	6.525	6.428	6.329
6	8.813	7.260	6.599	6.227	5.988	5.820	5.695	5.600	5.523	5.461	5.366	5.269	5.168
7	8.073	6.542	5.890	5.523	5.285	5.119	4.995	4.899	4.823	4.761	4.666	4.568	4.467
8	7.571	6.059	5.416	5.053	4.817	4.652	4.529	4.433	4.357	4.295	4.200	4.101	3.999
9	7.209	5.715	5.078	4.718	4.484	4.320	4.197	4.102	4.026	3.964	3.868	3.769	3.667
10	6.937	5.456	4.826	4.468	4.236	4.072	3.950	3.855	3.779	3.717	3.621	3.522	3.419
11	6.724	5.256	4.630	4.275	4.044	3.881	3.759	3.664	3.588	3.526	3.430	3.330	3.226
12	6.554	5.096	4.474	4.121	3.891	3.728	3.607	3.512	3.436	3.374	3.277	3.177	3.073
13	6.414	4.965	4.347	3.996	3.767	3.604	3.483	3.388	3.312	3.250	3.153	3.053	2.948
14	6.298	4.857	4.242	3.892	3.663	3.501	3.380	3.285	3.209	3.147	3.050	2.949	2.844
15	6.200	4.765	4.153	3.804	3.576	3.415	3.293	3.199	3.123	3.060	2.963	2.862	2.756
16	6.115	4.687	4.077	3.729	3.502	3.341	3.219	3.125	3.049	2.986	2.889	2.788	2.681
17	6.042	4.619	4.011	3.665	3.438	3.277	3.156	3.061	2.985	2.922	2.825	2.723	2.616
18	5.978	4.560	3.954	3.608	3.382	3.221	3.100	3.005	2.929	2.866	2.769	2.667	2.559
19	5.922	4.508	3.903	3.559	3.333	3.172	3.051	2.956	2.880	2.817	2.720	2.617	2.509
20	5.871	4.461	3.859	3.515	3.289	3.128	3.007	2.913	2.837	2.774	2.676	2.573	2.464

v_1 = número de grados de libertad del numerador y v_2 = número de grados de libertad del denominador.



Tabla t-student dos colas

Área de dos colas							
gl	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.001	0.0001
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619	6366,198
2	1,886	2,920	4,303	6,695	9,925	31,598	99,992
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924	28,000
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610	15,544
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869	11,178
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959	9,082
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408	7,885
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041	7,120
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781	6,594
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587	6,211
11	1,363	1,363	1,796	2,718	3,106	4,437	5,921
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318	5,694
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221	5,513
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140	5,363
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073	5,239
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015	5,134
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965	5,044
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922	4,966
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883	4,897
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850	4,837
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819	4,784
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792	4,736
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767	4,693
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745	4,654
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725	4,619
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707	4,587
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690	4,558
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674	4,530
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659	4,506
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646	4,482
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551	4,321
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460	4,169
100	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	3,390	4,053
140	1,288	1,656	1,977	2,353	2,611	3,361	4,006
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291	3,891