

**Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua
UNAN-León**

**FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE
PARA LA DETERMINACIÓN DE KETOCONAZOL EN TABLETAS.**

PRESENTADA POR:

❖ **Bra. Krysthel Jelian Salgado Fargas**

Tutor:

MSc. Manuel Antonio Vanegas Carvajal.

León, 17 de octubre de 2022

“A la libertad por la Universidad”

Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua
UNAN-León

FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE
PARA LA DETERMINACIÓN DE KETOCONAZOL EN TABLETAS**

PRESENTADA POR:

❖ **Bra. Krysthel Jelian Salgado Fargas**

Tutor:

MSc. Manuel Antonio Vanegas Carvajal.

Fdo. Manuel Antonio Vanegas Carvajal.

Fdo. Krysthel Salgado Fargas.

León, 17 de octubre de 2022

“A la libertad por la Universidad”

Agradecimiento

A Dios Todopoderoso por permitirme llegar a esta etapa, por la bondad de otórgame fortaleza, sabiduría y capacidad para culminar mi trabajo monográfico, ya que sin Él no hubiese sido posible.

A mis padres Jessica María Fargas y Donald Cristian Salgado Reyes por su apoyo incondicional y confianza a lo largo de la carrera.

A mis abuelos Cruz Donald Salgado Arauz, María Elena Reyes de Salgado y Auxiliadora Leiva por su apoyo incondicional y confianza a lo largo de la carrera.

A mi prima Janna Marcela Salgado por su apoyo y confianza.

A mis amigas Maité Mondragón y Roxana Ruiz Altaminano por su compañía y confianza durante todo mi periodo de estudio.

Mi agradecimiento y admiración al maestro MSc. Manuel Vanegas, por las enseñanzas a lo largo de la carrera, por su tiempo y seguridad durante todo el proceso, quien, con su dirección, permitió el desarrollo de este trabajo.

Mi agradecimiento y admiración a los maestros MSc. Fabio Palaviccini, MSc. Vernon Sandoval y MSc Jairo Salazar, por sus enseñanzas durante mi periodo de estudio.

Dedicatoria

El presente trabajo está dedicado primeramente a Dios Todopoderoso, siendo luz en mi camino para guiarme con su amor y bondad infinita, otorgándome sabiduría, entendimiento, fortaleza y capacidad para cumplir con todos mis anhelos.

A mi madre Jessica María Fargas, mi admiración, respeto y amor por siempre, mi mejor amiga siendo luz en mi camino para guiarme con su amor infinito, apoyo incondicional y confianza, Dios te bendiga y cuide siempre.

A mi padre, Donald Cristian Salgado, mi admiración, respeto y amor por siempre, Dios te bendiga y cuide siempre.

Resumen

En el presente trabajo se llevó a cabo el desarrollo de un método para la determinación de Ketoconazol en tabletas por espectrofotometría UV-VIS. Primeramente, se realizó la selección del disolvente adecuado para la determinación del principio activo, los disolventes probados fueron, HCl y H₂SO₄, a diferentes concentraciones, encontrándose que el disolvente más adecuado para nuestro propósito es el H₂SO₄ 0.05 M. Seguidamente, se evaluó el tiempo de reposo, observándose que las mediciones deben ser realizadas inmediatamente después de preparadas las disoluciones. Posteriormente, se evaluaron los parámetros de desempeño: Linealidad ($r^2=0.9996$ en el intervalo de 20 μgml^{-1} a 400 μgml^{-1}), Exactitud (%R = 105%), Precisión evaluada a tres niveles de concentración en términos de CV% (Nivel bajo de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$: 0.86% un nivel medio de 150 μgml^{-1} : 0.35% y nivel alto 250 μgml^{-1} : 1.90%, Límite de detección (2.96 μgml^{-1}), Límite de cuantificación (9 μgml^{-1}) y Rango de trabajo (9 μgml^{-1} a 400 μgml^{-1}).

Finalmente, se aplicó el método desarrollado para la evaluación de las tabletas conteniendo Ketoconazol, encontrándose que las tabletas cumplen con las indicaciones de la USP30/NF25.

Contenido

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
3. Planteamiento del problema	4
4. Justificación	5
5. Objetivo General.....	6
5.1. Objetivos específicos	6
6. Marco teórico.....	7
6.1. Ketoconazol.....	7
6.2. Usos del Ketoconazol	7
6.3. Presentación comercial de Ketoconazol.....	8
6.4. Valor recomendado por la USP.....	8
6.5. Reacciones adversas del uso de Ketoconazol	8
6.6. Contraindicaciones del uso de Ketoconazol	9
6.7. Métodos de análisis para el Ketoconazol	9
6.7.1. Valoración potenciométrica.....	9
6.7.2. Identificación de Ketoconazol en tabletas por TLC.....	10
6.7.3. Valoración por cromatografía líquida (HPLC)	10
6.7.4. Determinación de Ketoconazol por Espectrofotometría UV-Visible	12
6.8. Espectrofotometría UV-visible	13
6.8.1. Fundamento de espectrofotometría.....	14
6.8.2. Ley de Beer	14
6.8.3. Componentes del espectrofotómetro	15
6.9. Espectrofotometría derivada.....	16
6.9.1. Fundamento de espectrofotometría derivada	16
6.9.2. Ventajas de espectrofotometría derivada	16
6.9.3. Desventaja de espectrofotometría derivada.....	17
6.10. Validación de métodos analíticos.....	17
6.10.1. Parámetros de Validación de un Método.....	18
7. Diseño Metodológico.....	21
7.1. Reactivos	21
7.2. Equipos	21

7.3.	Materiales	22
7.4.	Preparación de soluciones.....	22
7.4.1.	Solución madre de Ketoconazol 1000 µgml ⁻¹	23
7.5.	Diseño experimental para determinar el disolvente y concentración adecuada para la cuantificación de Ketoconazol.....	23
7.5.1.	Prueba del HCl como disolvente en diferentes concentraciones.....	23
7.5.2.	Prueba del H ₂ SO ₄ como disolvente en diferentes concentraciones.....	24
7.5.3.	Prueba del tiempo adecuado para la cuantificación de Ketoconazol utilizando como disolvente el H ₂ SO ₄ 0.05M.....	25
7.6.	Diseño experimental para evaluar el grado de aptitud por medio de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite cuantificación y rango de medición	26
7.6.1.	Diseño experimental para evaluar la linealidad	26
7.6.2.	Diseño experimental para evaluar la precisión	27
7.6.3.	Diseño experimental para evaluar la exactitud.....	28
7.6.4.	Diseño experimental para evaluar el límite de detección y límite de cuantificación.....	29
7.6.5.	Diseño experimental para la evaluación del contenido del principio activo en tableta de Ketoconazol	30
8.	Resultado y discusión	32
8.1.	Determinación del disolvente y concentración adecuada para la cuantificación del principio activo de Ketoconazol	32
8.1.1.	Disolvente: HCl	32
8.1.2.	Disolvente: H ₂ SO ₄	34
8.1.3.	Determinación del tiempo adecuado para la cuantificación del principio activo de Ketoconazol, utilizando como disolvente el H ₂ SO ₄ 0.05M.....	35
8.2.	Evaluación del grado de aptitud por medio de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y rango de medición	37
8.2.1.	Evaluación de la linealidad.....	37
8.2.2.	Evaluación de la precisión	43
8.2.3.	Evaluación de la exactitud	45
8.2.4.	Límite de Detección.....	48
8.2.5.	Límite de Cuantificación	49
8.2.6.	Evaluación del rango de trabajo.....	50
8.3.	Comprobación del cumplimiento de contenido del principio activo en tabletas de Ketoconazol con respecto las indicaciones de la USP30/NF25	51
9.	Conclusión	55

10.	Recomendaciones.....	56
11.	Bibliografía.....	57
12.	Anexos	60

Índice de tabla

Tabla 1.	Presentación de Ketoconazol	8
Tabla 2.	Reactivos.....	21
Tabla 3.	Diseño experimental de las diferentes concentraciones de HCl.....	22
Tabla 4.	Diseño experimental de las diferentes concentraciones de H ₂ SO ₄	23
Tabla 5.	Diseño experimental para el estudio del comportamiento del principio activo en las diferentes concentraciones del disolvente HCl.....	24
Tabla 6.	Diseño experimental para el estudio del principio activo en las diferentes concentraciones del disolvente H ₂ SO ₄	25
Tabla 7.	Diseño experimental para el estudio de diferentes tiempos	26
Tabla 8.	Preparación de la curva de calibración normal para evaluar la Linealidad	27
Tabla 9.	Diseño experimental para evaluar la Precisión.....	28
Tabla 10.	Diseño experimental para la Exactitud (muestra de recuperación sin fortificar)	28
Tabla 11.	Diseño experimental para la Exactitud (muestra de recuperación fortificada)....	29
Tabla 12.	Diseño experimental del Límite de Detección y Límite Cuantificación.....	30
Tabla 13.	Diseño experimental para la valoración del principio activo en la tabletas #1 de Ketoconazol.....	31
Tabla 14.	Diseño experimental para la valoración del principio activo en tabletas #2 de Ketoconazol	31
Tabla 15.	Curva de calibración normal de 20 µgml ⁻¹ a 400 µgml ⁻¹	38
Tabla 16.	Parámetro de regresión lineal.....	39
Tabla 17.	Test de Hipótesis para la Correlación.....	40
Tabla 18.	Verificación de la pendiente	41
Tabla 19.	Test de verificación del intercepto.....	42
Tabla 20.	Repetibilidad obtenida del Nivel bajo 50 µgml ⁻¹	44
Tabla 21.	Repetibilidad obtenida del nivel medio 150 µgml ⁻¹	44
Tabla 22.	Repetibilidad obtenida del nivel alto 250 µgml ⁻¹	45
Tabla 23.	Resultados de los porcentajes de recuperación para el Ketoconazol 150 µg ml ⁻¹	47
Tabla 24.	Curva de calibración normal diluida de 5 µgml ⁻¹ a 20 µgml ⁻¹	48
Tabla 25.	Parámetros de regresión lineal.....	48
Tabla 26.	Límite de detección.....	49
Tabla 27.	Límite de Cuantificación	50
Tabla 28.	Tabla del Rango de trabajo.....	50
Tabla 29.	Resultados obtenidos para la evaluación de la tableta #1 de Ketoconazol	53
Tabla 30.	Resultado obtenido para la evaluación de la tableta #2 de Ketoconazol	54

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del Ketoconazol (Rane & Padmaja, 2012).	7
Figura 2. Componentes del Espectrofotómetro (Diaz et al., 2004).	15
Figura 3. Gráfica de las diferentes concentraciones en molaridad del HCl de 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25.	33
Figura 4. Espectro de absorción de Ketoconazol a concentraciones en molaridad del HCl de 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, y 0.25.	33
Figura 5. Gráfica de las diferentes concentraciones en molaridad del H ₂ SO ₄ de 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25.	34
Figura 6. Espectros de absorción de Ketoconazol a concentraciones en molaridad de H ₂ SO ₄ 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25.	35
Figura 7. Gráfica de H ₂ SO ₄ 0.05 M a diferente tiempo en minuto 0, 5, 10, y 15.	36
Figura 8. Espectros de absorción de Ketoconazol a diferentes tiempos 0, 5, 10, y 15 minutos.	36
Figura 9. Espectros de la primera derivada de Ketoconazol a concentraciones de 20 µg ml ⁻¹ a 400 µg ml ⁻¹	37
Figura 10. Curva de calibración normal de Ketoconazol de 20 µg ml ⁻¹ a 400 µg ml ⁻¹	39
Figura 11. Precisión de Ketoconazol. Niveles de concentración 50 µg ml ⁻¹ , 150 µg ml ⁻¹ y 250 µg ml ⁻¹	43
Figura 12. Gráfico de recuperación sin fortificar de Ketoconazol.	46
Figura 13. Gráfico de recuperación fortificada de Ketoconazol.	46
Figura 14. Procedimiento para la determinación de Ketoconazol.	51
Figura 15. Gráfica del espectro de orden cero	62
Figura 16. Gráfica del espectro de la primera derivada.	62



1. Introducción

El Ketoconazol es un agente antifúngico eficazmente utilizado para el tratamiento o prevención de infecciones por hongos (Naveed & Jaweed, 2014; Shrivastava et al., 2020). Las infecciones por hongos superficiales y sistémicas, se han convertido en un problema de salud pública (Shrivastava et al., 2020).

La preferencia para la determinación de Ketoconazol es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Sin embargo, estos implican la utilización de equipos costosos y consumen mucho tiempo (El-Ragehy & El-Saharty, 2001; Farhadi & Maleki, 2001; Safwan M Fraihat, 2014), debido a los pasos previos de tratamiento de la muestra, como la filtración y extracción (Popovska et al., 2013).

La monitorización de los fármacos es importante para evitar toxicidad e intoxicación, en el caso de las tabletas de Ketoconazol ($C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$), se debe verificar que contengan entre 90% y 110% de la dosis expresada (USP30/ NF25, 2007).

La aplicación de la espectrofotometría derivada es una herramienta para el análisis de mezclas de multicomponentes, ofrece una gran selectividad en comparación con la espectrofotometría normal ya que disminuye la superposición espectral y permite una mejor resolución (Mabrouk et al., 2015)

El presente estudio se llevó a cabo con el propósito de desarrollar un método exacto y preciso utilizando la espectrofotometría derivada para el análisis de Ketoconazol en tabletas.



2. Antecedentes

El-Ragehy & El-Saharty (2001), estudiaron la reacción quelante del Ketoconazol con diferentes metales, la cuantificación de los complejos de Ketoconazol-Cobre (II) y de Ketoconazol-Cobalto (II), se llevó a cabo por espectrofotometría UV-Visible. El Ketoconazol reacciona cuantitativamente con cobre (II) y cobalto (II) en diclorometano para formar complejos estables de color azul. La medición espectrofotométrica, se realizó a longitudes de ondas de máximas absorción a 720 nm y 612.5 nm en el caso de Cu (II) y Co (II), respectivamente. Los métodos obedecieron la ley de Beer en el rango de 2 mg/ml a 13 mg/ml y 1 mg/ml a 8 mg/ml en el caso de Cu (II) y Co (II), respectivamente.

Rane & Padmaja (2012) realizaron el desarrollo de un método para la cuantificación de Ketoconazol en tabletas basado en reacciones de amplificación, la técnica utilizada fue espectrofotometría UV-Visible. El Ketoconazol se oxidó con peryodato, lo que da como resultado la formación de iones KC^{2+} y iones de yodato. La medición espectrofotométrica, se realizó a una longitud de onda de 535 nm. El método presentó buena linealidad en el rango de concentración de 0.2136 mg/ml a 1.7088 mg/ml, obteniéndose un valor de coeficiente de correlación de 0.9963.

Fraihat & Bahgat (2014) realizaron el desarrollo de dos métodos para la cuantificación de ketoconazol en muestras puras y formulaciones farmacéuticas, la técnica utilizada fue la espectrofotometría UV-Visible. El método A, se basó en la oxidación del Ketoconazol, utilizando Ce (IV) en ácido sulfúrico, como agente oxidante y índigo carmín como colorante; En el método B, se utilizó permanganato de potasio como agente oxidante y el azul de metileno como colorante. La medición espectrofotométrica, se realizó a longitudes de ondas de 610 nm y 660 nm respectivamente. Con el propósito de determinar las cantidades de Ketoconazol, se efectuaron curvas de calibración tanto para el método A, como para el método B,



observándose que ambos métodos obedecen la ley de Beer, en los rangos de concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ a 30 $\mu\text{g/ml}$ para método A y 5 $\mu\text{g/ml}$ a 35 $\mu\text{g/ml}$ para método B, cumpliendo con el criterio de aceptación para el coeficiente de correlación, los valores obtenidos para ambos métodos fueron de 0.996 y 0.995, respectivamente.

En el año 2020, se desarrolló y validó un método espectrofotométrico UV-Visible para la cuantificación de Ketoconazol en comprimidos farmacéuticos. El solvente utilizado para el desarrollo del método propuesto fue el tampón de fosfato pH 6.8, medido a una longitud de onda a 208 nm. El método desarrollado fue validado, evaluándose los parámetros de linealidad, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y robustez. Se encontró que la linealidad del Ketoconazol está en el rango de 10 $\mu\text{g/ml}$ a 60 $\mu\text{g/ml}$ con un coeficiente de correlación de 0,999. La exactitud evaluada como recuperación fue de 98,99% y el 99,32%. La precisión intradía (%RSD) fue de 0,10% a 0,56%. Se observó que el método era preciso ya que se encontró que el % RSD era menor al 2%. El límite de detección y el límite de cuantificación fueron de 1,37 $\mu\text{g/ml}$ y 4,07 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. (Shrivastava et al., 2020).



3. Planteamiento del problema

Las infecciones por hongos superficiales y sistémicas, se han convertido en un problema de salud pública (Shrivastava et al., 2020).

En la literatura, los métodos analíticos que se utilizan para la determinación cuantitativa de Ketoconazol en muestras farmacéuticas (tabletas, shampoo y cremas) son: Espectrofotométricos, y Cromatográficos (Farhadi & Maleki, 2001; Safwan M Fraihat, 2014; Popovska et al., 2013).

De acuerdo con Popovska et al., (2013) se utiliza con más frecuencia la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada con espectrometría de masas (MS) para la identificación de Ketoconazol.

La preferencia para la determinación de Ketoconazol es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); sin embargo, estos implican la utilización de equipos costosos y consumen mucho tiempo (El-Ragehy & El-Saharty, 2001; Farhadi & Maleki, 2001; Safwan M Fraihat, 2014), debido a los pasos previos de tratamiento de la muestra, como la filtración y extracción (Popovska et al., 2013).

En base a lo antes descrito nos hemos propuesto las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuál es el disolvente, concentración, y tiempo óptimo para el desarrollo del método espectrofotométrico para la determinación de Ketoconazol?

¿Cuál es el grado de aptitud de método con respecto a la linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación?

¿Cómo se encuentra la concentración de principio activo en las tabletas de Ketoconazol con respecto a las de la USP30/NF25?



4. Justificación

El Ketoconazol es un agente antifúngico ampliamente utilizado para el tratamiento de hongos superficiales y sistémicos (El-Ragehy & El-Saharty, 2001; Farhadi & Maleki, 2001; Safwan M Fraihat, 2014).

La monitorización de los fármacos es importante para evitar toxicidad e intoxicación (Gordon, 2000), en el caso de las tabletas de Ketoconazol ($C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$), se debe verificar que contengan entre 90% y 110% de la dosis expresada (USP30/ NF25, 2007).

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica robusta, rápida, precisa, versátil, fácil y económica (Maldonado Cubas et al., 2018), en comparación con las técnicas de separación como HPLC.

La aplicación de la espectrofotometría derivada es una herramienta para el análisis de mezclas de multicomponentes, ofrece una gran selectividad en comparación con la espectrofotometría normal ya que disminuye la superposición espectral y permite una mejor resolución (Mabrouk et al., 2015).

El presente estudio se llevó a cabo con el propósito de desarrollar un método exacto y preciso utilizando la espectrofotometría derivada para el análisis de Ketoconazol en tabletas.



5. Objetivo General

Desarrollar un método por espectrofotometría UV-Visible para la determinación de Ketoconazol en tabletas.

5.1. Objetivos específicos

- ❖ Determinar el disolvente, concentración y tiempo de reposo adecuados para la cuantificación del principio activo de Ketoconazol.
- ❖ Evaluar el grado de aptitud del método por medio de linealidad, precisión exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y rango de trabajo.
- ❖ Comprobar el cumplimiento del contenido de principio activo en tabletas de Ketoconazol con respecto a las indicaciones de la USP30/ NF25.



6. Marco teórico

6.1. Ketoconazol

El Ketoconazol ($C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$) es un polvo de color blanco a blanquecino, es insoluble en agua y soluble en ácido fuerte (Popovska et al., 2013; Shrivastava et al., 2020). Químicamente se conoce como cis-1-acetil-4-[4-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il] metoxi] fenil] piperazina (El-Ragehy & El-Saharty, 2001; Farhadi & Maleki, 2001; S. M. Fraihat & Bahgat, 2014).

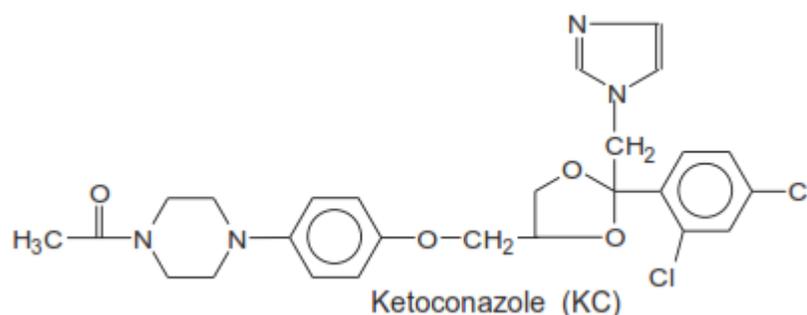


Figura 1. Estructura del Ketoconazol (Rane & Padmaja, 2012).

6.2. Usos del Ketoconazol

El Ketoconazol es un agente antifúngico eficazmente utilizado para el tratamiento o prevención de infecciones por hongos (Naveed & Jaweed, 2014; Shrivastava et al., 2020), tales como, la micosis sistémica que afecta el pulmón y tubo digestivo (Méndez-Tovar, 2008; Popovska et al., 2013), así como también la micosis superficial que afecta la capa de la córnea, la piel, el cabello y las uñas (Dalmau et al., 2005; Naveed & Jaweed, 2014).



6.3. Presentación comercial de Ketoconazol

En la **Tabla 1**, se muestra el listado de las diferentes presentaciones de Ketoconazol encontradas en el mercado farmacéutico nicaragüense.

Tabla 1. Presentación de Ketoconazol

Laboratorios	Presentaciones	Concentraciones
Laboratorio GENERIFAR	Tabletas de Ketoconazol	200mg
Laboratorio CEGUEL S.A.	Crema de Ketoconazol	400mg
Laboratorio RAMOS	Shampoo de Ketoconazol	2%
Laboratorio RAMOS	Óvulos de Ketoconazol	400mg
Laboratorio SOLKA S.A..	Crema de Ketoconazol	2%
Laboratorio SOLKA S.A..	Crema de Ketoconazol	400mg
Laboratorio RARPE	Shampoo de Ketoconazol	2%
Laboratorio RARPE	Óvulos de Ketoconazol	400mg

6.4. Valor recomendado por la USP

Las tabletas de Ketoconazol deben contener no menos de 90 % y no más de 110% de la cantidad declarada de Ketoconazol $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ (USP30/ NF25, 2007).

6.5. Reacciones adversas del uso de Ketoconazol

Frecuentes: Molestias gastrointestinales, náusea, diarrea, vómito y dolor abdominal.

Poco frecuentes: Cefalea, mareos, somnolencia, fiebre y escalofrío.

Raras: Impotencia e irregularidades menstruales (Agencia Española de Medicamentos, 2018).



6.6. Contraindicaciones del uso de Ketoconazol

Cuando el Ketoconazol es administrado por vía oral, se debe de tener precaución con pacientes que padezcan enfermedad hepática, debido a que el Ketoconazol se metaboliza en el hígado y puede llegar a ser hepatotóxico en concentraciones altas (Gupta & Lyons, 2015).

6.7. Métodos de análisis para el Ketoconazol

Los métodos analíticos para la identificación y determinación cuantitativa de Ketoconazol en muestras son: Métodos cromatográficos: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y Cromatografía en capa fina (TLC), Métodos espectrofotométricos: Espectrofotometría UV-visible y Métodos electroanalíticos: Potenciometría (Popovska et al., 2013).

En un trabajo realizado en el año 2013, se reportó la cuantificación de Ketoconazol en cremas mediante cromatografía de capa fina (TLC), se realizó la separación, cualitativa y análisis cuantitativo de Ketoconazol puro. En el análisis se aplicó un gel de sílice y un sistema de disolventes compuesto por n-hexano-cloroformo-metanol-dietilamina 50: 40: 10: 1 v / v (Popovska et al., 2013).

6.7.1. Valoración potenciométrica

Se disuelven aproximadamente 200 mg de Ketoconazol, pesados con exactitud, en 40 ml de ácido acético glacial, se valora con ácido perclórico 0,1 N, determinando el punto final potenciométricamente. Es requerido que se realice una determinación con un blanco. Cada ml de ácido perclórico 0,1 N equivale a 26,57 mg de $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ (USP30/ NF25, 2007).



6.7.2. Identificación de Ketoconazol en tabletas por TLC

Se lleva a cabo por medio de una cantidad de tabletas finamente pulverizadas, equivalente a 50 mg de Ketoconazol, se transfieren a un matraz volumétrico, se agregan 50 mL de cloroformo, se agita durante aproximadamente 2 minutos y se filtra. A continuación, se aplican porciones separadas de 10 μ l de esta solución y de una solución estándar de referencia de Ketoconazol, en cloroformo que contenga 1 mg por ml, sobre la línea de partida de una placa, para cromatografía en capa delgada de gel de sílice de 0,25 mm de espesor. Dejar que las aplicaciones se sequen y desarrollar el cromatograma en una cámara cromatográfica no saturada con una fase móvil constituida por una mezcla de n-hexano, acetato de etilo, metanol, agua y ácido acético glacial (42:40:15:2:1) hasta que el frente de la fase móvil haya recorrido aproximadamente tres cuartos de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, secar al aire y examinar bajo luz UV de longitud de onda corta: el valor R_F de la mancha principal obtenida de la solución de prueba se corresponde con el de la mancha principal obtenida a partir de la solución estándar.

6.7.3. Valoración por cromatografía líquida (HPLC)

6.7.3.1. Fase móvil

Consiste en preparar una mezcla adecuada (7:3) constituida por una solución de diisopropilamina en metanol (1 en 500) y una solución de acetato de amonio (1 en 200) (USP30/ NF25, 2007).



6.7.3.2. Preparación del estándar

Se pesan 20 mg del estándar de referencia de Ketoconazol, seguidamente, se transfiere a un matraz volumétrico de 50 ml y se diluye con Metanol-cloruro de metileno (USP30 / NF25, 2007).

6.7.3.3. Valoración

Se utiliza una preparación de valoración, en la cual se pesa y se reduce a polvo fino no menos de 20 tabletas, se transfiere una porción del polvo pesado, que contenga aproximadamente a 200 mg de Ketoconazol, a un frasco con tapa de rosca adecuado, se agregan 50ml de Metanol-cloruro de metileno, se mezcla mecánicamente durante 30 minutos y se centrifuga. Posteriormente, se transfiere 5 ml del sobrenadante transparente a un matraz volumétrico de 50 ml y se diluye con Metanol-cloruro de metileno, se inyectan por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (20 μ L) de la preparación estándar y de la preparación de valoración. Se registran los cromatogramas y finalmente se miden las respuestas de los picos principales. La cantidad de Ketoconazol ($C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$) en mg de tableta, se calcula mediante la **Ecuación 1**:

$$10W_s(R_u/R_s) \quad (1)$$

En donde W_s es el peso, en mg del estándar de referencia de Ketoconazol tomado; y R_u y R_s son los cocientes entre la respuesta de los picos de Ketoconazol obtenido a partir de la preparación de valoración y de la preparación estándar, respectivamente. Las tabletas de Ketoconazol contienen no menos de 90% y no más de 110% de la cantidad declarada de Ketoconazol $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ (USP30/ NF25, 2007).



6.7.4. Determinación de Ketoconazol por Espectrofotometría UV-Visible

6.7.4.1. Reactivo

Soluciones de acetato de cobre (II) y cloruro de cobalto (II) al 5% y 20% (p/v), respectivamente; se preparan disolviendo los compuestos en agua destilada recién hervida y enfriada.

Solución madre de Ketoconazol: 20 mg/ml; prepararse en diclorometano (El-Ragehy & El-Saharty, 2001).

6.7.4.2. Curva de calibración

A un embudo de decantación, se transfiere cuantitativamente una alícuota de solución madre de Ketoconazol. Se utilizan las alícuotas de 1.0 ml a 6.5 ml para las reacciones con Cu (II); y se utilizan las alícuotas de 0,5 ml a 4 ml para las reacciones con Co (II). Se agregan 3 ml de solución de acetato de Cu (II) al 5% o 2 ml de solución de cloruro de Co (II) al 20% y se agita vigorosamente el embudo.

Se transfiere la capa orgánica a un matraz aforado de 10 ml sin pasarlo por un papel de filtro humedecido con diclorometano y que contenga algo de sulfato de sodio anhidro colocado sobre un pequeño trozo de algodón. Agregue 2 ml adicionales de diclorometano al embudo de decantación y repita la extracción, pasando la capa orgánica a través del filtro. Se lava el filtro con diclorometano, transfiriendo los lavados al matraz y diluyendo la solución con diclorometano.

Se mide la absorbancia azul resultante a 720.0 nm y 612.5 nm en el caso de Cu (II) y Co (II), respectivamente contra un blanco de reactivo (El-Ragehy & El-Saharty, 2001).



6.7.4.3. Procedimiento de análisis en tableta

Consiste en pesar y pulverizar finamente como mínimo 20 comprimidos. Transferir una porción de las tabletas en polvo equivalente a 250 mg de Ketoconazol a un matraz aforado de 25 ml, disolver el polvo en diclorometano y diluir la solución a volumen. Mezclar bien y filtrar. Una alícuota de 1 ml de esta solución equivale a 10 mg de ketoconazol. Determine la concentración de Ketoconazol en el filtrado anterior, como se describe en la curva de calibración (El-Ragehy & El-Saharty, 2001).

6.7.4.4. Procedimiento de análisis en crema

Homogeneizar el contenido de 3 tubos de crema. Pesar una porción de la crema homogeneizada equivalente a 250 mg Ketoconazol en un matraz aforado de 25 ml. Disuelva la crema en diclorometano-isopropanol (1: 1). Una alícuota de 1 ml de esta solución equivale a 10 mg de Ketoconazol. Determine la concentración de Ketoconazol en la solución anterior, como se describe en la curva de calibración, utilizando un blanco de reactivo del mismo disolvente (El-Ragehy & El-Saharty, 2001).

6.8. Espectrofotometría UV-visible

La espectrofotometría UV-Visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez la cantidad de luz absorbida por dicha muestra depende de forma lineal de la concentración (Diaz et al., 2004).



6.8.1. Fundamento de espectrofotometría

La espectrofotometría en termino general trata las distintas interacciones de la radiación con la materia, ésta se basa en la medida de la absorción o emisión de la energía radiante mediante un detector, después que ha interactuado con una especie química (D. A. Skoog et al., 2001). Los modos de interacción pueden ser: Absorción, reflexión, dispersión, refracción. La materia puede ser átomos, iones y moléculas.

6.8.2. Ley de Beer

La ley Beer establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de una determinada especie absorbente siendo su **Ecuación 2**.

$$A = a \times b \times c \quad (2)$$

En donde:

- ❖ A: Absorbancia.
- ❖ a = Absortividad.
- ❖ b = Longitud de trayecto óptico.
- ❖ c = Concentración de la muestra.

La absorbancia, A, es el logaritmo en base 10 del recíproco de la transmitancia, esto es $A = \log_{10} 1/T = -\log_{10} T$ (D. A. Skoog et al., 2001).



6.8.3. Componentes del espectrofotómetro

1. Una fuente de energía radiante: Lámpara de deuterio y tungsteno.
2. Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas y redes de difracción.
3. Un compartimento donde contenga la muestra (cubetas), pueden ser de vidrio o cuarzo. Para medir en UV se deben usar las de cuarzo, porque el vidrio no transmite la radiación UV.
4. Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.
5. Un registrador o sistema de lectura de datos (D. Skoog et al., 2008).

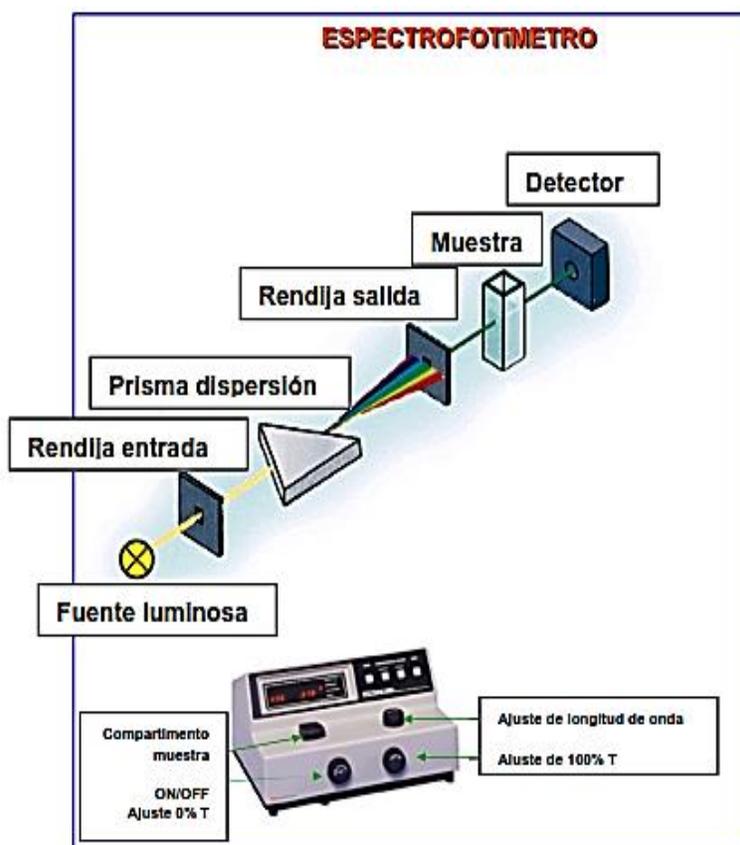


Figura 2. Componentes del Espectrofotómetro (Díaz et al., 2004).



6.9. Espectrofotometría derivada

La espectrofotometría derivada es una técnica, basada en los espectros derivados que se generan de los espectros de orden cero, es empleada para aumentar la estructura fina de las bandas espectrales y separar bandas espectrales solapadas (Torral et al., 2005).

6.9.1. Fundamento de espectrofotometría derivada

La espectrofotometría derivada consiste en calcular la primera, segunda o derivadas de orden superior de la absorbancia con respecto a la longitud de onda, que se representa de manera gráfica como el cociente diferencial $dA/d\lambda$ (para la primera derivada) en un intervalo determinado de longitud de onda, dando origen a un máximo y a un mínimo (Karpińska, 2004). La distancia vertical entre un máximo y un mínimo se denomina amplitud. En espectrofotometría derivada se mantiene la ley de la espectrofotometría clásica, por ejemplo: La ley de Lambert-Beer. (Torral et al., 2005).

6.9.2. Ventajas de espectrofotometría derivada

- ❖ Es muy útil para determinar la posición exacta de longitud de onda de la máxima absorción del espectro de orden cero o normal.
- ❖ Resuelve el problema de estructura fina de un espectro, que normalmente es difícil de ver en un espectro de orden cero.
- ❖ Permite separar bandas espectrales solapadas (Torral et al., 2005).



6.9.3. Desventaja de espectrofotometría derivada

Una desventaja que presenta esta técnica es que la relación señal/ruido va disminuyendo al aumentar el orden de la derivada, es decir el ruido aumenta, conforme lo haga el orden de la derivada. Esta disminución de la relación señal/ruido, se puede mejorar empleando un $\Delta\lambda$ mayor para calcular la derivada (Torral et al., 2005).

6.10. Validación de métodos analíticos

Un método debe ser validado cuando sea necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto (Eurachem, 2014).

La validación de un método es un procedimiento que tiene la finalidad de demostrar, por medio de evidencia objetiva, que un método analítico determinado, posee las características de desempeño adecuadas para cumplir con los requerimientos de la aplicaciones analíticas pretendida, los parámetros de desempeño están asociados a su validación y son evaluados como parte de desarrollo del método (Eurachem, 2014).



6.10.1. Parámetros de Validación de un Método

Los parámetros de validación que se desarrollan en este método.

6.10.1.1. Linealidad

Capacidad para proporcionar resultados del método, que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido (ICH, 2006) . Para poder hacer esto, es preciso establecer una relación entre las señales medidas y una serie de patrones de concentración conocida, se procura que la relación sea lineal (Tixe, 2013), frecuentemente se utiliza como criterio de la linealidad un coeficiente de correlación (r^2) del 0.999.

6.10.1.2. Precisión

Capacidad para proporcionar resultados próximos entre sí. Expresa la proximidad de la concordancia (grado de dispersión) entre una serie de resultados obtenidos de mediciones repetidas en la misma muestra. La precisión puede considerarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (ICH, 2006). El parámetro estadístico que caracteriza a este estudio es la desviación estándar o preferiblemente el coeficiente de variación (Tixe, 2013).

a) Repetibilidad

Evalúa la precisión del método, efectuando una serie de análisis sobre una misma muestra, mismo equipo, mismas condiciones y mismo laboratorio durante un breve intervalo de tiempo (ICH, 2006).



b) Precisión Intermedia

Evalúa la precisión del método, frente a variaciones dentro de un laboratorio en: diferente día, diferentes analistas, diferentes equipos (ICH, 2006).

c) Reproducibilidad

Evalúa la precisión del método, efectuando una series de análisis en las condiciones: distintos analistas, diferentes equipos y diferentes laboratorios (ICH, 2006).

6.10.1.3. Exactitud

Capacidad para proporcionar resultados los más cercano posible al valor teórico. Expresa la proximidad entre el valor que se acepta convencionalmente como un valor verdadero, valor teórico o un valor de referencia y el valor encontrado experimentalmente (ICH, 2006).

6.10.1.4. El límite de detección

Es la mínima cantidad del analito en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado con precisión y exactitud (Eurachem, 2014).

6.10.1.5. El límite de cuantificación

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantificada con una adecuada precisión y exactitud (Eurachem, 2014).

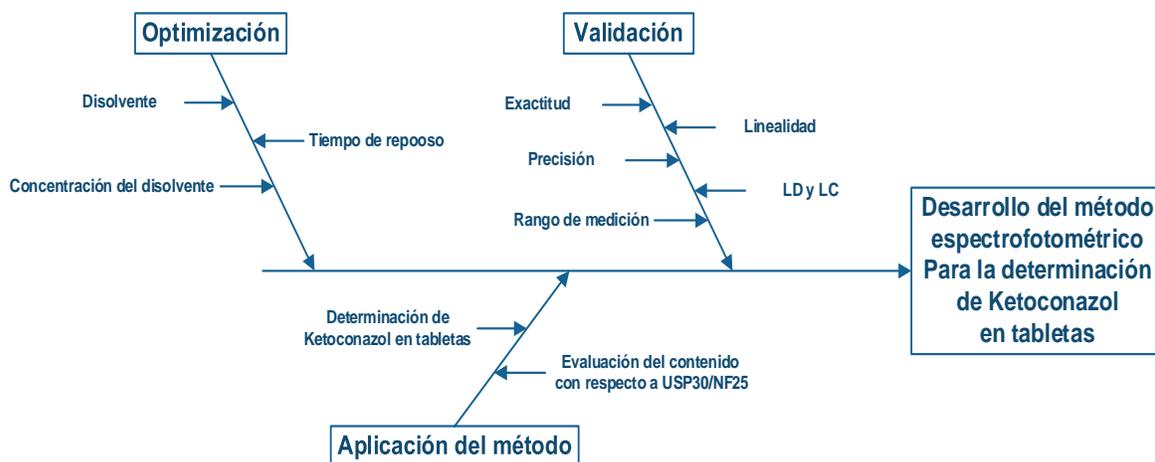


6.10.1.6. El rango

Es el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito en la muestra que se puede determinar con precisión, exactitud y linealidad. (ICH, 2006). El límite inferior corresponde al límite de cuantificación y el límite superior corresponde el nivel más alto de concentración en el cual se obtiene buena linealidad.



7. Diseño Metodológico



7.1. Reactivos

En la **Tabla 2**, se muestra el listado de reactivo necesario para la determinación de Ketoconazol.

Tabla 2. Reactivos

Nombre	Formula	Masa molar	Marca	Pureza %
Agua Desionizada	H ₂ O	18.01	-	-
Ácido Clorhídrico	HCl	36.46	FISHER CHEMICAL	36.5-38%
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	98.079	FISHER CHEMICAL	94%

7.2. Equipos

- ❖ Espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10s UV-Vis.
- ❖ Balanza analítica Sartorius GMBH gottingen (AC210S), d= 0.001g.
- ❖ El baño ultrasónico selecta.



7.3. Materiales

- ❖ Balones aforados 25 ml y 500 ml.
- ❖ Beaker 250ml.
- ❖ Pipetas serológicas 0.5 ml y 10 ml.
- ❖ Espátula.
- ❖ Pera.
- ❖ Pizeta.
- ❖ Tapones.
- ❖ Mortero.
- ❖ Gotero.
- ❖ Pilón.
- ❖ Celdas espectrofotométricas.

7.4. Preparación de soluciones

En la **Tabla 3**, se muestra el diseño experimental para las diferentes concentraciones de HCl.

Tabla 3. Diseño experimental de las diferentes concentraciones de HCl

E	Volumen en ml HCl concentrado (12.1M)	H ₂ O (ml)	Volumen final (ml)	Concentración HCl en M
1	0.21	csp	50	0.05
2	0.41	csp	50	0.1
3	0.62	csp	50	0.15
4	0.83	csp	50	0.2
5	1.03	csp	50	0.25

cps: Cantidad suficiente para, E: Experimentos.

En la **Tabla 4**, se muestra el diseño experimental para las diferentes concentraciones de H₂SO₄.



Tabla 4. Diseño experimental de las diferentes concentraciones de H_2SO_4

E	Volumen en ml H_2SO_4 concentrado (11.5 M)	H_2O (ml)	Volumen final (ml)	Concentración H_2SO_4 en M
1	0.22	csp	50	0.05
2	0.43	csp	50	0.1
3	0.65	csp	50	0.15
4	0.87	csp	50	0.2
5	1.08	csp	50	0.25

cps: Cantidad suficiente para, E: Experimentos.

7.4.1. Solución madre de Ketoconazol $1000 \mu\text{gml}^{-1}$

Se pesó 0.5001 g del principio activo de Ketoconazol, seguidamente se transfirió a un matraz volumétrico de 500ml, se agregó 250 ml de agua desionizada, posteriormente, se adicionó 2.2 ml de H_2SO_4 concentrado 11.5 M y se diluyó hasta la señal de aforo con agua desionizada.

7.5. Diseño experimental para determinar el disolvente y concentración adecuada para la cuantificación de Ketoconazol

7.5.1. Prueba del HCl como disolvente en diferentes concentraciones

En la **Tabla 5**, se muestra el diseño experimental para el estudio del comportamiento del principio activo en las diferentes concentraciones del disolvente HCl.



Tabla 5. Diseño experimental para el estudio del comportamiento del principio activo en las diferentes concentraciones del disolvente HCl

E	PA (g)	Volumen en ml HCl concentrado (12.1 M)	H ₂ O (ml)	Volumen final (ml)	Concentración de KZ (μgml^{-1})
1	0.0125	0.21	csp	50	250
2	0.0125	0.41	csp	50	250
3	0.0125	0.62	csp	50	250
4	0.0125	0.83	csp	50	250
5	0.0125	1.03	csp	50	250

PA: Principio activo (Ketoconazol) E: Experimento, cps: Cantidad suficiente para, KZ: Ketoconazol.

Luego de preparar la solución de cada experimento, se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm de la serie de experimento mostrados en la **Tabla 5**, los blancos utilizados para cada experimento son:

Experimentos	Blancos
1	HCl 0.05M
2	HCl 0.1M
3	HCl 0.15M
4	HCl 0.2 M
5	HCl 0.25M

7.5.2. Prueba del H₂SO₄ como disolvente en diferentes concentraciones

En la **Tabla 6**, se muestra el diseño experimental para el estudio del comportamiento del principio activo en las diferentes concentraciones del disolvente H₂SO₄.



Tabla 6. Diseño experimental para el estudio del principio activo en las diferentes concentraciones del disolvente H_2SO_4 .

E	PA (g)	Volumen en ml H_2SO_4 concentrado (11.5 M)	H_2O (ml)	Volumen final (ml)	Concentración de KZ (μgml^{-1})
1	0.0125	0.22	csp	50	250
2	0.0125	0.43	csp	50	250
3	0.0125	0.65	csp	50	250
4	0.0125	0.87	csp	50	250
5	0.0125	1.08	csp	50	250

PA: Principio activo (Ketoconazol) cps: Cantidad suficiente para, E: Experimentos, KZ: Ketoconazol.

Luego de preparar la solución de cada experimento, se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm de la serie de experimento mostrados en la **Tabla 6**, los blancos utilizados para cada experimento son:

Experimentos	Blancos
1	H_2SO_4 0.05M
2	H_2SO_4 0.1M
3	H_2SO_4 0.15M
4	H_2SO_4 0.2M
5	H_2SO_4 0.25M

7.5.3. Prueba del tiempo adecuado para la cuantificación de Ketoconazol utilizando como disolvente el H_2SO_4 0.05M

En la **Tabla 7**, se muestra el diseño experimental para el estudio de diferentes tiempos 0, 5,10, y 15 minutos, después de preparar las soluciones.



Tabla 7. Diseño experimental para el estudio a diferentes tiempos

E	PA (g)	Volumen en ml H ₂ SO ₄ concentrado (12.1 M)	H ₂ O (ml)	Volumen final (ml)	Tiempo en min	Concentración de KZ (µgml ⁻¹)
1	0.0125	0.22	csp	50	0	250
2	0.0125	0.22	csp	50	5	250
3	0.0125	0.22	csp	50	10	250
4	0.0125	0.22	csp	50	15	250

PA: Principio activo (Ketoconazol), cps: Cantidad suficiente para, E: Experimentos, KZ: Ketoconazol.

Luego de preparar la solución de cada experimento, se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm, utilizando como blanco H₂SO₄ de 0.05 M.

7.6. Diseño experimental para evaluar el grado de aptitud por medio de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite cuantificación y rango de medición

7.6.1. Diseño experimental para evaluar la linealidad

Se prepararon soluciones estándares de Ketoconazol, para elaborar curvas de calibración normal, en el rango lineal de 20 µgml⁻¹ a 400 µgml⁻¹, estas son preparadas a partir de la solución madre de Ketoconazol de 1000 µgml⁻¹, en la **Tabla 8**, se muestra el diseño experimental para evaluar la linealidad.



Tabla 8. Preparación de la curva de calibración normal para la linealidad

E	Volumen en ml de Stock KZ (1000 μgml^{-1})	H ₂ SO ₄ 0.05 M (ml)	Volumen final (ml)	Concentración de KZ (μgml^{-1})
B	0	cps	25	0
1	0.5	cps	25	20
2	1.25	cps	25	50
3	2.5	cps	25	100
4	3.75	cps	25	150
5	5	cps	25	200
6	6.25	cps	25	250
7	7.5	cps	25	300
8	8.75	cps	25	350
9	10	cps	25	400

B. Blanco, cps: Cantidad suficiente para, E: Experimento, KZ: Ketoconazol.

Inmediatamente de preparar la solución de cada experimento, se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm, utilizando como blanco H₂SO₄ de 0.05 M.

7.6.2. Diseño experimental para evaluar la precisión

En la **Tabla 9**, se muestra el diseño experimental que se llevó a cabo para evaluar la precisión, para lo cual se emplearon 3 estándares de Ketoconazol, las concentraciones fueron de 50 μgml^{-1} , 150 μgml^{-1} y 250 μgml^{-1} , estas se prepararon a partir de una solución madre de Ketoconazol de 1000 μgml^{-1} .



Tabla 9. Diseño experimental para la precisión

E	Volumen en ml del Stock KZ (1000 µgml ⁻¹)	H ₂ SO ₄ 0.05 M (ml)	Volumen final (ml)	Concentración de KZ (µgml ⁻¹)
B	0	csp	25	0
1	1.25	csp	25	50
2	3.75	csp	25	150
3	6.25	csp	25	250

B. Blanco, cps: Cantidad suficiente para, E: Experimentos, KZ: Ketoconazol.

Inmediatamente de preparar la solución de cada experimento, se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm, utilizando como blanco H₂SO₄ de 0.05 M.

7.6.3. Diseño experimental para evaluar la exactitud

Se pesaron 20 tabletas, conteniendo 200 mg de Ketoconazol cada una, seguidamente, se pulverizaron haciendo uso de un pilón y un mortero, posteriormente, se procedió de acuerdo al diseño experimental para las muestras de recuperación sin fortificar en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Diseño experimental para la exactitud (muestra de recuperación sin fortificar)

E	Tabletas pulverizadas (g)	H ₂ SO ₄ 0.05 M (ml)	Volumen de la solución (ml)	Baño ultrasónico (minutos)	Volumen de alícuota (ml)	H ₂ SO ₄ 0.05 M (ml)	Volumen final (ml)
1	0.0090	csp	25	10	6.3	csp	25
2	0.0090	csp	25	10	6.3	csp	25
3	0.0090	csp	25	10	6.3	csp	25

E: Experimento, csp: Cantidad suficiente para.

Inmediatamente de preparar la solución de cada experimento, se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm, utilizando como blanco H₂SO₄ de 0.05 M.



A continuación, se realizó un nuevo diseño de experimento en la **Tabla 11** fortificando la muestra de recuperación.

Tabla 11. Diseño experimental para la exactitud (muestra de recuperación fortificada)

E	Tabletas pulverizadas (g)	H ₂ SO ₄ 0.05 M (ml)	Vol. de solución (ml)	Baño ultrasónico (minutos)	Vol. de alícuota (ml)	Vol. sol. Stock de KZ de 1000 µgml ⁻¹ (ml)	H ₂ SO ₄ 0.05 M (ml)	Vol. Final (ml)
1	0.0090	csp	25	10	6.3	3.75	csp	25
2	0.0090	csp	25	10	6.3	3.75	csp	25
3	0.0090	csp	25	10	6.3	3.75	csp	25

E: Experimento, csp: Cantidad suficiente para. Vol.: Volumen, Sol.: solución, KZ: Ketoconazol.

Inmediatamente de preparar la solución de cada experimento, se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm, utilizando como blanco H₂SO₄ de 0.05 M.

7.6.4. Diseño experimental para evaluar el límite de detección y límite de cuantificación

Se preparan soluciones estándares de Ketoconazol, para elaborar una curva de calibración normal, en el rango lineal de 5 µgml⁻¹ a 20 µgml⁻¹, estas se prepararon a partir de la solución madre de Ketoconazol 1000 µgml⁻¹, para la cual se procedió de acuerdo al diseño experimental del límite de detección y cuantificación mostrado en la **Tabla 12**.



Tabla 12. Diseño experimental del límite de detección y límite cuantificación

E	Volumen en ml del Stock KZ (1000 μgml^{-1})	H ₂ SO ₄ 0.05 M (ml)	Volumen final (ml)	Concentración de KZ (μgml^{-1})
B	0	csp	25	0
1	0.13	csp	25	5
2	0.25	csp	25	10
3	0.38	csp	25	15
4	0.5	csp	25	20

csp: Cantidad suficiente para. E: Experimento, KZ: Ketoconazol.

Inmediatamente de preparar la solución de cada experimento, se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm, utilizando como blanco H₂SO₄ de 0.05 M.

7.6.5. Diseño experimental para la evaluación del contenido del principio activo en tableta de Ketoconazol

1. Pesar 20 tabletas de Ketoconazol para calcular el promedio.
2. Triturar las tabletas hasta convertirlas en polvo haciendo uso de un pilón y un mortero.
3. Tomar la cantidad de 0.0090 gramos de la tableta pulverizada, a partir de estas preparar soluciones de valoración o prueba del principio activo aproximadamente a 150 μgml^{-1} .

En la **Tabla 13**, se muestra el diseño experimental que se lleva a cabo para la valoración o prueba del principio activo en tableta de Ketoconazol # 1.



Tabla 13. Diseño experimental para la valoración del principio activo en la tableta #1 de Ketoconazol

E	Tabletas pulverizadas (g)	H ₂ SO ₄ 0.05 M (ml)	Volumen final (ml)	Baño ultrasónico (minutos)
1	0.0090	csp	25	10
2	0.0090	csp	25	10
3	0.0090	csp	25	10

csp: Cantidad suficiente para. E: Experimentos.

Inmediatamente de preparar la solución de cada experimento, se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm, utilizando como blanco H₂SO₄ de 0.05 M.

En la **Tabla 14**, se muestra el diseño experimental que se lleva a cabo para la valoración o prueba del principio activo en tableta de Ketoconazol #2.

Tabla 14. Diseño experimental para la valoración del principio activo en la tableta #2 de Ketoconazol

E	Tabletas pulverizadas (g)	H ₂ SO ₄ 0.05 M (ml)	Volumen final (ml)	Baño ultrasónico (minutos)
1	0.0090	csp	25	10
2	0.0090	csp	25	10
3	0.0090	csp	25	10

Inmediatamente de preparar la solución de cada experimento, se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm, utilizando como blanco H₂SO₄ de 0.05 M



8. Resultado y discusión

8.1. Determinación del disolvente y concentración adecuada para la cuantificación del principio activo de Ketoconazol

Con el propósito de estudiar el comportamiento del principio activo de Ketoconazol, se prepararon soluciones de éste a una concentración de $250 \mu\text{gml}^{-1}$, empleando dos disolventes diferentes (HCl y H_2SO_4). Se tomó como criterio de selección la concentración de aquel disolvente que presentara mayor absorbancia del principio activo en cuestión, y que presentara un espectro de absorción adecuado para la determinación por espectrofotometría derivada con una amplitud de $\Delta\lambda = 2$, en el rango de barrido de longitud de onda 230nm a 310nm.

8.1.1. Disolvente: HCl

Se prepararon soluciones de Ketoconazol, manteniendo constante la concentración a $250 \mu\text{gml}^{-1}$, empleando como disolvente el HCl a las diferentes concentraciones de 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25, todas en molaridad, posteriormente se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm. La primera derivada se realizó con una amplitud de $\Delta\lambda = 2$

La **Figura 3**, muestra la representación gráfica de las diferentes concentraciones en molaridad del HCl de 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25.

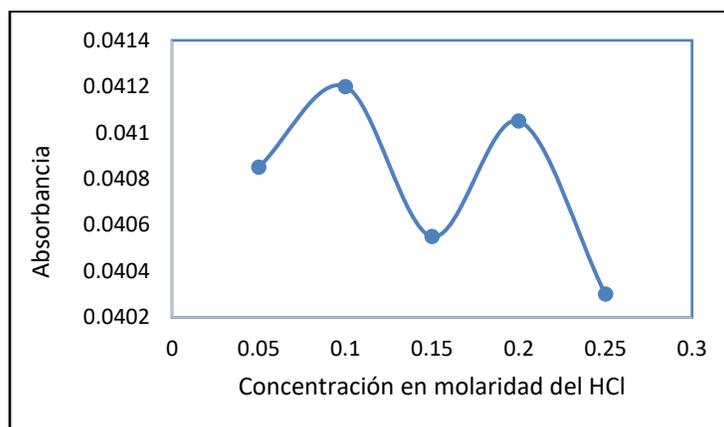


Figura 3. Gráfica de las diferentes concentraciones en molaridad del HCl de 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25.

La **Figura 3** contiene dos máximos de absorción, el primero a una concentración de 0.1M y el segundo a una concentración 0.2M, sin embargo, con la concentración de 0.1M, se obtiene una mayor absorbancia, por lo que, esta concentración de HCl, sería la más adecuada para determinar el Ketoconazol.

En la **Figura 4**, se pueden apreciar los espectros de la primera derivada del Ketoconazol correspondiente a los barridos espectrales de las diferentes concentraciones del HCl.

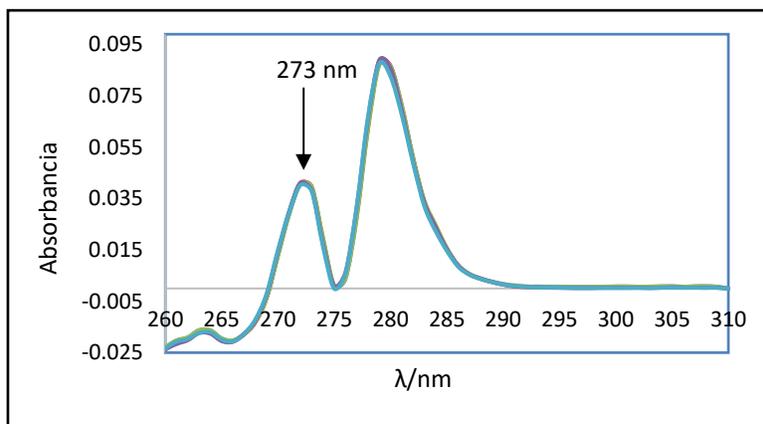


Figura 4. Espectros de la primera derivada del Ketoconazol a concentraciones en molaridad del HCl de 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, y 0.25.



8.1.2. Disolvente: H₂SO₄

Se prepararon soluciones de Ketoconazol, manteniendo constante la concentración a 250 µgml⁻¹, empleando como disolvente el H₂SO₄, a las diferentes concentraciones de 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25, todas en molaridad, posteriormente, se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm. La primera derivada se realizó con una amplitud de $\Delta\lambda = 2$.

La **Figura 5**, muestra la representación gráfica de las diferentes concentraciones en molaridad del H₂SO₄ de 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25.

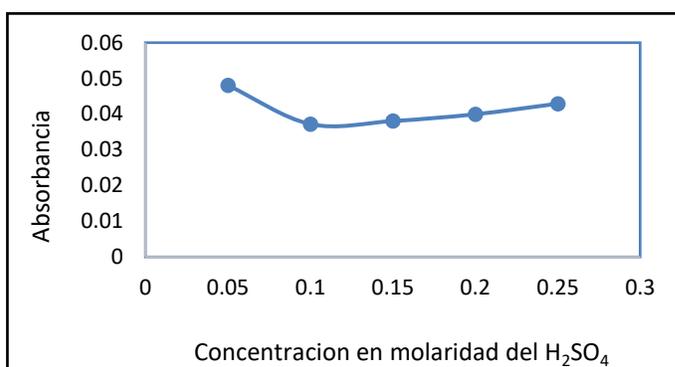


Figura 5. Gráfica de las diferentes concentraciones en molaridad del H₂SO₄ de 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25.

En la **Figura 5**, se puede apreciar que a una concentración de 0.05 .M de H₂SO₄, se obtiene una mayor absorbancia, por lo cual el Ketoconazol se puede determinar a dicha concentración para obtener el resultado más adecuado.

En la **Figura 6**, se pueden apreciar los espectros de la primera derivada de Ketoconazol correspondientes a los barridos espectrales de las diferentes concentraciones del H₂SO₄.

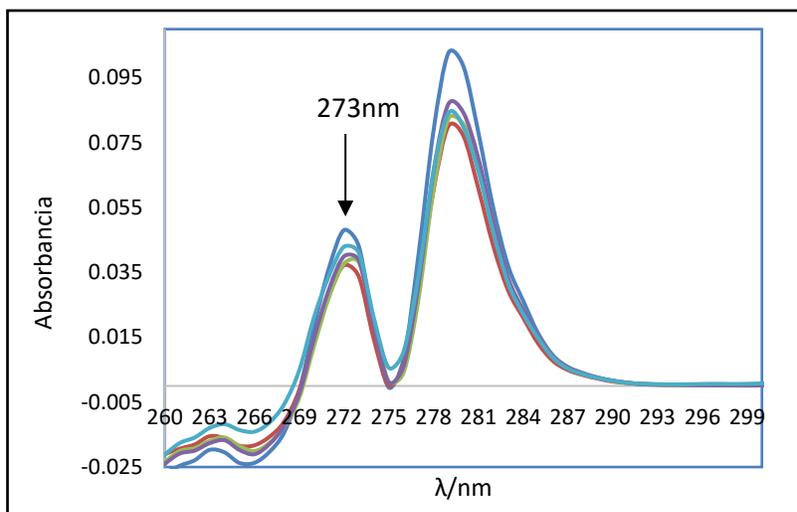


Figura 6. Espectros de la primera derivadas del Ketoconazol a concentraciones en molaridad de H_2SO_4 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25.

De los dos ácidos estudiados resulta más factible determinar el Ketoconazol utilizando H_2SO_4 0.05 M, ya que, al ser una concentración menor en comparación con la obtenida con el HCl, la cual fue de 0.1M, resultaría más económico.

8.1.3. Determinación del tiempo adecuado para la cuantificación del principio activo de Ketoconazol, utilizando como disolvente el H_2SO_4 0.05M

En el acápite anterior se encontró que el H_2SO_4 0.05 M, es más adecuado para la determinación de Ketoconazol, por lo cual, solamente se estudió el tiempo en la respuesta instrumental en este medio.

Se prepararon soluciones de Ketoconazol, manteniendo constante la concentración a $250 \mu gml^{-1}$, empleando como disolvente el H_2SO_4 0.05M a diferentes tiempos de 0, 5, 10, y 15, en minutos, posteriormente se realizó el barrido de longitudes de onda 230 nm a 310 nm. La primera derivada se realizó con una amplitud de $\Delta\lambda = 2$.



En la **Figura 7**, como se puede apreciar en la representación gráfica a tiempo de cero minutos (recién preparado), se obtiene una mayor de absorbancia.

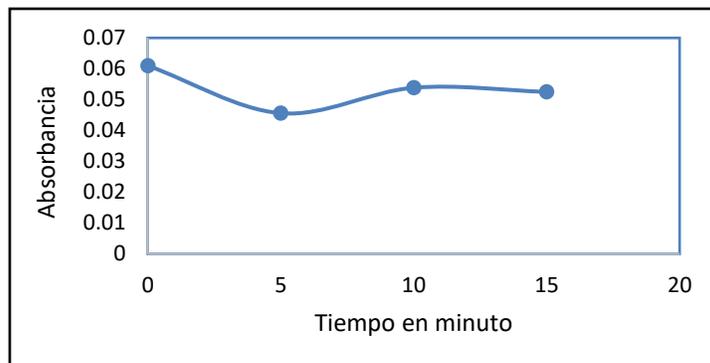


Figura 7. Gráfica de H₂SO₄ 0.05 M a diferente tiempo en minuto 0, 5, 10, y 15.

La medición, se debe realizar inmediatamente después de preparar las soluciones de la muestra, para obtener resultados más adecuado.

En la **Figura 8**, se pueden observar los espectros de la primera derivada del Ketoconazol en H₂SO₄ 0.05M a diferentes tiempos de 0 min a 15 min.

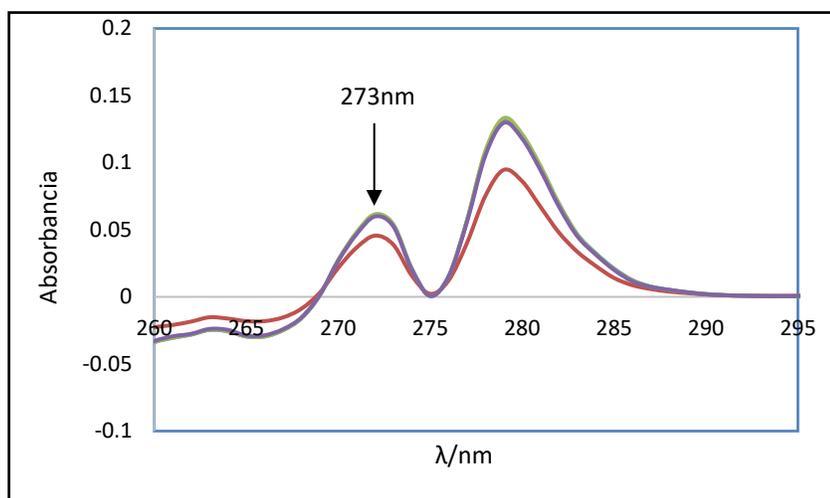


Figura 8. Espectros de la primera derivada del Ketoconazol en H₂SO₄ a diferentes tiempos 0, 5, 10, y 15 minutos.



8.2. Evaluación del grado de aptitud por medio de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y rango de medición

8.2.1. Evaluación de la linealidad

La linealidad, se evaluó mediante la curva de calibración normal, la cual se realizó durante 3 días consecutivos, se utilizaron 9 niveles de concentraciones de Ketoconazol para cada curva, las concentraciones fueron en el rango de $20 \mu\text{gml}^{-1}$ a $400 \mu\text{gml}^{-1}$. Se realizó el barrido espectral de 230 nm a 310 nm, posteriormente, se obtuvo el espectro de la primera derivada para cada nivel de concentración con una amplitud de $\Delta\lambda = 2$.

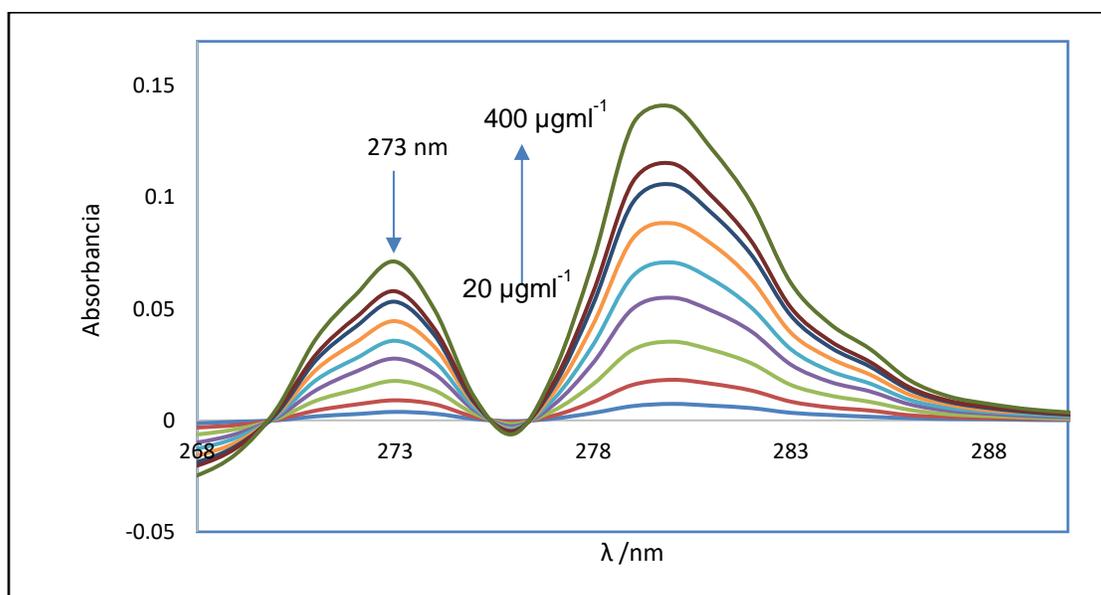


Figura 9. Espectros de la primera derivada de Ketoconazol a concentraciones de $20 \mu\text{gml}^{-1}$ a $400 \mu\text{gml}^{-1}$.

La **Figura 9** contiene los espectros de la primera derivada (D^1) para las diferentes concentraciones de Ketoconazol, como se puede apreciar, se logró la separación eficaz de los picos espectrales, por medio de la primera derivada, las longitudes de onda de máxima absorción fueron 273 nm y 280 nm, para cada pico,



respectivamente. Se evaluó la linealidad para ambos, encontrándose que el espectro a 273 nm presentó un mejor coeficiente de determinación, cuyo valor es 0.9996, por lo cual se decidió trabajar con éste, como se indica en la figura el espectro menor corresponde a la concentración de 20 μgml^{-1} y el mayor corresponde a la concentración de 400 μgml^{-1} indicándose con una flecha la dirección del incremento de los niveles de concentración, por otro lado, se indica la longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}} = 273 \text{ nm}$) seleccionada como longitud de onda de trabajo, a la cual se midió cada uno de estos espectros.

En la **Tabla 15**, se muestran los niveles de concentración, así como su absorbancia con los promedios para cada nivel de concentración.

Tabla 15. Curva de calibración normal de 20 μgml^{-1} a 400 μgml^{-1}

Concentración de Ketoconazol (μgml^{-1})	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio
20	0.0034	0.0034	0.0031	0.0033
50	0.0083	0.0081	0.0083	0.0082
100	0.0161	0.0157	0.0159	0.0159
150	0.0238	0.0248	0.0245	0.0243
200	0.0314	0.0317	0.0315	0.0315
250	0.0392	0.0397	0.0402	0.0397
300	0.0472	0.0476	0.0471	0.0473
350	0.0543	0.0520	0.0557	0.0540
400	0.0615	0.0637	0.0636	0.0629

A continuación, en la **Tabla 16**, se muestran los parámetros de regresión de la linealidad.



Tabla 16. Parámetro de regresión lineal

Pendiente(b)	Intercepto(a)	S _b	S _a	r ²
0.0002	0.0005	1.21x10 ⁻⁰⁶	0.0003	0.9996

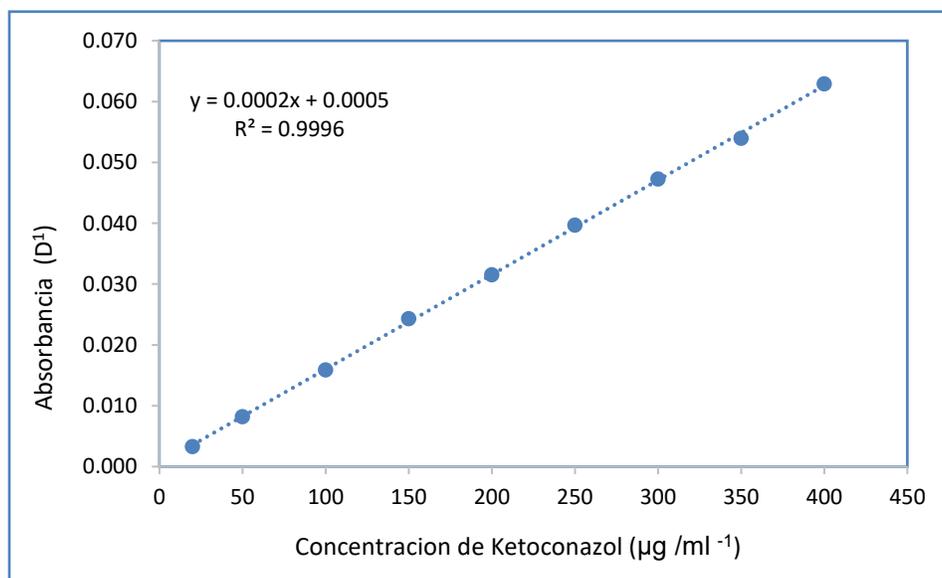


Figura 10. Curva de calibración normal de Ketoconazol de 20 µgml⁻¹ a 400 µgml⁻¹.

Para que la curva de calibración de un resultado sea confiable el r^2 debe ser lo más cercano a la unidad, en la **Figura 10** se muestra el rango de concentraciones, la concentración mínima corresponde a 20 µgml⁻¹ y la concentración máxima a 400 µgml⁻¹, en el cual se obtuvo un coeficiente r^2 de 0.9996, esto demuestra que existe una adecuada correlación entre la variable independiente (Concentración) y la variable dependiente (Absorbancia).

Para verificar la **linealidad** se realizó un test de Hipótesis para la Correlación.

- a) Se hizo el planteamiento de la hipótesis.



H₀= No existe correlación entre los Valores X y Y: $t_{\text{Cal}} < t_{\text{tabla}}$

H₁= Existe correlación entre los Valores X y Y: $t_{\text{Cal}} > t_{\text{tabla}}$

b) El estadístico de prueba se determinó por medio de la **Ecuación 3**:

$$t_r = \frac{|r| \times \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{Para } t_{\text{tabla}} = t_{n-2}, 0.05 \text{ (tabla dos colas).} \quad (3)$$

Donde:

n= Número de puntos de la curva de calibración.

r= Coeficiente de correlación.

$$\text{Entonces } t_r = \frac{|r| \times \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} = \frac{0.9998 \times \sqrt{9-2}}{\sqrt{1-0.9996^2}} = 132.2$$

c) El valor es calculado por t_{tabla} a dos colas para un nivel de significancia de 0.05 y $n-2$ ($9-2 = 7$) el grado de libertad es igual a 2.365. Los resultados obtenidos, se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Test de Hipótesis para la Correlación

t_r	t_{tabla}	N	Resultado
132.2	2.365	9	$t_r > t_{\text{tabla}}$, se acepta H_1 Tiene una adecuada Correlación lineal

d) Como $t_{\text{Cal}} > t_{\text{tabla}}$ ($132.2 > 2.365$), entonces la correlación entre la señal analítica y la variación de concentración es significativa, es decir que la Linealidad es adecuada.



Se realizó un **test estadístico a la pendiente** siguiendo lo establecido para verificar que la pendiente y la linealidad son adecuadas, por lo tanto, se establece la siguiente hipótesis (DOC-ONA-12-011, 2012).

H₀= La pendiente y la linealidad son adecuada: $t_{cal} > t_{tabla}$

H₁= La pendiente y la linealidad no son adecuada: $t_{cal} < t_{tabla}$

El estadístico de prueba se determinó por medio de la **Ecuación 4**:

$$t_{cal} = \frac{|b|}{S_b} \quad \text{Para } t_{tabla} = t_{n-2}, 0.05 \text{ (tabla dos colas)}. \quad (4)$$

Dónde:

b= Pendiente y **S_b**= Desviación estándar de la pendiente.

$$t_{cal} = \frac{|0.0002|}{1.21 \times 10^{-06}} = 165.28$$

Los resultados obtenidos, se muestran en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Verificación de la pendiente

T CALCULADO	T TABLA	RESULTADO
165.28	2.365	T Calculado > T Tabla , se acepta H₀ La pendiente y la Linealidad son adecuadas



Se realizó un **test estadístico al intercepto** siguiendo lo establecido, la señal analítica no es significativo y que la linealidad es válida, por lo tanto, se establece la siguiente hipótesis (DOC-ONA-12-011, 2012).

H₀= La señal analítica no es significativo y la linealidad es válida: $t_{cal} < t_{tabla}$

H₁= La señal analítica es significativo y la linealidad no es válida: $t_{cal} > t_{tabla}$

El estadístico de prueba se determinó por medio de la **Ecuación 5**:

$$t_{cal} = \frac{|a|}{S_a} \quad \text{Para } t_{tabla} = t_{n-2}, 0.05 \text{ (tabla dos colas)} \quad (5)$$

Dónde:

a= Intercepto y **S_a** = Desviación estándar del intercepto.

$$t_{cal} = \frac{|0.0005|}{0.0003} = 1.67$$

Los resultados obtenidos, se muestran en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Test de verificación del intercepto

T CALCULADO	T TABLA	RESULTADO
1.67	2.365	T Calculado < T Tabla, se acepta H₀, la señal analítica no es significativo y la linealidad es válida.



8.2.2. Evaluación de la precisión

La precisión, se evaluó como repetibilidad, durante 3 días diferentes, se utilizaron 3 niveles de concentración de Ketoconazol equivalente a un nivel bajo de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$, un nivel medio de $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ y un nivel alto de $250 \mu\text{g ml}^{-1}$. Se realizó el barrido espectral de 230 nm a 310 nm, posteriormente, se obtuvo el espectro de la primera derivada para cada nivel de concentración con una amplitud de $\Delta\lambda = 2$.

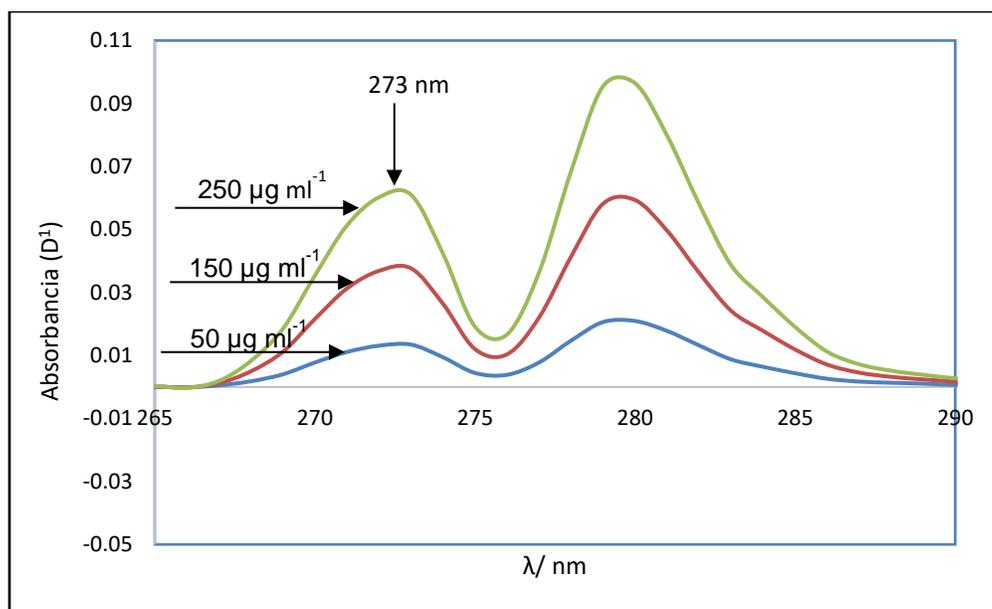


Figura 11. Espectros de la primera derivada de Ketoconazol de los 3 niveles de concentración de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$, $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $250 \mu\text{g ml}^{-1}$.

La **Figura 11** contiene los espectros de la primera derivada (D^1) de Ketoconazol de los 3 niveles de concentración, nivel bajo, nivel medio y nivel alto, se efectuaron en condiciones de repetibilidad a $\lambda_{\text{máx}} = 273 \text{ nm}$.

Se calculó el % CV con los 3 niveles de concentración, nivel bajo de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$, nivel medio $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ y nivel alto $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ para compararse con el criterio establecido. Se analizaron 5 réplicas por cada nivel de concentración por el mismo analista y en las mismas condiciones de trabajo.



El criterio de aceptación: % CV = $\leq 5.0\%$ (DOC-ONA-12-011, 2012). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 20, 21 y 22**.

Tabla 20. Repetibilidad obtenida del Nivel bajo $50 \mu\text{gml}^{-1}$

Réplicas	Día 1	Día 2	Día 3
1	0.0081	0.0131	0.0126
2	0.0080	0.0135	0.0126
3	0.0082	0.0135	0.0125
4	0.0080	0.0135	0.0126
5	0.0081	0.0135	0.0126
Promedio	0.0081	0.0134	0.0125
Des. (S)	8.22×10^{-05}	1.86×10^{-04}	2.24×10^{-05}
CV %	1.02	1.39	0.18

Como se puede observar en la **Tabla 20** los valores de coeficiente de variación %, obtenidos, son menores al criterio de aceptación de 5%, eso demuestra que el método presenta una adecuada precisión.

Tabla 21. Repetibilidad obtenida del nivel medio $150 \mu\text{gml}^{-1}$

Réplicas	Día 1	Día 2	Día 3
1	0.0239	0.0378	0.0379
2	0.0241	0.0377	0.0381
3	0.0240	0.0376	0.0379
4	0.0241	0.0380	0.0379
5	0.0239	0.0379	0.0380
Promedio	0.0240	0.0378	0.0380
Des. (S)	9.08×10^{-05}	1.60×10^{-04}	9.35×10^{-05}
CV %	0.38	0.42	0.25



Como se puede observar en la **Tabla 21** los valores de coeficiente de variación %, obtenidos son menores al criterio de aceptación de 5% eso demuestra que el método presenta una adecuada precisión.

Tabla 22. Repetibilidad obtenida del nivel alto 250 µgml⁻¹

Réplicas	Día 1	Día 2	Día 3
1	0.0402	0.0618	0.0585
2	0.0399	0.0611	0.0582
3	0.0391	0.0606	0.0584
4	0.0400	0.0614	0.0609
5	0.0387	0.0618	0.0625
Promedio	0.0396	0.0613	0.0597
Des. (S)	6.44x10 ⁻⁰⁴	5.03x10 ⁻⁰⁴	1.93x 10 ⁻⁰³
CV %	1.63	0.82	3.24

Como se puede observar en la **Tabla 22** los valores de coeficiente de variación % son menores al criterio de aceptación de 5% eso demuestra que el método presenta una adecuada precisión.

8.2.3. Evaluación de la exactitud

La exactitud, se evaluó por medio del porcentaje de recuperación para muestras sin fortificar del principio activo en tabletas de Ketoconazol, manteniendo la concentración, a 150 µgml⁻¹, seguidamente, se realizó el barrido espectral de 230 nm a 310 nm éste se llevó a cabo por triplicado. La primera derivada se realizó con una amplitud de $\Delta\lambda = 2$.

En la **Figura 12**, se puede observar los espectros de la primera derivada (D¹) para las muestras sin fortificar, la medición de las absorbancias se realizó a la longitud de onda de máxima absorbancia ($\lambda_{m\acute{a}x}$) = 273 nm.

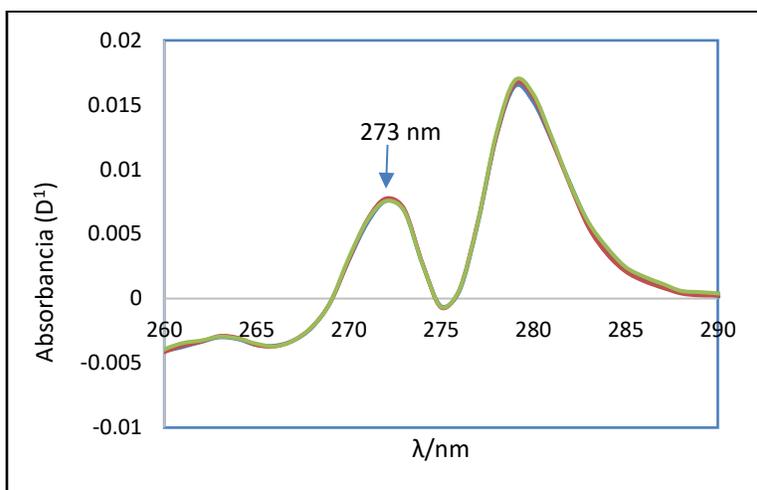


Figura 12. Espectros de la primera derivada de recuperación sin fortificar de Ketoconazol.

A continuación, se realizó la fortificación de las muestras con el principio activo en tabletas de Ketoconazol, manteniendo la concentración a $150 \mu\text{gml}^{-1}$, seguidamente, se realizó el barrido espectral de 230 nm a 310 nm, éste se llevó a cabo por triplicado. La primera derivada se realizó con una amplitud de $\Delta\lambda = 2$.

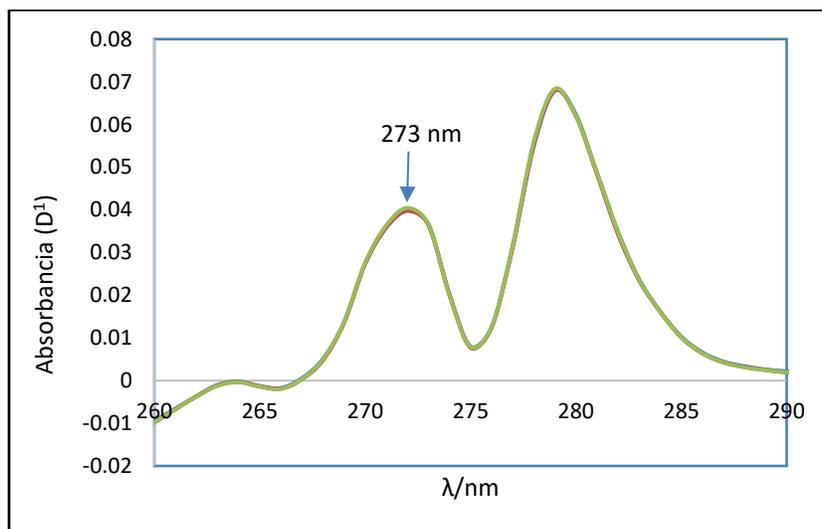


Figura 13. Espectros de la derivada de recuperación fortificada de Ketoconazol.



En la **Figura 13**, se puede observar los espectros de la primera derivada de las muestras fortificadas, las mediciones de absorbancia se realizaron a la longitud de onda de máxima absorbancia ($\lambda_{\text{máx}}$) = 273 nm.

El porcentaje de recuperación fue calculada por medio de la **Ecuación 6**

$$\%R = \left(\frac{C_{MA} - C_M}{C_A} \right) \times 100 \quad (6)$$

Donde:

C_{MA}: Es la concentración de la muestra fortificada con el principio activo en tabletas.

C_M: Es la concentración de la muestra sin fortificar del principio activo en tableta.

C_A: Es la concentración del principio activo adicionado.

A continuación, en la **Tabla 23**, se muestra los porcentajes de recuperación obtenido para el Ketoconazol.

Tabla 23. Resultados de los porcentajes de recuperación para el Ketoconazol 150 μgml^{-1}

Réplicas	C _M en μgml^{-1}	C _{MA} en μgml^{-1}	C _{MA} - C _M en μgml^{-1}	C _A en μgml^{-1}	% Recuperación
1	39.5	197	160	150	105
2	39.5	196.5	160	150	104
3	39	197.5	160	150	105
Promedio					105

Como se puede observar, el valor promedio del % de recuperación obtenido de Ketoconazol es de 105 %, dicho resultado se encuentra dentro el rango establecido



80 % y 110 %, eso demuestra que el método propuesto posee la exactitud necesaria para considerarlo adecuado.

8.2.4. Límite de Detección

Con el propósito de evaluar el límite de detección, se realizó una curva de calibración normal, durante 3 días consecutivos, se utilizaron 4 niveles de concentraciones diluidas, estas se prepararon en el rango de $5 \mu\text{gml}^{-1}$ a $20 \mu\text{gml}^{-1}$, seguidamente, se realizó el barrido espectral de 230 nm a 310 nm. La primera derivada se realizó con una amplitud de $\Delta\lambda = 2$.

En la **Tabla 24**, se muestran los niveles de concentración de la curva, así como su absorbancia con los promedios para cada nivel de concentración.

Tabla 24. Curva de calibración normal diluida de $5 \mu\text{gml}^{-1}$ a $20 \mu\text{gml}^{-1}$

Concentración de Ketoconazol ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio
5	0.0018	0.0019	0.0018	0.0018
10	0.0031	0.0029	0.0031	0.0030
15	0.0038	0.0039	0.0039	0.0038
20	0.0052	0.0052	0.0052	0.0052

A continuación, en la **Tabla 25**, se muestran los parámetros de regresión

Tabla 25. Parámetros de regresión lineal

Pendiente(b)	Intercepto(a)	S_b	S_a
0.0002	0.0007	1.34×10^{-05}	0.00018



El límite de detección es determinado a partir de la curva de calibración promedio, utilizando los parámetros de regresión lineal, tomando el valor de Pendiente (**b**) y el valor de Desviación estándar del intercepto (**S_a**), los cuales se muestran en la **Tabla 25**.

El límite de detección, se calculó multiplicando 3.29 veces la desviación estándar del intercepto y dividiendo sobre la pendiente, aplicando la **Ecuación 7**.

$$LD = \frac{3.29 \times S_a}{b} = \frac{3.29 \times 0.00018}{0.0002} = 2.96 \quad (7)$$

La cantidad mínima que puede ser detectada por el método desarrollado para la determinación de Ketoconazol, se muestra en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Límite de detección

L.D.	Ketoconazol	Unidades
Límite de detección	2.96	µgml ⁻¹

8.2.5. Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación es determinado a partir de la curva de calibración promedio, utilizando los parámetros de regresión tomando el valor de Pendiente (**b**) y el valor de la Desviación estándar del intercepto (**S_a**), los cuales se muestran en la **Tabla 25**.

Para el caso de límite de cuantificación, se calculó multiplicando 10 veces la desviación del intercepto entre la pendiente aplicando la **Ecuación 8**.



$$LC = \frac{10 \times S_a}{b} = \frac{10 \times 0.00018}{0.0002} = 9 \quad (8)$$

La cantidad mínima que puede ser cuantificada por el método desarrollado para la determinación de Ketoconazol, se muestra en la **Tabla 27**.

Tabla 27. Límite de Cuantificación

L.C	Ketoconazol	Unidades
Límite de Cuantificación	9	μgml^{-1} .

8.2.6. Evaluación del rango de trabajo

El rango de trabajo para Ketoconazol es determinado a partir del Límite de Cuantificación (LC) y el nivel más alto de concentración de la curva de calibración normal, en el cual se ha demostrado que existe una adecuada correlación lineal, el rango de trabajo se puede apreciar en la **Tabla 28**.

Tabla 28. Tabla del rango de trabajo

R.T	Ketoconazol	Unidades
Rango de Trabajo	9 a 400	μgml^{-1} .



8.3. Comprobación del cumplimiento de contenido del principio activo en tabletas de Ketoconazol con respecto las indicaciones de la USP30/NF25

De acuerdo con lo establecido en la USP30/NF25 (2007), las tabletas de Ketoconazol deben contener no menos de 90.0% y no más de 110.0% de la cantidad declarada de Ketoconazol $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$.

El método desarrollado se aplicó en la evaluación de la calidad de las tabletas que fueron adquirida en el mercado local, se encontraron formulaciones conteniendo 200 mg del principio activo de Ketoconazol.

Con el propósito de evaluar el contenido de principio activo declarado en las tabletas, se prepararon soluciones de valoración o prueba de aproximadamente a $150 \mu\text{gml}^{-1}$, tomando como base de cálculo la cantidad de principio activo indicado en dicha tableta. En la **Figura 14**, se muestra el procedimiento que se siguió para la preparación de la solución de valoración o prueba.

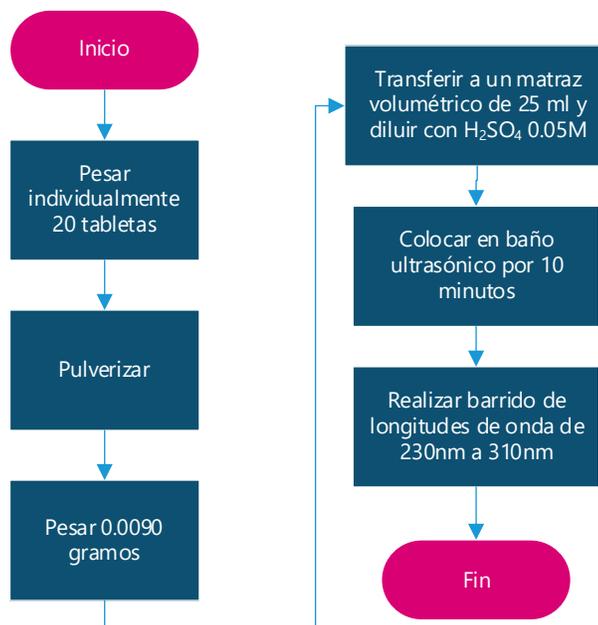


Figura 14. Procedimiento para la determinación de Ketoconazol en tabletas.



Se realizó el barrido espectral para cada uno de los experimentos en el rango de longitudes de onda de 230 nm a 310 nm, se obtuvo el espectro de la primera derivada con una amplitud de $\Delta\lambda = 2$.

La concentración de la solución de valoración o prueba fue calculada por medio de la **Ecuación 9**.

$$C_p = \left(\frac{X_1 \cdot X_2 \cdot X_3}{X_4 \cdot X_5} \right) \quad (9)$$

Donde:

C_p: Es la concentración de la solución de valoración o prueba.

X₁: Es la masa de la muestra en gramos.

X₂: Es la cantidad en miligramos de principio activo declarada en la tableta.

X₃: Factor de 1000 para convertir de miligramos a microgramos.

X₄: Es el volumen de solución de la muestra en mililitros.

X₅: Es el peso promedio de las 20 tabletas pulverizadas.

La cuantificación del contenido de principio activo en la solución de valoración, se llevó a cabo por medio de la curva de calibración normal de Ketoconazol, de acuerdo con la **Ecuación 10**.

$$C_x = \left(\frac{A - a}{b} \right) \quad (10)$$



Donde:

C_x: Es la concentración de principio activo en μgml^{-1} encontrado en la solución de valoración o prueba.

A: Es la absorbancia obtenida del espectro de la primera derivada de la solución de valoración o prueba.

a: Es el intercepto de la curva de calibración normal.

b: Es la pendiente de la curva de calibración normal.

A continuación, en la **Tabla 29**, se muestran los resultados obtenidos para la solución de valoración o prueba del Ketoconazol.

Tabla 29. Resultados obtenidos para la evaluación de la tableta #1 de Ketoconazol

Replicas	Concentración de la solución de prueba (μgml^{-1})	Concentración encontrada (μgml^{-1})	Porcentaje %	Criterio de aceptación %	Cumplimiento
1	143	140.79	98.45	90 a 110	Cumple
2	143	142.07	99.35	90 a 110	Cumple
3	143	142.07	99.35	90 a 110	Cumple

Como se puede observar en la **Tabla 29**, la tableta de Ketoconazol sometida a valoración cumple con lo indicado en la USP30/NF25 (2007)



Tabla 30. Resultado obtenido para la evaluación de la tableta #2 de Ketoconazol

Replicas	Concentración de la solución de prueba (μgml^{-1})	Concentración encontrada (μgml^{-1})	Porcentaje %	Criterio de aceptación %	Cumplimiento
1	143	154.62	108.13	90 a 110	Cumple
2	143	155.91	109.03	90 a 110	Cumple
3	143	155.27	108.58	90 a 110	Cumple

Como se puede observar en la **Tabla 30**, la tableta de Ketoconazol sometida a valoración cumple con lo indicado en la USP30/NF25 (2007)



9. Conclusión

Se ha logrado el desarrollo de un método para la determinación de Ketoconazol en tabletas.

El disolvente H_2SO_4 0.05 M, demostró ser adecuado para la determinación de Ketoconazol en tabletas.

De acuerdo con los parámetros de validación evaluados el método desarrollado es apto para la determinación de Ketoconazol en tabletas, en un adecuado rango de aplicación.

El método desarrollado se aplicó sin ningún inconveniente para la determinación de Ketoconazol en tabletas, los resultados obtenidos indican que cumplen con la USP30/NF25, en cuanto al contenido de este principio activo.



10. Recomendaciones

Luego de concluido el presente trabajo, se recomienda lo siguiente:

- Evaluar la reproducibilidad.
- Evaluar la robustez.
- Evaluar la incertidumbre asociada a la medición.
- Evaluar la veracidad.
- Aplicar el método desarrollado para la valoración de la calidad de otras presentaciones de Ketoconazol, tales como cremas, óvulos y shampoo disponibles en el mercado nacional.



11. Bibliografía

- Dalmau, J., Peramiquel, L., Róe, E., & Puig, L. (2005). Micosis Superficiales. *ELservir*, 19(3), 80–83. <https://www.elsevier.es/es- Las micosis superficiales>
- Diaz, N. A., Bárcela, J. A., Fernández, E., Aurora, G., Jorrín, J., Peinado, J., & Toribio, F. (2004). Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. In *SAE Technical Papers* (pp. 1–8). <https://doi.org/10.4271/841496>
- DOC-ONA-12-011. (2012). *Política para la validación de métodos de laboratorios de ensayos y calibración* (p. 49). Oficina Nacional de Acreditación.
- El-Ragehy, N. A., & El-Saharty, Y. S. (2001). Investigation of ketoconazole copper(II) and cobalt(II) complexes and their spectrophotometric applications. *Journal of AOAC International*, 84(2), 563–568. <https://doi.org/10.1093/jaoac/84.2.563>
- Eurachem. (2014). *Guia Eurachem: La adecuación al uso de los Metodos Analíticos - Una guia de laboratorio para Validacion de Metodos y temas relacionados*. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961117>
- Farhadi, K., & Maleki, R. (2001). A new spectrophotometric method for the determination of ketoconazole based on the oxidation reactions. *Science*, 17, 867–870. <https://doi.org/10.1126/science.104.2712.602>
- Fraihat, S. M., & Bahgat, K. M. (2014). Spectrophotometric methods for the determination of ketoconazole in pharmaceutical dosage forms. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(9), 1511–1514. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i9.18>
- Fraihat, Safwan M. (2014). A sequential injection system determination of ketoconazole for. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 8(03), 232–239.
- Gordon, L. (2000). Monitorización de fármacos: Una necesidad social en la provincia



de Camagüey. *Scielo*, 4(4), 1–12.

Gupta, A., & Lyons, D. (2015). *The Rise and Fall of Oral Ketoconazole*. *J Cutan Med Surg*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25775613/>

ICH. (2006). *ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (p. 15). European Medicines Agency. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00861-7>

Karpińska, J. (2004). Derivative spectrophotometry - Recent applications and directions of developments. *Elsevier*, 64(4), 801–822. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.03.060>

López de Alba, P. ., & López Martínez, L. (1992). *Una introducción a la espectrofotometría derivada*. 4(3), 12.

Mabrouk, M. M., Hammad, S. F., El-fatatry, H. M., & El-malla, S. F. (2015). Spectroscopic Methods for Determination of Dexketoprofen Trometamol and Spectroscopic Methods for Determination of Dexketoprofen Trometamol and Tramadol HCl. *Spreading Knowledge*, March.

Maldonado Cubas, J., Casañas Pimentel, R., Martínez Merlín, I., & San Martín Martínez, E. (2018). La espectroscopia UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama. *Latin-American Journal of Physics Education*, 12(2), 2307–2312.

Méndez-Tovar, L. J. (2008). IV. Las micosis sistémicas en México. *Gaceta Medica de Mexico*, 144(2), 128–130.

Naveed, S., & Jaweed, L. (2014). UV spectrophotometric assay of Ketoconazole oral formulations. *American Journal of Biology and Life Sciences*, 2(5), 108–111.

Popovska, O., Rafajlovska, V., & Kavrakovski, Z. (2013). A Review: Current Analytical Methods for Determination of Ketoconazole in IJPI ' s Journal of Analytical Chemistry. *Journal of Analytical Chemistry*, 1003(June 2015), 15.



- Rane, S. S., & Padmaja, P. (2012). Spectrophotometric method for the determination of ketoconazole based on amplification reactions. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2(1), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2011.10.004>
- Shrivastava, S., Shrivastava, S., & Tiwle, R. (2020). Validation of novel UV Spectrophotometric method for the determination of Ketoconazole in Pharmaceutical Formulation. *Journal of Pharmaceutical Advance Research*, 3(2), 792–798. <https://www.researchgate.net/publication/341098956>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principio de Analisis Instrumental* (Quinta Edi). Mc Graw Hill.
- Skoog, D., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *principios de analisis instrumental* (Sexta edic). CENGAGE.
- Tixe, A. M. (2013). *Validación de Método para el análisis de Metales en diferentes Matrices por Epectrofotometría*.
- Toral, M. I., Muñoz, M., & Orellana, S. (2005). Estrategias en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación stmultánea de compuestos orgánicos por espectrofotometría derivada. *Journal of Chromatography. B*, 88(2), 255–261.
- USP30/ NF25, 2007. (2007). In *Farmacopea de los Estados Unidos de América: Formulario Nacional* (Vol. 3, p. 1464). The United Stated Pharmacopeial Convention.



12. Anexos



Espectrofotómetro Génesis 10S UV-VIS



Balanza analítica Sartorius
GMBH gottingen (AC210S), $d = 0.001g$



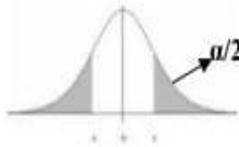
El baño ultrasónico selecta



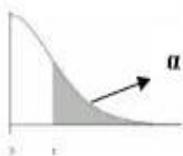
Estandares de Ketoconazol



Tabla de valores críticos de la distribución t de Student



	Niveles de Significancia DOS COLA								
	0.500	0.250	0.200	0.100	0.050	0.025	0.020	0.010	0.005
1	1.00	2.41	3.08	6.31	12.71	25.45	31.82	63.66	127.32
2	0.82	1.60	1.89	2.92	4.30	6.21	6.96	9.92	14.09
3	0.76	1.42	1.64	2.35	3.18	4.18	4.54	5.84	7.45
4	0.74	1.34	1.53	2.13	2.78	3.50	3.75	4.60	5.60
5	0.73	1.30	1.48	2.02	2.57	3.16	3.36	4.03	4.77
6	0.72	1.27	1.44	1.94	2.45	2.97	3.14	3.71	4.32
7	0.71	1.25	1.41	1.89	2.36	2.84	3.00	3.50	4.03
8	0.71	1.24	1.40	1.86	2.31	2.75	2.90	3.36	3.83
9	0.70	1.23	1.38	1.83	2.26	2.69	2.82	3.25	3.69
10	0.70	1.22	1.37	1.81	2.23	2.63	2.76	3.17	3.58
11	0.70	1.21	1.36	1.80	2.20	2.59	2.72	3.11	3.50
12	0.70	1.21	1.36	1.78	2.18	2.56	2.68	3.05	3.43
13	0.69	1.20	1.35	1.77	2.16	2.53	2.65	3.01	3.37
14	0.69	1.20	1.35	1.76	2.14	2.51	2.62	2.98	3.33
15	0.69	1.20	1.34	1.75	2.13	2.49	2.60	2.95	3.29
16	0.69	1.19	1.34	1.75	2.12	2.47	2.58	2.92	3.25
17	0.69	1.19	1.33	1.74	2.11	2.46	2.57	2.90	3.22
18	0.69	1.19	1.33	1.73	2.10	2.45	2.55	2.88	3.20
19	0.69	1.19	1.33	1.73	2.09	2.43	2.54	2.86	3.17
20	0.69	1.18	1.33	1.72	2.09	2.42	2.53	2.85	3.15
21	0.69	1.18	1.32	1.72	2.08	2.41	2.52	2.83	3.14
22	0.69	1.18	1.32	1.72	2.07	2.41	2.51	2.82	3.12
23	0.69	1.18	1.32	1.71	2.07	2.40	2.50	2.81	3.10
24	0.68	1.18	1.32	1.71	2.06	2.39	2.49	2.80	3.09
25	0.68	1.18	1.32	1.71	2.06	2.38	2.49	2.79	3.08
26	0.68	1.18	1.31	1.71	2.06	2.38	2.48	2.78	3.07
27	0.68	1.18	1.31	1.70	2.05	2.37	2.47	2.77	3.06
28	0.68	1.17	1.31	1.70	2.05	2.37	2.47	2.76	3.05
29	0.68	1.17	1.31	1.70	2.05	2.36	2.46	2.76	3.04
30	0.68	1.17	1.31	1.70	2.04	2.36	2.46	2.75	3.03
31	0.68	1.17	1.31	1.70	2.04	2.36	2.45	2.74	3.02
32	0.68	1.17	1.31	1.69	2.04	2.35	2.45	2.74	3.01
33	0.68	1.17	1.31	1.69	2.03	2.35	2.44	2.73	3.01
34	0.68	1.17	1.31	1.69	2.03	2.35	2.44	2.73	3.00
35	0.68	1.17	1.31	1.69	2.03	2.34	2.44	2.72	3.00
36	0.68	1.17	1.31	1.69	2.03	2.34	2.43	2.72	2.99
37	0.68	1.17	1.30	1.69	2.03	2.34	2.43	2.72	2.99
38	0.68	1.17	1.30	1.69	2.02	2.33	2.43	2.71	2.98
39	0.68	1.17	1.30	1.68	2.02	2.33	2.43	2.71	2.98
40	0.68	1.17	1.30	1.68	2.02	2.33	2.42	2.70	2.97



	0.250	0.125	0.100	0.050	0.025	0.013	0.010	0.005	0.003
	Niveles de Significancia UNA COLA								

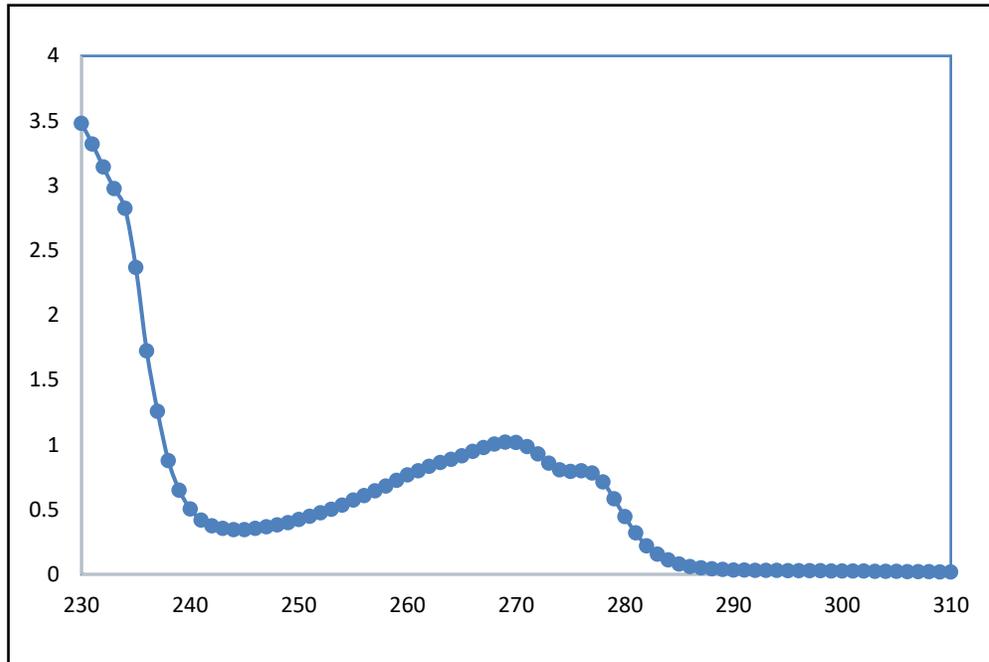


Figura 15. Gráfica del espectro de orden cero.

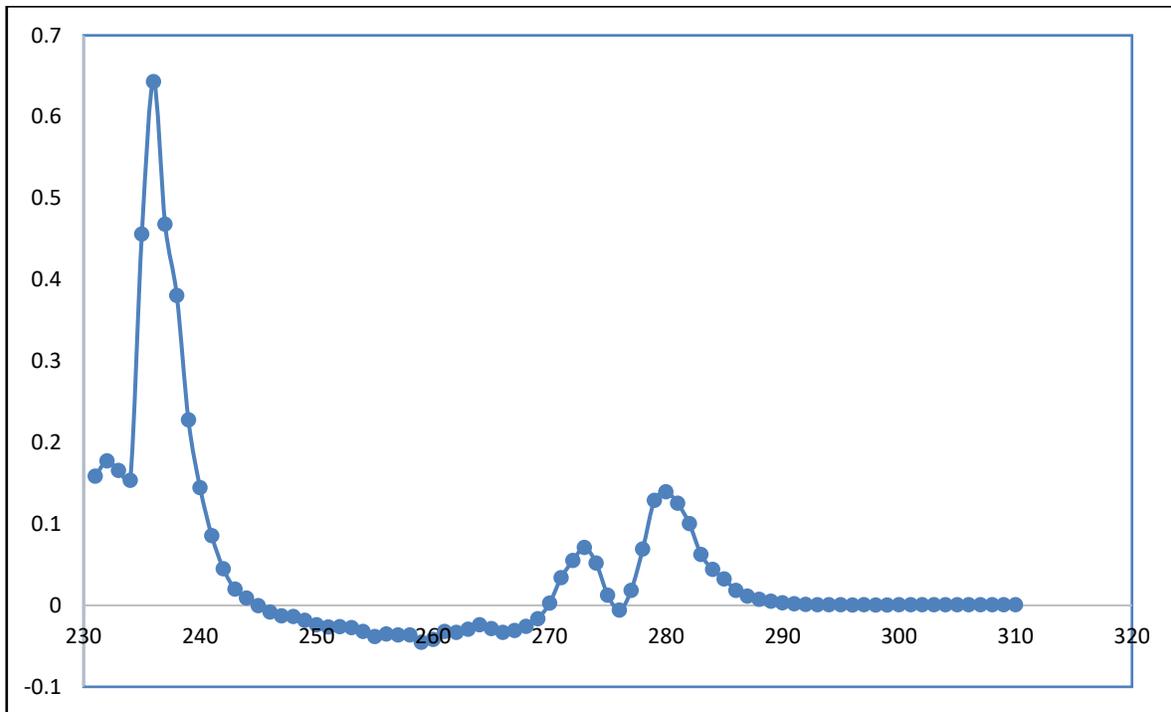


Figura 16. Gráfica del espectro de la primera derivada.