



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Innovación de un Método Analítico para la
Cuantificación de Taninos en una Formulación
Magistral para un Enjuague Bucal de Extracto de
Encino.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

PRESENTA:

CARLOS HIRAM CAMACHO HUERTA.

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. DOMITILA BURGOS JARA

MÉXICO D.F.

2012

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, quienes a lo largo de todo este tiempo me ofrecieron su apoyo incondicional. Apoyándome en todo momento sin importar las circunstancias, haciendo esto posible.

A mis compañeros y profesores quienes a lo largo de mis estudios contribuyeron a mi formación académica y personal, por estar siempre ahí para ayudarme a crecer como profesional.

A mi pareja por ayudarme a superar todo obstáculo, pero sobre todo por estar a mi lado a lo largo de todos estos años.

GRACIAS

ÌNDICE

	Pag.
SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	2
1. MARCO TEORICO	4
1.1 Innovación Farmacéutica.	4
1.2 La Industria Farmacéutica.	6
1.3 Forma Farmacéutica.	9
1.3.1 Definición de forma farmacéutica.	9
1.3.2 Colutorio.	9
1.3.2.1 Ventajas y desventajas.	10
1.3.2.2 Componentes.	12
1.3.2.3 Método de fabricación	13
1.4 Extracto de Encino.	14
1.4.1 Nombre Científico.	14
1.4.2 Fuente de Extracción.	14
1.4.3 Composición Química.	15
1.4.4 Acciones Farmacológicas.	16
1.4.4.1. Actividad Astringente.	16
1.4.4.2 Otros.	16
1.4.5 Efectos Tóxicos.	16
1.4.6. Estatus Legal.	16
1.4.7 Usos Etnomedicinales	16
1.5 Control de Calidad.	17
1.6 Validación.	21
1.6.1 Parámetros de Validación.	22
1.6.1.1. Especificidad.	23
1.6.1.2. Precisión del Sistema.	24
1.6.1.3. Linealidad del Sistema.	24
1.6.1.4. Exactitud del Método.	24
1.6.1.5. Linealidad del Método.	25
1.6.1.6. Precisión del Método.	26
1.6.1.7. Robustez.	26
1.6.1.8. Estabilidad Analítica de la Muestra.	26
1.7 Espectrofotometría.	27
1.7.1. Colorimetría.	28
1.7.1.1 Ventajas y Desventajas.	28
1.7.2 Ley de Beer.	29
1.7.3 Instrumentos de Medición.	29
1.8 Cromatografía en capa fina.	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	34

3. OBJETIVO GENERAL.	35
3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	35
4. HIPÒTESIS	36
5. METODO	37
5.1 Material.	38
5.2 Equipo.	38
5.3 Instrumentos.	38
5.4 Sustancias de referencia.	38
5.5 Reactivos analíticos.	39
5.6 Soluciones.	39
5.7 Diagrama de bloques de la validación del método analítico desarrollado.	40
5.8 Innovación del Método Analítico.	41
5.9 Descripción del método analítico desarrollado.	42
6. RESULTADOS	48
6.1 Control de calidad de la Benzocaina.	48
6.2 Control de Calidad Fenol.	49
6.3 Control de Calidad Extracto de Encino.	50
6.4 Resultados de validación.	52
6.4.1. Métodos evaluados.	52
6.5 Sistemas de Elusión Evaluados y respuesta analítica obtenida.	52
6.6 Pruebas de desempeño evaluadas.	69
6.6.1 Especificidad.	69
6.6.2 Precisión del sistema.	71
6.6.3 Linealidad del sistema.	72
6.6.4 Exactitud del método.	73
6.6.5 Linealidad del método.	73
6.6.6 Precisión intermedia del método.	74
6.6.7 Estabilidad analítica de la muestra.	75
6.6.8 Tolerancia del método.	75
6.6.9 Robustez.	76
6.7 Resumen de los parámetros de validación evaluados.	77
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	80
8. CONCLUSIONES	83
9. RECOMENDACIONES	84
10. ANEXOS	85
11. REFERENCIAS	95

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

g	gramos	Σ	sumatoria
h	horas	S	desviación estándar
mL	mililitro	\bar{Y}	promedio de las muestras
nm	nanómetro	n	número de muestras
r²	coeficiente de correlación	λ	longitud de onda
CV	coeficiente de variación	mg	miligramos
m	pendiente	α	coeficiente de absortividad molar
b	ordenada al origen		
IC	intervalo de confianza		
ICm	intervalo de confianza de la pendiente		
ICb	intervalo de confianza de la ordenada al origen		
%R	porcentaje de recobro		

INTRODUCCIÒN

La Validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una formula farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, en donde se verifica que el método desarrollado cumple consistentemente para el propósito para el cual fue desarrollado, proporcionando resultados confiables.

De acuerdo a las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), así como las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), es necesario que todos los métodos analíticos empleados, estén debidamente validados.

En muchas ocasiones es necesario medir un componente específico en una muestra, para ello es necesario contar con un método de medición (método analítico). Por ello las empresas de transformación (principalmente farmacéuticas) requieren de este tipo de metodologías, pudiendo utilizar métodos farmacopeicos o bien dedicar tiempo para su desarrollo.¹

Por lo tanto la validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación deseada, esta actividad puede ser justificada por los siguientes aspectos:

El moral y ético; el profesional Farmacéutico es el responsable de los procesos farmacéuticos y por lo tanto de la calidad de estos, debido a que todo producto farmacéutico debe satisfacer requisitos y para ello se utilizan métodos para medir componentes específicos en el producto. Lo cual es llevado a cabo por métodos analíticos.

Aseguramiento de calidad; los métodos analíticos están definidos como un sistema de Aseguramiento de Calidad en una empresa farmacéutica, y que impactan de manera directa en la calidad del producto.

Económica; la carrera de muchas empresas por alcanzar una productividad elevada a costos menores esta determinada, entre otros factores, al dictamen del producto en el menor tiempo posible. Utilizando métodos de prueba a menor costo, mantenimiento o tiempo de análisis entre otros.

Por las razones anteriormente mencionadas innovar es una necesidad presente en la industria farmacéutica, ya que esto permite contar con metodologías mas eficaces, rápidas, confiables y seguras, lo cual significa un ahorro de tiempo y recursos, todo esto para garantizar que los productos fabricados cumplen con los requisitos establecidos por la ley.

Este trabajo tiene como finalidad llevar a cabo la modificación e innovación de un método analítico, destinado a la cuantificación de taninos en una formulación magistral para un enjuague bucal de extracto de encino, la cual fue desarrollada en la farmacia universitaria de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, así como el control de calidad de las materias primas utilizadas durante su fabricación y material de envase a utilizar, todo esto con la finalidad de cumplir con el objetivo establecido en las buenas prácticas de fabricación, el garantizar que el producto es apto para su uso.

1. MARCO TEÒRICO.

1.1. Innovación Farmacéutica

De acuerdo a su raíz etimológica latina. Innovación se puede definir como: Innovación: innovatio; renovato, instaurato, novatio, haciendo referencia a innovación, movere, instaurator, novator, novarum.¹

Innovar: renovare, resnovas, inducere, **mutare**.

Mutare: conversio, conversus, permutatio. Es decir, permuta, traslado, para este propósito de una aplicación a otra nueva.¹

De tal manera que para el propósito de este trabajo puede definirse la innovación como adaptar una metodología aplicada a un producto, en otro, con sus debidos cambios que proporcionen resultados satisfactorios.

La **innovación**, según el diccionario de la Real Academia Española, es la modificación de un producto, y su introducción en un mercado, a su vez define innovar como alterar algo, con la función muchas veces de mejorarlo¹. Un aspecto esencial de la innovación es su aplicación exitosa de forma comercial. No sólo hay que inventar algo, sino, por ejemplo, introducirlo y difundirlo en el mercado para que la gente pueda disfrutar de ello.¹

La innovación es el alma máter del progreso en atención de la salud. La ciencia de avanzada y la fuerte competencia en el sector privado originaron una revolución en nuevas tecnologías sanitarias.²⁹

La industria farmacéutica representa el 2.4% del PIB de la economía mexicana, lo que genera más de 78 mil 500 empleos directos de alta especialización y 330 mil empleos indirectos. Además de incentivar exportaciones por 2 mil 200 millones de dólares anualmente. Esto es un ejemplo de cómo la innovación farmacéutica trae consigo importantes beneficios tanto de salud, como sociales y económicos.²⁹

La innovación ligada a nuevas tecnologías médicas se ha convertido, por ende, en una fuente importante de ventaja competitiva, en especial en el campo emergente de las ciencias biológicas – un impulsor clave del crecimiento económico en el siglo 21.³⁰

La importancia de la innovación para la permanencia y crecimiento de las empresas, para el desarrollo de una nación e inclusive para el bienestar del individuo, es una realidad comprobada través de la historia. Los medicamentos representan una de las herramientas más valiosas con las que cuenta el ser humano para combatir problemas de salud; por lo tanto, cualquier intento de innovación para crear, mejorar o ampliar su utilidad deberá repercutir sin duda en beneficios para la humanidad.¹

Para describir un producto innovador este implica que tiene propiedades que son dignas de reconocimiento y recompensa. El término sugiere que el producto tiene un valor único. Sin embargo, las nociones de valor son una cuestión de perspectiva. El valor comercial, por ejemplo, generalmente se evalúan desde la perspectiva de la rentabilidad de una empresa.³⁰

Los productos farmacéuticos no tienen ningún valor intrínseco para los pacientes o para la sociedad, sino que su valor radica en la salud que generan. Los productos farmacéuticos tienen licencia para la venta sobre la base de si la dirección segura y eficaz de dicho producto farmacéutico atiende una necesidad para la salud, no porque los pacientes puedan tener preferencias relativas a su forma, color, sabor o marca.³⁰

Aunque las características como forma, color, sabor o marca pueden desempeñar un papel en la mejora de los resultados de salud – quizás por el aumento de la observancia del tratamiento – son las mejoras en los resultados de salud que generan valor para la sociedad.³⁰

Los avances farmacológicos en este tipo de medicamentos, representan avances significativos para el tratamiento de padecimientos específicos que traen mejoras significativas que podrían ser mayor comodidad en el consumo, menores efectos colaterales, rapidez de acción y efecto prolongado entre otros beneficios.³⁰

La percepción de valor para la sociedad de bienes ordinarios se define a menudo por las preferencias de los consumidores como se refleja en su disposición a pagar por los productos a los que se perciben como “buena relación calidad-precio.” Sin embargo, los productos farmacéuticos no son mercancías ordinarias.³¹

La innovación farmacéutica requiere novedad de eficacia. Las innovaciones farmacéuticas crean valor para la sociedad, por lo que permiten generar mejoras en la salud de los pacientes (neto de tratamiento de los riesgos) que anteriormente eran inalcanzables.³¹

Es la singularidad de tales mejoras de salud las que definen a las innovaciones farmacéuticas. Una nueva formulación puede ser considerada como una innovación farmacéutica únicamente si cumple o no satisfactoriamente con el propósito para la cual fue desarrollada.³¹

La innovación, el descubrimiento de nuevos fármacos que mejoren la terapéutica actual es la base, razón de ser, y futuro de la industria farmacéutica a nivel internacional. Al mismo tiempo la industria farmacéutica es una fuerza generadora de desarrollo económico y de cuya eficacia depende la competitividad de las empresas.³²

La innovación farmacéutica se produce generalmente por empresas e instituciones de investigación. La industria farmacéutica de los países industrializados – en su afán de superación constante- ha sido quien sin lugar a dudas, quien mayores aportaciones ha realizado para la innovación de medicamentos.¹

La innovación va de la mano con la mejora continua. La diferencia es que en la mejora continua se ven resultados a corto plazo, y los cambios son graduales, mientras que en la innovación se notan grandes cambios y se pueden ver resultados a mediano plazo. Mientras que la mejora continua es orientada al proceso, la innovación va orientada al resultado final.³²

La innovación de producto es una de las estrategias de empresa encaminada a ganar competitividad en el mercado bien mediante ahorros de costes de producción o distribución bien mediante éxitos comerciales (aumento de ventas, fidelización de clientes, aumento de cuota de mercado, etc.).³²

En el caso de los productos farmacéuticos, no cualquier empresa o país puede darse el lujo de realizar grandes descubrimientos, debido a la necesidad de una gran intensidad científica avanzada de diversas disciplinas y fundamentalmente de una inversión de sustancias. Sin embargo, la innovación no está restringida de forma alguna de la creación radical.¹

La profesión farmacéutica, ha realizado contribuciones recientes que cada vez abren más la potencialidad de innovación; sin embargo, es también una de las menos apreciadas.¹

1.2 La Industria Farmacéutica.

La industria farmacéutica surgió a partir de una serie de actividades diversas relacionadas con la obtención de sustancias utilizadas en medicina. A principios del siglo XIX, los boticarios, químicos o los propietarios de herbolarios obtenían partes secas de diversas plantas, recogidas localmente o en otros continentes. Estas últimas se compraban a los especieros, que fundamentalmente importaban especias, pero como negocio secundario también comerciaban con productos utilizados con fines medicinales, entre ellos el opio de Persia o la ipecacuana de Suramérica. Los productos químicos sencillos y los minerales se adquirirían a comerciantes de aceites y gomas.³³

Los boticarios y químicos fabricaban diversos preparados con estas sustancias, como extractos, tinturas, mezclas, lociones, pomadas o píldoras. Algunos profesionales elaboraban mayor cantidad de preparados de los que necesitaban para su propio uso y los vendían a granel a sus compañeros.³³

Las compañías farmacéuticas fueron creadas en diferentes países por empresarios o profesionales, en su mayoría antes de la II Guerra Mundial. Allen & Hambury y Wellcome, de Londres, Merck, de Darmstadt (Alemania), y las empresas norteamericanas Parke Davis, Warner Lambert y Smithkline & French fueron fundadas por farmacéuticos. La farmacia de Edimburgo que produjo el cloroformo utilizado por James Young Simpson para asistir en el parto a la reina Victoria también se convirtió en una importante empresa de suministro de fármacos. Algunas compañías surgieron a raíz de los comienzos de la industria química, como por ejemplo Zeneca en el Reino Unido, Rhône-Poulenc en Francia, Bayer y Höchst en Alemania o Hoffmann-La Roche, Ciba-Geigy y Sandoz (estas dos últimas más tarde

fusionadas para formar Novartis) en Suiza. La belga Janssen, la norteamericana Squibb y la francesa Roussell fueron fundadas por profesionales de la Medicina.³³

La moderna empresa farmacéutica de investigación se inició a partir de la Segunda Guerra Mundial. Durante esa época se vio favorecida principalmente debido a las necesidades surgidas, por desgracias, en aquel momento histórico. La introducción de los antibióticos en la década de los 40, fue seguida por una serie de afortunados hallazgos de moléculas de actividad farmacológica, incluyendo cardiovasculares, diuréticos, esteroides y agentes que actúan sobre el sistemas nervioso central.¹

Fue tal el grado de aparición de novedades quimioterapéuticas, que a esta época se llegó a conocer como “la época de oro del descubrimiento de fármacos”, pues solo en aquella breve temporada se llegaron a superar los logros totales de cuatro mil años en la historia previa de la medicina. Las grandes compañías actuales deben todavía su éxito actual, en buena medida, a los descubrimientos de esas 3 décadas, a partir de ese momento, la introducción en los mercados de nuevas entidades químicas ha sido, con honrosas excepciones, sólo de versiones más potentes o más seguras de lo entonces descubierto.¹

“La industria farmacéutica de hoy reconoce su responsabilidad social y trata de mantener sus productos dentro de las más estrictas normas de calidad”.¹

Por otro lado las necesidades de la tecnología moderna son cada vez mayores, no únicamente para incrementar la productividad, sino para satisfacer los estrictos estándares de calidad. Esta situación ha dejado, tanto a la pequeña como a la gran industria, con márgenes cada vez menores en sus utilidades y, en consecuencia, con pocas posibilidades de poder dedicar recursos a la investigación.¹

Innovar es un proceso que utiliza principalmente los frutos del avance científico o del progreso tecnológico, el cual origina un cambio en los productos, en los servicios o en las empresas en general.¹

En el contexto moderno, la innovación para la productividad requiere de un orden sorprendentemente alto de pensamiento creativo y analítico, para la adecuada utilización de los recursos técnicos y científicos. Su ejecución debe estar complementada con el ímpetu, energía, trabajo en equipo y habilidades administrativas para la adecuada motivación, definición, organización, planeación y control.¹

Por lo tanto la innovación es necesaria para toda empresa y, cuando está bien dirigida, resulta ser una inversión rentable y posible de realizarse de manera importante, aun con recursos limitados.¹

Algunos directivos están convencidos de que la innovación ofrece la fuente más importante de crecimiento para sus compañías, pues un factor indispensable para poder llenar las necesidades cambiantes de la sociedad. Ellos predicen que las novedades colaboran para penetrar, asegurar o incrementar su participación en el mercado en el cual compiten, o bien para establecer una participación en un mercado nuevo, de tal manera que son ellos los que obligan a los competidores a seguirlos, o quedar desplazados irremediamente. Reconocen también que las innovaciones permiten reducir el costo de productos directa o indirectamente y aumentan las características técnicas y cualitativas de estos, se obtiene la liquidez necesaria para la supervivencia de la firma, se utiliza la capacidad existente de mejor manera y se atribuye substancialmente a las utilidades, de tal forma que al final se obtienen ventajas competitivas sostenibles y les es posible pretender el liderazgo en la industria.¹

Razones para la innovación

- Mejora la relación con el cliente al presentarle nuevos beneficios.
- Permite nuevos argumentos de ventas.
- Aumenta el nivel de ventas al presionar sobre el índice de sustitución de producto.
- Mejora la imagen de empresa presentándola como activa y moderna.
- Establece barreras de entrada a la competencia.

Fuentes de innovación

- Por iniciativa del cliente o distribuidor. En ocasiones, es el propio cliente o distribuidor el que solicita un producto exclusivo que se puede llegar a fabricar, incluso, con su propia marca (véase marcas blancas).
- Por necesidad. Por ejemplo, para cumplir con la normativa vigente.
- Por iniciativa del departamento comercial o de marketing al detectar una nueva necesidad en el mercado o un nuevo nicho de venta.
- Por iniciativa del departamento de Investigación y Desarrollo.

De esta forma podemos concluir que para lograr que una innovación sea exitosa, no necesariamente se debe incorporar un cambio revolucionario en la función o el diseño de un producto, sino como se ha mencionado puede definirse a la innovación como la aplicación de una metodología establecida para un producto en otro con sus debidos cambios que proporcionen resultados confiables, debido bien a la falta de un método para el producto en cuestión, o bien para la simple mejora del ya existente. Tal es el caso del presente trabajo, en cual se modifica un método reportado en un artículo científico para cuantificar taninos en el vino, para aplicarse en un enjuague bucal de extracto hidroalcoholico de encino debido a la falta de una metodología analítica establecida para el producto en cuestión.¹

1.3 Forma Farmacéutica

1.3.1. Definición de forma Farmacéutica

De acuerdo con F.E.U.M. 9ª edición, una forma farmacéutica es la mezcla de uno o mas fármacos, con o sin aditivos, que presentan características físicas propias para su dosificación y administración.

1.3.2 Colutorio

Los colutorios son soluciones acuosas que con frecuencia contienen antisépticos, antibióticos y/o agentes anestésicos con la finalidad de tratar la faringe y la nasofaringe forzando al aire de los pulmones mediante gargarismos para mantener el líquido en la faringe y expulsarlo por expectoración.²²

Es obvio que como ocurre con los agentes dentífricos terapéuticos, es posible añadir agentes bacteriostáticos a los materiales de enjuague. Muy probablemente la acción sobre las caries dentales de sustancias como urea, fosfato de amonio dibásico, clorofila, penicilina y sarcinato en el enjuague bucal, debería ser similar a la observada cuando se emplea el dentífrico.²

El empleo de enjuagues en soluciones fluoradas se desarrolló como medida de salud comunitaria a partir de la década de los 60, sobre todo en programas escolares en Estados Unidos y países escandinavos, y su uso se ha extendido considerablemente hasta nuestros días, tanto de manera colectiva, así como su uso doméstico.²

Las indicaciones de uso doméstico de los colutorios en pacientes individuales se reducen a los pacientes con un riesgo de caries alto o moderado, tanto en niños como en adultos. En los niños se aconseja tomar 5 mL de solución y no debe recomendarse a menores de 6 años o a los individuos con problemas para la deglución del preparado. El uso comunitario actualmente se recomienda en grupos con riesgo elevado de caries o cuando no exista un consumo regular de pasta dentífrica por parte de los niños de la población.⁸

Sin embargo es necesario mencionar que en el caso de colutorios, como suele ocurrir con otras formas farmacéuticas, este puede no contener principios activos, es decir actúa como un placebo. En aquellos casos donde el colutorio contiene principios activos, estos son muy variados, a continuación se mencionarán los principios utilizados con mayor frecuencia:⁸

- Flúor. El flúor tiene acción preventiva en las caries a través del aumento de la resistencia del esmalte a la desmineralización y el incremento de la remineralización de las lesiones iniciales.⁸
- Sales metálicas: las sales de estaño cobre y cinc han atraído el especial interés de los investigadores por su efecto sobre el control de la placa bacteriana.⁸

- agentes oxidantes: el interés en el uso de agentes oxidantes se deriva principalmente de su capacidad para tratar la gingivitis.⁸
- Fenoles: los fenoles se han utilizado por mucho tiempo como control de placa, siendo el más popular hasta ahora el Listerine. Aunque no es tan eficaz como la clorhexidina.⁸
- Triclosàn: este agente antimicrobiano podría considerarse un compuesto fenolico, pero debido a su novedad, el triclosan por si solo tiene una acción antimicrobiana moderada sobre el control de la placa, pero combinado con el citrato de cinc, la eficacia para combatir la placa dental y la gingivitis aumenta mucho.⁸
- Clorhexidina: es una bisbiguanidina que se ha usado extensamente como desinfectante cutáneo y cuya eficacia antiplaca fue demostrada en estudios sobre el control de la gingivitis. La eficacia de esta en el control de la gingivitis se considera el modelo respecto al cual se mide la eficacia de todos los demás agentes antiplaca, y aun no ha sido superada por ninguno.⁸

Un enjuague bucal puede cumplir con dos objetivos: terapéutico y cosméticos. Los enjuagues o lavados terapéuticos tienen como finalidad reducir la formación de placas, la gingivitis, la caries dental y la estomatitis, los enjuagues cosméticos pueden estar destinados a combatir halitosis mediante el uso de agentes microbianos o aromatizantes.²⁵

Los enjuagues bucales pueden ser utilizados para combatir trastornos específicos de la cavidad oral, por ejemplo aquellos preparados a partir de una combinación de antihistamínicos, hidrocortisona, nistatina y tetraciclina a partir de suspensiones, polvos o jarabes o soluciones comercialmente disponibles para el tratamiento de la estomatitis, un efecto colateral grave de la terapéutica contra el cancer.²⁵

1.3.2.1 Ventajas y Desventajas

Las ventajas y desventajas aplicables para un colutorio son las mismas que para una solución oral:

Ventajas

- Las dosis pueden ser fácilmente ajustables a dosis fraccionadas por dilución.⁴
- Debido a que las soluciones son mezclas homogéneas, el fármaco es distribuido uniformemente en la formulación.⁴
- Es una vía de administración sencilla para combatir trastornos bucales, tales como caries o gingivitis, así como halitosis.⁸
- Se pueden usar para niños pacientes psiquiátricos, pacientes de edad avanzada, que no pueden deglutir las formas farmacéuticas sólidas.³

Desventajas

- Los fármacos en general son menos estables en medio líquido que en formas de dosificación sólidas.⁴
- Se requieren técnicas especiales para solubilizar los fármacos pobremente solubles.⁴
- Algunas veces resulta difícil enmascarar el inherente sabor amargo de algunos fármacos.⁴
- Los fármacos extremadamente potentes, con un índice terapéutico muy bajo no pueden formularse en soluciones orales, puesto que los pacientes pueden tener errores en la medición de la dosis.⁴
- No se puede administrar en pacientes inconscientes.⁴

1.3.2.2 Componentes

Los componentes utilizados durante la fabricación de un colutorio generalmente son los mismos utilizados para la fabricación de una solución oral.

Cuadro 1. Componentes y aditivos de las soluciones.

Componente	Función	Ejemplos
Principio activo	Define la función terapéutica del medicamento.	Cefaclor, Acetil-Cefuroxima.
Cosolvente	Incrementan la solubilidad de las sustancias pobremente solubles en agua.	Alcohol, glicerina, sorbitol, propilenglicol.
Edulcorante	Enmascara el amargo e inaceptable sabor de los componentes de la fórmula.	Sacarosa, sorbitol, glucosa líquida, sacarina, aspartame.
Conservador	Impide la proliferación microbiana por inhibición o retraso del crecimiento.	Èsteres del ácido p-oxibenzòico, ácido benzòico, ácido sórbico, ésteres metílico y propílico (parabenos).
Amortiguadores de pH	Estabiliza el pH	Soluciones reguladoras de fosfatos, acetatos, citratos, entre otros.
Antioxidante	Evitar la oxidación del principio activo por la oxidación propia.	Sulfitos, ácido cítrico, ácido ascórbico.
Saborizante.	Enmascara el desagradable sabor del fármaco.	Ácido cítrico, tartárico, glutamato de sodio, taninos.
Colorante.	Confiere color para su identificación y aceptación visual.	Amarillo de quinolina, amarillo oca, eritrosina, tartracina.

FEUM (2008), Swarbirck 2002

1.3.2.3 Método de Fabricación

La mayoría del equipo debe tener la capacidad de calentar y enfriar rápidamente para la disolución de los componentes de la formulación, requieren tener adecuados los sistemas de transferencia y filtración. Los equipos son hechos con material compatible y no reactivo, tal como el acero inoxidable. El diseño y construcción de los tanques facilita la limpieza del mismo.⁴

Las soluciones orales son preparaciones que generalmente contienen uno o mas ingredientes terapéuticamente activos, disueltos en agua o en un sistema agua-cosolvente. Casi siempre se preparan disolviendo directamente.²⁴

Los soluciones que se administran por vía oral en muchas ocasiones contienen ingredientes inocuos (aditivos) para mejorar el sabor, estabilidad y aspecto estético, u bien una combinación de dichos agentes. Algunos ejemplos son saborizantes, edulcorantes o saborizantes, modificadores de la viscosidad, amortiguadores, antioxidantes y conservadores.²⁴

Una de las operaciones utilizadas con mayor frecuencia en la preparación de enjuagues bucales es el mezclado. Esta operación es una de las mas antiguas y en la actualidad probablemente sea una de las mas difundida ya que la mayoría de las industrias químicas modernas suponen en una o en varias etapas del proceso, la mezcla de sustancias con algún fin determinado. De la eficacia con que se realiza tal mezcla depende que el proceso se haya realizado correctamente o no.²⁶

El equipo estándar para la agitación o mezcla de fases liquidas, es un tanque con un agitador rotatorio y si bien las variaciones de tal esquema son numerosas, los principios básicos involucrados son en todos los casos, derivaciones de los estudiados en mecánica de fluidos.²⁶

Los mezcladores utilizados con mayor frecuencia son los siguientes:

- De propulsores: del tipo de hélices marinas son aptos para líquidos livianos, generalmente en un flujo axial en el material, originando una corriente cilíndrica, con gran turbulencia en su interior, la que avanza hasta chocar con los contornos del recipiente.²⁶
- De paletas : de gran sencillez en su construcción consiste en dos o mas paletas de diámetro apreciable (de 40% a 80% del diámetro del tanque), horizontales o verticales que giran a bajas velocidades (de 20 a 150 rpm) montadas sobre un eje. Empujan el material y crean un flujo netamente circular alrededor del eje de rotación manteniendo capas adyacentes en sus respectivos planos horizontales con muy poco o nada de mezcla entre ellas.²⁶

- De turbinas: se trata de rodets de bombas centrifugas sin la carcaza, trabajando directamente sumergidos en el liquido. Se utilizan para líquidos de baja viscosidad; el material es tomado axialmente y luego de ser acelerado en los alabes del agitador es descargado tangencialmente con gran alcance.²⁶

El método más común para fabricar, es hacer una solución simple por la adición del soluto al solvente y agitar hasta formar una solución homogénea. La mayoría de los materiales utilizados pueden disolverse simplemente por agitación, pero puede emplearse calor y un alto grado de agitación, cuando se requieren soluciones más concentradas o cuando el soluto se disuelve lentamente.⁴

Los excipientes son adicionados en un orden específico, para incrementar la velocidad de disolución, los solutos presentes en cantidades pequeñas particularmente tinturas y otros intensificadores del color, deben ser disueltos antes de ser mezclados con la porción principal del lote, para asegurar su completa disolución, debido a que si son adicionados directamente al volumen de disolvente presente en el tanque, pequeñas cantidades emigran al fondo de este dificultando la disolución completa.⁴

La mayoría de las soluciones son filtradas y clarificadas, esta etapa es llamada limpieza, una alta limpieza requiere la remoción de partículas mayores o iguales a 3 nanómetros (nm), para ello los filtros utilizados en la manufactura, proceso o acondicionamiento de soluciones destinadas al consumo humano no deben liberar fibras.⁴

1.4 Extracto de Encino

1.4.1 Nombre científico

Quercus robur L. nombres populares: Roble, fresnal, Carballo.⁶

1.4.2 Fuente de Extracción

Como su nombre lo indica se obtiene del árbol del mismo nombre, con este nombre se conoce a numerosos árboles del género *Quercus*, el cual comprende en México cerca de 300 especies.⁷

Se distinguen por sus hojas duras y coriáceas, viven en climas templados y su madera es muy estimada. Los de hojas grandes en muchos lugares son conocidos como robles.⁷

La extracción es un termino, que cuando es usado farmacéuticamente implica la separación de fracciones medicinalmente activas de tejidos vegetales o animales, a partir de componentes inactivos o inertes utilizando solventes selectivos en procedimientos de extracción estandar.²⁷

La USP define a los extractos como preparaciones concentradas de drogas de origen vegetal o animal obtenidas mediante la remoción de los componentes activos, mediante evaporación de todo o casi todo el disolvente y su ajuste las masas o líquidos residuales para que estos cumplan con los requisitos establecidos.²⁸

Los productos que se obtienen de plantas son líquidos, semisólidos o bien polvos relativamente impuros para uso oral externo, estos productos incluyen preparaciones conocidas como decocciones, infusiones, extractos fluidos, tinturas y extractos en polvo.²⁷

Una vez obtenida la solución de componentes activos de una droga cruda, la preparación puede ser utilizada como agente medicinal.²⁷

1.4.3 Composición Química

Taninos: presentes en la corteza en un porcentaje entre el 8% y el 20% (en forma de ácido quercitánico la mayor parte). En cambio en las agallas son mucho más abundantes, llegando casi al 60 o 70%. Entre los taninos de las agallas figuran los ácidos gálico (2-4) y elàgico (presentes en la corteza también).⁶

El ácido gálico se encuentra tanto en su forma libre como formando parte de taninos. Las sales y los èsteres del ácido gálico se denominan galatos. Su nombre se refiere a las agallas donde suele encontrarse y no al elemento galio.⁶

Su peso molecular es de 170 gramos (g) / mol.

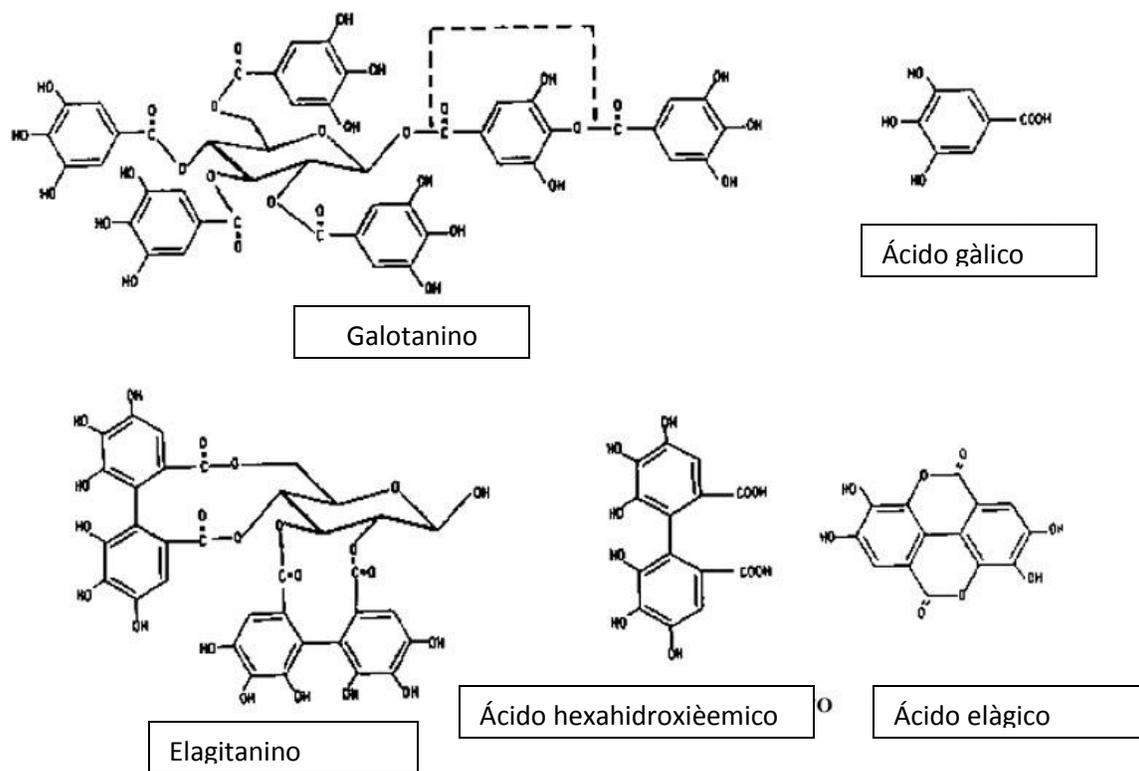


Figura 1. Estructuras de taninos.

1.4.4 Acciones Farmacológicas.

La principal acción farmacológica del roble radica en el empleo de los taninos como producto astringente.⁶

1.4.4.1 Actividad Astringente

Las agallas son fuente principalmente de activos utilizados medicinalmente, como el ácido tánico o tanino oficial, el cual resulta de una mezcla de ésteres del ácido gálico con glucosa, formados en las paredes celulares y espacios intercelulares. La obtención es a través de la extracción con una mezcla de éter-alcohol saturada con agua, separación posterior de las fases y evaporación de la fase acuosa. El alto contenido de taninos le confiere a la corteza y agallas de roble propiedades astringentes y antisépticas, útiles por aplicación externa en heridas hemorrágicas y diarrea.⁶

1.4.4.2 Otros

Extractos de la corteza han evidenciado actividad diurética, antibacteriana, antiinflamatoria y favorecedora de la eliminación de cálculos urinarios.⁶

El extracto hidroalcohólico demuestra propiedades antiestafilococcicas, lo cual podría justificar su empleo como antiséptico en heridas de la piel. El contenido de saponinas de la corteza brinda propiedades expectorantes, hipocolesteromiantes e inmuno estimulantes en presencia de infecciones virales.⁶

1.4.5. Efectos Tóxicos

La alta proporción de taninos puede ocasionar irritación gástrica, náuseas y vómito, para evitar esto, puede mezclarse la droga vegetal con hierbas demulcentes como el malvavisco, malva, etc.; e ingerirse después de las comidas.⁶

1.4.6 Estatus Legal

La corteza de Roble revistió en la United States Pharmacopeia (USP) desde 1820 hasta 1920. Actualmente, el ácido tánico es oficial y la corteza de roble se encuentra enlistada en la categoría de suplemento dietario y como producto “Generalmente Seguros a Dosis Apropriadas (GRAS). La comisión “E” de Alemania ha aprobado la corteza de roble para uso humano, recomendándola en caso de dermatitis, faringitis, inflamaciones perineales y genitales (uso externo), así como para diarrea inespecífica (uso interno). La administración externa no debe superar los tres a cuatro días.⁶

1.4.7. Usos Etnomedicinales

La decocción de corteza y agallas del roble es muy empleada como descongestionante del sistema bucofaríngeo (en forma de gárgaras), así como astringente y hemostático (en forma de apósitos y compresas) en casos de hemorroides, heridas, úlceras dérmicas, etc. Las duchas vaginales se recomiendan en caso de vaginitis y leucorreas.⁶

También resulta útil la corteza en presencia de excesiva transpiración de los pies. Frente a cuadros diarreicos suele beberse a manera de infusión, a razón de dos a tres tazas al día. El polvo de corteza se suele aspirar para tratar pólipos nasales o se suele esparcir sobre heridas de difícil cicatrización.⁶

1.5 Control de Calidad

Durante un estudio de estabilidad, así como en un análisis de rutina inicial, el producto farmacéutico deber ser evaluado en sus distintos parámetros de control de calidad, los parámetros a evaluar cambian de acuerdo al tipo de forma farmacéutica a evaluar, en este caso se llevaràn a cabo aquellos controles aplicables a una solución oral, ya que un colutorio es considerado como una solución oral.¹⁴

Los controles de calidad a evaluar son los siguientes:

- Apariencia: no debe tener cambios perceptibles a simple vista.
- Color: no debe tener cambios en el color, ya que seria indicativo de descomposición. Se aprecia de manera visual.
- Olor: cambios en el aroma podrían ser indicativo de presencia de productos de degradación. Mediante el olfato se determina.
- Claridad de la solución: la claridad de la solución debe ser la misma durante el estudio. Se aprecia de manera visual. El método se basa en la comparación visual del color de la solución muestra, contra patrones de referencia en un rango colorido específico, bajo condiciones establecidas. El color que presenta la muestra estará dentro del rango café amarillo-rojo, de acuerdo a la monografía individual. La comparación de color debe ser en tubos Nessler, los patrones de referencia contra los que se compara son: **solución de cloruro ferrico (Amarillo primario)**, se pesan 46 gramos de cloruro férrico hexahidratado, se transfieren a un matraz volumétrico de 1000 mL, se disuelve y se lleva al aforo con ácido clorhídrico al 2.5% (v/v), solución de **cloruro de cobalto (Rojo primario)**, se pesan 60 g de cloruro de cobalto, se transfieren a un matraz volumétrico de 1000 mL, se disuelve y se lleva al aforo con ácido clorhídrico al 2.5% (v/v). Y finalmente **solución sulfato cúprico (Azul Primario)** pesar 63g de sulfato cúprico, transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver y llevar al aforo con solución de ácido clorhídrico al 2.5% (v/v), el color de la solución muestra no debe exceder al color de la solución patrón.

- pH: esta prueba se basa en la determinación de la actividad de iones hidrógeno, empleando un instrumento potenciométrico, con sensibilidad para reproducir valores de pH de 0.05 unidades usando un electrodo indicador al ion hidrógeno como electrodo de vidrio y un electrodo de referencia apropiado, tal como el de calomel o el de cloruro de plata. El aparato detecta el potencial en milivolts y en unidades de pH a través del par de electrodos. Para la calibración del potenciómetro se utilizan soluciones amortiguadoras con un periodo máximo de 3 meses de caducidad, a menos que se indique otra cosa en la monografía individual correspondiente, para el ajuste del aparato se utilizan dos soluciones amortiguadoras, se enciende el aparato y se deja calentar lo suficiente, se coloca el control de temperatura a la temperatura de la solución, ajustar el control de calibración hasta hacer que los valores sean idénticos a los tabulados, enjuagar los electrodos y los recipientes con varias porciones de la segunda solución amortiguadora seleccionada para la calibración, el pH de la segunda solución amortiguadora esta dentro de 0.07 unidades de pH del valor tabulado. las determinaciones se efectúan a una temperatura de $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$, lavar los electrodos con agua destilada, dejar escurrir los electrodos y secar con cuidado con papel absorbente, enjuagar los electrodos con la solución prueba y llevar a cabo la determinación de pH.
- Ensayo (Valoración): para cuantificar el principio activo presente en el medicamento nuevo durante su estudio de estabilidad, se utilizara el método analítico propuesto, el cual debe estar validado y ser indicativo de estabilidad, una vez que cumpla con dichos requisitos, se llevara a cabo la cuantificación mediante espectrofotometría visible (colorimetría).

- Límite microbiano:** su objetivo es evaluar la calidad sanitaria de productos farmacéuticos, mediante el recuento de microorganismos mesófilos aerobios, hongos filamentosos y levaduras, así como la investigación de microorganismos objetables en dichos productos. Para lo cual se recomienda trabajar en condiciones asépticas, las muestras deben incubarse durante 24 a 48 horas, a menos que se especifiquen otras condiciones, el cultivo debe llevarse a cabo en un medio adecuado, la toma de muestra debe seguir un plan bien definido, este debe considerar tamaño de lote, características del producto, riesgo a la salud y su nivel de contaminación.

Recuento de microorganismos mesófilos aerobios: Para líquidos solubles en agua, medir 10 mL de muestra y transferirlo a 90 mL de diluyente adecuado. En muestras solubles, el método de elección es el de vaciado en placa, se efectúan las diluciones necesarias hasta obtener una placa que contenga entre 30 y 300 UFC, inocular por duplicado las diluciones del producto en cajas de petri estériles, añadir a cada caja de 15 mL a 20 mL de medio agar soya tripticaseína, distribuir con movimientos rotarios suaves, permitir que el medio de cultivo solidifique e incubar las placas en posición invertida entre 30° C y 35° C durante 48 a 72 horas. La muestra de producto para cada determinación no debe ser menor a 10g o 10mL. Los resultados se reportan en unidades Formadoras de Colonia (UFC).

Recuento de hongos filamentosos y levaduras: proceder como se indica en el método de mesófilos aerobios, excepto que se utiliza agar dextrosa Saboraud o agar papa dextrosa, e incubar a 20° C y 25° C de 5 a 7 días.

Investigación de microorganismos objetables: en función de la vía de administración del producto proceder a la investigación de los microorganismos señalados a continuación:

productos orales *Escherichia coli* y *Salmonella sp*, adicionar 10 mL de muestra en 90 mL de medio lactosa e incubar entre 30° C y 35° C de 18 a 24 horas, si presenta crecimiento resembrar 1.0 mL de cultivo y sembrar en caldo selenito, mezclar e incubar de 12 a 24 horas a la misma temperatura, para aislar *Salmonella sp* tomar una asada y sembrar por estría cruzada en agar verde brillante, para la confirmación de *Salmonella sp* se presentan colonias pequeñas transparentes, incoloras o rosas, rodeadas de una zona roja o rosa, y su morfología microscópica es la de bacilos gram negativos.

para aislar *Escherichia coli*, tomar una asada y sembrar por estría cruzada en agar verde McConkey, para la confirmación de *Escherichia coli* se presentan colonias pequeñas rojas, incoloras o rosas, y su morfología microscópica es la de bacilos gram negativos.
- Pérdida de peso:** se compara el peso inicial y final, posteriormente se determina en % el peso perdido por el producto. En pesa filtros de forma baja y puestos a peso constante, bajo las mismas condiciones de la determinación e coloca la muestra, se tapa y se pesa, se agita suavemente distribuyendo el contenido uniformemente hasta obtener un espesor de aproximadamente 5 mm, el pesafiltro con la muestra se coloca en la estufa u horno de desecación a la temperatura dada para cada sustancia con una variación de +/- 2° C, se quita el tapón y se seca durante el tiempo especificado, al abrir el horno estufa de desecación se tapa inmediatamente y se pasa a un desecador hasta que adquiera la temperatura ambiente. El peso obtenido se calcula de la siguiente manera:

$$p_i - p_f = p_s$$

Donde:

p_i = peso inicial de la muestra en gramos

p_f = peso final de la muestra en gramos.

p_s = peso inicial de la muestra en gramos.

Para calcular la pérdida en porcentaje, utilizar la siguiente fórmula:

$$\%p_s = (p_s/p_i)(100)$$

Donde:

$\%p_s$ = porcentaje de pérdida por secado.

p_s = peso perdido durante el secado en gramos.

p_i = peso inicial de la muestra en gramos.

- Densidad: esta prueba se basa en la relación que existe, entre el peso de un volumen de una sustancia y el peso del mismo volumen de agua, a una temperatura dada. Para la medición se utiliza un picnómetro debidamente calibrado, efectuar esta calibración y todas las mediciones a 20° C, ensamblar y pesar el picnómetro vacío y seco en una balanza analítica. Registrando el peso en gramos, hasta la cuarta cifra decimal, llenar el picnómetro con agua hervida y enfriada a 20° C, colocar el tapón esmerilado con el termómetro adaptado cuidadosamente y dejar que el exceso de agua salga por el tubo capilar. Registrar el peso hasta la cuarta cifra decimal. Calcular el peso del agua contenida en el picnómetro con la siguiente fórmula :

$$C = B - A$$

Donde

C = peso del agua en gramos.

B = peso del picnómetro lleno con agua en gramos.

A = peso del picnómetro vacío en gramos

Proceder como se indica en la calibración del picnómetro, sustituyendo el agua por la muestra, La densidad relativa de la muestra se calcula mediante la siguiente fórmula: $DR = (D/C)$, donde: DR = densidad relativa. D = peso de la muestra en gramos. D = c = peso del agua en gramos, medida a 20° C.

- Viscosidad: prueba en la cual se detecta cualquier cambio de viscosidad en el producto, aplicable a formas farmacéuticas líquidas. El método consiste en medir el tiempo en segundos que requiere un líquido en fluir a través de un orificio y llenar un envase hasta una marca determinada. El método más sencillo para medir viscosidades es mediante un viscosímetro de Ostwald.

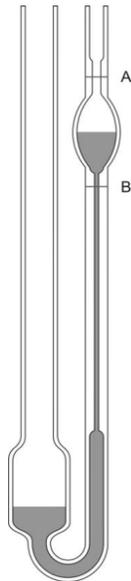


Figura 2. Viscosímetro de Ostwald

Llenar el viscosímetro limpio y seco con 10 ml del líquido problema, a través del tubo de mayor diámetro, Introducir el viscosímetro en el baño termostático y esperar unos 5 minutos para que el líquido problema alcance la temperatura de medida. Succionar líquido por encima de la marca superior del viscosímetro (tubo de menor diámetro) y medir a continuación el tiempo de paso del mismo entre las marcas A y B. Hacer para cada líquido un mínimo de 3 medidas independientes. Cuando se termine la serie de medidas con un líquido, limpiar el viscosímetro primero con agua y luego con alcohol y por último secar con aire.

La evaluación de los parámetros de control de calidad mencionados es muy importante, durante los estudios de estabilidad, ya que los cambios significativos en los mismos pueden ser indicativos de presencia de productos de degradación, afectando el perfil de estabilidad del medicamento nuevo.

1.6 Validación

De acuerdo con NOM-059-SSA1-2006, buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.⁹

La validación es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad específicos.⁵

El uso de un método se justifica sólo después de haber descubierto que es válido, tanto la Food and Drug Administration (FDA), como la USP, tienen un vital interés en la validación de los métodos de ensayo formal para asegurarse de que dichos métodos son lo que pretenden ser.

Debe establecerse un protocolo escrito que especifique como se llevará a cabo la validación. El protocolo debe especificar los pasos críticos, su calendario y los criterios de aceptación.¹⁰

Los métodos analíticos para fines de validación se clasifican en cuatro categorías.⁵

Categoría I. Métodos para cuantificar a un componente específico.

Categoría II. Métodos para la determinación de impurezas.

Categoría III. Métodos para la determinación de un analito en una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico (disolución, liberación controlada, entre otras).

Categoría IV. Pruebas de identificación de un analito.

1.6.1 Parámetros de Validación

Los parámetros a evaluar en la validación de un método analítico, se muestran a continuación, de acuerdo a su categoría.

Cuadro 2. Parámetros a considerar en un método analítico de acuerdo a su categoría

Características de desempeño	de Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativas	Cualitativa		
Verificación del sistema	*	*	*	*	NO
Precisión del sistema	SI	SI	*		NO
Linealidad del sistema	SI	SI	*	*	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Exactitud del método	SI	SI	*	*	NO
Linealidad del método	SI	SI	*	*	NO
Precisión del método	SI	SI	NO	SI	NO
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Robustez	*	*	*	*	*

*Puede ser necesario dependiendo de la naturaleza del método.

La “Guideline for Industry Text on Validation of Analytical Procedures, ICH-Q2A, 1995” establece que los procedimientos analíticos a validar se clasifican en¹¹:

- Pruebas de identificación.
- Pruebas para cuantificar contenido de impurezas.
- Pruebas para controlar el límite de impurezas.
- Pruebas para cuantificar humedad activa en muestras de una sustancia farmacéutica, producto farmacéutico u otro componente en el producto farmacéutico.

De acuerdo a que se desea cuantificar un analito en específico, el método analítico a validar pertenece a la categoría I, por lo tanto los parámetros a evaluar son los siguientes.

1.6.1.1. Especificidad

Propósito: Verificar la habilidad del método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes como excipientes o productos de degradación de la muestra. El método debe ser indicativo de estabilidad, es decir, debe ser capaz de detectar variaciones en las propiedades del material evaluado debidas a las condiciones de almacenaje²⁰.

De acuerdo con la guía de validación del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos, cuando no se conocen los productos de degradación, se someten las muestras a condiciones drásticas²⁰.

Esto involucra la estabilidad de la muestra analítica, la cual se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras, con los obtenidos de las mismas muestras de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones¹³.

Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones (por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc.), durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico¹³.

La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

Criterio:

La muestra es estable si el Intervalo de confianza (Ic) para la diferencia de la media (\bar{x}) de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor 0 y/o la magnitud del efecto no exceda para métodos espectrofotométricos es 3%.

1.6.1.2. Precisión del Sistema

La precisión de un método analítico expresa la cercanía entre la serie de mediciones obtenidas a partir de un muestreo múltiple de una muestra homogénea bajo las mismas condiciones preestablecidas, en este caso se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema¹².

Se preparan a partir de una sustancia de referencia por lo menos seis soluciones que representen el 100% de la concentración del analito, se medirá la respuesta dentro de la misma corrida analítica. Se lleva a cabo de manera conjunta a la linealidad del sistema, para lo cual el nivel correspondiente a 100%, se realiza por sextuplicado para el cálculo de este parámetro¹³.

Las seis muestras se someten bajo el tratamiento establecido en el método.

Calcular el Coeficiente de Variación (CV) y desviación estándar de la respuesta analítica.

Criterios de aceptación.

$CV \leq 3\%$ para métodos espectrofotométricos.

1.6.1.3 Linealidad del sistema

Propósito: Verificar la habilidad del método para asegurar que la respuesta analítica es proporcional a la concentración del analito de interés dentro de un intervalo del 60% al 140%.¹²

Cuando la relación entre la concentración y la respuesta del analito, no es lineal dentro del intervalo de trabajo dará lugar a una inexactitud del método analítico, por lo que es conveniente verificarlo bajo las condiciones del laboratorio¹³.

Es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito se ajustan al modelo analítico, en un intervalo de concentraciones pertinentes. Se investiga la relación concentración vs respuesta en un intervalo que incluya por lo menos cinco niveles, por triplicado, de la concentración del analito¹².

Criterio:

El Coeficiente de correlación (r^2) debe ser igual o mayor a 0.98

Intervalo de confianza de la pendiente (Icm) no debe incluir al cero.

1.6.1.4 Exactitud del Método

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la cercanía entre los valores obtenidos y los que son aceptados de manera convencional como un valor verdadero o referente aceptado y el valor hallado¹².

Se determina de cuando menos seis placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista¹³.

Criterio:

El % recuperado (%R o % Recobro) y el CV deberán de estar de acuerdo con la tabla 3.

Tabla 1. Rango de CV aceptable dependiendo el método analítico empleado.

Método	Porcentaje de recobro	CV
Cromatograficos	98-102%	Igual o menor al 2%
Titrimetricos	98-102%	Igual o menor al 2%
Químicos	97-103%	Igual o menor al 3%
Espectrofotométricos	97-103%	Igual o menor al 3%
Microbiológicos	95-105%	Igual o menor al 5%

1.6.1.5 Linealidad del método.

Propósito: Todo método analítico no debe presentar sesgo (error sistemático) dentro del intervalo de cuantificación, por lo que es necesario seleccionar al menos tres niveles de concentración (intervalo) que permita demostrar exactitud y linealidad. Es necesario que el intervalo incluya los límites de especificación de la aplicación analítica del método.¹²

Con la finalidad de determinar la uniformidad de contenido, la determinación se llevara a cabo de manera que se incluya el intervalo establecido para dicho parámetro, el cual es de 75% a 125%:¹³

Criterio:

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada: pendiente (m)=1, ordenada al origen (b)= 0 $r^2 =$ igual o mayor a 0.98

Los % recuperados y los CV a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo a la tabla 3.

1.6.1.6 Precisión del método.

La precisión de un método analítico está expresada en como la varianza, desviación estándar y el coeficiente de variación de la serie de mediciones.¹²

Criterio: El CV total debe cumplir con los siguientes criterios.

Método:	CV
Cromatográficos	igual o menor al 2%
Químicos y espectrofotométricos	igual o menor al 3%
Microbiológicos	igual o menor al 5%

notas: dependiendo de la naturaleza de la muestra el CV puede incrementarse.

1.6.1.7 Robustez.

Propósito: los resultados de los métodos analíticos pueden ser afectados por una serie de factores relacionados con las condiciones instrumentales o inherentes a este, los cuales se presentan normalmente durante una corrida analítica, por lo que es necesario investigar su efecto bajo pequeños cambios deliberados, fijados por el analista, para asegurar la confiabilidad de los resultados.¹²

Determinación: se deben establecer aquellos factores instrumentales y/o no instrumentales (pH, fases, volúmenes de solventes orgánicos, etc.) que se consideren críticos. Para su investigación se puede presentar el siguiente caso:¹³

Investigación a 3 factores como máximo: en este caso se deberá establecer un nivel inferior y superior respecto al nivel normal de operación, pueden ser cambios pequeños pero deliberados. Por lo que es necesario evaluar por triplicado una misma muestra a cada nivel para cada uno de los factores a analizar.⁵

1.6.1.8 Estabilidad Analítica de la Muestra

Propósito: determinar la capacidad del método de proporcionar resultados confiables en aquellos procesos que hayan sido interrumpidos en alguna parte del método analítico.¹²

La estabilidad analítica de la muestra es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.¹²

Determinación: se determina preestableciendo la parte del proceso en la cual la muestra será almacenada a condiciones de almacenaje, continuando a partir del paso donde el método analítico haya sido interrumpido, evaluando, si dicho plazo afecta en los resultados obtenidos.¹³

1.7. Espectrofotometría

El término espectrofotometría se refiere al uso de la luz para medir las concentraciones de sustancias químicas.¹⁵

La espectrofotometría se basa en la medida de la absorción, por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de distintas longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática.¹⁵

La banda espectral empleada en las mediciones se extiende desde las longitudes de onda corta de la zona ultravioleta hasta la zona visible del espectro. Por razones prácticas este intervalo espectral puede considerarse como si estuviera constituido por 2 zonas, la ultravioleta (UV) de 190 nm a 380 nm y la visible de 380 nm a 780 nm.¹⁶

La espectrofotometría de absorción ultravioleta visible fue uno de los primeros métodos físicos que se aplicó al análisis cuantitativo y a la determinación de estructuras.¹⁷

En general los espectros ultravioleta y visible de una sustancia no tienen un alto grado de especificidad, sin embargo son muy adecuados para las valoraciones cuantitativas y en el caso de muchas sustancias constituyen un medio útil de identificación adicional, la energía de la luz radiante disminuye en relación con la distancia que viaja a través de un medio absorbente. También disminuye en relación con la concentración de iones o moléculas absorbentes presentes en el medio: estos dos factores determinan la proporción de la energía incidente total que es transmitida.¹⁵

La energía de la luz radiante disminuye en relación con la distancia que viaja a través de un medio absorbente.¹⁵

También disminuye en relación con la concentración de iones o moléculas absorbentes presentes en el medio. Estos 2 factores determinan la proporción de la energía incidente total que es transmitida.¹⁵

La disminución de la energía de radiación monocromática que pasa a través de un medio absorbente homogéneo se establece cuantitativamente por la ley de Beer:¹⁸

$$A = abc = \log_{10} (1/T)$$

Donde:

A= absorbancia: logaritmo en base 10 del inverso de la transmitancia (T).

a= absortividad: cociente de dividir la absorbancia (A) entre el producto de la concentración de la sustancia(c), y la longitud de la trayectoria de la energía luminosa.

b= longitud de la trayectoria de la energía luminosa expresada en centímetros.

C= concentración de la sustancia expresada en gramos por litro.

T= transmitancia: cociente de dividir la energía radiante transmitida por la sustancia presente en el medio entre la energía radiante incidente.

Cualquier instrumento que se utilice debe ser apropiado para medir la longitud de onda indicada para detectar un analito en particular.¹⁹

La muestra y el blanco de referencia deben ser colocados en el rayo de luz de manera que el radio de la transmitancia pueda ser medido y finalmente el valor de la absorbancia en la solución pueda ser registrado. Estos son los requerimientos que se consideran como básicos en un espectrofotómetro UV-visible y a continuación se verán los componentes que típicamente posee dicho instrumento.¹⁹

1.7.1. Colorimetría.

La espectrofotometría en la zona visible (que antes solía llamarse colorimetría), es la medida de la absorción de la luz visible, que generalmente no es monocromática pero se selecciona mediante el empleo de filtros pigmentados o de interferencia.¹⁹

La luz que generalmente se considera visible para el ojo humano es la comprendida entre 380 y 780 nm. Si el ojo recibe la luz de todas las longitudes de onda que constituyen la región visible del espectro, el efecto es la luz blanca. La sensación de color se produce cuando disminuye apreciablemente una o más zonas de la región visible.¹⁹

1.7.1.1 Ventajas y Desventajas

Ventajas

- Los métodos colorimétricos son usualmente más rápidos en comparación con los volumétricos y gravimétricos.
- Algunos requieren un mínimo de preparación de muestras, y en ocasiones solamente la disolución y desarrollo del color.
- Usualmente requieren montos pequeños de muestra, en muchos métodos con unos cuantos miligramos es suficiente.
- El equipo requerido es simple, particularmente en el caso de técnicas de comparación visual.
- No requiere técnicos altamente entrenados, personal que no sea técnico puede ser entrenado para hacer la simple comparación de la intensidad de color.

Desventajas

- La preparación de estándares para la colorimetría puede ser un problema, y para métodos de comparación visual, estos deben ser reemplazados en intervalos frecuentes.
- La presencia de iones interfiriendo pueden causar distorsiones, así como invalidar la comparación visual.

- La sensibilidad de los métodos visuales no es alta, una exactitud de +/- 5% puede esperarse de manera rutinaria, lo cual es pobre en comparación con los métodos volumétricos o gravimétricos.

1.7.2 Ley de Beer

La disminución de la energía de radiación monocromática que pasa a través de un medio absorbente homogéneo, se establece cuantitativamente por la ley de Beer:¹⁵

$$A = \alpha lc$$

$$\frac{I_1}{I_0} = 10^{-\alpha lc}$$

$$A = -\log \frac{I_1}{I_0}$$

Dónde:

- A es la absorbancia (o absorbencia).
- I_0 es la intensidad de la luz incidente.
- I_1 es la intensidad de la luz una vez ha atravesado el medio.
- l es la distancia que la luz atraviesa por el cuerpo.
- c es la concentración de sustancia absorbente en el medio.
- α es el coeficiente de absorción o la absorbancia molar de la sustancia.
- λ es la longitud de onda del haz de luz.
- k es el coeficiente de extinción.

La ley explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa. Si conocemos l y α , la concentración de la sustancia puede ser deducida a partir de la cantidad de luz transmitida.¹⁵

1.7. 3 Instrumentos de Medición

Un espectrofotómetro es un instrumento usado en la física óptica que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones. También es utilizado en los laboratorios de química para la cuantificación de sustancias y microorganismos.¹⁸

Este instrumento tiene la capacidad de proyectar un haz de luz monocromática a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra. Esto le permite al operador realizar dos funciones:

Dar información sobre la naturaleza de la sustancia en la muestra.¹⁸

Indicar indirectamente que cantidad de la sustancia que nos interesa está presente en la muestra.¹⁸

Existen distintos tipos de espectrofotómetros, sin embargo los componentes principales son los siguientes:

- **Una fuente de radiación:** que abarque el rango de longitud de onda deseado, para medir longitudes de aprox 320 nm se suele utilizar lámparas de tungsteno, las viejas lámparas de este tipo, no permitían mediciones por encima de los 360nm, en cambio las actuales lámparas de halógeno de tungsteno contienen pequeñas cantidades de vapor de yodo, que cubren el filamento de tungsteno, para mediciones por debajo de los 320 nm se suele utilizar una fuente de deuterio, la cual emite radiación por debajo de los 400 nm.¹⁸
- **Selector de longitud de onda:** Debemos recordar que la ley de Beer, aplica radiación monocromática, en la práctica no es posible obtener radiación monocromática usando las fuentes mencionadas, la radiación entonces consiste de un límite estrecho de longitudes de onda, llamadas banda, entonces un estrecho rango de la banda es requerido para aumentar la sensibilidad de la medición de la absorbancia. Existen dos selectores de longitud de onda, que usualmente suelen emplearse:
- **Filtros:** que proporcionan solamente una longitud de onda seleccionada.¹⁸
- **Monocromadores:** que evitan la variación continua de la longitud de onda.¹⁸
- Una instalación que permita sostener la celda que contiene la muestra y el blanco de referencia en medio de la radiación del rayo utilizado.¹⁸
- Un dispositivo que sea capaz de medir la intensidad de la radiación del rayo transmitido a través de la celda. La función de un detector es responder a la radiación en la superficie y proporcionar una señal eléctrica proporcional a la intensidad de dicha radiación. Hay dos tipos de detectores que son usados en espectrofotometría UV-visible. Los fotodiodos de silicón, que ahora son reemplazados con fototubos y celdas fotovoltaicas. Para máxima sensibilidad a bajos niveles de energía, se usa tubos fotomultiplicadores en instrumentos más caros, los fotomultiplicadores poseen la ventaja de responder en un rango de 190 a 950 nm.¹⁸
- Una pantalla para registrar la medición de una manera viable.¹⁸

Diagrama de bloques del funcionamiento de un espectrofotómetro UV- Visible.

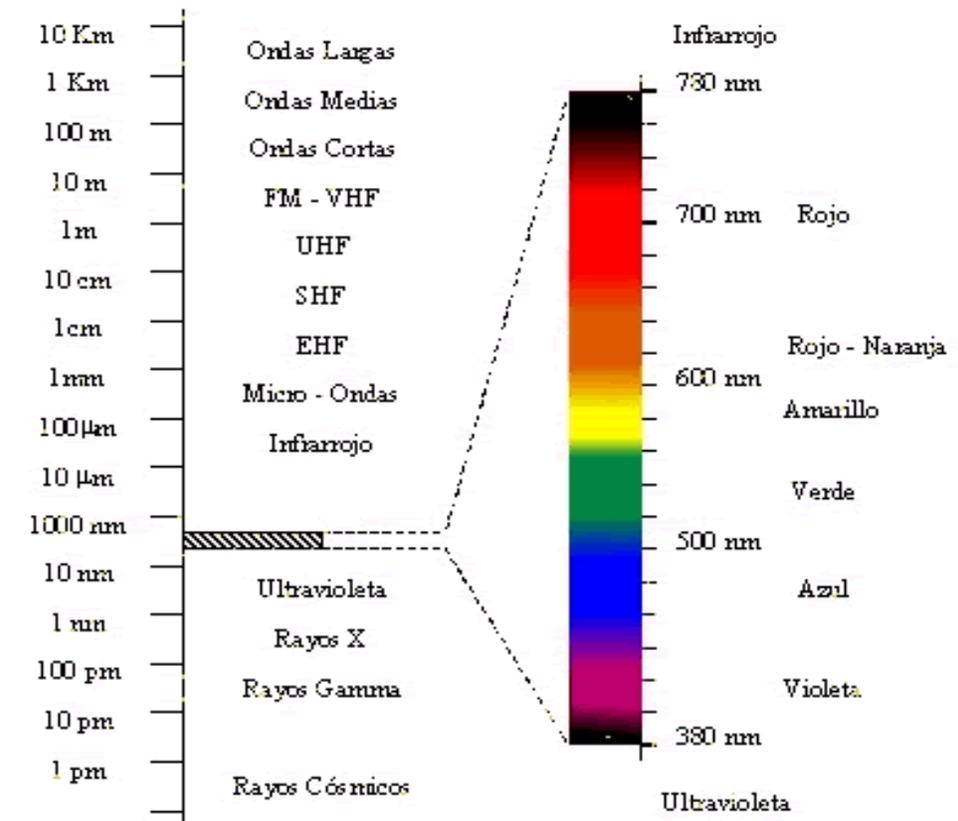
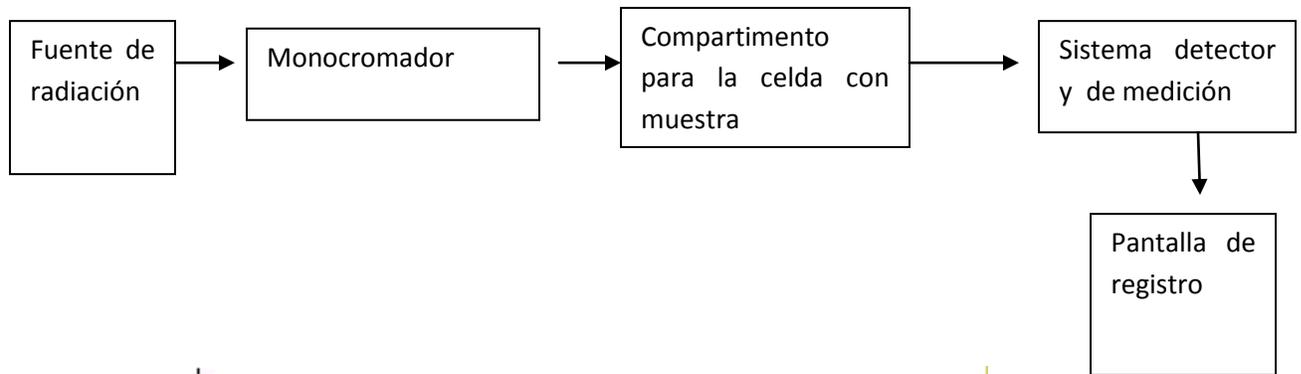


Fig. 3 Espectro electromagnético.

1.8 Cromatografía en capa fina

La cromatografía es un método físico o de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y la física. Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.²⁸

Las técnicas cromatográficas¹ son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Los componentes de la mezcla interactúan en distinta forma con la fase estacionaria. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando.²⁸

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. Los requisitos son un absorbente, placas, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de absorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas.²¹

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.²¹

Polaridad de los compuestos orgánicos en orden creciente:

hidrocarburos < olefinas < flúor < cloro < nitro < aldehído

aldehído < ester < alcohol < cetonas < aminas < ácidos < amidas

El desarrollo de los cromatogramas en capa fina se realiza normalmente por el método ascendente, esto es, al permitir que un eluyente ascienda por una placa casi en vertical, por la acción de la capilaridad. La cromatografía se realiza en una cubeta. Para conseguir la máxima saturación posible de la atmósfera de la cámara, las paredes se impregnan del eluyente.²¹

La elección del eluyente se realiza de forma empírica. Hay que estudiar la polaridad del componente y probar con eluyentes cada vez menos polares.²¹

Al aplicar en primer lugar eluyentes poco polares, podemos seguir utilizando la misma placa para aplicar otros eluyentes más polares, hasta dar con el más apropiado.²¹

Las placas pueden desarrollarse durante un tiempo prefijado, o hasta que se alcance una línea dibujada a una distancia fija desde el origen, esto se hace para estandarizar los valores de Relación de frentes o bien por su nombre en inglés Ratio of Front (RF).²¹

La constante Ratio of Front es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente y se define como:²¹

$$R_F = \frac{\text{distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}} = \frac{X}{Y}$$

La cromatografía en capa fina presenta una serie de ventajas frente a otros métodos Cromatográficos (en columna, en papel, en fase gaseosa) ya que el utillaje que precisa es más simple. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, que sobre papel destruirían el cromatograma. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos.²¹

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la Farmacia Universitaria de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, se desarrollo una nueva formulación para un enjuague bucal de extracto de encino.

Durante el desarrollo de una nueva formulación, es necesario llevar una serie de controles de calidad que garanticen que el nuevo producto es apto para su consumo, dentro de estos controles, uno de los mas importantes es la valoración, ya que permite cuantificar un componente especifico en la misma, proporcionando información de utilidad para un uso más seguro del producto en cuestión, garantizando que el producto cumple con el propósito establecido en las buenas prácticas de fabricación, por lo tanto se debe contar con un método analítico que cumpla con los requisitos que indiquen que es adecuado para aplicarse al producto en cuestión.

Debido a que no existe un método farmacopeico establecido que permita cuantificar el contenido de taninos presentes, es necesario el desarrollo del mismo, el cual posteriormente será evaluado, todo esto con la finalidad de garantizar que el mismo proporciona resultados confiables, y que por lo tanto puede ser utilizado como un método de rutina, tanto en estudios de estabilidad, como en producto terminado inicial.

Se propone el desarrollo un método de valoración mediante espectrofotometría visible (colorimetría), el cual debe ser indicativo de estabilidad, una vez que cumpla con los parámetros de validación requeridos, este podrá ser utilizado con el resto de las pruebas de control de calidad, e incluso en aquellas pruebas llevadas a cabo durante los estudios de estabilidad para el producto en cuestión. Así como el control de calidad de las materias primas. Con la finalidad de cumplir con el objetivo establecido en las buenas prácticas de fabricación, garantizando que el producto es apto para su uso.

3. OBJETIVO GENERAL

Innovar, y evaluar un método analítico por espectrofotometría visible, que permita cuantificar el contenido de taninos presentes en una formulación magistral de enjuague bucal extracto de encino, así como llevar a cabo los controles de calidad en sus materias primas.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- * desarrollar un método analítico que permita cuantifica el contenido de taninos presentes en la formulación de enjuague bucal de extracto de encino.
- * Proceder a la evaluación de los parámetros de validación correspondientes:
- * Evaluar especificidad.
- *Evaluar la precisión del sistema.
- *Evaluar la linealidad del sistema.
- * Evaluar la exactitud del método.
- * Evaluar la precisión del método.
- * Evaluar la robustez.
- * Evaluar la estabilidad analítica de la muestra.
- * En base a los resultados obtenidos realizar las correcciones necesarias en el método desarrollado.

4. HIPÓTESIS

De acuerdo a la estructura química de los taninos, se desarrollará un método analítico por espectrofotometría visible, para la cuantificación de taninos presentes en el enjuague bucal de extracto de encino, el cual cumplirá con los parámetros de validación necesarios, estos parámetros son; La especificidad, precisión del sistema, linealidad del sistema, exactitud del método, precisión del método, linealidad del método, robustez y finalmente estabilidad analítica de la muestra. Demostrando que el método analítico propuesto puede ser utilizado como método de valoración de rutina, tanto en productos terminados iniciales, como en estudios de estabilidad.

5. METODO

Se realizó el control de calidad de las materias primas a utilizar, así como de los materiales de envase, con la finalidad de garantizar un resultado confiable, en los posteriores estudios de estabilidad acelerada.

Debido a que existe un método analítico establecido para la cuantificación de taninos en el enjuague bucal de extracto de encino, fue necesario el desarrollo de un método analítico adecuado, con esta finalidad se probaron diversos métodos existentes para determinar si alguno era aplicable a la formulación.

La primera prueba que se realizó en cada método propuesto fue verificar que existiera respuesta analítica para el analito en cuestión, para lo cual se analizaron placebos, extracto de encino y muestras de producto terminado, con lo cual además se verificaría que dicha respuesta fuera favorable, es decir que no existiera interferencia por parte de otros componentes como principios activos existentes además de los taninos y excipientes.

Aquellos métodos que no presentaron una respuesta analítica específica para los taninos fueron descartados, a su vez, así como aquellos con un número elevado de variantes o bien aquellos demasiado tardados, ya que generaron errores analíticos, como coeficientes de variación superiores al 2%.

Finalmente se modificó el método descrito por Raymund R. Willis y Phillip R. Allen. En su artículo titulado: "Improved Method for Measuring Hydrolizable Tannins Using Potassium Iodate", en el cual estudian el efecto de la temperatura de congelación en la cuantificación de taninos al reaccionar éstos con yodato de potasio al 2.5%, y registran su absorbancia a 550 nm. Debido a que es más simple, rápido, y la cantidad de variantes que pueden ocasionar errores es inferior a las existentes en otros métodos, a su vez los coeficientes de variación obtenidos fueron inferiores al 2%.

Para designar al método analítico como adecuado, se llevó a cabo la validación del mismo, evaluando cada uno de los parámetros correspondientes, con lo cual se demostró que el método puede ser utilizado para la valoración de taninos presentes en la formulación, a su vez se realizaron pruebas en placebos, extracto de encino y producto terminado, tanto íntegro, como degradado por hidrólisis ácida, alcalina, oxidación y reducción, demostrando que el método analítico además de ser aplicable al producto terminado, es indicativo de estabilidad, es decir la respuesta analítica obtenida es debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes como productos de degradación del principio activo, o bien de excipientes, por lo cual el método puede ser utilizado en pruebas de estabilidad proporcionando resultados confiables.

5.1 Material

- Vasos de precipitados de 100 mL.
- Pipetas volumétricas de 1 mL de capacidad.
- Pipetas volumétricas de 3 mL de capacidad.
- Pipetas volumétricas de 5 mL de capacidad.
- Probeta graduada de 50 mL.
- Gradilla.
- Tubos de ensayo.
- Matraces volumétricos de 25 mL.
- Matraces volumétricos de 50 mL.
- Matraces volumétricos de 100 mL.
- Celdas espectrofotométricas de vidrio.
- Soporte universal.
- Pinza doble de presión.
- Bureta de 10 mL de capacidad.
- Espátula.
- Piceta de 500 mL de capacidad.
- Matraz balón 100 mL de capacidad.
- Tubos de ensayo con capacidad de 10 mL con tapón de baquelita.

5.2 Equipo

- Baño de agua Marca Ríos Rocha S.A.
- Vortex para tubo de ensayo Marca Craft.

5.3 Instrumentos

- Colorímetro Marca Barnsted Turner.
- Balanza analítica Marca Ohaus.
- Termómetro.
- Refractómetro de Abbe Marca Atago.

5.4 Sustancias de referencia

- Ácido tánico marca Meyer.
- Fenol marca Meyer.
- Benzocaina.
- Extracto hidroalcoholico de encino marca Mixim.

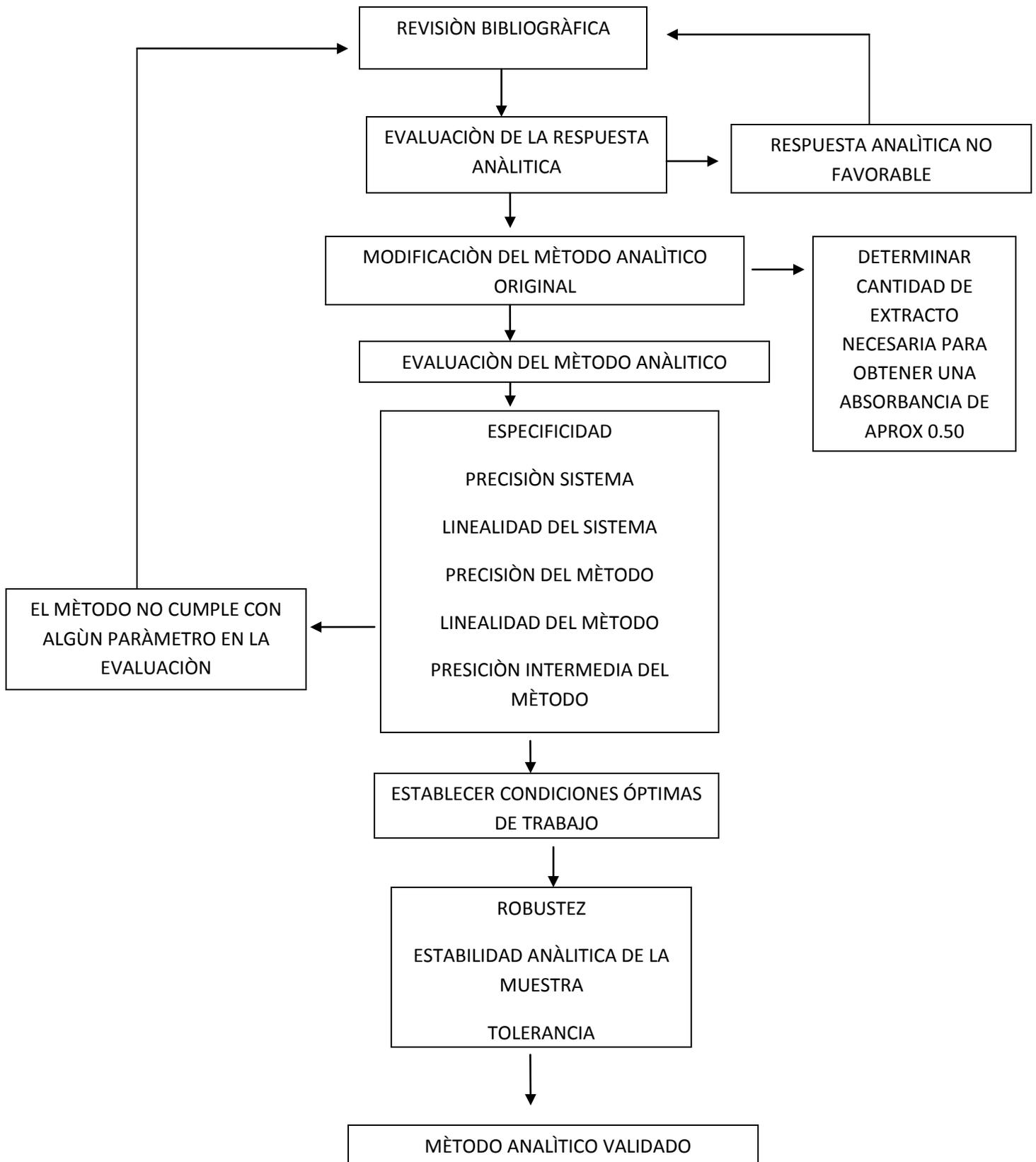
5.5 Reactivos analíticos

- Alcohol etílico grado R.A.
- Acetato de etilo grado R.A.
- Agua destilada.
- Zinc Metálico grado R.A.
- Ácido Clorhídrico grado R.A.
- Hidróxido de sodio grado R.A.
- Peróxido de hidrogeno grado R.A.
- Acetona grado R.A.
- Ácido Fosfórico grado R.A.

5.6 Soluciones.

- Solución de Ácido clorhídrico (HCl) 2N.
- Solución de Hidróxido de sodio (NaOH) al 10%.
- Solución de Peróxido de Hidrogeno (H₂O₂) al 30%.
- Solución de Yodato de potasio al (KIO₃) al 2.5%.
- Solución de Acetona al 70%.
- Solución de Ácido fosfórico (H₃PO₄) al 0.1%.

5.7 Diagrama de bloques de la validación del método analítico desarrollado



5.8 Innovación del método analítico.

Partiendo de una reacción entre la gelatina y los taninos presentes en la muestra, que genera la precipitación de los mismos en combinación con caolín coloidal y solución saturada de NaCl acidificada con HCl 0.2 N a un pH 3.

Se midió 1 mL de extracto de encino, a esta muestra se le extrajeron los taninos precipitándolos, añadiendo 10 mL de gelatina al 25%, 20 mL de solución de Cloruro de sodio acidificada, posteriormente se agregó 2 g de caolín coloidal y 20 mL de agua destilada, se agito por 5 minutos, para posteriormente decantar y centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos, se tomaron 2 mL de este centrifugado, se transfirieron a matraces erlenmeyer de 125 mL de capacidad, añadiendo 2 mL de indicador índigo carmín y se titulo con solución estandarizada de Permanganato de potasio, comparándose con otra titulación de una muestra de extracto de encino sin el tratamiento antes propuesto, es decir una muestra con taninos presentes. En ambos casos hasta obtener un color amarillo estable, y mediante las diferencias en volúmenes gastados se estimo la cantidad de taninos presentes en la muestra, sin embargo este método fue descartado, debido a la gran cantidad de variables que interfieren en el método analítico, así como por la dificultad del manejo de la muestra añadir cantidades grandes de gelatina para precipitar todos los taninos presentes.

Otro método alternativo propuesto fue el del uso de vainillina como reactivo para la cuantificación y el del uso de azul de tetrazoleo, sin embargo ambos métodos fueron descartados debido a la baja reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Finalmente el método empleado es el propuesto en el artículo titulado “Improved method for measuring hidrolizable tannins using potassium iodate” escrito por Raymond B. Willis y Phillip R Allen, el cual se utiliza una solución de yodato de potasio al 2.5% con la finalidad de generar un complejo colorido entre el yodo del reactivo y los taninos presentes en la muestra, lo cual hace posible la cuantificación de los mismos midiendo su absorbancia a 550 nm. En dicho artículo se investiga el efecto de la congelación en la respuesta analítica obtenida tras un tratamiento con acetona al 70%, así como en la determinación del tiempo y temperatura óptimos de calentamiento, con la finalidad de obtener el máximo de respuesta analítica obtenida (absorbancia).

Este método a su vez propone medir la cantidad de taninos directamente al disolverla muestra procedentes de diversas plantas con cinco mL acetona al 70% y hacerla reaccionar con un mL yodato de potasio al 2,5% y no con la extracción con solventes para su posterior cuantificación, ya que algunos de estos ocasionan la precipitación de parte de los taninos presentes, generando una resultados imprecisos, lo cual lleva a resultados con baja reproducibilidad, para la determinación del tiempo optimo de reacción, el artículo propone disolver la muestra en acetona al 70%, llevar a cabo la reacción con acetona y colocar en un baño de agua a 25° C y medir su absorbancia a 550 nm cada 2 minutos. Como resultado de la investigación, el método establece como temperatura y tiempo óptimos de calentamiento para la determinación de taninos 25° C y 7 minutos respectivamente.

Con esta información obtenida a partir del artículo, se propuso aplicar el método descrito anteriormente al enjuague bucal de extracto de encino como método de valoración, y llevar a cabo las correcciones necesarias que permitieran su validación, el primer paso fue determinar que existiera una respuesta analítica favorable, una vez obtenida, se procedió a determinar la cantidad de extracto de encino necesaria en la muestra para generar una absorbancia de aproximadamente 0.500, todo esto con la finalidad de establecer esta concentración como 100% y hacer posible la validación cumpliendo con la ley de Beer.

Una vez obtenida la concentración de extracto y estándar, necesarias para obtener una respuesta analítica favorable, se procedió a la evaluación de los parámetros de validación de la manera que se indica a continuación.

5.9 Descripción del método analítico propuesto.

Preparación de la sustancia de referencia. Preparar una solución de ácido tánico de pureza conocida (88%) en acetona al 70%, que contenga una concentración de 1mg/mL, pesar 56.8 de ácido tánico, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y aforar con acetona al 70%. Tomar 1 alícuota de 1 mL, transferir a un tubo de ensayo con 5 mL yodato de potasio al 2.5% puesto a 25° C con anterioridad, agitar en vortex 1 minuto, calentar en baño de agua a 25° C por 7 minutos.

Preparación de la muestra. Tomar una alícuota de 5 mL de enjuague bucal, transferir a un matraz volumétrico de 25 mL, homogeneizar y completar a volumen con acetona al 70%, tomar 1 alícuota de 3 mL de esta solución y transferir nuevamente a un matraz volumétrico de 25 mL, homogeneizar y aforar nuevamente con acetona al 70%. Tomar una alícuota de 1 mL, transferir a un tubo de ensayo con 5 mL yodato de potasio al 2.5% puesto a 25° C con anterioridad, agitar en vortex 1 minuto, calentar en baño de agua a 25° C por 7 minutos.

Transcurrido el periodo de calentamiento en el baño de agua a 25° C, determinar la absorbancia de la solución de referencia, así como de la muestra a una longitud de onda de 550 nm, utilizando una mezcla de 5 mL de yodato de potasio al 2.5% a 25° C y 1 mL de acetona al 70% como blanco de ajuste.

Calcular la cantidad de taninos presentes en el enjuague bucal mediante la siguiente fórmula:

$$(A_m/A_s)(C_s/V_m) \times 41.666 = \text{mg/ml de taninos en el enjuague bucal.}$$

En donde

A_m: absorbancia de la muestra.

A_s: absorbancia de la solución de referencia.

C_s: concentración de la solución de referencia en mg/mL.

V_m: Volumen de la muestra en mL.

41.666: factor de dilución de la muestra.

La evaluación de los distintos parámetros de validación se realizó de la manera que se describe a continuación:

Para llevar a cabo la validación, primero se llevó a cabo el método para determinar las diluciones necesarias para obtener un valor de absorbancia de 0.5 o aproximado, lo cual permitiría evaluar los parámetros de desempeño necesarios y que a su vez estos mismos cumplieran con la ley de Beer.

Especificidad. Se determinó llevando a cabo el método en muestra de producto terminado, placebo y placebo adicionado. Para lo cual se preparó muestras de producto terminado y placebo adicionado con contenido aproximado de 1 mg/mL de ácido tánico, usando acetona al 70% como medio de dilución, a su vez el placebo se maneja de la misma manera establecida en el método, para el caso del placebo añadido y el producto terminado la respuesta debería ser únicamente debida al producto de interés, y para el placebo nula o no significativa.

Con la finalidad de determinar la especificidad del método analítico, se llevó a cabo la determinación del medio de elusión a utilizar más adelante, para lo cual se llevó a cabo las cromatografías en capa fina de cada uno de las muestras a utilizar en la validación, así como sus distintas fases de degradación, teniendo como objetivo, no solo demostrar que dicha muestra sufrió degradación, también con fines de identificación de los posibles productos de degradación presentes en las mismas.

Posteriormente se determinó si el método era indicativo de estabilidad, para lo cual se llevó a cabo la hidrólisis ácida, hidrólisis básica, así como la oxidación y la reducción de muestras de producto terminado, placebo, y solución estándar de ácido tánico. Para la hidrólisis ácida se utilizó HCl 2N, la hidrólisis básica se llevó a cabo con NaOH al 40%, la oxidación con H₂O₂ al 30% y finalmente la reducción al reaccionar con HCl 2N añadiendo una pizca de Zn metálico, para todas las reacciones de degradación la proporción de muestra y reactivos fue de 1:1. En todas las reacciones las respectivas muestras fueron sometidas a reflujo por 4 horas, las muestras degradadas fueron tratadas con el método analítico, cuya respuesta analítica debería ser inferior a las muestras sin degradación, lo cual indicaría que es debida al analito de interés y no a otros componentes como productos de degradación.

Especificidad respecto al placebo. Se preparo placebo analítico conteniendo fenol al 3% y benzocaina de acuerdo a lo establecido en la formulación, se tomo una alícuota de 5 mL, la cual fue transferirá a un matraz volumétrico de 25 mL, se completo a volumen con acetona al 70%, posteriormente se tomo nuevamente una alícuota de 3 mL, que fue transferirá a un matraz volumétrico de 25mL llevando volumen con acetona al 70%, se tomo una alícuota de 1 mL de esta ultima dilución, realizando el método analítico, a su vez se llevo a cabo el barrido de 400 a 700 nm, así como su respectiva cromatografía en capa fina de la ultima dilución realizada

Especificidad respecto al estándar de ácido tánico. Se llevo a cabo de la misma manera que se describe para el placebo, sustituyendo el placebo por solución estándar de acido tánico conteniendo 236 mg/mL, con la final de obtener una dilución final con una concentración final de aproximada de 1 mg/mL.

Especificidad respecto al producto terminado. Se llevó a cabo de la misma manera que la descrita para el placebo, sustituyendo la alícuota de placebo, por una alícuota de 5 mL de producto terminado, preparado como se establece en la formulación.

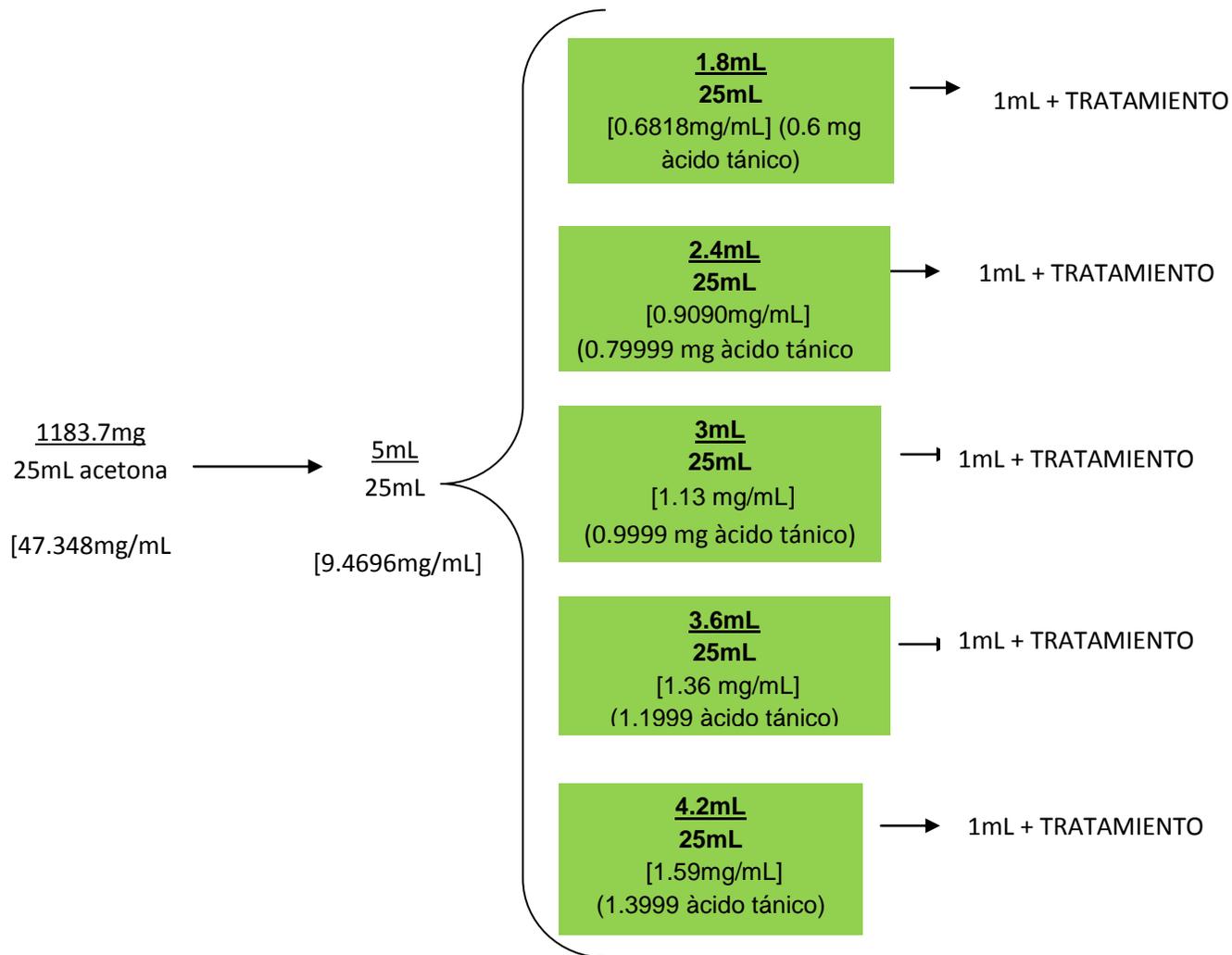
Especificidad respecto a los productos de degradación del placebo. Se tomo una alícuota de 5 mL del placebo analítico degradado y se procedió de la misma manera que la descrita anteriormente para el placebo analítico (este proceso se llevo a cabo para cada fase degradación: hidrolisis acida, alcalina, oxidación y reducción) llevando a cabo sus respectivos barridos de 400 a 700 nm, así como las respectivas cromatografías en capa fina.

Especificidad respecto a los productos de degradación de la solución estándar de acido tánico. Se tomo una alícuota de 5 mL de la sustancia de referencia degradada y se procedió de la misma manera que la descrita anteriormente para la muestra de solución estándar de acido tánico (este proceso se llevo a cabo para cada fase degradación: hidrolisis acida, alcalina, oxidación y reducción) llevando a cabo sus respectivos barridos de 400 a 700 nm, así como las respectivas cromatografías en capa fina.

Especificidad respecto a los productos de degradación del producto terminado. Se tomo una alícuota de 5 mL del producto degradado y se procedió de la misma manera que la descrita anteriormente para el producto (este proceso se llevo a cabo para cada fase degradación: hidrolisis acida, alcalina, oxidación y reducción) llevando a cabo sus respectivos barridos de 400 a 700 nm, así como las respectivas cromatografías en capa fina.

Precisión del sistema. Se determinó por análisis de seis muestras de una solución de acido tánico (utilizado como referencia) con una concentración de 1 mg/mL, valor considerado como 100% para el analito de interés, preparadas a partir de una solución stock, calculando, su promedio y CV.

Linealidad del sistema. Se llevò acabo a partir de soluciones stock iniciales de acido tánico de distinta concentración, disueltas en acetona al 70%, para lo cual se realizaron las diluciones señaladas en el método y llevando a acabo el tratamiento anteriormente descrito, de acuerdo al diagrama que se muestra a continuación.

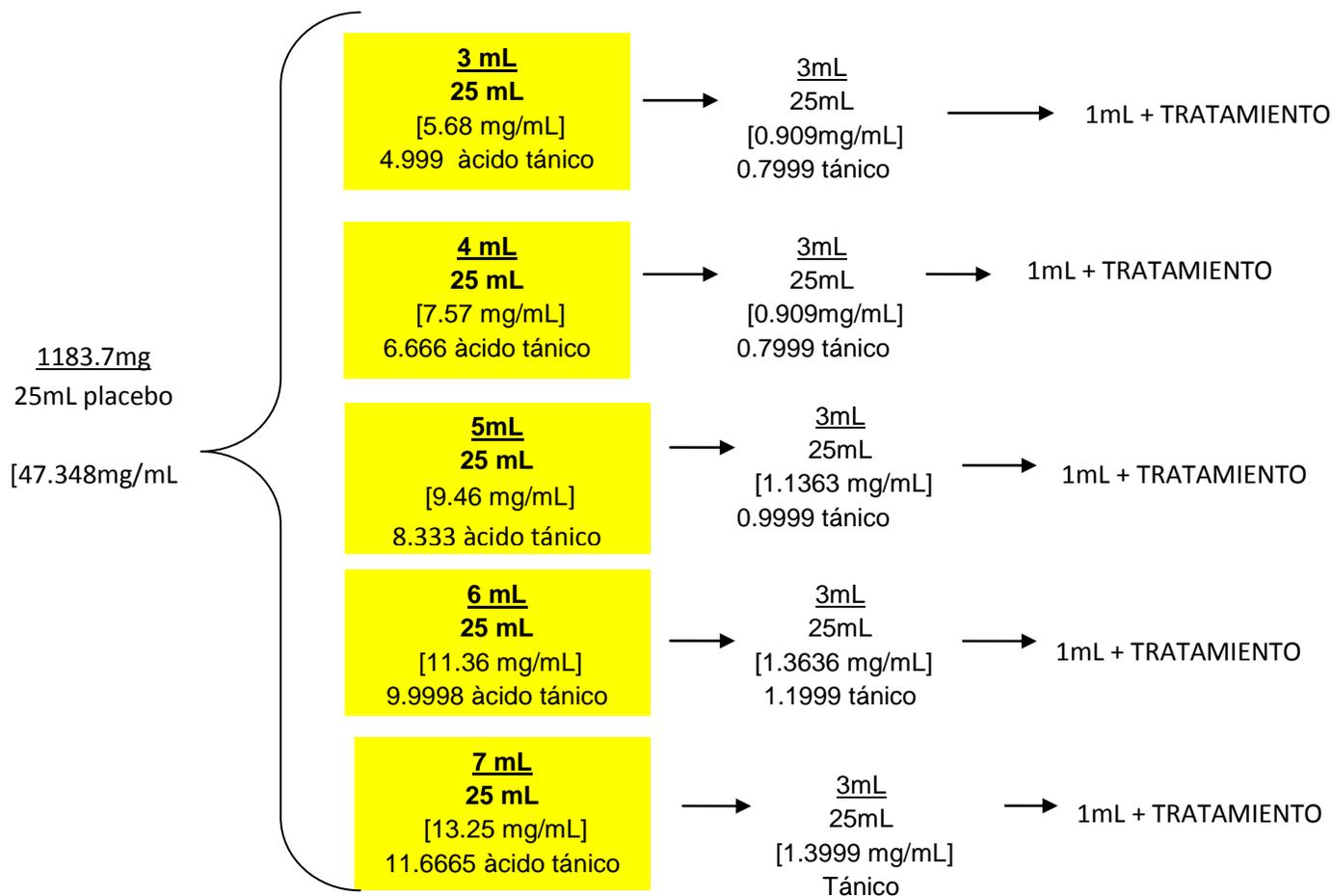


Para cada nivel el método analítico se llevo a cabo por triplicado a excepción del nivel establecido como 100%, que se llevo a cabo por sextuplicado para evaluar el parámetro de precisión del sistema.

Se calculo el promedio, desviación estándar en cada nivel de concentración, así como su coeficiente de correlación, intervalo de confianza y se trazo el grafico correspondiente.

Precisión del método. Se determino por análisis de seis muestras de placebo adicionado (utilizando como referencia acido tánico) con una concentración de 1 mg/mL, valor considerado como 100% para el analito de interés, preparadas a partir de una solución stock, se calcular0, su promedio y CV.

Linealidad del método. Se llevo acabo a partir de placebos adicionados de acido tánico de distinta concentración, para lo cual se realizaron las diluciones señaladas en el método y llevando a acabo el tratamiento anteriormente descrito, de acuerdo al diagrama mostrado a continuación.



Para cada nivel el método analítico se llevo a cabo por triplicado a excepción del nivel establecido como 100%, que se llevo a cabo por sextuplicado para evaluar el parámetro de precisión y exactitud del método.

El intervalo para la linealidad del método se extenderá hasta abarcar con los porcentajes de 60% y 140%, esto con la finalidad de evaluar la uniformidad de dosis.

Se calculo el promedio, desviación estándar en cada nivel de concentración, así como su coeficiente de correlación, intervalo de confianza y se trazo el grafico correspondiente.

Precisión intermedia del método. Se llevo a cabo por 2 analistas, llevando a cabo el todo, con muestras de placebo adicionado, a partir de la cantidad de acido tánico establecida como 100%, el método analítico se realizo por triplicado, por ambos analistas, calculando el CV de cada analista, de manera individual, así como en conjunto por los 2 días.

Robustez. Se llevo a cabo estableciendo aquellos factores determinantes en la respuesta analítica, para el método analítico propuesto el tiempo y la temperatura, considerando como condiciones normales de operación 7 minutos y 25° C respectivamente, el parámetro se evaluó a partir de muestras de placebo adicionado preparadas de manera independiente y a partir de una solución stock inicial homogénea, llevando a cabo las diluciones establecidas en el método analítico para obtener una concentración final de 1 mg/mL de ácido tánico, las muestras se procesaron de manera simultánea y por triplicado, para llevar a cabo el tratamiento final de las muestras, calentado en baño de agua a 25° C modificando el tiempo por 4 y 10 minutos, así como por 7 minutos modificando la temperatura a 20° y 30° C y finalmente comparar con las condiciones normales de operación, de 25° c y 7 minutos de calentamiento.

Estabilidad analítica de la muestra. Se realizó a partir de muestras independientes, preparadas a partir de un placebo adicionado con una concentración final de 1mg/mL de ácido tánico, empleando el método analítico y verificando la respuesta obtenida a los 10 minutos de calentamiento, 15 y finalmente 20 minutos, para compararse con el tiempo normal de operación de 7 minutos.

Tolerancia. Se realizó a partir de muestras independientes, preparadas a partir de un placebo adicionado con una concentración final de 1mg/mL de ácido tánico, empleando el método analítico y verificando la respuesta obtenida, a diferencia de la robustez, en este parámetro se evaluó el cambio en la respuesta analítica al utilizar un espectrofotómetro uv-visible, comparándola con la obtenida con el colorímetro utilizado durante el resto de la validación.

6. RESULTADOS.

6.1 Control de Calidad de la Benzocaina.

Cuadro 3. Control de Calidad Benzocaina.

Prueba	Especificación	Resultado	Dictamen
Ensayo de Identidad A	20 mg muestra + HCl 3N+ Nitrito de Sodio+ α -naftol, forma precipitado rojo	Precipitado rojo	Aprobado.
Ensayo de Identidad B	Disolver 1 g en 10 mL de alcohol, diluir con H ₂ O, añadir 2 gotas de fenolftaleina y una gota de NaOH 0.1 N produce color violeta	Color violeta	Aprobado.
Rango de fusión	Entre 88° C y 92° C pero no mas de 2° C de diferencia entre el inicio y el final.	1. Inicio 89° C, final 90° C. 2. Inicio 89° C, final 90° C. 3. Inicio 90° C, final 91° C.	1. Aprobado. 2. Aprobado. 3. Aprobado.
Residuo de Ignición	No más del 1% del peso inicial.	1. 0.28%. 2. 0.26%. 3. 0.29%	$\bar{X} = 0.276 \%$
Pérdida por secado	No más del 1% del peso inicial.	1. 0.36%. 2. 0.34%. 3. 0.38%	$\bar{X} = 0.36\%$
Cloruros	200 mg en 5 mL de alcohol con HNO ₃ diluido + nitrato de plata produce turbidez	turbidez	Aprobado
Ensayo	Cada mL de nitrito de sodio equivale a 16.52 mg de benzocaina No menos del 98 y no más del 101% de benzocaina.	1. 98.7% 2. 98.4% 3. 98.8%	Aprobado. $\bar{X} = 98.63$ CV= 0.211

6.2 Control de calidad fenol

Cuadro 4. Control de Calidad Fenol.

Prueba	Especificación	Resultado	Dictamen
Ensayo de Identidad A	10 mL de solución (1 en 100)+ 1 gota de cloruro férrico produce color violeta.	Color violeta	Aprobado
Ensayo de identidad B	Solución muestra al 1%+ SR de agua de Bromo genera un precipitado blanco.	Precipitado blanco	Aprobado.
Descripción	Cristales en forma de agujas o masa incolora cristalina.	Cristales en forma de agujas	Aprobado.
Aspecto de la solución	1 g de la muestra en 15 mL de H ₂ O, la solución es clara.	Solución clara	Aprobado.
Residuo de ignición	No especificado	1. 0.38%. 2. 0.32% 3. 0.36%	No especificado. — $\bar{X}=0.35\%$
Pérdida por secado	Menos del 1%	1. 0.71% 2. 0.76 % 3. 0.68%	Aprobado — $\bar{X}=0.71\%$
Ensayo	1 mL de Bromuro 0.1 N es equivalente a 1.569 mg de fenol. No menos del 99% y no más de 100.5%.	1. 99.0%. 2. 99.5%. 3. 99.7	Aprobado. — $\bar{X}= 99.4\%$ CV= 0.363

6.3 control de Calidad Extracto de Encino.

Cuadro 5. Control de Calidad Extracto de Encino.

Prueba	Especificación	Resultado	Dictamen
Limite microbiano	Sin coliformes Sin hongos (menos de 10 UFC).	Coliformes (caldo lactosado)	
		Lote 1.	
		1. Menos de 10 UFC.(sin crecimiento).	Aprobado
		2. Menos de 10 UFC.(sin crecimiento).	
		3. Menos de 10 UFC.(sin crecimiento).	
		Lote 2.	
		1. Menos de 10 UFC.(sin crecimiento).	Aprobado.
		2. Menos de 10 UFC.(sin crecimiento).	
		3. Menos de 10 UFC.(sin crecimiento).	
		Hongos (Agar Saboraud)	
		Lote 1.	
		1. Menos de 10 UFC.(sin crecimiento).	Aprobado
		2. Menos de 10 UFC.(sin crecimiento).	
		3. Menos de 10 UFC.(sin crecimiento).	
		Lote 2.	
1. Menos de 10 UFC.(sin crecimiento).	Aprobado		
2. Menos de 10 UFC.(sin crecimiento).			
3. Menos de 10 UFC.(sin crecimiento).			
	Especificacion	Resultado	Dictamen

Prueba	Especificación	Resultado	Dictamen
pH	Lote 1= 5.01 Lote 2= 5.29 (de acuerdo al certificado)	Lote 1 1. 5.05 2. 5.01 3. 5.07	\bar{X} = 5.04 CV= 0.606
		Lote2. 1. 5.26. 2. 5.29 3. 5.24	\bar{X} = 5.26 CV= 0.478
Densidad	Lote 1=0.9961g/mL Lote2= 0.9811g/mL (de acuerdo al certificado)	Lote 1. 1. 0.973g/mL 2. 0.978g/mL 3. 0.970g/mL	\bar{X} = 0.973 g/mL. CV= 0.415
		Lote2. 1. 0.983g/mL 2. 0.988g/mL 3. 0.981g/mL	\bar{X} =984 g/mL CV=0.366
Olor	Lote1. Maderoso, nota acida. Lote2. Maderoso, nota acida.	Lote1. Maderoso, nota acida. Lote2. Maderoso, nota acida.	Aprobado. Aprobado.
		Liquido café oscuro	Lote 1. Liquido café oscuro Lote 2. Liquido café oscuro
Viscosidad	No especificado	Lote 1. 0.016 poises, 0.016 poises, 0.015 poises	\bar{X} = 0.0156 poises.
		Lote 2. 0.015 poises, 0.015 poises, 0.015 poises.	\bar{X} = 0.015 poises. No especificado.
Sabor	Maderoso, astringente. (de acuerdo al certificado)	Lote1. Maderoso, astringente. Lote2. Maderoso, astringente.	Aprobado. Aprobado.
		Solución clara. (de acuerdo al certificado)	Lote1. Solución clara. Lote2. Solución clara.
% de sólidos	Lote1. 21.08% Lote2. 20.39% (de acuerdo al certificado)	Lote1. 1. 20.89%. 2. 20.84%. 3. 20.91%	\bar{X} = 20.88%
		Lote2. 1. 20.30%. 2. 20.45%. 3. 20.39%	\bar{X} =20.38%
Color de la solución.	No especificado.	Lote 1. Mas oscuro que la solución B.	Aprobado
		Lote1. Mas oscuro que la solución B.	Aprobado

6.4 Resultados de validación.

6.4.1 Métodos evaluados.

Cuadro 6. Métodos Evaluados.

Métodos Evaluados	Resultado en la respuesta
Método de precipitación de taninos con gelatina con caolín coloidal y cloruro de sodio acidificado	Respuesta favorable a bajas concentraciones de taninos (extracto de encino al 50% o inferior), pero a concentración mayor la muestra solidifica, lo cual dificulta la cuantificación de taninos presentes en la misma.
Azul de tetrazoleo	Rápido y sencillo, sin embargo presenta baja precisión en los resultados analíticos con valores de CV superiores al 2%. Coeficiente de variación del 2.75%
Método de la vainillina	Rápido y simple, sin embargo debido al elevado costo del reactivo de vainillina, no fue llevado a cabo.
Método de la cuantificación mediante Yodato de potasio al 2.5%	Rápido, sencillo, con resultados reproducibles.

6.5. Sistemas de Elución Evaluados y respuesta analítica obtenida.

Cuadro 7. Sistemas de Elución Evaluados para la Cromatografía en Capa Fina.

	Butanol (mL)	Acido acético (mL)	Agua (mL)	Resultado
Sistema 1	3	1	6	Polaridad excesiva, la muestra no corre, parte inferior de la placa oscurecida, sin separación.
Sistema 2	4	1	5	Polaridad excesiva, la muestra no corre, parte inferior de la placa oscurecida, sin separación.
Sistema 3	5	1	4	Polaridad alta, la muestra no corre lo suficiente, parte inferior de la placa ligeramente oscurecida, la separación no es la suficiente como para determinar valores de RF.
sistema 4	6	1	3	Polaridad alta, parte inferior de la placa ligeramente ya no esta oscurecida, la separación no es la suficiente como para determinar valores de RF.

Cuadro 8. Nuevos Sistemas de Elusión Evaluados para la CCF.

	Metanol (mL)	Acido fosfórico al 0.1% (mL)	Acetato etilo (mL)	de Resultado
Sistema a	3	2	2	Separación no efectiva, la muestra no corre lo suficiente como para determinar valores de RF.
Sistema b	3.5	2	3	Separación ideal y por lo tanto el utilizado en la prueba.
Sistema c	4	2	4	La muestra corre demasiado, sin separación.

Cuadro 9. Verificación de la respuesta analítica usando acetona al 70% como blanco de ajuste respecto al blanco de reactivos.

muestra	Respuesta analítica	Dictamen
1	0.001	
2	0.002	Respuesta no significativa
3	0.001	

Cuadro 10. Verificación de la respuesta analítica usando blanco de reactivos como blanco de ajuste respecto así mismo.

muestra	Respuesta analítica	Dictamen
1	0.001	
2	0.002	Respuesta no significativa
3	0.001	

Cuadro 11. Verificación de la respuesta analítica usando blanco de reactivos como blanco de ajuste respecto al placebo analítico.

muestra	Respuesta analítica	dictamen
1	0.000	
2	0.001	Respuesta no significativa
3	0.001	

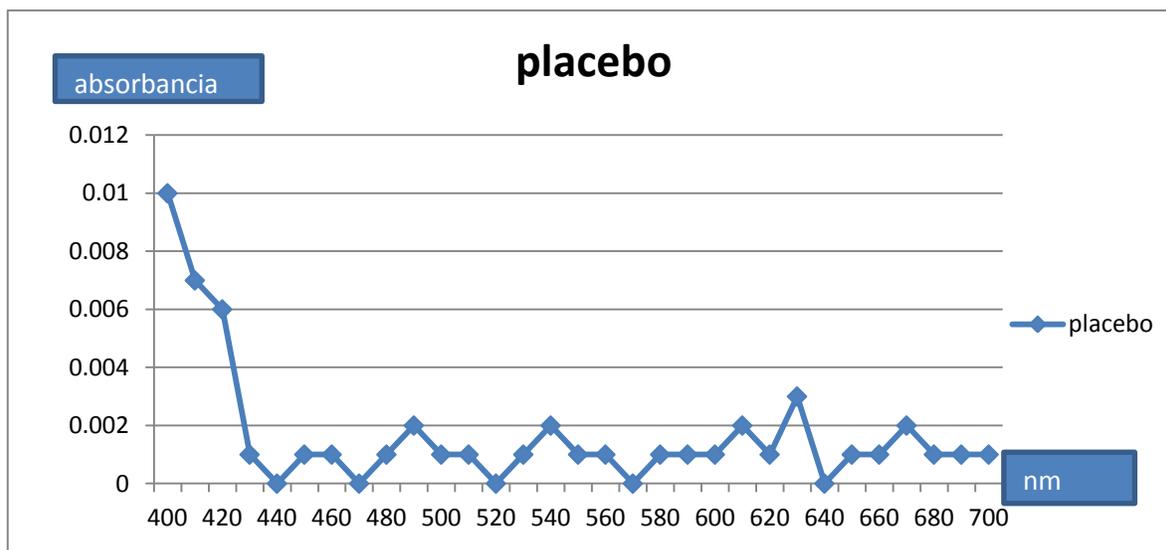


Grafico 1. Barrido de 400 nm a 700nm para el placebo.

Espectros de placebo analítico degradado empleados en la especificidad del método respecto a los productos de degradación.

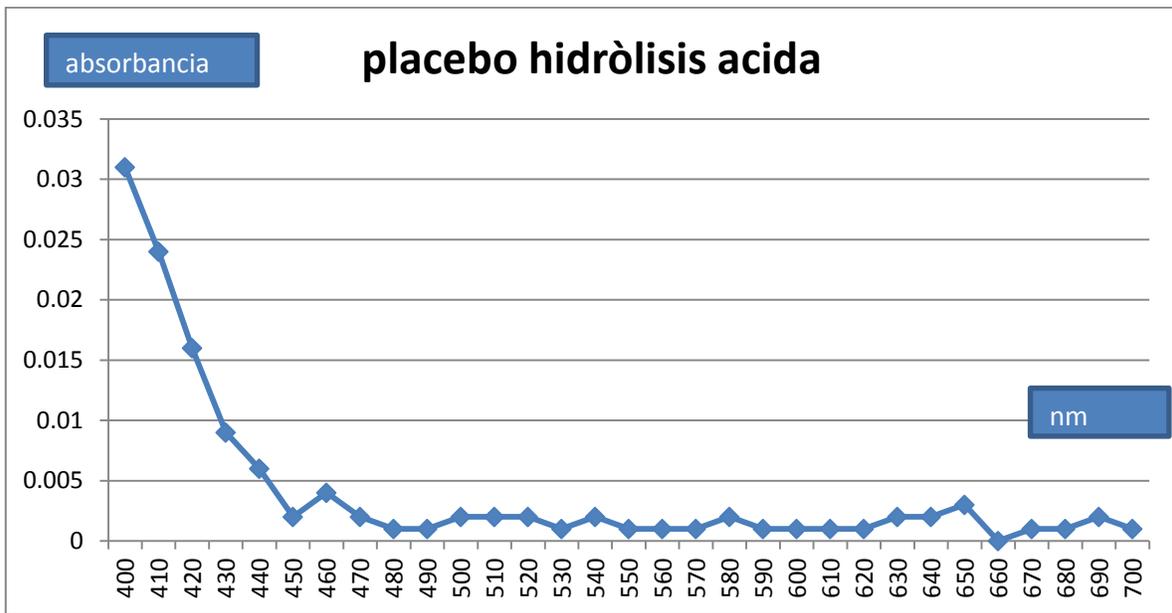


Grafico 2. Espectro que muestra la ausencia de respuesta analítica en placebo degradado por hidrólisis acida con acido clorhídrico al llevar a cabo la reacción con yodato de potasio al 2.5% en la región visible, registrado de manera puntual.

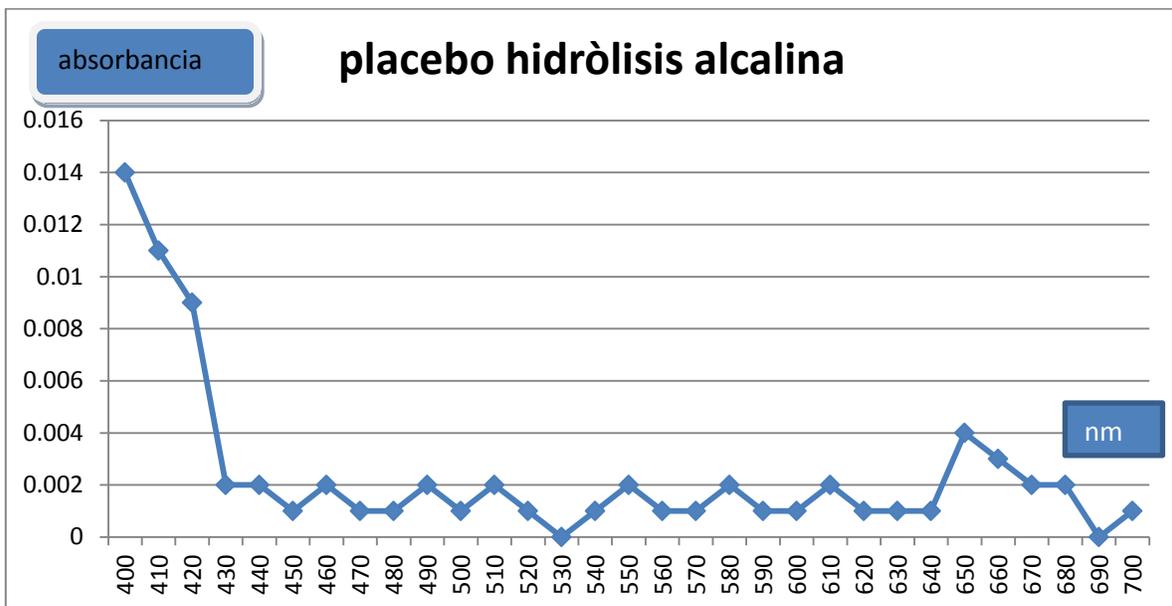


Grafico 3. Espectro que muestra la ausencia de respuesta analítica significativa en placebo degradado por hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio al llevar a cabo la reacción con yodato de potasio al 2.5% en la región visible, registrado de manera puntual.

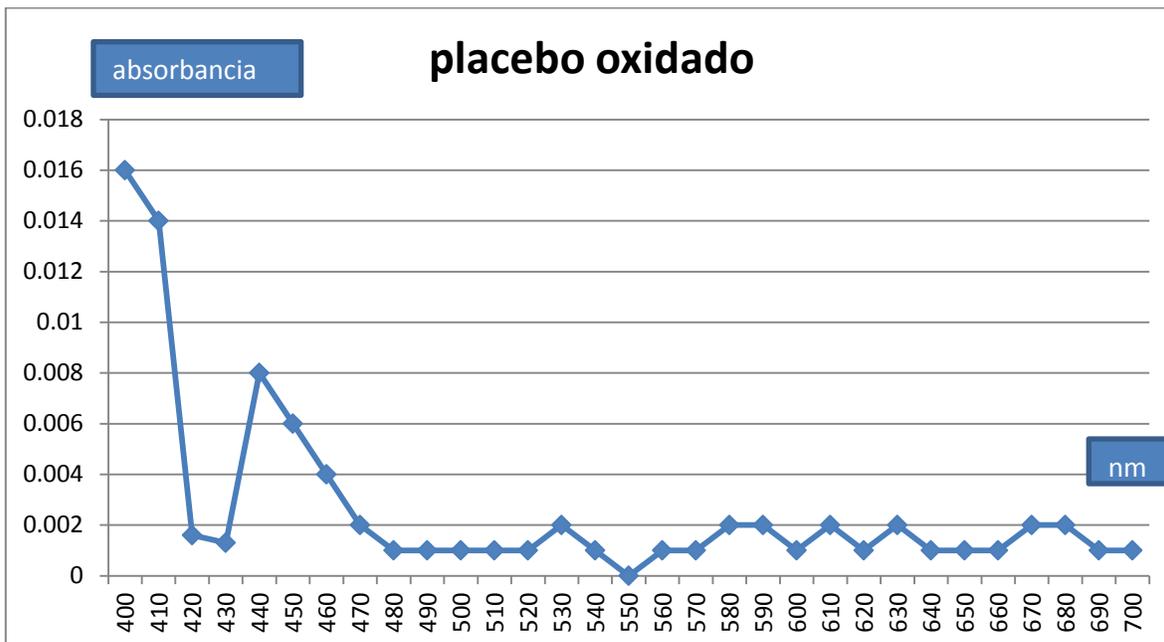


Grafico 4. Espectro que muestra la ausencia de respuesta analítica significativa en placebo degradado por oxidación con peróxido de hidrogeno al llevar a cabo la reacción con yodato de potasio al 2.5% en la región visible. Registrado de manera puntual

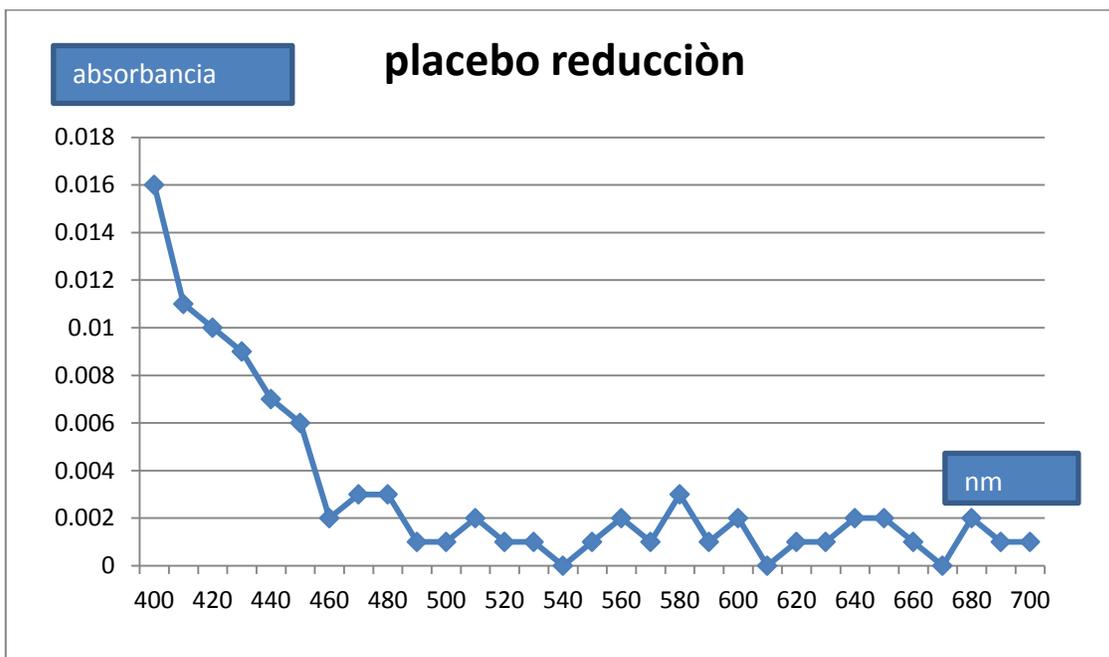


Grafico 5. Espectro que muestra la ausencia de respuesta analítica significativa en placebo degradado por zinc y acido clorhídrico al llevar a cabo la reacción con yodato de potasio al 2.5% en la región visible, registrado de manera puntual.

Cuadro 12. Verificación de la respuesta analítica usando blanco de reactivos como blanco de ajuste y solución estándar de ácido tánico como muestra.

muestra	Respuesta analítica	
1	0.493	$\bar{X} = 0.493$
2	0.499	$\sigma = 0.005$
3	0.489	$CV = 0.847$

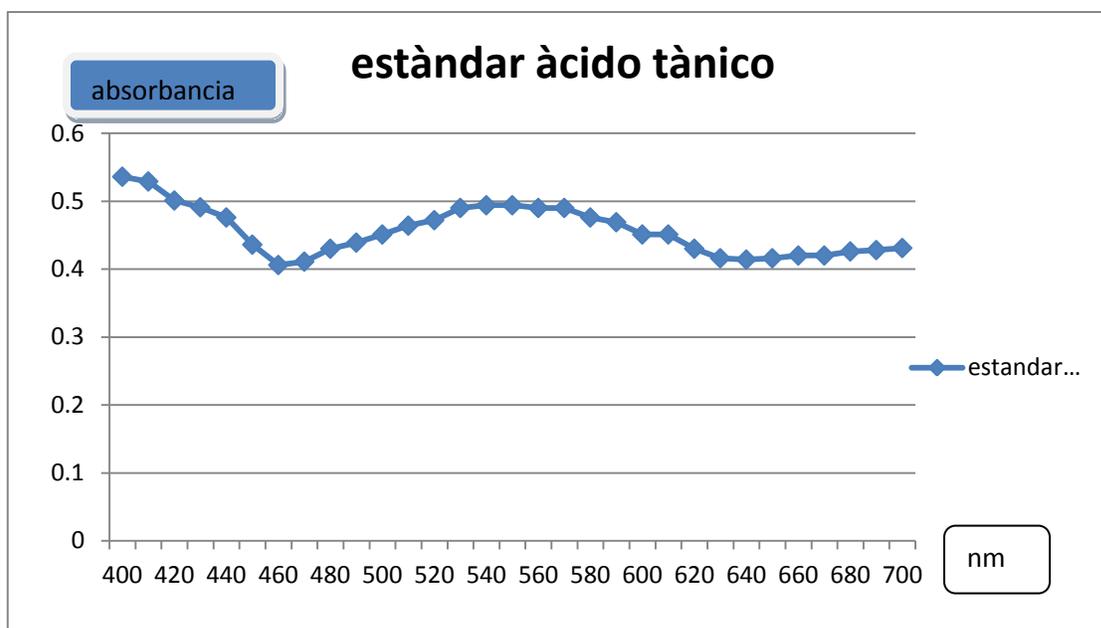


Gráfico 6. Barrido de 400 a 700 nm, para el estándar de ácido tánico registrado de forma manual debido a la falta de impresora en el colorímetro.

Espectros de estándar de ácido tánico analítico empleados en la especificidad del método respecto a los productos de degradación.

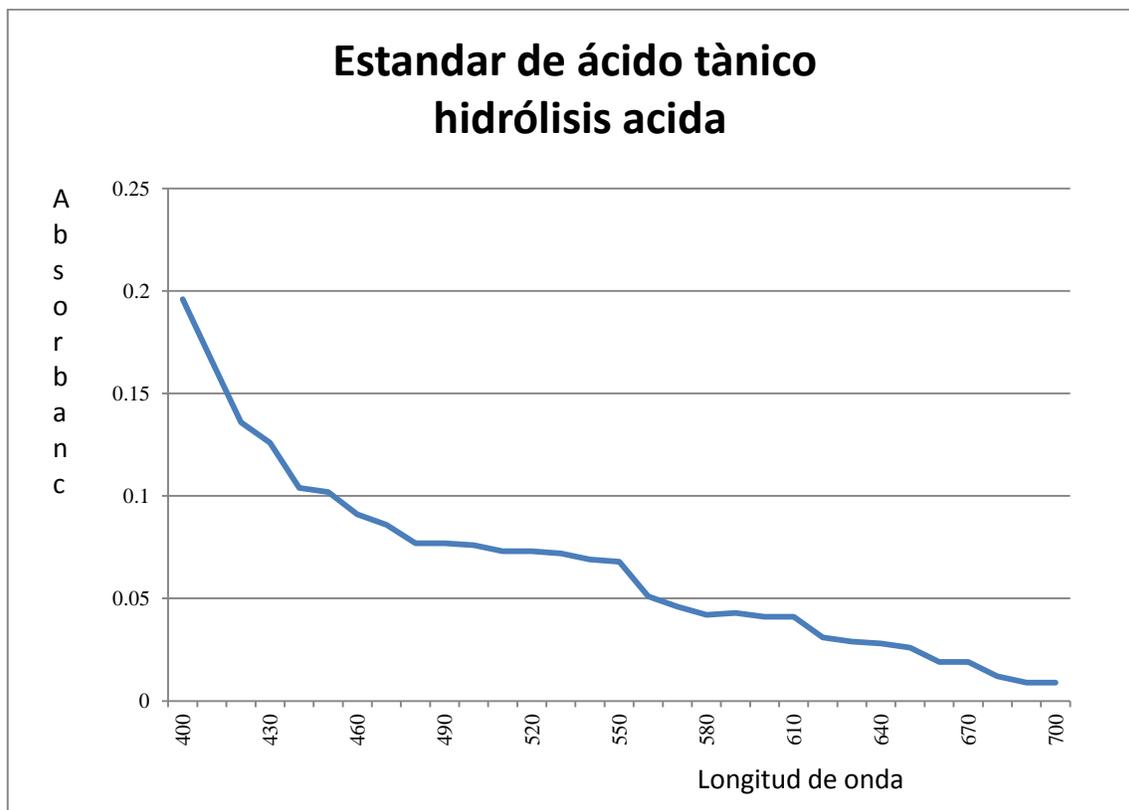


Grafico 7. Espectro registrado de manera puntual, que muestra la disminución de la respuesta analítica en la región visible en una solución estándar de ácido tánico degradado por ácido clorhídrico al llevar a cabo la reacción con yodato de potasio al 2.5% en la región visible, dicha disminución se debe únicamente a aquellos taninos que continúan intactos, lo cual demuestra que el método propuesto es indicativo de estabilidad.

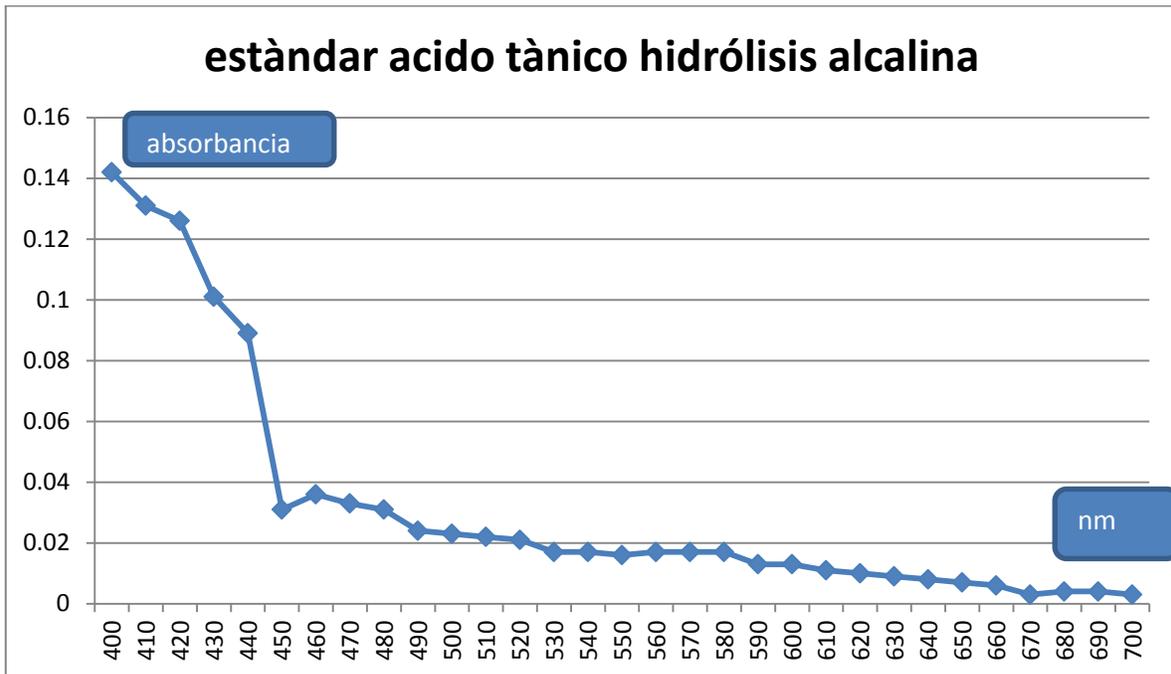


Grafico 8. Espectro registrado de manera puntual, que muestra la disminución de la respuesta analítica en la región visible en una solución estándar de ácido tánico degradado por hidróxido de sodio al llevar a cabo la reacción con yodato de potasio al 2.5% en la región visible, dicha disminución se debe únicamente a aquellos taninos que continúan intactos, lo cual demuestra que el método propuesto es indicativo de estabilidad.



Grafico 9. Espectro registrado de manera puntual, que muestra la disminución de la respuesta analítica en la región visible en una solución estándar de ácido tánico degradado por oxidación en medio ácido, haciendo uso de peróxido de hidrogeno al llevar a cabo la reacción con yodato de potasio al 2.5% en la región visible, dicha disminución se debe únicamente a aquellos taninos que continúan intactos, lo cual demuestra que el método propuesto es indicativo de estabilidad.

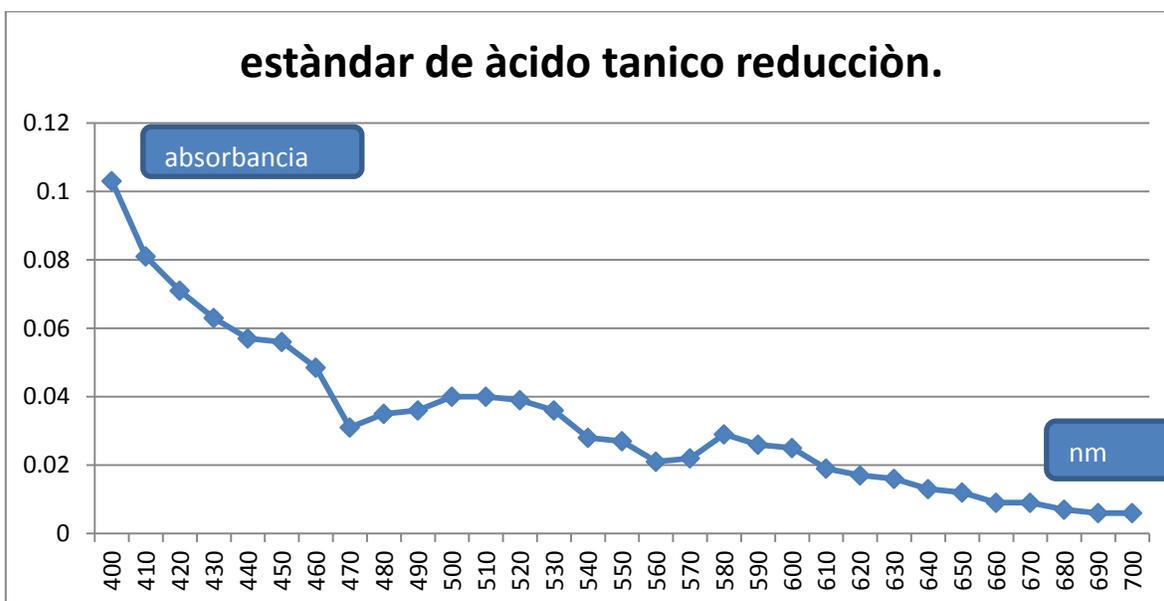


Grafico 10. Espectro registrado de manera puntual, que muestra la disminución de la respuesta analítica en la región visible en una solución estándar de ácido tánico degradado por reducción en medio ácido, haciendo uso de ácido clorhídrico y Zinc al llevar a cabo la reacción con yodato de potasio al 2.5% en la región visible, dicha disminución se debe únicamente a aquellos taninos que continúan intactos, lo cual demuestra que el método propuesto es indicativo de estabilidad.

Cuadro 13. Verificación de la respuesta analítica usando blanco de reactivos como blanco de ajuste y producto terminado como muestra.

muestra	Respuesta analítica	
1	0.457	$\bar{X} = 0.458$
2	0.461	$\sigma = 0.002$
3	0.458	$CV = 0.453$

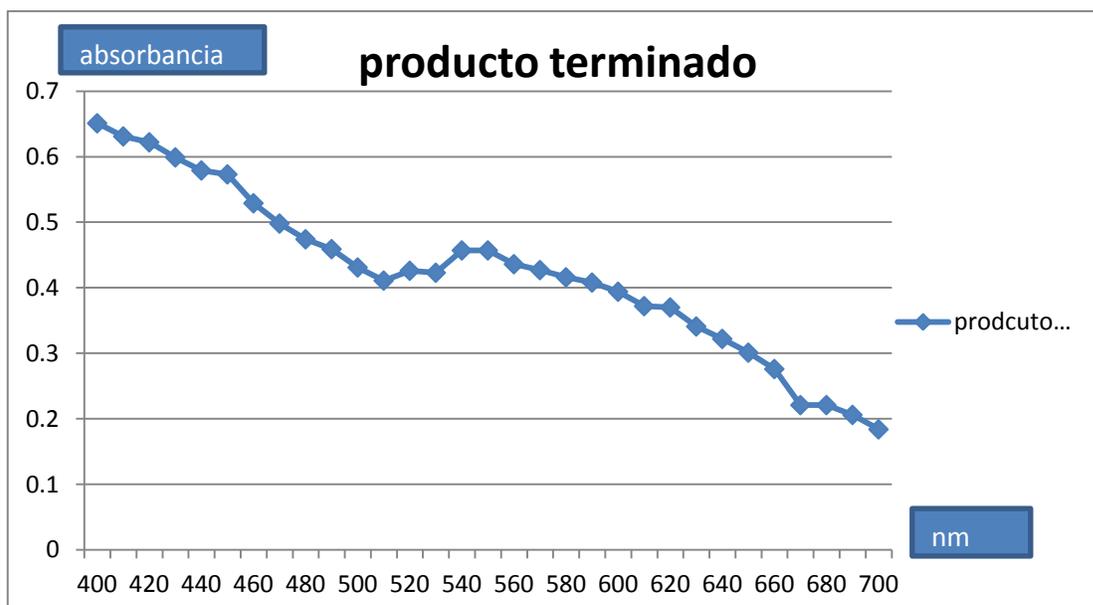


Grafico 11. Barrido de 400 nm a 700 nm para el producto terminado registrado de manera puntual.

Espectros de producto terminado empleados en la especificidad del método respecto a los productos de degradación.

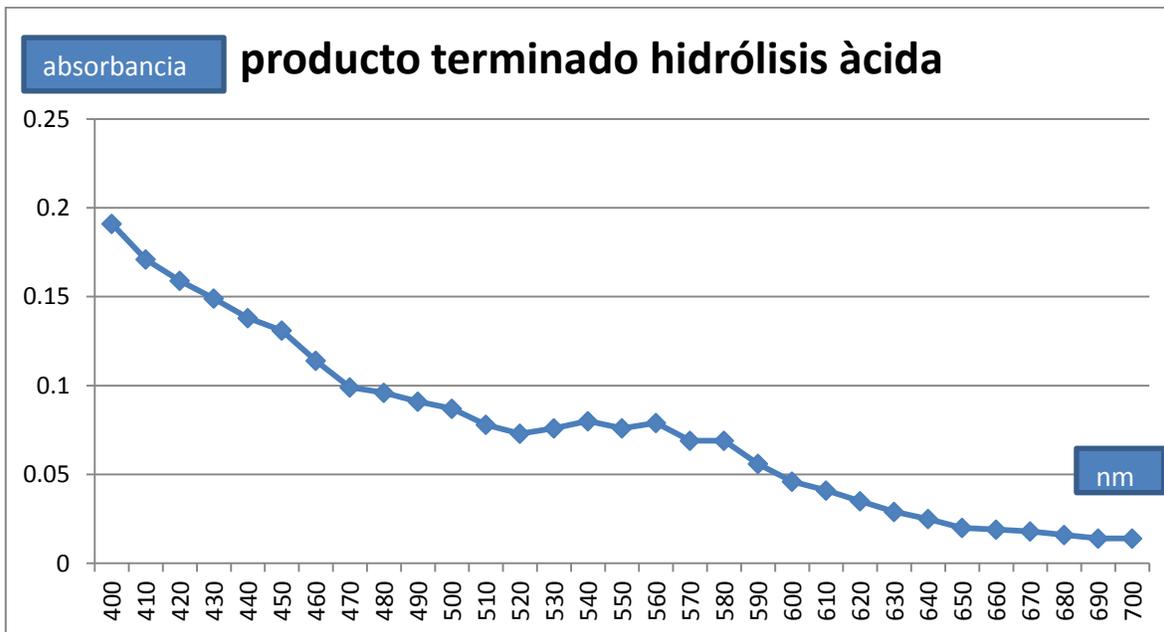


Grafico 12. Espectro registrado de manera puntual, que muestra la disminución de la respuesta analítica en la región visible en una muestra de producto terminado, degradada por ácido clorhídrico al llevar a cabo la reacción con yodato de potasio al 2.5% en la región visible, dicha disminución se debe únicamente a aquellos taninos que continúan intactos, lo cual demuestra que el método propuesto es indicativo de estabilidad.

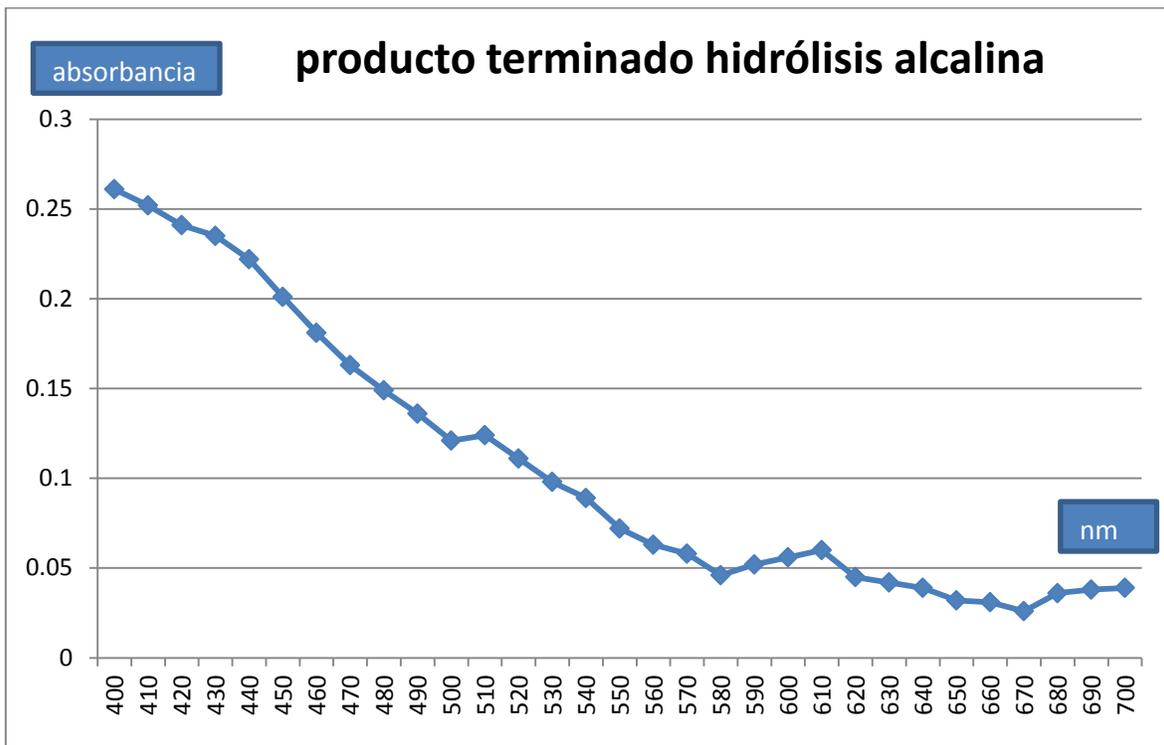


Grafico 13. Espectro registrado de manera puntual, que muestra la disminución de la respuesta analítica en la región visible en una muestra de producto terminado, degradada por hidróxido de sodio al llevar a cabo la reacción con yodato de potasio al 2.5% en la región visible, dicha disminución se debe únicamente a aquellos taninos que continúan intactos, lo cual demuestra que el método propuesto es indicativo de estabilidad.

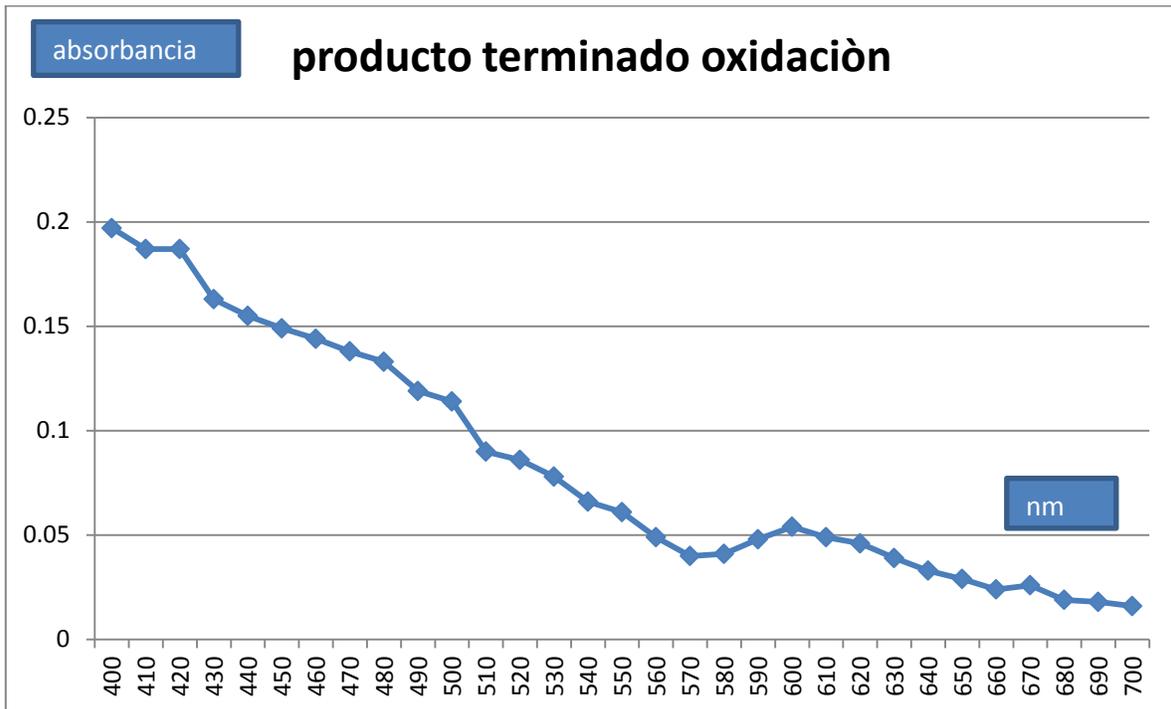


Grafico 14. Espectro registrado de manera puntual, que muestra la disminución de la respuesta analítica en la región visible en una muestra de producto terminado, degradada por peróxido de hidrogeno al llevar a cabo la reacción con yodato de potasio al 2.5% en la región visible, dicha disminución se debe únicamente a aquellos taninos que continúan intactos, lo cual demuestra que el método propuesto es indicativo de estabilidad.

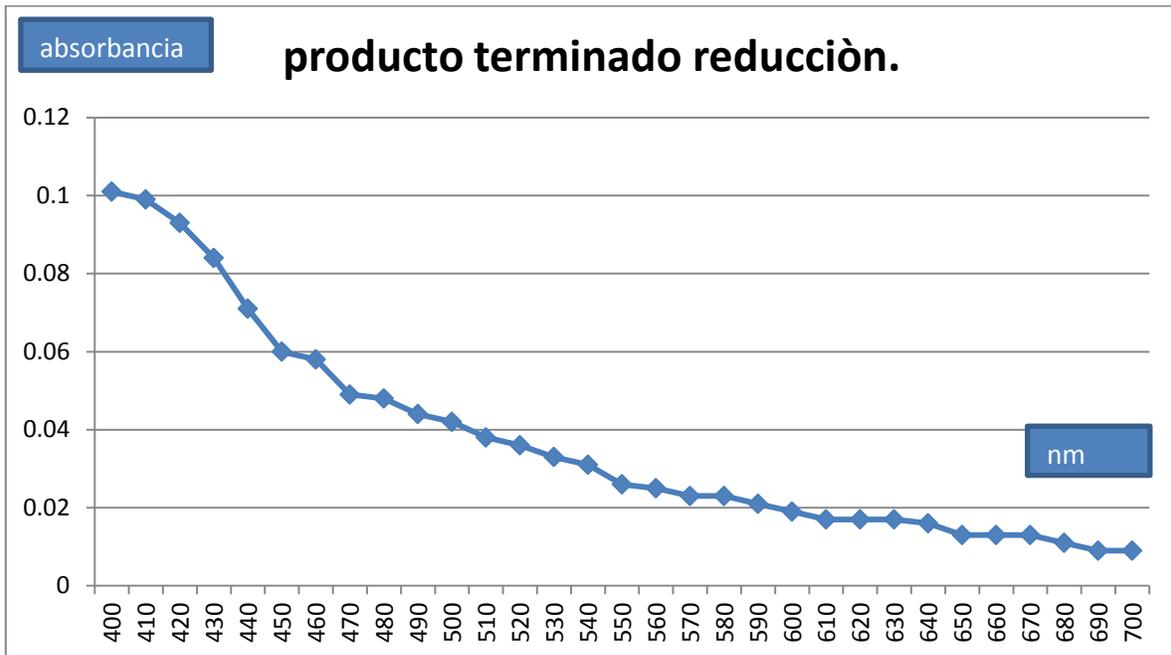


Grafico 15. Espectro registrado de manera puntual, que muestra la disminución de la respuesta analítica en la región visible en una muestra de producto terminado, degradada por reducción en medio ácido, haciendo uso de ácido clorhídrico y Zinc metálico, al llevar a cabo la reacción con yodato de potasio al 2.5% en la región visible, dicha disminución se debe únicamente a aquellos taninos que continúan intactos, lo cual demuestra que el método propuesto es indicativo de estabilidad.

Cuadro 14. Absorbancias de placebos registradas durante los barridos de 400 a 700 nm.

Absorbancia (longitud de onda nm)	Placebo intacto	Hidrólisis ácida	Hidrólisis alcalina	Oxidación	Reducción
400	0.010	0.031	0.014	0.016	0.016
420	0.006	0.016	0.009	0.001	0.010
440	0.000	0.006	0.002	0.008	0.007
460	0.001	0.004	0.002	0.004	0.002
480	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003
500	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001
520	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001
540	0.002	0.001	0.001	0.000	0.000
550	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001
560	0.000	0.001	0.001	0.001	0.002
580	0.001	0.001	0.001	0.002	0.003
600	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002
620	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
640	0.000	0.002	0.001	0.001	0.002
660	0.001	0.000	0.003	0.006	0.001
680	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002
700	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Cuadro 15. Absorbancias de estándar ácido registradas durante los barridos de 400 a 700 nm.

Absorbancia (longitud de onda nm)	Estándar intacto	Hidrólisis ácida	Hidrólisis alcalina	Oxidación	Reducción
400	0.541	0.196	0.143	0.127	0.122
420	0.500	0.152	0.126	0.121	0.071
440	0.486	0.112	0.091	0.103	0.058
460	0.402	0.086	0.038	0.099	0.049
480	0.420	0.075	0.035	0.082	0.036
500	0.450	0.073	0.022	0.071	0.040
520	0.480	0.071	0.020	0.058	0.039
540	0.488	0.068	0.018	0.041	0.028
550	0.496	0.051	0.017	0.041	0.021
560	0.494	0.047	0.019	0.032	0.023
580	0.480	0.045	0.019	0.031	0.029
600	0.454	0.042	0.016	0.023	0.026
620	0.420	0.035	0.015	0.026	0.018
640	0.420	0.031	0.009	0.018	0.016
660	0.425	0.026	0.008	0.017	0.011
680	0.431	0.016	0.005	0.016	0.009
700	0.436	0.014	0.003	0.009	0.008

Cuadro 16. Absorbencias de producto terminado registradas durante los barridos de 400 a 700 nm.

Absorbancia (longitud de onda nm)	Producto intacto	Hidrólisis ácida	Hidrólisis alcalina	Oxidación	Reducción
400	0.663	0.186	0.258	0.196	0.112
420	0.621	0.158	0.243	0.186	0.092
440	0.587	0.141	0.219	0.153	0.071
460	0.527	0.114	0.171	0.147	0.058
480	0.483	0.096	0.150	0.179	0.048
500	0.424	0.088	0.121	0.118	0.042
520	0.424	0.073	0.111	0.084	0.037
540	0.461	0.076	0.082	0.070	0.027
550	0.461	0.072	0.076	0.061	0.025
560	0.423	0.076	0.060	0.050	0.026
580	0.406	0.071	0.048	0.043	0.023
600	0.382	0.047	0.053	0.052	0.019
620	0.346	0.039	0.049	0.048	0.018
640	0.302	0.026	0.042	0.031	0.017
660	0.213	0.022	0.036	0.025	0.015
680	0.202	0.021	0.043	0.024	0.014
700	0.196	0.020	0.047	0.022	0.009

Cuadro 17. Valores de RF registrados para la cromatografía en capa fina de las muestras iniciales.

Muestra	Frente de elusión	de	Mancha 1 en cm	Mancha 2 en cm	Mancha 3 en cm	Mancha 4 en cm
Benzocaina	5.5 cm		5.3 cm RF:0.964			
Fenol	5.5 cm		4.9 cm RF:0.891			
Extracto de Encino	5.6 cm		4.0 cm RF:0.714	3.1 cm RF:0.554	2.0 cm RF:0.357	0.7 cm RF:0.125
Ácido tánico	5.5 cm		3.0 cm RF: 0.536			
Placebo	5.4 cm		5.1 cm RF:0.944	4.8 cm RF:0.889		
Producto terminado	5.6 cm		5.4 cm RF:0.964	4.0 cm RF:0.714	2.0 cm RF:0.357	1.5 cm RF:0.268

Cuadro 18 . Valores de RF registrados para la cromatografía en capa fina del placebo degradado.

Muestra	Frente de elusión	de	Mancha 1 en cm	Mancha 2 en cm	Mancha 3 en cm
Hidrólisis ácida	5.6 cm		3.5 cm RF:0.625	2.4 cm RF:0.429	1.7 cm RF:0.304
Hidrolisis alcalina	5.6 cm		3.8 cm RF:0.679	2.2 cm RF:0.393	
Oxidación	5.4 cm		4.9 cm RF:0.907	1.1 cm RF:0.204	
Reducción	5.4 cm		5.0 cm RF: 0.926	3.7 cm RF: 0.985	1.2 cm RF:0.222

Cuadro 19. Valores de RF registrados para la cromatografía en capa fina del extracto de encino degradado.

Muestra	Frente de elusión	de	Mancha 1 en cm	Mancha 2 en cm	Mancha 3 en cm
Hidrólisis ácida	5.4 cm		4.9 cm RF:0.907	2.8cm RF:0.518	1.4 cm RF:0.259
Hidrolisis alcalina	5.4 cm		5.1 cm RF:0.944	3.4 cm RF:0.630	2.9 cm RF:0.537
Oxidación	5.6 cm		4.8 cm RF:0.857	2.7 cm RF:0.482	1.5 cm RF:0.268
Reducción	5.5 cm		5.4 cm RF: 0.982	3.1 cm RF:0.564	

Cuadro 20. Valores de RF registrados para la cromatografía en capa fina del producto degradado.

Muestra	Frente de elusión	de	Mancha 1 en cm	Mancha 2 en cm	Mancha 3 en cm
Hidrólisis ácida	5.6 cm		5.2 cm RF:0.929	2.0 cm RF:0.357	
Hidrolisis alcalina	5.6 cm		5.0 cm RF:0.893	4.2 cm RF:0.750	
Oxidación	5.5 cm		5.3 cm RF:0.964	3.5 cm RF:0.637	1.9 cm RF:0.345
Reducción	5.5 cm		5.3 cm RF: 0.964	5.1 cm RF:0.927	2.0 cm RF:0.364

6.6 Pruebas de desempeño evaluadas.

6.6.1 Especificidad

Tabla 4. Especificidad respecto al placebo.

Muestra	Respuesta analítica	Dictamen
1	0.000	
2	0.001	Respuesta no significativa
3	0.001	

El método es específico respecto al placebo.

Tabla 5. Especificidad respecto a los productos de degradación del placebo.

Muestra	Respuesta analítica (absorbancia)	Dictamen
Hidrólisis ácida 1	0.001	
Hidrólisis ácida 2	0.001	Respuesta no significativa
Hidrólisis ácida 3	0.002	
Hidrólisis alcalina 1	0.002	Respuesta no significativa
Hidrólisis alcalina 2	0.001	
Hidrólisis alcalina 3	0.002	
Oxidación 1	0.000	Respuesta no significativa
Oxidación 2	0.001	
Oxidación 3	0.001	
Reducción 1	0.001	Respuesta no significativa
Reducción 2	0.000	
Reducción 3	0.001	

El método es indicativo de estabilidad, ya que aunque las respectivas muestras se encuentran degradadas, estas no generan respuesta analítica significativa.

Tabla 6. Especificidad respecto al estándar de ácido tánico.

Muestra	Respuesta analítica	Resultado Estadístico
1	0.493	$\bar{x} = 0.493$
2	0.499	$\sigma = 0.503$
3	0.489	$CV = 0.847$

Tabla 7. Especificidad respecto a los productos de degradación del estándar de ácido tánico.

Muestra	Respuesta analítica (absorbancia)	Dictamen
Hidrólisis acida 1	0.070	Respuesta analítica inferior.
Hidrólisis acida 2	0.068	
Hidrólisis acida 3	0.071	
Hidrólisis alcalina 1	0.016	Respuesta analítica inferior.
Hidrólisis alcalina 2	0.014	
Hidrólisis alcalina 3	0.016	
Oxidación 1	0.042	Respuesta analítica inferior.
Oxidación 2	0.043	
Oxidación 3	0.040	
Reducción 1	0.027	Respuesta analítica inferior.
Reducción 2	0.026	
Reducción 3	0.024	

El método es indicativo de estabilidad respecto a los productos de degradación del estándar de ácido tánico, ya que al obtener una respuesta analítica menor en comparación con el estándar intacto (absorbancia de 0.493) se demuestra que dicha respuesta es debida únicamente a los remanentes de ácido tánico intactos, los productos de degradación presentes no generan respuesta analítica significativa.

Tabla 8. Especificidad respecto al producto terminado.

Muestra	Respuesta analítica	Resultado Estadístico
1	0.457	$\bar{x} = 0.458$
2	0.461	$\sigma = 0.002$
3	0.458	$CV = 0.453$

Tabla 9. Especificidad respecto a los productos de degradación del producto terminado.

muestra	Respuesta analítica (absorbancia)	Dictamen
Hidrólisis acida 1	0.071	Respuesta analítica inferior.
Hidrólisis acida 2	0.073	
Hidrólisis acida 3	0.069	
Hidrólisis alcalina 1	0.070	Respuesta analítica inferior.
Hidrólisis alcalina 2	0.074	
Hidrólisis alcalina 3	0.071	
Oxidación 1	0.063	Respuesta analítica inferior.
Oxidación 2	0.061	
Oxidación 3	0.060	
Reducción 1	0.023	
Reducción 2	0.023	
Reducción 3	0.022	

El método es indicativo de estabilidad, ya que al medirse una respuesta analítica inferior (absorbancia promedio de 0.458) se demuestra que esta es debida únicamente a los taninos intactos presentes en la muestra.

6.6.2 Precisión del sistema

Tabla 23. Precisión del sistema

Muestra	Concentración (mg/mL)	Respuesta analítica (absorbancia)
1	1	0.490
2	1	0.488
3	1	0.484
4	1	0.493
5	1	0.490
6	1	0.493

Promedio= 0.488

$\sigma = 0.002$

CV= 0.574

El sistema cumple con el criterio de precisión, el coeficiente de variación es inferior al 2.0%.

6.6.3 Linealidad del Sistema.

Tabla 10. Linealidad del sistema

nivel	Concentración mg/mL	Respuesta analítica (absorbancia)	Resultado estadístico
60%	0.6	0.274	Promedio =0.278 σ =0.003 CV=1.2
		0.279	
		0.281	
80%	0.8	0.393	Promedio =0.394 σ =0.0036 CV=0.915
		0.394	
		0.395	
100%	1	0.490	(precisión del sistema)
		0.488	
		0.484	
		0.493	
		0.490	
		0.487	
120%	1.2	0.589	Promedio =0.584 σ =0.0036 CV=0.6
		0.578	
		0.584	
140%	1.4	0.684	Promedio =0.685 σ =0.002 CV=0.3
		0.688	
		0.683	

Coefficiente de correlación (r^2) = 0.99

m= 0.5

b= - 0.0162

Intervalo de confianza (IC pendiente) = 0.489 a 0.514 no incluye al cero.

CV total=0.574

El sistema es lineal.

6.8.4 Exactitud del Método.

Tabla 11. Exactitud del método.

Muestra	Concentración (mg/mL)	Respuesta analítica (absorbancia)	% recuperado
1	1	0.486	98.9
2	1	0.488	100.3
3	1	0.492	98.5
4	1	0.489	97.8
5	1	0.486	97.2
6	1	0.493	98.7

% R= 98.5

CV %R= 1.07

El método cumple con los criterios de precisión.

6.6.5. Linealidad del Método.

Tabla 12. Linealidad del Método.

nivel	Concentración mg/mL	Respuesta analítica (absorbancia)	% Recuperado	Resultado estadístico
60%	0.6	0.263	101.3	\bar{x} =0.263 σ =0.002 CV=0.9
		0.266	99.3	
		0.261	98.83	
100%	1	0.486	98.9	(exactitud del método)
		0.488		
		0.492		
		0.489		
		0.486		
		0.493		
140%	1.4	0.693	99.36	\bar{x} =0.693 σ =0.003 CV=0.446
		0.690	100.34	
		0.697	99.21	

$$r^2 = 0.99$$

$$\%R=99.16$$

$$m= 0.005$$

$$b= -0.056$$

$$IC\%R= 98.87 \% \text{ a } 100.28\%$$

IC pendiente= 0.972 a 1.018 no incluye al **CV%R= 0.92**
cero

IC ordenada= -0.218 a 0.0221 incluye al
cero

$$CV= 0.86$$

El método analítico cumple con el criterio de linealidad.

6.6.6 Precisión Intermedia del Método.

Tabla 13. Precisión Intermedia del Método.

	Día 1		Día 2	
Analista 1	0.459	$\bar{x}= 0.456$	0.458	$\bar{x}= 0.454$
	0.458	$\sigma=0.0032$	0.453	$\sigma=0.003$
	0.453	$cv=0.703$	0.451	$cv=0.78$
Analista 2	0.458	$\bar{x}= 0.454$	0.457	$\bar{x}= 0.457$
	0.454	$\sigma=0.003$	0.451	$\sigma=0.003$
	0.457	$cv=0.795$	0.454	$cv=0.66$

Criterio CV inferior a 3

$$\text{Total: } \bar{x} = 0.455$$

$$CV= 0.636$$

El método analítico cumple con los criterios establecidos en la precisión intermedia.

6.6.7 Estabilidad Analítica de la Muestra.

Tabla 14. Estabilidad Analítica de la Muestra.

tiempo	absorbancia	Resultado estadístico	Valor de ldl
7 minutos	0.459	$\bar{x}= 0.454$	0
	0.451	$\sigma=0.004$	
	0.454	$cv=0.88$	
10 minutos	0.439	$\bar{x}= 0.440$	3.08
	0.444	$\sigma=0.002$	
	0.439	$cv=0.65$	
15 minutos	0.411	$\bar{x}= 0.410$	9.69
	0.408	$\sigma=0.002$	
	0.412	$cv=0.5$	
20 minutos	0.396	$\bar{x}= 0.395$	19.6
	0.393	$\sigma=0.002$	
	0.398	$cv=0.63$	

Criterio de aceptación: ldl igual o menor a 3%

La muestra no presenta estabilidad analítica. A partir de 10 minutos de calentamiento.

6.6.8 Tolerancia del método.

Tabla 15. Respuestas Analíticas con Colorímetro

Muestra	Respuesta analítica (Absorbancia)	Resultado estadístico
1	0.456	$\bar{x}= 0.454$ $\sigma=0.002$ $Cv=0.5$ $ldl=0.4\%$
2	0.454	
3	0.455	
4	0.451	
5	0.459	
6	0.452	

Tabla 16. Respuesta Analítica con Espectrofotómetro uv- visible.

Muestra 1	Respuesta analítica (Absorbancia)	Resultado estadístico
1	0.458	
2	0.453	$\bar{x} = 0.454$
3	0.455	$\sigma = 0.002$
4	0.451	$Cv = 0.5$
		$Idl = 0.7\%$
5	0.459	
6	0.452	

Diferencia entre los 2 aparatos: 0.21 %.

Criterio: igual o inferior al 3%.

El método cumple con los criterios establecidos en el parámetro de tolerancia.

6.6.9 Robustez.

Tabla 17. Robustez con respecto al tiempo de operación.

Tiempo de operación	Respuesta analítica (absorbancia)	Resultado estadístico	Idl
4 minutos	0.438	$\bar{x} = 0.435$	3.97%
	0.434	$\sigma = 0.002$	
	0.435	$CV = 0.47$	
7 minutos	0.455	$\bar{x} = 0.453$	0%
	0.450	$\sigma = 0.002$	
	0.454	$CV = 0.58$	
10 minutos	0.436	$\bar{x} = 0.438$	3.31
	0.440	$\sigma = 0.002$	
	0.438	$CV = 0.45$	

El método no presenta robustez respecto al tiempo de calentamiento.

CV total = 1.91

Tabla 18. Robustez con respecto a al temperatura de operación.

Temperatura de operación	Respuesta analítica (absorbancia)	Resultado Estadístico	Idl
20° C	0.417	$\bar{x}=0.414$	8.8%
	0.414	$\sigma=0.002$	
	0.412	CV=0.607	
25° C	0.454	$\bar{x}=0.454$	0%
	0.450	$\sigma=0.004$	
	0.459	CV=0.992	
30° C	0.539	$\bar{x}=0.536$	18.06%
	0.536	$\sigma=0.0002$	
	0.535	CV=0.387	

El método no presenta robustez respecto a la temperatura de operación.

6.7. Resumen de resultados de los parámetros de validación evaluados.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
Especificidad	Placebo (sin respuesta significativa)	Específico.
	Productos de degradación placebo (sin respuesta significativa)	Específico.
	Estándar ácido tánico CV < 3%	especifico
	Productos de degradación ácido tánico. (inferior debida solo a taninos)	especifico
	Producto terminado CV < 3%	Específico.
Precisión del sistema	Productos de degradación producto terminado (inferior solo debida taninos)	Específico.
	CV < 3%	CV= 0.488

Linealidad del sistema

$r^2 \geq 0.98$

$r^2 = 0.99$

ICm no incluye al 0.

IC=0.489 a 0.514 no incluye al cero.

Exactitud del método.

**IC%R incluye al 100%
%Rprom entre 97-103%
CV%R $\leq 3\%$**

**% R= 98.5
CV %R= 1.07
CV%R= 1.15**

parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
Linealidad del método	$r^2 \geq 0.98$	$r^2=0.99$
	ICm no incluye al 0.	IC pendiente= 0.972 a 1.018 no incluye al cero
Precisión intermedia	$CV \leq 3\%$	CV= 0.636
Robustez	$Idl \leq 3\%$	20° C=8.8%
		30° C=18.06%
		4 minutos= 3.97%
		10 minutos= 3.31%
Tolerancia	$Idl \leq 3\%$	Espectro uv-visible=0.7%
		Colorímetro= 0.4%
Estabilidad Analítica de la Muestra	$Idl \leq 3\%$	7 minutos = 0%
		10 minutos = 3.08%
		15 minutos = 9.69%
		20 minutos = 19.6%

7. ANALISIS DE RESULTADOS

Los datos correspondientes al control de calidad de las materias primas, , demuestran que los mismos pueden ser utilizados para llevar a cabo la innovación, así como para posteriores estudios de estabilidad acelerada. Ya que cumplen con los parámetros de calidad establecidos.

Inicialmente se propuso el método de la gelatina y el caolín coloidal para precipitar los taninos, para posteriormente cuantificar los taninos mediante titulación con permanganato de potasio, comparando los resultados en muestras antes y después del tratamiento, sin embargo el método propuesto no fue aplicable debido a la dificultad del manejo de la muestra, a la solidificación de la misma, así como por la gran cantidad de variables presentes causantes de errores, estas variables son la temperatura, el tiempo, así como la elevada cantidad de pasos a seguir.

Otro método propuesto fue el uso de azul de tetrazoleo como reactivo para la generación de un complejo colorido con los taninos presentes, este método no fue aplicable, debido al costo de obtención del reactivo en cuestión, así como por la baja reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Otro método propuesto fue el uso de vainillina para cuantificar taninos, sin embargo este no fue probado, debido al elevado costo del reactivo en cuestión.

Finalmente se modificó el método descrito por Raymund R. Willis y Phillip R. Allen. En su artículo titulado: “Improved Method for Measuring Hydrolizable Tannins Using Potassium Iodate”, En el cual estudian el efecto de la temperatura de congelación en la cuantificación de taninos al reaccionar estos con yodato de potasio al 2.5%, y registrar su absorbancia a 550 nm.

En este método se forma un complejo entre el yodo procedente del yodato de potasio y los taninos presentes en la muestra, por lo que se procedió a verificar que fuera aplicable para el producto en cuestión.

Inicialmente se compararon las respuestas analíticas estableciendo distintas variables, es decir cambiando el reactivo que funcionaría como blanco de reactivos y muestra, con la finalidad de descartar posibles fuentes de error.

En ningún caso se observó respuesta analítica significativa que pudiera interferir con el resultado. Por lo que se procedió a verificar que el método fuera específico.

Una vez comprobado que no existía respuesta analítica significativa por parte de los demás componentes de la formulación, se procedió a verificar la respuesta obtenida con un estándar de ácido tánico y posteriormente con el producto en cuestión, demostrando así que el método analítico modificado es específico.

Otra factor importante fue demostrar que el método en cuestión es indicativo de estabilidad, es decir que detecta solo el analito de interés y no otros componentes como productos de degradación tanto de excipientes como del mismo principio activo, por lo que se procedió a colocar muestra de placebo analítico, solución estándar de ácido tánico y producto en reflujo por 3 horas, llevando a cabo las respectivas cromatografías en capa fina para demostrar que la muestra de interés sufrió cambios por oxidación, reducción, hidrólisis ácida y alcalina, posteriormente sometidas al método analítico propuesto, para comparar las respuestas analíticas obtenidas, todo esto con la finalidad de demostrar la existencia de productos de degradación en las muestras y a su vez el método solo detecta el analito de interés.

Una vez realizadas las correspondientes reacciones de degradación, se compararon los resultados obtenidos con las muestras sin degradar, para el placebo la respuesta continua siendo no significativa, en el caso del estándar de ácido tánico y producto terminado, las respuestas obtenidas son inferiores, estas respuestas son debidas a las moléculas remanentes de taninos sin degradar, con lo cual se demuestra que el método analítico es indicativo de estabilidad.

Una vez comprobada su especificidad se procedió a evaluar la precisión y linealidad (en caso de sistema) y la exactitud y linealidad (en caso del método).

En ambos casos el método cumple con los parámetros de validación establecidos, tanto sistema como en método proporciona resultados reproducibles, además debe mencionarse la similitud de las respuestas analíticas obtenidas al nivel de 100%, lo cual garantiza que no existe interferencia por parte del medio de dilución (para sistema acetona al 70%, para método placebo analítico), la linealidad involucra un intervalo de porcentajes de %60 a 140%, si consideramos que el 100% es 1 mg/mL, el método es eficiente para muestras que contengan de 0.6mg/mL hasta 1.4 mg/mL en su dilución final.

Posteriormente se evaluó la precisión intermedia del método, esto con el fin de verificar que tan reproducible y por ende aplicable es el mismo al ser llevado a cabo por más de un analista o en días diferentes.

El método demuestra proporcionar resultados reproducibles, al ser llevado a cabo de manera correcta, aun entre distintos analistas y en distintos días, al obtenerse valores de absorbancia similares y un CV total de 0.636, el cual es inferior al límite de CV de 3.

Finalmente se procedió a evaluar los parámetros de validación necesarios, los parámetros en cuestión son: robustez, estabilidad analítica de la muestra, y tolerancia, estos parámetros tienen como finalidad establecer las condiciones experimentales en que el método propuesto proporciona resultados confiables.

Por lo tanto el siguiente parámetro evaluado fue la tolerancia. El cual tiene como finalidad evaluar el grado en que puede afectar al resultado, la presencia de variables no inherentes al método, para este propósito se utilizó un colorímetro y un espectrofotómetro UV.

El método es tolerante, ya que proporciona resultados reproducibles al utilizar distintos instrumentos de medición. Cumpliendo con criterio de IdI, el cual tiene como límite un valor de 3%, siendo 0.7 % inferior y por lo tanto aceptable.

Se evaluó el parámetro de robustez, el cual tiene como finalidad determinar el grado en que las variantes experimentales inherentes al método pueden afectar al resultado obtenido, en este caso las variantes más importantes son el tiempo y la temperatura.

El método no demuestra robustez ante cambios en los factores experimentales inherentes al mismo, ya que al existir variaciones en la temperatura de operación de 5° C el resultado excede el límite establecido. De la misma manera el método se ve afectado de por el tiempo de operación, ya que un tiempo de 3 minutos ocasiona que el resultado obtenido exceda el límite establecido, en ambos casos generando resultados no reproducibles, el límite de IdI es de 3%, por lo tanto el método debe llevarse a cabo solo cuando el mismo pueda cumplir con todas las condiciones experimentales predeterminadas.

El último parámetro en ser evaluado. Fue la estabilidad analítica de la muestra, el cual tiene como finalidad determinar la capacidad que posee una muestra de conservar su integridad fisicoquímica y por lo tanto proporcionar un resultado confiable.

Nuevamente el tiempo de operación afecta al resultado excediendo los límites establecidos a partir de los 10 minutos de calentamiento el cual es de IdI, nuevamente el método debe llevarse a cabo cuando sea posible cumplir con las condiciones experimentales establecidas, para obtener resultados confiables, la muestra por lo tanto no cumple con el parámetro de estabilidad analítica.

8. CONCLUSIONES

El análisis de control de calidad llevado a cabo para las materias primas utilizadas en la fabricación del enjuague bucal de extracto de encino, demuestra que las mismas son aptas para utilizarse en el producto en cuestión, a su vez dicho control aplicado a los materiales de envase, indica que estos cumplen con los parámetros de calidad establecidos con la finalidad de ser utilizados para posteriores estudios de estabilidad acelerada.

Se propuso innovar el método descrito en el artículo titulado: “Improved Method for Measuring Hydrolyzable Tannins Using Potassium Iodate” de los autores Raymond R. Willis y Phillip R. Allen.. Dicho método utiliza una solución de yodato de potasio al 2.5%, con la finalidad de generar un compuesto colorido entre los taninos presentes en la muestra y el yodo procedente del KIO_3 , en el artículo mencionado se investigó el impacto de la temperatura de congelación en muestras procedentes de diversas plantas. como establece el mismo, el tiempo, temperatura óptima de calentamiento y longitud de onda de máxima absorción para la detección de taninos es de 7 minutos, $25^{\circ} C$ y 550 nm respectivamente, tomando en cuenta esto anterior la técnica se modificó estableciendo la cantidad de extracto de encino y estándar necesarios para obtener en ambos casos una absorbancia de aproximadamente 0.5, lo cual hizo posible establecer una técnica para cuantificar taninos aplicable al enjuague bucal de extracto de encino, la cual cumple con la ley de Beer. Y por lo tanto es posible utilizarla como método de valoración de rutina tanto en productos terminados iniciales, así como en estudios de estabilidad.

El método cumplió con los parámetros de validación necesarios, y por lo tanto demuestra proporcionar resultados confiables en muestras que contengan de 0.6 mg a 1.4mg de taninos en ellas. Cumpliendo con los valores de CV en todos los casos, al ser llevados a cabo de manera correcta. Por lo tanto el método analítico innovado es aplicable para la formulación magistral para un enjuague bucal de extracto de encino.

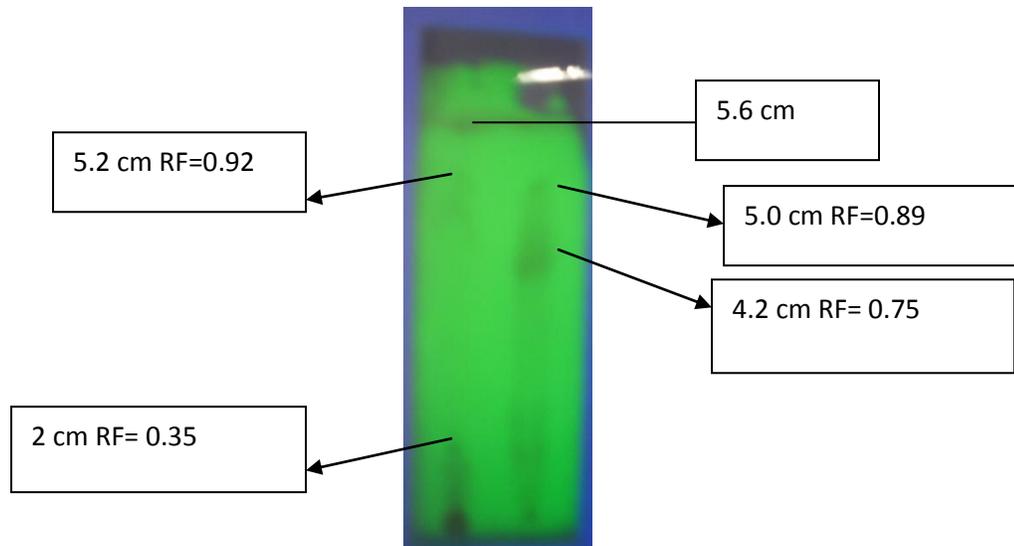
9. RECOMENDACIONES.

Es recomendable que el método analítico sea llevado a cabo solo cuando se pueda cumplir con todos los factores experimentales inherentes al mismo y cuando se tenga control de los mismos, así como cuando la totalidad de las muestras pueda ser analizada. Esto es debido a la baja estabilidad que presenta tanto el yodo como solución, así como por la misma naturaleza de este tipo de reacciones generadoras de complejos coloridos, que son sencillas y rápidas, pero con muy poca estabilidad. Por es necesario llevarlas a cabo con control total de tiempos y temperaturas, con la finalidad de obtener resultados reproducibles y confiables.

10. ANEXOS.

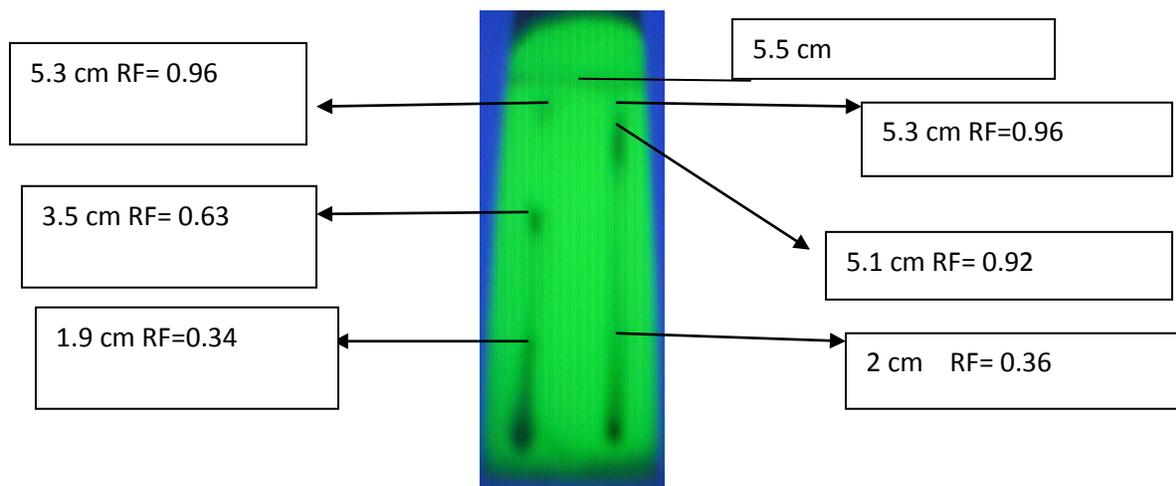
Anexo 1. Cromatografías en capa fina de las fases de degradación llevadas a cabo.

Producto terminado hidrólisis acida – hidrólisis alcalina



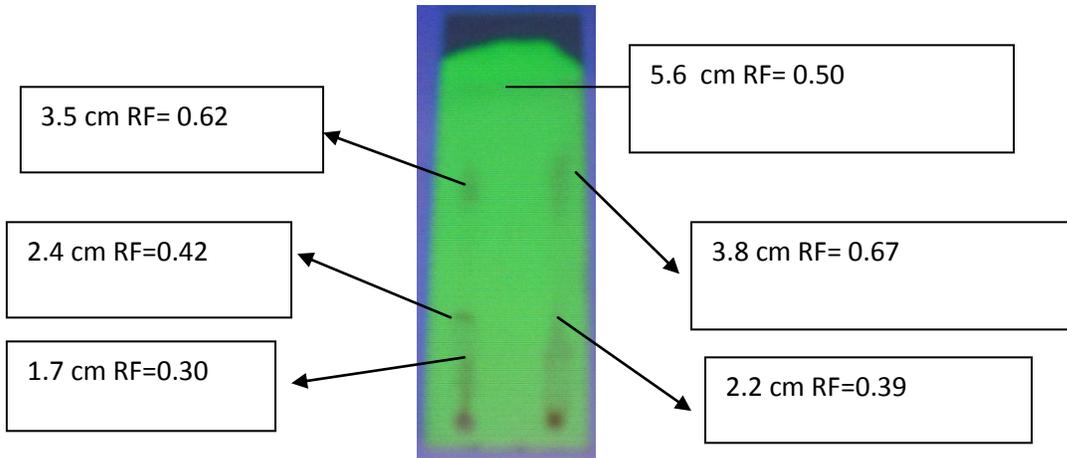
Producto terminado

oxidación- reducción



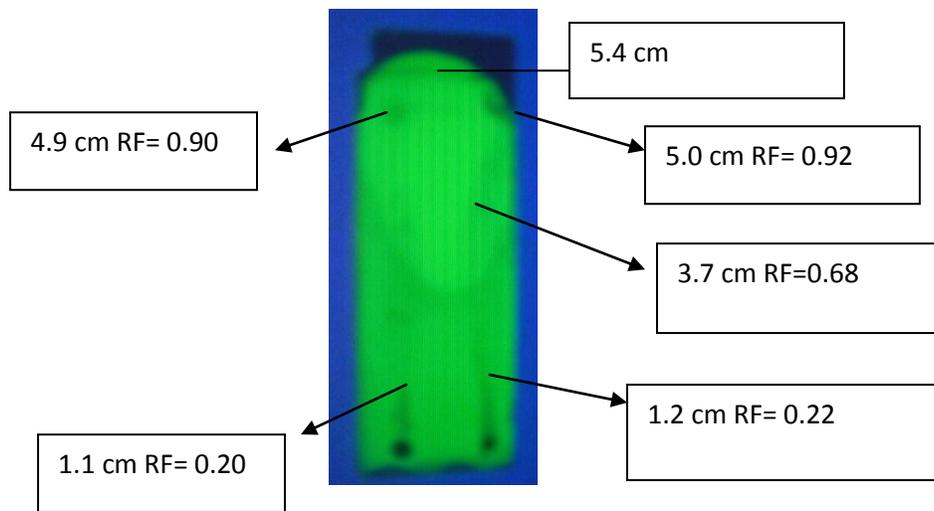
Placebo

oxidación- reducción

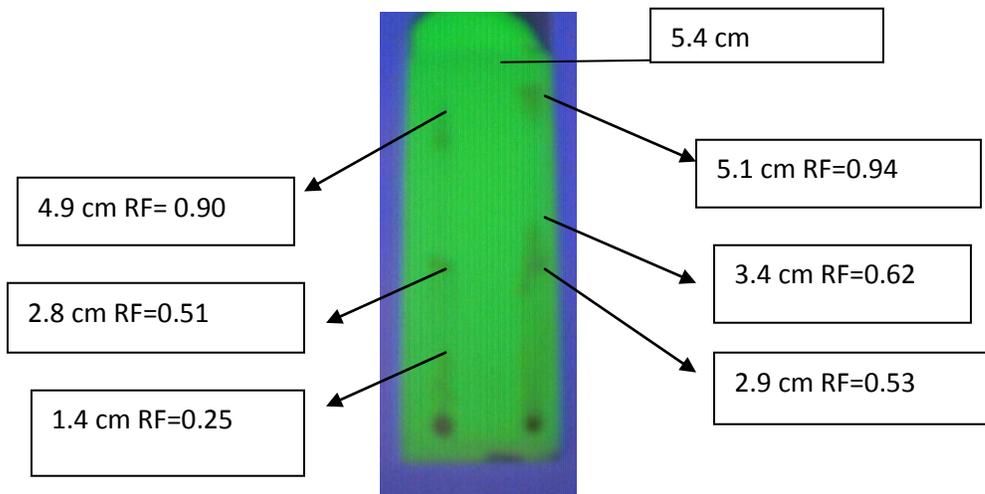


Placebo

oxidación - reducción



Extracto de encino hidrólisis acida- hidrólisis alcalina



Extracto de encino oxidación- reducción

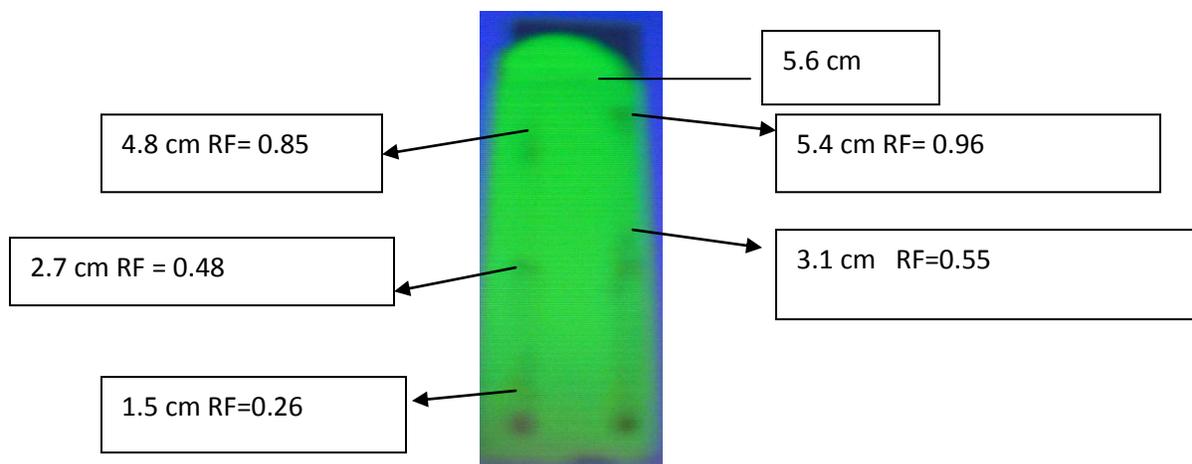


Figura 4. Cromatografías en capa fina llevadas a cabo en las distintas muestras de placebo, producto terminado y extracto de encino y producto degradadas por hidrolisis acida, hidrólisis alcalina, oxidación reducción.

Anexo 2. Fórmulas para la linealidad del sistema.

Pendiente

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

n = número de mediciones

Ordenada al origen

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación.

$$r^2 = \frac{(n \sum xy - (\sum x)(\sum y))^2}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de Confianza para la Pendiente.

$$ICm = m \pm t_{0,975 \ n-2} S_m$$

$$S_m = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n - 2}}$$

Anexo 3. Fórmulas para la precisión del sistema

Media aritmética.

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar.

$$S = \sqrt{\frac{n (\sum y^2) - (\sum y)^2}{n (n - 1)}}$$

Coefficiente de variación.

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Anexo 4. Fórmulas para la linealidad del método.

Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada.

Pendiente

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

n = número de mediciones

Ordenada al origen

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación.

$$r^2 = \frac{(n \sum xy - (\sum x)(\sum y))^2}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de Confianza para la Pendiente.

$$IC_m = m \pm t_{0.975, n-2} S_m$$

$$S_m = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - n}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - m \Sigma xy - b \Sigma y}{n - 2}}$$

Intervalo de Confianza para la ordenada al origen

$$IC_b = b \pm t_{0.975, n-2} S_b$$

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\Sigma x)^2}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}}$$

$$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n}$$

Coefficiente de variación de regresión.

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{Y}} * 100$$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

PORCENTAJE DE RECOBRO.

Media aritmética

$$\overline{\%R} = \frac{\Sigma R}{n}$$

Desviación estándar.

$$S_{\%R} = \sqrt{\frac{n(\Sigma R^2) - (\Sigma \%R)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación.

$$CV = \frac{S}{\%R} * 100$$

Intervalo de Confianza para la media poblacional.

$$IC_{\%R} = \%R \pm t_{0,975n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Anexo 5. Fórmulas para la exactitud del método.

$$\%R = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$$

Media aritmética

$$\overline{\%R} = \frac{\Sigma R}{n}$$

Desviación estándar.

$$S_{\%R} = \sqrt{\frac{n(\Sigma R^2) - (\Sigma \%R)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación.

$$CV = \frac{S}{\overline{\%R}} * 100$$

Intervalo de Confianza para la media poblacional.

$$IC_{\%R} = \overline{\%R} \pm t_{0,975n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

n = número de recobros

Anexo 6. Fórmulas para la precisión del método.

Media aritmética.

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

Desviación estándar.

$$S = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación.

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Anexo 7. Fórmulas para la Estabilidad analítica de la muestra.

Media aritmética del análisis inicial.

$$\bar{y}_0 = \frac{\Sigma y_0}{n_0}$$

n_0 = número de muestras del análisis inicial.

Media aritmética para el análisis de cada condición de almacenaje.

$$\bar{y}_i = \frac{\Sigma y_i}{n_i}$$

n_i = número de muestras del análisis de la i-ésima condición de almacenaje.

DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE CADA CONDICIÓN DE ALMACENAJE RESPECTO DE LA MEDIA ARITMÉTICA DEL ANÁLISIS INICIAL.

$$| d | = | \bar{y}_i - \bar{y}_0 |$$

Anexo 8. Fórmulas para la Robustez.

Media aritmética de la condición normal de operación.

$$\bar{y}_0 = \frac{\Sigma y_0}{n_0}$$

n_0 = número de muestras de la condición normal de operación.

Media aritmética para el análisis de cada condición de operación diferente a la condición normal.

$$\bar{y}_i = \frac{\Sigma y_i}{n}$$

n_i = número de muestras del análisis de la i-ésima condición de operación.

DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE CADA CONDICIÓN DE RESPECTO DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE LA CONDICIÓN NORMAL.

$$| d | = | \bar{y}_i - \bar{y}_0 |$$

11. REFERENCIAS.

1. L. Chafetz, R.E. Daly, H. Schrifman, J. Lomner. Pharm. Sci. 60 (1971) 463-466.
2. Dr. Sídney B. Finn, "Odontología pediátrica", 4ª edición, Nueva Editorial Interamericana, México, 479-480, 1976.
3. LLoyd, V., "The Art, Science and technology of Pharmaceutical Compounding", 2a. American Pharmaceutical Association, Washington, USA, 231-233, 2002.
4. Swarbrick J, Boylan JC. Pharmaceutical Technology. Liquid Oral Preparations. 2 es New York: Marcel Dekker, 2002; vol 2: 1674-1683.
5. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 9ª edición, Vol. II, Secretaría de Salud, México, 2427-2431, 2008.
6. Jorge Alonso, "Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos", Editorial Corpus, Rosario Argentina, 924-926, 2004.
7. Martínez Máximo, "Catalogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas", Editorial fondo de Cultura Económica, México D.F., 324, 1987.
8. Emili Cuenca Sala, Carolina Manau Navarro, carolina Serra Majem, "Odontología Preventiva y Comunitaria, Principios, Métodos y Aplicaciones", 2ª edición, Editorial Masson, S.A, Barcelona, España, 53-55, 70-72, 1995.
9. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2004. Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de la industria Químico Farmacéutica dedicado a la fabricación de medicamentos.
10. Validación de Métodos Analíticos. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. 1991.
11. ICH Q2A Text on Validation of Analytical Procedures (March 1995).
12. ICH Harmonized tripartite guideline, Validation of Analytical Procedures Text and Methodology, 4ª version, November 2005
13. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Métodos Analíticos; Guía de Validación 2002: 8-38.
14. Norma Oficial Mexicana Nom-073-SSA-2005. Estabilidad de Farmacos y Medicamentos.

15. Skoog, D., "Principios de Análisis Instrumental, 5ª., Mc Graw-Hill, Madrid, España, 335-339, 2003.
16. Day, R., "Química Analítica Cuantitativa", 5ª., Pearson Educación, México, 57, 90, 91, 1989.
17. Orozco, F. "Análisis Químico Cuantitativo", 16, Editorial Porrúa S.A., México, 181,182, 1985.
18. Owen, T., "Fundamentals of modern UV-VIS Espectroscopy", Hewlett-Packard, Alemania, 15, 1996.
19. Rouessac, F., "Análisis Químico Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas", Mc Graw-Hill, Madrid España, 147, 148, 155, 159, 2003.
20. Sarabia M. López R. "Estabilidad de Fármacos y Medicamentos", Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México, 1-7. 2004.
21. A. García, F.J: Rupérez, A. de la Maza, C. Barbas, J. Chromatogr. B. 785 (2003) 237-243.
22. "Enciclopedia of Pharmaceutical Technology", Liquid oral preparations, 2a., Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 2, 1674 – 1683, 2002.
23. Raymund R. Willis y Phillip R. Allen. "Improved Method for Measuring Hydrolizable Tannins Using Potassium Iodate".
28. Miguel Valcárcel Cases. Editorial Reverté, 1994. ISBN: 8429179844. Cap. 12: Introducción a la cromatografía. Pág.333.
29. Barton JH, Emanuel EJ. Barton JH, Emanuel EJ. The patents-based pharmaceutical development process: rationale, problems, and potential reforms. JAMA 2005;294(16):2075–82. Las patentes de productos farmacéuticos proceso de desarrollo: fundamentos, problemas y posibles reformas. JAMA 2005; 294 (16) :2075-82.
30. Wardell WM, DiRaddo J. The measurement of pharmaceutical innovation. J Clin Pharmacol 1980;20(1):1–9. Wardell WM, DiRaddo J. La medición de la innovación farmacéutica. J Clin Pharmacol 1980; 20 (1) :1-9.

31. Wardell WM, DiRaddo J, Weintraub M. The measurement of therapeutic value. *J Clin Pharmacol* 1980;20(2-3):77–90. Wardell WM, DiRaddo J, Weintraub M. La medición de valor terapéutico. *J Clin Pharmacol* 1980; 20 (2-3) :77-90.

32. Barton JH, Emanuel EJ. Barton JH, Emanuel EJ. The patents-based pharmaceutical development process: rationale, problems, and potential reforms. *JAMA* 2005;294(16):2075–82. Las patentes de productos farmacéuticos proceso de desarrollo: fundamentos, problemas y posibles reformas. *JAMA* 2005; 294 (16) :2075-82.

33. Carlos García Villanueva: La industria farmacéutica en América Latina. Instituto Mexicano del Seguro Social, Secretaría General, Departamento de Asuntos Internacionales, 1982.