

**MATERIAL
DIDÁCTICO PARA
ESTUDIANTES**

Guía Teórico-Práctica de Laboratorio

**CONTROL DE
CALIDAD
DE MEDICAMENTOS**

**FACULTAD DE QUÍMICA BIOQUÍMICA
Y FARMACIA**



Universidad Nacional
de San Luis

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

Guía Teórico-Práctica de Laboratorio: **CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS**

Dra. María Roxana GÓMEZ

Dra. María Gimena ACOSTA

Farm. Elbio SAIDMAN

Dra. Chien Chun WANG

Lic. Leslie ARAGÓN

Dr. Emiliano FELICI

Dra. Ana L. VICARIO

Personal Técnico de Laboratorio: Téc. Gabriela DI CHIACCHIO



FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2022

Decana

Dra. Mercedes Edith CAMPDERRÓS

Vice Decana

Dra. Lucía Beatriz FUENTES

Secretaria académica

Dra. Estela Isabel GASULL

Comisión de la Serie Didáctica

Coordinadora

Dra. María Cristina ALMANDOZ

Integrantes

Departamento de Bioquímica
y Ciencias Biológicas

Dra. Susana I. SÁNCHEZ

Dra. Verónica P. FILIPPA

Departamento de Farmacia

Dr. Luis A. DEL VITTO

Dra. Alejandra O. MARIA

Departamento de Química

Dra. Yamina A. DÁVILA

Dra. María de los Ángeles ÁLVAREZ

SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N°269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudio dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acordes al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mde.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

PRESENTACION DEL CURSO

La presente Guía de Trabajos Prácticos pertenece a la asignatura Control de Calidad de Medicamentos la cual integra el Plan de Estudio de la Carrera de Farmacia, es obligatoria, corresponde al ciclo profesional, 5º curso y se dicta en el primer cuatrimestre. Durante el desarrollo del presente curso se dictan clases teóricas y teórico-prácticas, estas últimas consisten en prácticos de aula y de laboratorio. El crédito horario semanal de la materia es de 10 horas, y el crédito total es de 120 horas.

La asignatura Control de Calidad de Medicamentos completa la formación profesional de los alumnos de la carrera de Farmacia aplicando conocimientos obtenidos en cursos anteriores (Química Analítica, Química Orgánica, Farmacología y Microbiología) al análisis farmacéutico, lo que le permite al alumno trabajar en laboratorios de Control de Calidad de medicamentos de la industria farmacéutica, oficiales o privados.

El objetivo de la materia es que el alumno de la carrera de Farmacia desarrolle criterios de evaluación, según las reglamentaciones vigentes, para el análisis y control de calidad de medicamentos, desde el proceso de fabricación hasta la obtención del producto terminado. Estos controles son necesarios para su liberación al mercado y en cualquier momento de su vida útil, y se realizan de acuerdo con los aspectos de Garantía de Calidad y satisfacción del consumidor, y con las normas oficiales nacionales e internacionales de control.

INSTRUCTIVO PARA LOS ESTUDIANTES

Los laboratorios son ámbitos de trabajo con riesgo potencial para las personas, por ello se requiere especialmente una actitud seria y responsable y una adecuada preparación previa al momento de ingreso.

Con el objetivo de cuidar la seguridad personal, las instalaciones y equipos y permitir el mayor aprovechamiento de las prácticas de laboratorio, se indican a continuación una serie de acciones.

Normas de Conducta en el Laboratorio

1. En todos los casos los alumnos deben demostrar sus conocimientos de las actividades a realizar, de la teoría que las sustenta y de los riesgos y medidas de seguridad, tanto previo a la práctica de laboratorio como durante el transcurso de toda la realización de la práctica experimental.
2. No está permitido a los alumnos trabajar solos fuera de las horas normales previstas.
3. Se recomienda trabajar con orden, manteniendo las mesadas libres de elementos innecesarios. Los artículos personales: mochilas, camperas, paraguas, etc. deben dejarse en otro lugar habilitado a tal fin.
4. No está permitido consumir alimentos y bebidas en el laboratorio.
5. No está permitido fumar en todo el ámbito del Área de Gestión en Calidad y Salud.
6. Los alumnos que posean cabellos largos deben usarlo recogido durante las actividades prácticas.
7. No se debe pipetear ni probar sustancias con la boca, para tal fin se deben usar propipetas.
8. No se debe oler ningún tipo de sustancia química.
9. Es obligatorio el uso del guardapolvo en el laboratorio y guantes de látex.
10. No está permitido descartar ningún tipo de sustancia líquida o sólida sin consultar previamente al encargado del trabajo práctico.
11. Ante un accidente, lastimadura, quemadura, rotura de material, etc. Avisar inmediatamente al docente a cargo (no ocultar) y no tomar ninguna acción sin consultar.
12. En caso de emergencia en primer lugar guardar la calma y luego atender en todo momento las instrucciones del jefe de Trabajos Prácticos quien indicará cómo proceder.

13. Lavarse las manos después de finalizar el Trabajo Práctico y luego de toda experiencia que haya tenido posible contacto con material irritante, cáustico, tóxico o patógeno.
14. Conectar equipos a la red eléctrica previa autorización.
15. Al finalizar el trabajo práctico dejar todo el material ordenado, mesadas limpias, mecheros cerrados, microscopios apagados, limpios y cubiertos.
16. Esperar el consentimiento del encargado del Trabajo Práctico para retirarse del laboratorio.

Normas de Procedimiento Generales en el Laboratorio

1. Al usar material de vidrio comprobar su perfecto estado (no usar material sucio, con roturas o rajaduras)
2. Cuando se calienta un material de vidrio (por ej. al preparar medios o esterilizar) diferenciarlo perfectamente del material frío, dado que ambos presentan el mismo aspecto.
3. Se deben seguir las normas de calentamiento cuando se utiliza fuego directo de muestras de tubos de ensayo, vasos etc., para evitar proyecciones sobre uno mismo u otra persona. Evitando de esta forma posibles accidentes y quemaduras.
4. Los productos inflamables (alcohol, éter) no deben estar cerca de fuentes de calor. Si se necesita calentar recipientes con estos productos se hará a baño maría.
5. Si se trabaja con sustancias que emiten vapores tóxicos se debe trabajar bajo campana de extracción o en su defecto en lugares con buena ventilación.
6. Comprobar cuidadosamente los rótulos de los envases antes de utilizarlos, de la misma manera contribuir al mantenimiento de las etiquetas en buen estado.
7. No volver al frasco de origen los sobrantes de los reactivos utilizados, a menos que sea justificado por el responsable del laboratorio.
8. No dejar envases abiertos

INDICE

1. Trabajo práctico N° 1: cromatografía líquida de alta eficacia y cromatografía en capa fina	1
2. Trabajo práctico N° 2: volumetría ácido-base en medio acuoso y vol ácido-base en medio no acuoso con punto final potenciométrico	13
3. Trabajo práctico N° 3: métodos espectroscópicos absorción UV Vis	30
4. Trabajo práctico N° 4: espectrometría infrarroja	32
5. Trabajo práctico N° 5: volumetría Iodometrica de antibioticos β -lactámicos	36
6. Trabajo práctico N° 6: ensayos biofarmacéuticos	44

TRABAJO PRÁCTICO N°1: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA y CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

1. Objetivos

Con la realización del presente Trabajo Práctico de Laboratorio el alumno será capaz de:

- Cuantificar los ingredientes farmacéuticos activos (IFA) de un medicamento mediante su separación por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).
- Utilizar el método de “patrón interno” y el “método unipuntual” para determinar la concentración de PA en formas farmacéuticas de administración oral.

2. Introducción Teórica

La cromatografía es esencialmente un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: una móvil que percola a través del lecho de una fase estacionaria. Si a este sistema se le introduce una mezcla de sustancias solubles en la fase estacionaria, estas avanzarán debido a los sucesivos equilibrios de partición o adsorción que se producen entre ambas fases. Si las sustancias que componen la mezcla interaccionan en distinta magnitud con la fase estacionaria, estas avanzarán por el sistema con distinta velocidad, pudiéndose producir una separación de las mismas.

Si la fase estacionaria es sólida, la cromatografía se llama de adsorción, si es líquida recibe el nombre de cromatografía de partición o de reparto, a pesar de que esta fase debe soportarse sobre un sólido que no interviene en el proceso cromatográfico. De acuerdo a esto, la cromatografía puede clasificarse en (**Tabla 1**):

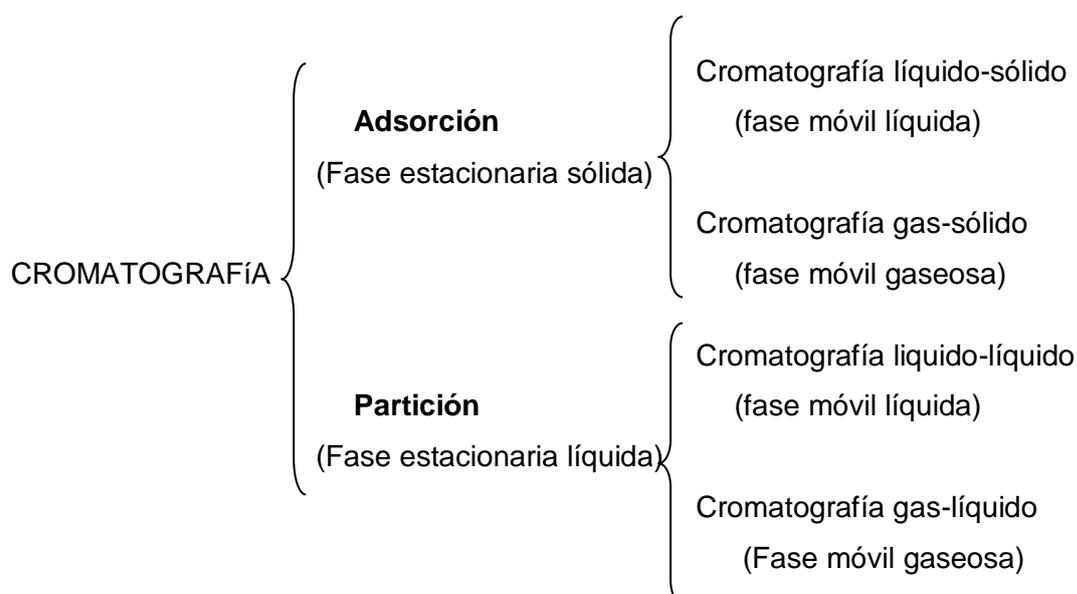


Tabla 1: Clasificación de los métodos cromatográficos según la naturaleza de las fases.

En la cromatografía de líquidos la naturaleza de la fase estacionaria impone el mecanismo de separación y de acuerdo a ello se clasifican en:

Cromatografía de Intercambio Iónico: si el sólido que forma la fase estacionaria posee iones capaces de ser intercambiados por otros del mismo signo.

Cromatografía de Exclusión: las partículas se separan en función de su tamaño, se trata de una cromatografía de baja resolución, de forma que se suele utilizar en los pasos finales del proceso de purificación. En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa, las columnas se empaquetan con pequeñas partículas esféricas formadas por esos polímeros entrecruzados. El tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar a esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas más pequeñas que entonces tardarán más en salir de la columna.

Cromatografía de afinidad: el sólido que constituye la fase estacionaria tiene enlazado un determinado ligando que interactúa selectivamente con un soluto, una enzima, un anticuerpo, etc.

El factor más importante del proceso cromatográfico es el equilibrio de los distintos componentes de la muestra entre las fases estacionaria y móvil. La relación entre las concentraciones de una sustancia entre estas dos fases, en estado de equilibrio, se denomina **coeficiente de reparto o de partición (K)** definido por:

$$K = \frac{C_S}{C_M} = \frac{(m_S/V_S)}{(m_M/V_M)}$$

donde, m_S , m_M : son las masas retenidas o disueltas en la fase estacionaria y móvil, respectivamente. V_S y V_M : son los volúmenes de las fases estacionaria y móvil. C_S y C_M : son las concentraciones de las fases estacionaria y móvil.

Cromatografía en columna

El resultado de un análisis por HPLC se representa a través de un gráfico denominado **cromatograma**, el cual está definido por las siguientes características:

- 1) Cada compuesto que abandona la columna, se muestra teóricamente como una banda simétrica (curva gaussiana) cuya área es función del número de moléculas (n). Esto permite el cálculo de la concentración del analito.
- 2) Cada banda emerge de la columna en un tiempo característico para cada compuesto, denominado *tiempo de retención* (t_R) que es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta el instante en que el máximo número de moléculas de un componente abandona

la columna (**Fig. 1**). Este parámetro permite la identificación de un compuesto por comparación con cromatogramas de referencia.

3) El tiempo que tarda en emerger la fase móvil se denomina t_0 o tiempo muerto (t_m) (**Fig. 1**).

4) Ancho de banda (t_w), el cual se define como la anchura del pico medio en la línea de base del cromatograma (**Fig. 1**).

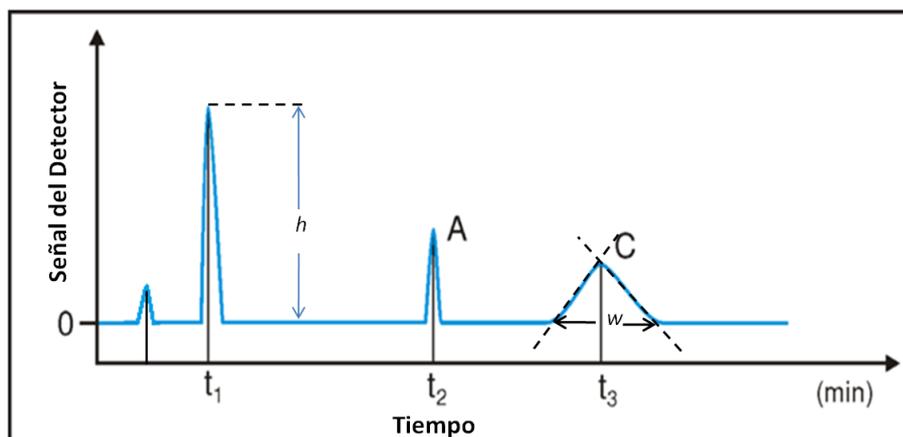


Figura 1- Cromatograma característico de una mezcla de tres componentes. El pico pequeño de la izquierda representa una especie que no se retiene en la columna, y de esta forma alcanza el detector casi inmediatamente después del inicio de la elución. Por lo tanto, su tiempo de retención t_R es aproximadamente igual al tiempo que tarda una molécula de la fase móvil para alcanzar el detector. T_1 , T_2 y T_3 son los tiempos T_R de los compuestos 1, 2 y 3, respectivamente.

Las velocidades de migración de los analitos en la columna son frecuentemente descritas mediante un parámetro denominado *factor de capacidad*, que para un soluto A se define como:

$$K'_A = K_A V_S / V_M$$

Donde K_A es el coeficiente de reparto de la especie A. Este parámetro puede calcularse mediante datos experimentales utilizando la siguiente ecuación:

$$K'_A = (t_R - t_M) / t_M$$

La velocidad de migración diferencial se describe a través de otro parámetro que se denomina *factor de selectividad* (α):

$$\alpha = K'_B / K'_A$$

Donde K'_B es la constante de reparto de la especie más fuertemente retenida y K'_A la de la especie menos retenida. Por lo tanto, α es siempre mayor que la unidad y puede calcularse a partir del cromatograma mediante la ecuación:

$$\alpha = ((t_R)_B - t_M) / ((t_R)_A - t_M)$$

La eficacia de una columna cromatográfica se define a través de los siguientes términos:

- 1) Altura de plato (H)
- 2) Número de platos teóricos (N)

Ambos se relacionan mediante la ecuación $N = L/H$, donde L es la longitud de la columna. Un plato teórico es una consideración abstracta que representa cada sección teórica (transversal) de la columna donde se establece un equilibrio de partición durante el flujo de la fase móvil.

La eficacia de la columna aumenta cuanto mayor es el número de platos y menor la altura de plato. En forma experimental puede calcularse N con:

$$N = 16(t_R/W)^2$$

Donde W es el ancho del pico sobre la línea base del cromatograma.

Para la separación de dos sustancias en una mezcla, la resolución, R_s , es determinada por la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{1/2(W_2 + W_1)}$$

en la cual t_2 y t_1 son los tiempos de retención de los dos componentes y W_2 y W_1 son los anchos de los picos medidos en la línea base (**Fig. 1**).

El área y/o la altura del pico son generalmente proporcionales a la cantidad de sustancia eluida. En general se miden las áreas de los picos, sin embargo, la medición de las alturas pueden ser más exactas que las primeras cuando se consideran picos parcialmente superpuestos.

Aptitud del sistema

Los ensayos de aptitud del sistema forman parte de los métodos cromatográficos, y se emplean para comprobar que la resolución es apta para realizar el ensayo. En estos casos se considera que el equipo, las operaciones analíticas y las muestras a ensayar constituyen un sistema único que puede evaluarse como tal.

Los parámetros de aptitud del sistema se determinan para el pico de la sustancia, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Si es necesario, pueden realizarse ajustes en las condiciones operativas para cumplir con los requisitos de aptitud del sistema, entre ellos, las proporciones de los componentes de la fase móvil y el caudal.

La resolución R , es una función de la eficiencia de la columna N , y se especifica para asegurar que las sustancias que eluyan muy cercanas se resuelvan entre sí y para asegurar que los estándares internos se resuelvan de las sustancias a determinar. La eficiencia de la columna puede especificarse también como un requisito de aptitud del sistema, especialmente si hay un solo pico de interés en el cromatograma, sin embargo, el valor aislado de eficiencia no puede asegurar la resolución para el sistema en estudio. La eficiencia de la columna es una medida de la agudeza de los picos, lo cual es importante para detectar componentes en baja concentración.

Para evaluar si se cumplen los requisitos de aptitud del sistema se realizan inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* empleada en la *Valoración* u otra *Solución estándar*. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, para calcular la desviación estándar relativa, S_R , se emplean los datos de cinco inyecciones repetidas del estándar si el requisito es 2,0 % o menor, y seis inyecciones repetidas si el requisito de la desviación estándar relativa es mayor de 2,0 %.

La desviación estándar relativa S_R , se calcula según la fórmula siguiente:

$$S_R = \frac{100}{\bar{X}} \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

El factor de asimetría F , una medida de la simetría del pico, es 1 para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta a medida que la asimetría es más pronunciada (ver **Fig. 2**). En algunos casos, pueden observarse valores menores de la unidad. Como consecuencia de la asimetría del pico, la integración se torna menos confiable, perdiendo precisión.

El factor de asimetría se calcula por la fórmula siguiente:

$$F = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

en la cual $W_{0,05}$ es el ancho del pico al 5 % de altura y f es la distancia entre el borde simétrico del pico y el centro del mismo medida al 5 % de la altura.

Estos datos se obtienen a partir de inyecciones repetidas del estándar u otras soluciones según se especifique en la monografía correspondiente.

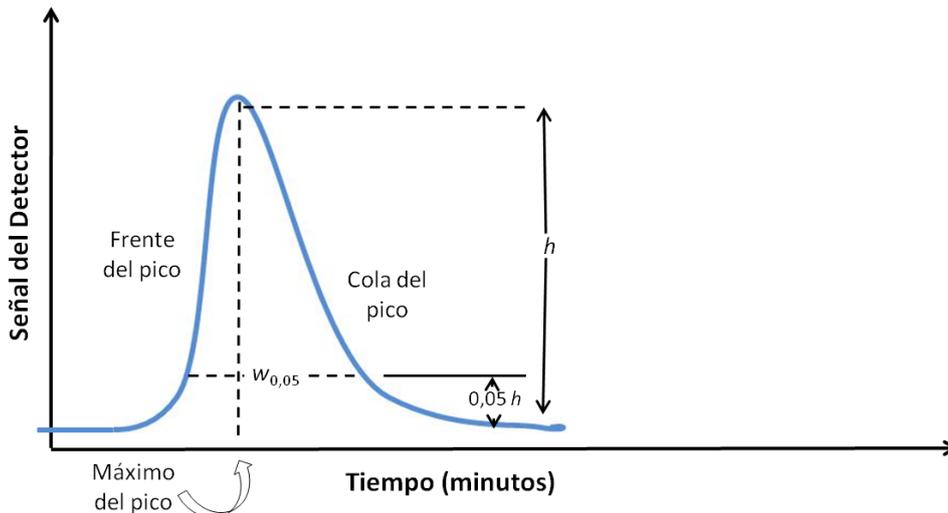


Figura 2-Pico cromatográfico asimétrico.

2.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia, es una cromatografía de líquidos que posee una serie de ventajas frente a otros tipos de cromatografía:

- Se pueden resolver mezclas complejas en pocos minutos.
- Permite separar sustancias termolábiles como drogas potentes o productos biológicos.
- Se puede lograr la resolución de sustancias con un amplio margen de pesos moleculares.

2.1.1. Equipamiento

El equipamiento básico de un sistema de HPLC (**Fig. 3**) consta de:

- *Módulo de Solvente*: los sistemas de HPLC deben tener un sistema de bombas que suministre la presión adecuada sobre la columna para que se alcance un caudal suficiente a su salida. Estas bombas pueden contar con una o más cámaras de mezclado, lo cual permite variar las condiciones de composición de la fase móvil (FM). Se denominan **separaciones isocráticas** aquellas que se realizan sin variar las condiciones de composición y caudal de la FM, mientras que en las **separaciones en gradiente** (de elusión o de caudal) se varían dichas condiciones.
- *Columnas*: Los tipos de rellenos en las columnas con fases unidas químicamente se pueden clasificar en función de las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria. Las fases estacionarias de elevada polaridad como por ejemplo Agua o Trietilenglicol colocadas sobre partículas de sílice o alúmina dan lugar a una **cromatografía en fase**

normal. Cuando la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, y la fase móvil es relativamente polar como Agua, Metanol o Acetonitrilo, nos referimos **acromatografía en fase inversa o reversa.**

- **Detectores:** Dependiendo de la propiedad física que convenga medir pueden emplearse los detectores espectrofotométricos, espectrofluorímetros, conductimétricos, espectrómetros de masa, refractómetros, etc.
- **Registrador y procesador de datos:** brindan un cromatograma, que es el resultado gráfico de la cromatografía.

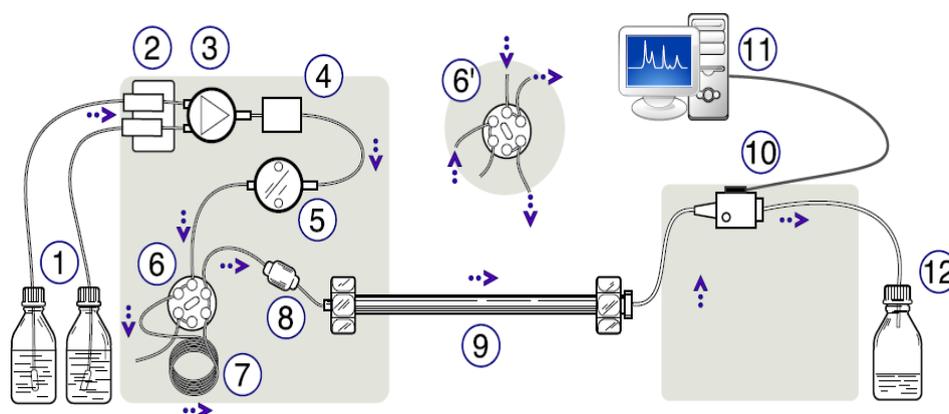


Figura 3-(1) Reservorio de solventes, (2) Desgaseador, (3) Válvula de gradiente, (4) Cámara de mezclado de solvente (5) Bomba, (6) Válvula de inyección (6') posición de carga, (7) Bucle de muestra (8) Pre-columna, (9) Columna, (10) Detector (i.e. IR, UV), (11) Adquisición de datos, (12) Desagüe/colector de fracciones.

2.1.2. Análisis Cualitativo por HPLC

Un análisis cromatográfico puede dar una amplia información cualitativa si se escoge el sistema de detección adecuado para determinar y evaluar los analitos separados, así si se utiliza un detector que permita obtener un espectro de cada compuesto separado y a su vez contenga una base de datos que pueda realizar su comparación con una biblioteca de espectros se podría, de una forma muy precisa, establecer la identidad de los componentes de una muestra. Sin embargo, estos sistemas son muy costosos, es por ello que la mayoría de los laboratorios cuentan con cromatógrafos con sistemas de detección sencillos en los cuales la información cualitativa que ofrecen es el tiempo de retención del analito. Utilizando un estándar y manteniendo las condiciones cromatográficas constantes se puede identificar un analito.

2.1.3. Análisis Cuantitativo por HPLC

En HPLC, el análisis cuantitativo se basa en la comparación de la altura, o del área del pico del analito con la de uno o más patrones inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas. El uso de uno u otro término dependerá de las características de la banda obtenida, aunque en la actualidad con el uso de sistemas de integración de área computarizados, la precisión es muy alta para el cálculo de área.

Para aislar los errores producidos se utiliza un “estándar interno” (EI), que es una sustancia que se añade en cantidades conocidas a la solución de referencia y a la solución muestra (**Figs. 3 y 4**).

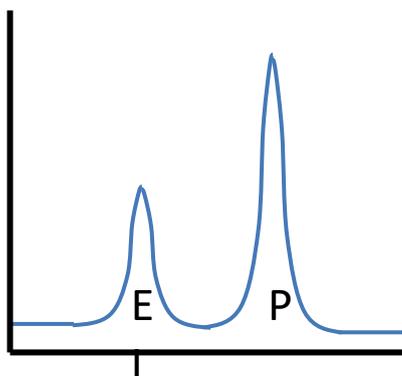


Figura 3– Cromatograma de la solución patrón: (EI) picodel estándar interno; (P) pico del patrón.

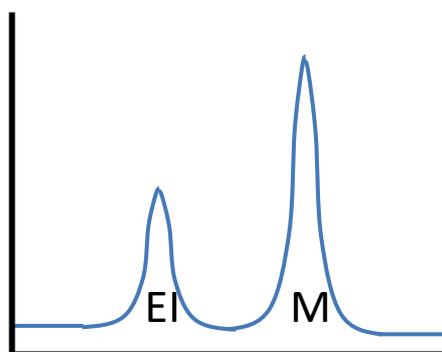


Figura 4– Cromatograma de la solución muestra: (EI) pico del estándar interno; (M) pico delamuestra.

$$A_M = \frac{\text{Área de Muestra}}{\text{Área de EI}}$$

$$A_P = \frac{\text{Área de Patrón}}{\text{Área de EI}}$$

A_P x mg de patrón

A_M x' mg de muestra

En este procedimiento se necesita que el ancho de los picos permanezca constante de una inyección a otra, lo que se logra si las condiciones de operación (temperatura, presión, flujo) son idénticas para cada inyección. La elección del patrón interno es una de las etapas importantes en

todo método analítico. Esta sustancia debe tener características fisicoquímicas semejantes a las de la sustancia cuyas identidades se desea determinar. Dentro de estas características podemos mencionar:

- Extracción en las mismas condiciones (pH, disolventes)
- Elusión parecida
- Detección idéntica.

Cuando los picos a medir son suficientemente estrechos o simétricos, sus áreas pueden reemplazarse por sus alturas.

La relación de las alturas es directamente proporcional a la concentración de la sustancia que se analiza. La curva de calibración se obtiene al graficar las concentraciones de las soluciones patrón (abscisas) y como ordenada las relaciones de áreas o alturas (**Fig. 5**):

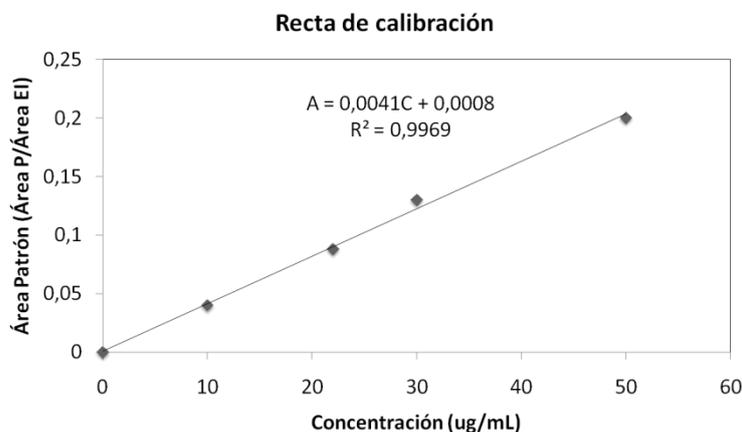
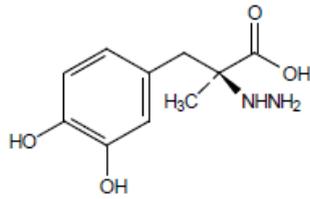


Figura 5 – Curva de calibración

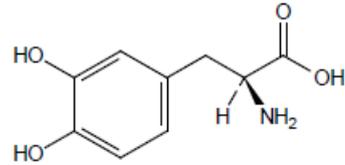
3. Actividades a realizar

- Separar y cuantificar Carbidopa y Levodopa en comprimidos por HPLC, utilizando el método de patrón interno.
- Interpretar los resultados obtenidos, calcular la concentración y porcentaje de cada PA analizado. Aceptar o rechazar las muestras analizadas de acuerdo a los criterios de aceptación codificados.

Protocolo de análisis de Carbidopa y Levodopa Comprimidos según Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5° edición



Carbidopa
Fórmula: C₁₀H₁₄N₂O₄ · H₂O
 PM: 244,2 g/mol



Levodopa
Fórmula: C₉H₁₁NO₄
 PM: 197,2 g/mol

Acción terapéutica: Levodopa es un dopaminérgico y Carbidopa es un inhibidor de la dopadescarboxilasa, se utilizan para el tratamiento del Mal de Parkinson.

Test de Identificación

a) Por CCF

Soporte: gel de sílice

Fase móvil: Acetona-Cloroformo-*n*-butanol-Ác. Acético glacial-Agua (60:40:40:40:35)

Solución reveladora: disolver 300mg de Tricetohidrendeno en 100ml de *n*-butanol acidificando con 3ml de Ác. Acético glacial. Después de revelar se calienta la placa y se ven dos manchas, una correspondiente a Levodopa de color café rojizo y otra a Carbidopa de color amarillo naranja, que deben coincidir en R_f y tamaño con la de la referencia.

b) Por HPLC: según tiempos de retención.

Test de Disolución

- Medio: 750 ml de HCl 0,1N
- Aparato: l a 50 rpm

No menos del 80% de las cantidades de Levodopa y Carbidopa declaradas en la etiqueta se disuelven en 30 minutos (Q=80%).

Valoración por HPLC

Reactivos:

- *Fase Móvil:* Solución de Fosfato monobásico de Potasio 0,1M ajustada a pH 3 con Ác. Fosfórico 1M, filtrada y desgasificada.
- *Solución de Referencia interna:* Preparar una solución de Metildopa de pureza conocida que contenga 500µg/ml en solución de HCl 0,1N.
- *Solución de Referencia I:* Pesar 25mg de Carbidopa referencia en matraz de 100ml disolver y llevar a enrase con solución de HCl 0,1N.
- *Solución de Referencia II:* Pesar 25mg de Levodopa referencia en un matraz de 50ml, añadir 25ml de HCl 0,1N; agregar una alícuota de 10ml de solución de referencia I y 5ml de

solución de referencia interna. Esta solución contiene 500 µg/ml de Levodopa y 50 µg/ml de Carbidopa.

- *Solución Muestra:* Pesar no menos de 20 tabletas, calcular su peso promedio, pulverizar hasta polvo fino y pesar una cantidad de polvo equivalente a 250mg de Levodopa, en un matraz de 100ml, añadir 60ml de HCl 0,1N, agitar durante 15 minutos llevar a volumen con la misma solución y filtrar. Tomar 10ml de esta solución en un matraz de 50ml, agregar 5ml de solución de referencia interna y llevar a volumen con HCl 0,1N.

Condiciones del equipo:

- Detector ultravioleta a 282 nm.
- Columna: C18 de 25 cm x 4 mm.
- Velocidad de Flujo: 1,5 ml/min

Procedimiento:

Inyectar al cromatógrafo por separado 25 µl de la solución II de referencia y de la solución muestra. Obtener sus respectivos cromatogramas y medir el área bajo los picos.

Cálculos

Calcular la cantidad de Levodopa en mg en la alícuota de muestra tomada. De igual manera se calcula para Carbidopa. Relacionar los valores obtenidos con el peso promedio por tableta calculado al principio de la valoración.

Criterios de aceptación

1. FEUM 1980: Los comprimidos de Levodopa y Carbidopa contienen no menos de 90% y no más de 110% de la cantidad indicada en el rótulo.

Cromatografía en capa fina

Protocolo de Análisis de Aspirina Comprimidos según United States Pharmacopeia (USP) XXIII

Test de identificación de Aspirina y Ácido Salicílico

Reactivos

- Identificación con FeCl_3
 - Reactivo FeCl_3
- Cromatografía en placa
 - Alcohol 96°
 - Acetona
 - Cloroformo
 - Solución de FeCl_3 al 5%

1. Reacción con FeCl_3 (USP 34)

Procedimiento: Moler una tableta, hervirla con 50 ml de agua durante 5 minutos, enfriar y agregar una o dos gotas de FeCl_3 . Se produce un color rojo violáceo.

2. Cromatografía en capa fina (USP 23)

Procedimiento: Se pesa en un matraz de 10 ml una cantidad de polvo de tabletas de Aspirina equivalente a 40 mg, enrasar con alcohol 96°. Agitar bien por 10 minutos y dejar decantar. La solución patrón debe contener 4 mg/ml en alcohol de 96°. Sobre la placa de sílica gel se siembran muestra y patrón, se coloca en la cuba cromatográfica, cuando el frente del solvente ha alcanzado las $\frac{3}{4}$ partes de la placa, se saca de la cuba, se seca y se revela.

Fase móvil: Cloroformo: Acetona (4:1)

Revelador: Solución de FeCl_3 al 5%

Verificar la presencia del producto de degradación, Ácido Salicílico. Con este revelador los fenoles dan manchas azules o violetas. *Rf Aspirina:* 16, *Rf Salicílico:* 7.

4. Bibliografía

- Farmacopea Argentina (2014). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud de la Nación.
- The United States Pharmacopeial (2018). Rockville, Estados Unidos de América.
- British Pharmacopoeia (2013). London, Reino Unido.

TRABAJO PRÁCTICO Nº 2: VOLUMETRIA ACIDO-BASE EN MEDIO ACUOSO Y VOLUMETRIA ACIDO-BASE EN MEDIO NO ACUOSO CON PUNTO FINAL POTENCIOMETRICO.

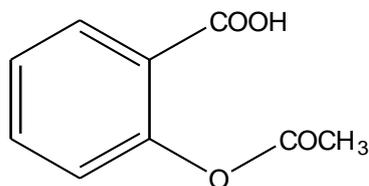
1. Objetivos

Mediante la realización del presente Trabajo Práctico de Laboratorio el alumno podrá:

- Aplicar la volumetría ácido-base en medio acuoso para la determinación del contenido de Aspirina en comprimidos.
- Aplicar la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) como test de identificación para Aspirina y Ácido Salicílico.
- Aplicar la volumetría ácido-base en medio no acuoso para determinar la pureza de una droga empleando un método potenciométrico en la detección del punto final

2. Introducción Teórica

El Ácido Acetilsalicílico o Aspirina es un antiinflamatorio no esteroide (AINE) de venta libre que posee actividades analgésicas y antipiréticas. En el mercado farmacéutico se encuentra solo o asociado a otros IFAs como, Cafeína, Paracetamol y Vitamina C.



Ácido Acetilsalicílico (aspirina) *Fórmula:* $C_9H_8O_4$ *PM:* 180,16 g/mol

Dentro de su estructura química posee un grupo carboxilo que puede ser titulado en medio acuoso, utilizando hidróxido de sodio como reactivo valorante. En general, cuando la reacción es lenta o el ácido no es lo suficientemente fuerte, se realizan volumetrías de neutralización por retorno.

Aspirina tiene una función éster lo que la hace estable, pero en contacto con el agua se hidroliza a Ácido Acético y Ácido Salicílico. La reacción de descomposición es catalizada por ácidos y bases y se acelera con el calentamiento.

La solución patrón debe contener 4 mg/ml en alcohol de 96°. Sobre la placa de sílica gel se siembran muestra y patrón, se coloca en la cuba cromatográfica, cuando el frente del solvente ha alcanzado las $\frac{3}{4}$ partes de la placa, se saca de la cuba, se seca y se revela.

Fase móvil: Cloroformo: Acetona (4:1)

Revelador: Solución de FeCl_3 al 5%

Verificar la presencia del producto de degradación, Ácido Salicílico. Con este revelador los fenoles dan manchas azules o violetas. *Rf Aspirina:* 16, *Rf Salicílico:* 7.

Test de Disolución

No menos del 80% de la cantidad rotulada se debe disolver en 30 minutos. Medio de disolución: 500 ml de Buffer Acetato 0,05M; pH $4,5 \pm 0,05$; se utiliza el aparato I a 50 rpm.

Valoración por HPLC

Fase móvil: 2 g de 1-heptasulfonato de Sodio disuelto en una mezcla de 850 ml de agua y 150 ml de Acetonitrilo, ajustar a pH 3,4 con Ácido Acético glacial.

Solución de dilución: Acetonitrilo-Ácido Fórmico (99:1)

Preparación del Patrón: Disolver una cantidad exactamente pesada de Aspirina en la solución de dilución para obtener una concentración conocida de 0,5 mg/ml aproximadamente.

Preparación de la Muestra: Pesar no menos de 20 tabletas, calcular su peso promedio, pulverizar hasta polvo fino y pesar una cantidad de polvo equivalente a 100 mg de Aspirina, en un recipiente adecuado. Agregar 20 ml de solución de dilución. Agitar por 10 minutos y centrifugar (solución madre). Diluir un volumen exactamente medido de la solución madre con 9 volúmenes de la solución de dilución.

Sistema cromatográfico:

- Columna L1 de 300 mm x 4 mm.
- Velocidad de flujo: 2 ml/min.
- Detección: UV a 280 nm.

Procedimiento: Inyectar volúmenes iguales de solución Patrón y Muestra. Calcular en mg la cantidad de Aspirina en la porción de la muestra tomada.

Protocolo de Análisis de Aspirina Comprimidos según British Pharmacopoeia (BP) 2001.

Valoración de Aspirina mediante una titulación ácido-base en medio acuoso

Reactivos

- Hidróxido de sodio 0,5M (SV)

- Ácido Clorhídrico 0,5 M (SV)
- Indicador solución Rojo Fenol o Fenolftaleína

Procedimiento:

Pesar 20 comprimidos y calcular el peso promedio. Pulverizarlos 20 comprimidos y tomar una cantidad de polvo equivalente a 0,5 g de Aspirina adicionar 30 ml de NaOH 0,5M hervir suavemente durante 10 minutos. Enfriar. Titular el exceso de álcali con HCl 0,5M usando solución de Rojo Fenol como indicador. Realizar un blanco. La diferencia entre los volúmenes de titulante gastados representa la cantidad de NaOH 0,5M requeridos para la Aspirina. *Cada ml de NaOH 0,5M es equivalente a 0,04504 g de C₉H₈O₄.*

Cálculos:

$$(V_B - V_M)_{HCl} \cdot N_{HCl} \cdot \frac{PM_{aspirina}}{2 \cdot 1000} = g \text{ de aspirina}$$

Criterios de aceptación

1. *BP 2001*: Los comprimidos de Aspirina deben contener no menos de 95% y no más de 105% de la cantidad rotulada de C₉H₈O₄.
2. *USP 34*: Los comprimidos de Aspirina deben contener no menos de 90% y no más de 110% de la cantidad rotulada de C₉H₈O₄.

4. Bibliografía

- Farmacopea Argentina Séptima Edición (2014).
- Farmacopea Británica (2013).
- USP Vol 41. (2018).

Volumetría ácido base en medio no acuoso

Introducción Teórica

Un alto porcentaje de las drogas utilizadas en farmacia poseen características ácido-básicas débiles, considerando la parte fisiológicamente activa de cada compuesto, es posible valorar esa porción de la molécula seleccionando convenientemente el disolvente y el reactivo valorante. De allí la importancia en la elección del disolvente a utilizar cuando se desea realizar las valoraciones de dichas drogas.

Importancia del Disolvente

El agua es el disolvente más utilizado, pues puede actuar como el segundo par ácido-base, tanto para:

ACIDOS, en tal caso se comporta como una base.

BASES, en tal caso se comporta como un ácido.

Aunque su comportamiento anfótero es útil, limita su uso como medio de valoración debido a que en el equilibrio ácido base existe competencia entre dos bases por un protón, por lo tanto en solución acuosa una de estas bases sería el agua. Por lo antes mencionado, se pueden presentar dos situaciones:

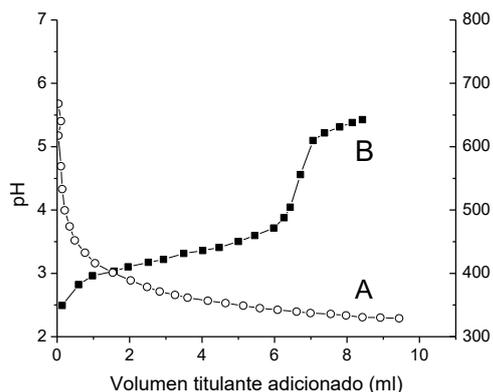
*Base fuerte: donde esta base competiría con el hidroxilo del agua por el protón del reactivo valorante.

* Base débil: la cual no puede competir con el hidroxilo del agua, por ende no sería valorable.

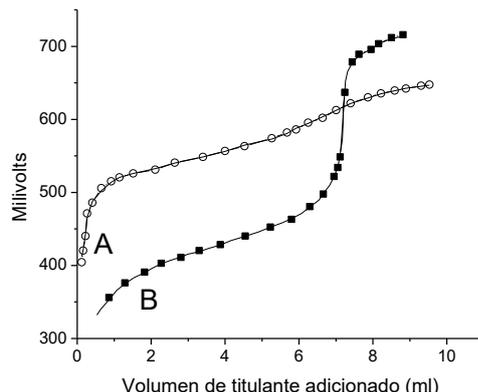
Si se tratara de un ácido ocurriría lo mismo, pues el ácido competiría con el protón del agua por la base valorante en caso que se tratara de un ácido fuerte, en tanto que si fuera un ácido débil esta competencia no ocurriría.

Por todo esto, ni las sustancias débilmente ácidas, ni las débilmente básicas, resultan fáciles de valorar en soluciones acuosas, a causa del efecto preponderante del disolvente. La solución es reemplazar el disolvente (**Fig. 6**):

- Si el soluto es una base débil se sustituye el agua por un disolvente poco básico reduciendo o evitando así, esa competencia indeseable.
- Si el soluto es un compuesto débilmente ácido se reemplaza el agua por un disolvente poco ácido o que no muestre claras propiedades ácidas.



Valoración potenciométrica de muestras de Antipirina. **A**, valoración en agua con HCl 0,1N; **B**, valoración en Ác. Acético glacial con HClO₄ 0,1N.



Valoración potenciométrica de muestras de Cafeína con HClO₄ 0,1N. **A**, valoración en Ác. Acético glacial; **B**, valoración en Anhídrido.

Figura 6- Ejemplos de dos bases débiles valoradas utilizando diferentes disolventes y medios de valoración.

Clasificación de los disolventes

En las valoraciones en medio no acuoso los disolventes se clasifican como sigue:

- Disolventes Protogénicos: se disocian originando un protón solvatado, son disolventes ácidos que poseen un débil carácter básico. Ejemplo: Acido Acético



- Disolventes Protófilicos: son aquellos capaces de aceptar un protón, son disolventes básicos que poseen un débil carácter ácido. Ejemplo: Piridina, Éter, Anhídrido Acético.
- Disolventes Anfipróticos: pueden aceptar o dar un protón, tal es el caso del agua y los alcoholes. Son a la vez ácidos y básicos. En presencia de ácidos fuertes estos disolventes harán resaltar sus propiedades básicas.
- Disolventes Apróticos: no tienen tendencia a dar o aceptar un protón, tal es el caso del Cloroformo y los hidrocarburos, por ende no presentan propiedades ácidas ni básicas.

Efecto de la Temperatura

Es de suma importancia en este tipo de valoraciones el control de la temperatura a la cual se estandariza la solución valorante, siendo lo ideal que sea igual a la temperatura a la cual se lleva a cabo la valoración de la base débil. De no ser así, se debe efectuar una corrección debido al alto valor del coeficiente de expansión cúbica de la mayoría de los líquidos orgánicos.

Con los cambios de temperatura la normalidad de la solución valorante no acuosa varía más ampliamente que la de una solución acuosa. El coeficiente de expansión cúbica para el Ácido Acético es $1,07 \times 10^{-3} \text{ grados}^{-1}$ a 20°C (para el agua es $0,21 \times 10^{-3} \text{ grados}^{-1}$); por tanto cabe considerar que una solución patrón de Ácido Perclórico en Ácido Acético glacial cambia su volumen un 0,1% por cada grado Celsius que varía la temperatura.

Como se trata de una variación importante debe hacerse la corrección del volumen gastado (V_g), para lo cual es necesario anotar la temperatura de trabajo durante la titulación con el HClO_4 y ese valor deberá restarse o sumarse a la temperatura de estandarización del HClO_4 de la siguiente manera:

1. Si la temperatura a la cual se valora la muestra es superior a la de estandarización, el volumen corregido (V_c) será:

$$V_c = V_g \cdot [1 - |t_x \cdot 0,001|]$$

2. Si la temperatura de valoración de la muestra es inferior a la de estandarización, la corrección será:

$$V_c = V_g \cdot [1 + |t_x \cdot 0,001|]$$

siendo en ambos casos t_x la diferencia (en términos absolutos) en grados centígrados entre la temperatura de estandarización de la solución valorante y la temperatura de trabajo durante la titulación de la muestra.

Determinación de Compuestos con características ácido-bases débiles

Determinación de bases débiles

Por las razones explicadas anteriormente se emplean disolventes neutros o ácidos como:

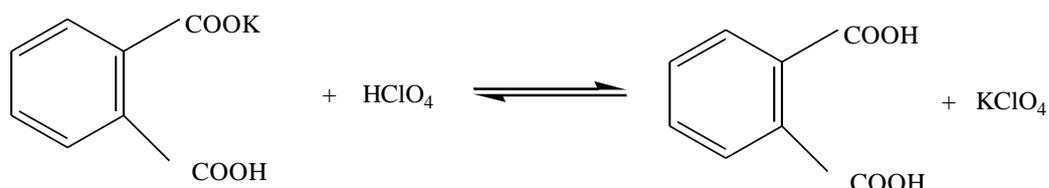
- Ácido acético glacial, es el más utilizado.
- Anhídrido acético, muy útil para el análisis de bases muy débiles como las amidas, permitiendo una buena detección del punto final. (ver **Fig. 6**-Curva de Valoración para Cafeína, utilizando como disolvente Anhídrido Acético comparada con Ácido Acético).
- Dioxano, a veces se emplea en mezclas con Ácido Acético.
- Mezclas de disolventes, como Propilenglicol y Cloroformo, Etilenglicol y n-butanol, empleadas para sustancias difícilmente solubles.

Por otro lado, es muy importante la selección del reactivo valorante, siendo los más útiles los ácidos fuertes. Dicha selección la realizamos en función de la formación del ión acetónio $\text{CH}_3\text{-COOH}_2^+$ al reaccionar el ácido al cual le queremos determinar su fuerza, con Ácido Acético. De acuerdo a esto la fuerza de los ácidos decrece en el siguiente sentido:



Entre los reactivos valorantes, el más utilizado es el Ácido Perclórico, aunque también pueden emplearse el Ácido p-toluensulfónico y el Ácido Fluorosulfónico.

Estos valorantes se estandarizan con una sustancia que se comporte como base fuerte, y que sea patrón primario, el más utilizado es el Biftalato de Potasio.



Otros patrones primarios que pueden emplearse son: Tris (hidroximetil) aminometano, Carbonato de Sodio y Difenilguanidina.

La detección del punto final puede efectuarse con indicadores visuales (bases muy débiles) o de modo potenciométrico. Dentro de los indicadores visuales, el más utilizado es el Cristal Violeta (Violeta de Genciana) que vira de violeta (color básico)-azul- verde azulado- verde- verde amarillento a amarillo (color ácido) (Ver **Tabla 2**). El cambio de color en el punto final depende de la base particular y del disolvente, es por eso que para muchas bases el cambio de color desde el violeta a azul marca el punto final.

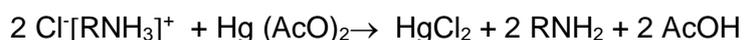
Para las valoraciones en Ácido Acético glacial se recomienda como indicador a la p-naftolbenceína.

INDICADORES	FORMA BASICA	FORMA ACIDA
Cristal violeta	Violeta	Amarillo
p-naftolbenceína	Amarillo	Verde
Verde de Malaquita	Verde	Amarillo
Rojo de Quinaldina	Rosa	Incoloro

Tabla 2- Indicadores utilizados en la valoración de bases débiles.

La mayoría de las aminas y muchos alcaloides se valoran en Ácido Acético. Cuando las aminas están salificadas se disuelven en ácido acético y se les adiciona un exceso de Acetato de Mercurio, de este modo se libera la amina y se puede valorar.

El Cloruro de Mercurio y el Acetato de Mercurio en exceso, no son básicos, por lo tanto no interfieren en la valoración.



Ejemplo: El Clorhidrato de Clorpromazina (psicotrónico pertenecientes al grupo de los tranquilizantes mayores), debido a que se presenta como sal, primero debe disolverse en Acetona y efectuarse el clivaje con Acetato de Mercurio. Luego se valora la base libre con Ácido Perclórico.

Determinación de ácidos débiles

Los disolventes con carácter básico tienden a aumentar el carácter ácido de los ácidos muy débiles, y como consecuencia de ello resultan adecuados para la valoración de este tipo de compuestos. Asimismo, los disolventes neutros son adecuados para la valoración diferenciadora de mezclas.

Entre los disolventes básicos comúnmente utilizados en la valoración de compuestos débilmente ácidos podemos mencionar:

- Etilendiamina.
- N-butilamina.
- Piridina.
- N-N-Dimetilformamida.
- Otros como Benceno, Etanol, Metanol, Acetona, Metil-etil-cetona, etc.

Dentro de los reactivos utilizados para valorar ácidos débiles se pueden mencionar los Metóxidos de Potasio, de Sodio o Litio, en solución Metanol-Benceno, además se suelen emplear los Hidróxidos de Tetraalquilamonio como por ejemplo el Hidróxido de Tetrabutilamonio.

Todos los titulantes básicos absorben fácilmente el CO_2 , por lo tanto, las valoraciones se llevan a cabo bajo corriente de nitrógeno para evitar este inconveniente y siempre se efectúa un blanco paralelamente. Como se mencionó anteriormente, para estandarizar el reactivo valorante, se utiliza una sustancia que sea patrón primario, en este caso, el más usado es el Ácido Benzoico.

Los siguientes indicadores visuales se emplean comúnmente en la determinación del punto final (ver **Tabla 3**):

- Azul de Timol, se emplea en la valoración de ácidos carboxílicos, imidas, sulfonamidas, etc.
- Violeta azo (*p*-nitrobencenazo-resorcinol), es un indicador ácido muy débil, por ende es útil para valorar ácidos muy débiles (por ejemplo, Fenol con sustituyentes aceptores de electrones).
- O-fenantrolina, para ácidos aún más débiles.
- Fenolftaleína y Timolftaleínas, son excelentes para aquellas valoraciones que emplean alcohol y/o piridina.

Para valoraciones de ácidos muy débiles se prefiere la valoración con punto final potenciométrico.

INDICADORES	FORMA BASICA	FORMA ACIDA
Azul de Timol	Azul	Amarillo
Violeta azo	Azul	Rojo
Fenolftaleína	Rosa	Incoloro
Timolftaleína	Azul	Incoloro

Tabla 3- Indicadores utilizados en la valoración de ácidos débiles.

Ejemplo: Meprobamato, psicotrópico perteneciente al grupo de los tranquilizantes menores. Este compuesto puede determinarse a través de un agregado en exceso de Metóxido de Sodio en solución bencénica, y realizando una valoración por retorno utilizando Ácido Benzoico (en Benceno), como reactivo valorante (**Fig. 7**).

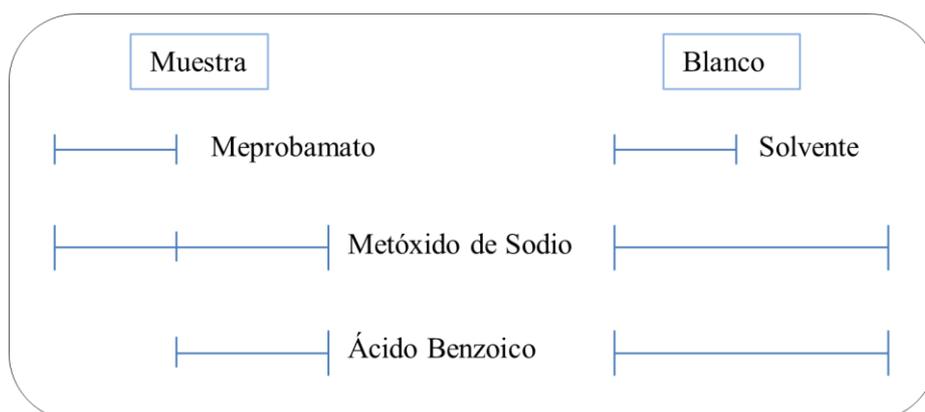


Figura 7- Esquema de barras representando la valoración de Meprobamato.

Cálculos:

Sin utilizar el blanco de reacción:

$$[(VN)_{Metóx.} - (VN)_{Ác. Benzoico}] \frac{PM_{Meprobamato}}{2 \cdot 1000} = g \text{ de Meprobamato}$$

Realizando un blanco de reacción:

$$[(V_B - V_M)_{Ác. Benz} \cdot N_{Ác. Benz}] \frac{PM_{Meprobamato}}{2 \cdot 1000} = g \text{ de Meprobamato}$$

Determinación Potenciométrica del Punto Final

La potenciometría es un conjunto de métodos químicos que se basan en la medida del potencial eléctrico de un electrodo sumergido en la solución problema, respecto a una referencia, a partir del cual se puede establecer la concentración de la solución desconocida, directa o indirectamente.

Toda potenciometría exige un electrodo indicador, un electrodo de referencia y un dispositivo para medir el potencial. Los electrodos indicadores más usados son: Oro, Pt y Ag y para medidas de pH, el electrodo de vidrio.

La ecuación fundamental del análisis potenciométrico es la ecuación de Nernst, que vincula la fuerza electromotriz de una celda electroquímica con la actividad de los iones en solución. La actividad de sólidos y líquidos puros, es igual a 1.

Si las soluciones son diluidas, se puede considerar que la actividad de una especie iónica es igual a su concentración:

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{a_{\text{productos}}}{a_{\text{reactivos}}}$$

Puede considerarse:

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[\text{productos}]}{[\text{reactivos}]}$$

$$E = E^{\circ} - \frac{0,059}{n} \cdot \log \frac{[\text{productos}]}{[\text{reactivos}]}$$

La potenciometría se clasifica en:

- a) Potenciometría directa y medida del pH: la medida del potencial del electrodo indicador da directamente la concentración de la sustancia en estudio. Por ejemplo en medida de pH, obtenemos directamente la concentración de ión H⁺ con lo cual es posible obtener el valor de pH.
- b) Valoraciones potenciométricas: el punto final de la valoración ocurre cuando se produce una brusca variación del potencial.

Generalmente, en una valoración potenciométrica se mide el potencial después de la adición de cada alícuota de reactivo. Los datos obtenidos se representan en una gráfica de potencial versus cantidad de reactivo titulante adicionado.

Para mejorar la detección del punto final, se puede graficar la primera derivada dE/dV en función del volumen de titulante agregado; o bien, la segunda derivada d²E/d²V, frente al volumen.

El vaso de titulación y el electrodo indicador se convierte en una de las semiceldas de una celda electroquímica, mientras que un electrodo de referencia apropiado, la otra semicelda. Los reactivos y los productos se encuentran todos en la misma semicelda (**Fig. 8**).

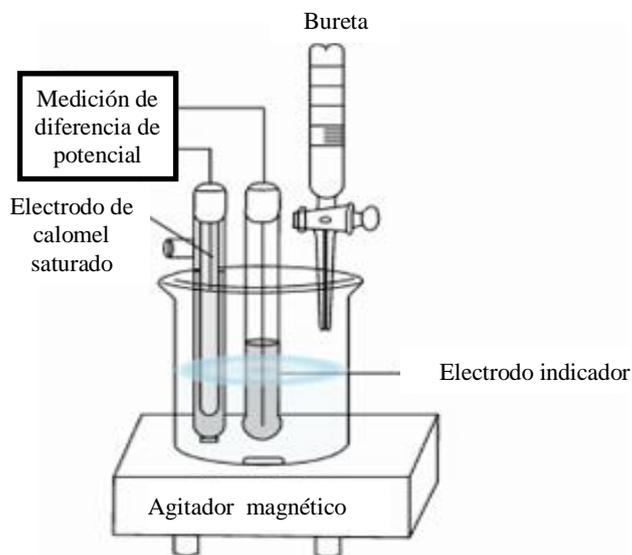


Figura 8- Esquema gráfico de la celda electroquímica tipo, utilizada en una valoración potenciométrica.

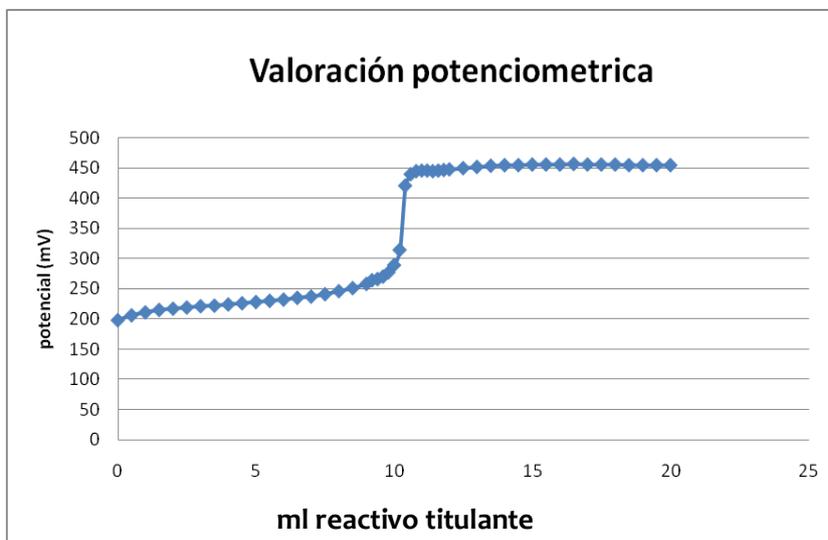
Localización del punto final

La curva de titulación puede seguirse punto a punto, proyectando como ordenada valores sucesivos de fuerza electromotriz (*fem*) de la celda, en función del volumen del titulante agregado. Los volúmenes de titulante adicionado deben ser cantidades muy pequeñas, exactamente medidas. En la mayor parte de la titulación la *fem* varía gradualmente, mientras que en las cercanías del punto final, donde la concentración del reactante original se hace muy pequeña, se producen cambios agudos en la *fem*. Debido a ello, es de fundamental importancia la correcta detección de dicho cambio para no cometer errores en la determinación del punto final.

El volumen de titulante adicionado en el punto final, se puede calcular **gráficamente o analíticamente**:

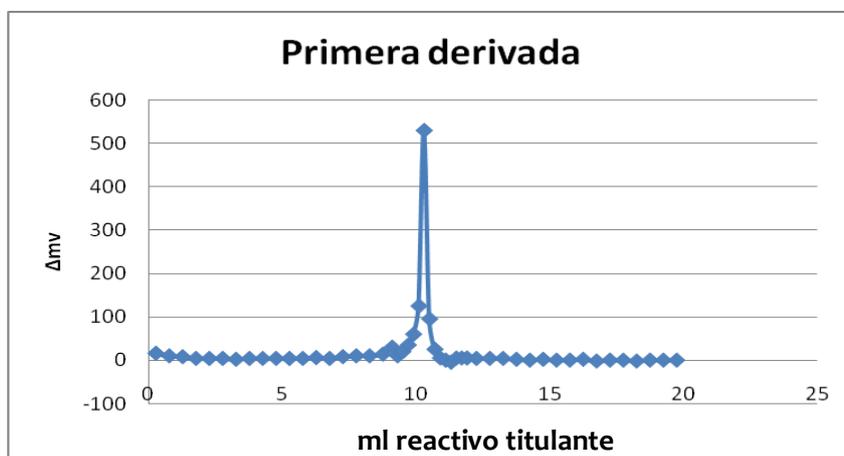
Gráficamente

a) Se grafica la variación de *fem* versus el volumen de reactivo titulante agregado, y se obtiene una curva como la siguiente, donde el punto de inflexión de la misma corresponde al volumen del punto final:



Esta curva da un intervalo y no se tiene certeza donde se produce el punto de inflexión.

b) Mayor exactitud se obtiene graficando la primera derivada ($\Delta E/\Delta V$) versus el volumen de reactivo agregado. Aquí el volumen del punto final corresponde al valor máximo de la derivada. De esta manera se logra disminuir el intervalo.



c) A partir de la gráfica de la derivada segunda ($\Delta^2 E/\Delta V^2$) versus el volumen de reactivo agregado, se obtiene la siguiente curva, donde el volumen de titulante en el punto final corresponde al valor de las abscisas por donde pasa una recta tangencial a las dos ramas.



Analíticamente

En la siguiente tabla (**Tabla 4**) se presentan, a modo de ejemplo, los datos obtenidos en la valoración de metronidazol, a partir de los cuáles se calcula analíticamente el volumen de reactivo titulante en el punto final.

Volumen reactivo (ml)	E	$\Delta E/\Delta V$	$\Delta^2 E/\Delta V^2$
24	530		
24,2	530		
24,4	530	0	0
24,6	530	0	0
24,8	530	0	0
25	530	0	0
25,2	530	10	10
25,4	540	20	10
25,6	560	90	70
25,8	650	20	-70
26	670	10	-10
26,2	680	5	-5
26,4	685	4	-1
26,6	689		
26,8			

Tabla 4- Datos obtenidos en la valoración de Metronidazol.

Cálculos a partir de los datos obtenidos: Si en la zona del cambio brusco de potencial la derivada segunda da cero, el volumen que corresponde a la misma, es el del punto de equivalencia. Esto se deduce de la observación de la curva Δ^2E/Δ^2V . Si no fuese así, lo cual es lo más corriente, debe efectuarse una interpolación:

Para una diferencia de 0,2 ml de reactivo titulante adicionado corresponde una diferencia en los valores de segunda derivada, en este ejemplo, 70-(-70), para una diferencia de 70 - 0 el valor será (ya que en cero se encuentra el volumen de reactivo del punto final):

$\begin{array}{l} 0,2 \text{ ml} \longrightarrow 70 - (-70) \\ A \text{ ml} \longleftarrow 70 - 0 \end{array}$
--

$$A = \frac{70 \times 0,2}{140} = 0,1 \text{ ml}$$

Este valor sumado al menor de los volúmenes considerados, nos da el valor correspondiente al punto final de la titulación.

Luego:

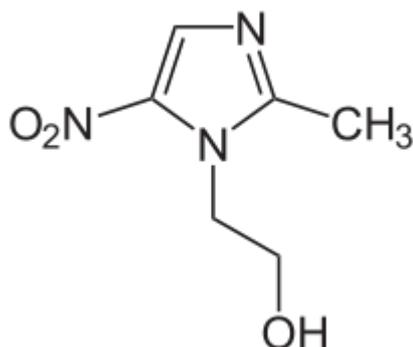
$$(V \cdot N)_{\text{titulante}} \cdot \frac{PM_{\text{droga}}}{1000} = g \text{ de droga}$$

Teniendo en cuenta que en este caso V corresponderá a un Volumen corregido (Vc) calculado en base a las posibles diferencias entre la T° de estandarización y la T° de trabajo.

Actividades a realizar

- Determinar la pureza de Metronidazol droga por volumetría en medio no acuoso
- Detectar potenciométricamente el punto final de la valoración. Determinar gráfica y analíticamente el volumen del reactivo titulante en el punto final de la valoración.
- Interpretar de los resultados obtenidos, calcular del porcentaje de pureza. Aceptar o rechazar del lote de acuerdo al criterio de aceptación codificado.

Protocolo de Análisis de Metronidazol droga según USP 34, NF25 2011



Metronidazol *Fórmula:* C₆H₉N₃O₃ *PM:* 171,2 g/mol

Acción terapéutica: Antiprotozoario. Antibacteriano.

Test de Identificación:

- a) Por espectroscopía IR
- b) Por espectroscopía UV.

Determinación del Punto de Fusión: El punto de fusión de Metronidazol debe ser entre 159°C y 163°C.

Pérdida por Secado: Secar la droga por 2 horas a 105°C: no debe perder más del 0,5% de su peso.

Límite metales pesados: 0,005%.

Valoración:

Reactivos:

- Anhídrido Acético
- Verde de Malaquita
- Ácido Perclórico 0,1N

Procedimiento:

En un erlenmeyer de 125 ml, pesar exactamente 100mg de Metronidazol. Agregar 20ml de Anhídrido Acético, tapan, calentar suavemente sobre plancha calefactora a efectos de una buena disolución. Enfriar bajo canilla, adicionar una gota de Verde de Malaquita y valorar con Ácido Perclórico 0,1N. El punto final se visualiza por viraje del indicador de verde a amarillo.

Paralelamente se realiza un blanco de determinación, partiendo de 20ml de Anhídrido Acético y siguiendo el mismo procedimiento que para la muestra. *Cada ml de Ácido Perclórico 0,1N es equivalente a 17,12mg de C₆H₉N₃O₃.*

Cálculos

$$(V_M - V_B)_{HClO_4} \cdot N_{HClO_4} \cdot \frac{PM_{Metronidazol}}{1000} = g \text{ de Metronidazol}$$

Criterio de aceptación

USP 34: Metronidazol droga contiene no menos de 99% y no más de 101% de Metronidazol calculado sobre la base seca.

6. Bibliografía

- Farmacopea Argentina (2014). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud de la Nación.
- The United States Pharmacopeial (2018). Rockville, Estados Unidos de América.
- British Pharmacopoeia (2013). London, Reino Unido.

TRABAJO PRÁCTICO Nº 3: METODOS ESPECTROSCOPICOS ABSORCION UV-Vis

1. Objetivos

Mediante la realización del presente Trabajo Práctico de Laboratorio, el alumno será capaz de aplicar los métodos espectroscópicos de absorción UV-visible para la determinación cuantitativa de IFA.

2. Introducción Teórica

La espectrometría de absorción es la medición de la absorción selectiva, por parte de átomos, moléculas o iones, de radiación electromagnética con un espectro de longitud de onda definido y estrecho, próximo a la energía monocromática. Abarca las regiones de longitud de onda ultravioleta (200-380nm) y visible (380-780nm). La región por debajo de 200nm, conocida como UV lejano o UV de vacío (ya que se requiere la total ausencia de aire debido a su interferencia) no tiene aplicación en el análisis farmacéutico.

El tipo de radiación absorbida por una molécula depende de su estructura, y la cantidad de radiación depende de la concentración.

Si la energía de la radiación corresponde a la zona del UV o la zona Visible del espectro, en la molécula se producen transiciones electrónicas.

La cuantificación por espectroscopia UV-Vis es un método rápido y preciso que se basa en la Ley de Lambert-Beer que relaciona la absorción con la concentración de las moléculas en solución y el camino óptico para una longitud de onda determinada.

Los grupos químicos susceptibles de absorber luz en el UV o en el Visible se llaman "cromóforos". Para que una molécula absorba en el UV o el Visible debe tener por lo menos un grupo cromóforo (doble enlace-simple enlace-doble enlace o llamados también dobles enlaces conjugados). Existen otros grupos incapaces por si mismos de absorber por encima de 200nm pero refuerzan el efecto del grupo cromóforo. Se trata de los grupos auxocromos (halógenos, -OH, NH₂, etc.). La combinación cromóforo más auxocromo permite una absorción por encima de los 200nm con un número de combinaciones muy importantes, por tanto, no es específico de una molécula, lo que implica que esta técnica por si sola es insuficiente para identificar un IFA, pero puede ser útil para complementar otras metodologías como el infrarrojo, la espectrometría de masa, la resonancia magnético nuclear, etc.

3. Actividades a realizar

- Cuantificar MetforminaHCl mediante espectrofotometría UV.
- Interpretar de los resultados obtenidos, calcular del porcentaje de pureza. Aceptar o rechazar del lote de acuerdo al criterio de aceptación codificado.

3.3.1 Protocolo de Análisis de Comprimidos de MetforminaHCl según USP 41

Los comprimidos de Metformina contienen entre 95 % y 105% de metformina HCl respecto de la cantidad rotulada.

Ensayos de Identificación

A- Por espectroscopia IR

B- Reacción de color con 1-naftol

C- Identificación de cloruros

Valoración

Procedimiento

Preparación de solución estándar: Pesar una cantidad de MetforminaHCl patrón y disolver en agua para obtener una concentración final de 10 µg/ml.

Preparación de solución muestra: Pulverizar 10 comprimidos y pesar una cantidad de polvo equivalente a 100 mg de MetforminaHCl, colocar en matraz de 100 ml y disolver con 70 ml agitando mecánicamente. Llevar a volumen final con agua. Filtrar. Tomar 10 ml de este filtrado y diluir a 100 ml con agua. Medir ambas soluciones en espectrofotómetro UV a 232 nm

Otro Ensayo

Ensayo de disolución.

4. Bibliografía

- Farmacopea Argentina (2014). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud de la Nación.
- The United States Pharmacopeial (2018). Rockville, Estados Unidos de América.
- British Pharmacopoeia (2013). London, Reino Unido.

TRABAJO PRÁCTICO Nº 4: ESPECTROMETRÍA INFRARROJA

1. Objetivos

Mediante la realización del presente Trabajo Práctico de Laboratorio el estudiante podrá:

- Aplicar la espectrometría infrarroja para el análisis cualitativo y cuantitativo de Paracetamol en comprimidos.
- Interpretar el espectro de absorción infrarrojo obtenido para el estudio de la estructura molecular del paracetamol.

2. Introducción Teórica

La espectrometría Infrarroja es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético que abarca entre los números de onda de 12800 a 10 cm^{-1} aproximadamente, lo que corresponde a las longitudes de onda de 0,78 a 1000 μm . Esta región se divide en 3 porciones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano. Por lo general, la región del infrarrojo que propicia mayor información estructural de la molécula se encuentra comprendido entre 4000-400 cm^{-1} .

La técnica se basa en el hecho de que los enlaces intramoleculares tienen frecuencias de vibración específica, que dependen de la naturaleza de los átomos que conforman la molécula, la geometría molecular y su entorno. Los enlaces en una molécula pueden vibrar de seis maneras: estiramiento simétrico, estiramiento asimétrico, tijera en el plano, balanceo en el plano, torsión y aleteo. Si se irradia a la molécula con la misma energía de vibración, el fotón emitido será absorbido por la molécula y ese cambio es registrado en el correspondiente espectro de absorción.

El número de estados vibracionales son numerosos aún para moléculas simples dando espectros complejos respecto a otras técnicas espectrométricas. Los espectros infrarrojos se caracterizan por brindar grandes cantidades de informaciones, dando patrones de absorción únicos para cada molécula. Por esta razón, la espectrometría infrarroja se ha empleado principalmente para análisis cualitativo de especies orgánicas.

Como todas las espectroscopías, el modelo de absorción infrarroja obedece a la ley del Lambert-Beer. De esta manera, la intensidad de absorción es en función de la concentración del analito, mientras que los máximos de absorción son en función de la naturaleza del analito, independientemente de su concentración. Al igual que las otras técnicas espectroscópicas, en la determinación de IR se produce la saturación de la señal analítica al superar un cierto límite de concentración del analito. Para evitar esto, es necesario diluir el analito en proporciones adecuadas con un diluyente ópticamente transparente a la radiación IR. Las moléculas de agua absorben intensamente en el rango de interés del espectro IR, por lo que no se emplea como

diluyente. Típicamente, para las muestras sólidas se emplean como diluyente sales altamente purificadas de Bromuro de Potasio, aunque pueden usarse sales de cloruro de sodio o bromuro de cesio. Las muestras se mezclan con la sal, se tritura y se prensan formando una pastilla. En caso de muestras líquidas, se emplea una celda especial que posee ventanas constituida por cristal de cloruro de sodio por donde atraviesa el haz IR.

Esta técnica está indicada en la mayoría de las farmacopeas para el ensayo de identificación en las monografías, tanto para drogas puras como para muestras comerciales. De acuerdo a las características físico-químicas de la sustancia a analizar mediante espectrometría infrarroja, los métodos de preparación de la muestra pueden variar. Los métodos de preparación de muestras más comunes son:

- Mezclar íntimamente la muestra sólida con KBr.
- Dispersión de la muestra sólida en aceite mineral.
- Suspender la muestra entre placas de NaCl o KBr.
- Disolver la muestra con un solvente específico indicado en la monografía individual.

(Se debe realizar el mismo procedimiento para los estándares de referencia de cada muestra)

Una vez preparada de la misma forma la muestra de prueba y el correspondiente estándar de referencia, se registran los espectros de absorción en el intervalo de 3800 cm^{-1} a 650 cm^{-1} (número de onda). El espectro de absorción de la muestra pura debe presentar los mismos máximos de absorción que su correspondiente estándar de referencia. Las diferencias que pueden observarse en los espectros entre la muestra de prueba y la del estándar de referencia pueden atribuirse a la presencia de polimorfos, y/o contaminantes.

Determinación de la presencia de polimorfos

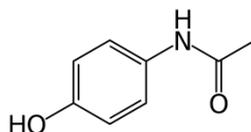
Para verificar la presencia de polimorfos en el caso de que aparezca diferencias en los espectros IR de la muestra y el estándar, se disuelve porciones iguales de la muestra de prueba y del estándar en volúmenes iguales de un disolvente apropiado, evaporar la solución hasta sequedad bajo condiciones idénticas y repetir el ensayo con los residuos obtenidos. Se vuelve a comparar los espectros IR obtenidos de la re-cristalización bajo la misma condición de la muestra y el estándar. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- Desaparece la diferencia espectral observada entre la muestra y el estándar: la muestra presenta polimorfos respecto al estándar de referencia.
- Persiste la diferencia espectral observada entre la muestra y el estándar: la muestra presenta impurezas o contaminantes.

Esta interpretación se debe a que al re-cristalizar bajo las mismas condiciones la sustancia en estudio tanto para la muestra pura y el estándar, la estructura del sólido se reorganiza de la misma manera para ambos. Por ende, si la diferencia espectral entre la muestra pura y su estándar se debe a la presencia de polimorfos, ésta desaparece mediante la re-cristalización. Por

el contrario, si la diferencia espectral se debe a la presencia de impurezas o contaminantes, persistirá aún luego de la re-cristalización.

PARACETAMOL



N-(4-hidroxifenil) acetamida

Sinonimia: Acetaminofen, paracetamol.

Es un fármaco con propiedades analgésicas y antipiréticas, que se emplea sola o en asociación con otros principios activos. Se encuentra codificado en la Farmacopea USP 34 como droga pura, cápsulas, solución oral, suspensión oral, supositorios, comprimidos y comprimidos de liberación prolongada.

La droga sólida de Paracetamol pueden presentar dos polimorfos, FORMA I y FORMA II, que tienen diferentes estructuras cristalinas, y por tanto, distintas propiedades físico-químicas. FORMA I (monoclínica): Termodinámicamente estable, se usa comercialmente, tiene malas propiedades de compresión.

FORMA II (ortorrómbica): Metaestable (termodinámicamente inestable, se transforma en la FORMA I), se puede comprimir directamente.

4.3 Ensayo de identificación para paracetamol (USP34)

Preparación del estándar de referencia y la muestra:

-Preparación del estándar de referencia: pesar en un vidrio de reloj 50 mg de estándar de referencia de paracetamol y transferir el contenido a un mortero de ágata. Por otro lado, pesar 500 mg de KBr en un vidrio de reloj y transferir el contenido al mismo mortero. Mezclar íntimamente el estándar de referencia con el KBr mediante trituración con el pilón.

-Preparación de la muestra: tomar 10 comprimidos de paracetamol 500 mg y pesar individualmente. Transferir los diez comprimidos a un mortero y triturar hasta obtener un polvo fino. Pesar la cantidad del polvo equivalente a 50 mg de paracetamol en un vidrio de reloj y transferir el contenido a un mortero de ágata. Por otro lado, pesar 500 mg de KBr en un vidrio de reloj y transferir el contenido al mismo mortero. Mezclar íntimamente la muestra con el KBr mediante trituración con el pilón.

Procedimiento para la obtención del espectro infrarrojo

-Señal de blanco: llenar la celda de muestra con la sal de KBr y realizar la lectura del blanco.

-Espectro de absorción del estándar de referencia: llenar la celda de muestra con la mezcla de estándar de referencia/KBr, preparada como se indicó en la sección anterior. Realizar la lectura del infrarrojo en el rango de 400-4000 cm^{-1} (número de ondas) para la mezcla estándar/KBr.

-Espectro de absorción de la muestra comercial: llenar la celda de muestra con la mezcla de muestra/KBr, preparada como se indicó en la sección anterior. Realizar la lectura del infrarrojo en el rango de 400-4000 cm^{-1} (número de ondas) para la mezcla muestra/KBr.

Interpretación de resultados

-Comparar los espectros de absorción obtenidos de estándar de referencia y de la muestra. El perfil de absorción de la muestra debe ser igual al del estándar de referencia para indicar si se trata de la misma especie.

-Mediante la tabla de valores de absorción infrarrojo, buscar los máximos correspondientes para los grupos funcionales de interés.

Cálculo de concentración de la Muestra

Número de ondas (cm^{-1})	% T estándar de referencia	%T muestra
3329 (N-H)		
3176 (N-O)		

Bibliografía

- Farmacopea Argentina (2014). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud de la Nación.
- The United States Pharmacopeial (2018). Rockville, Estados Unidos de América.
- British Pharmacopoeia (2013). London, Reino Unido.

TRABAJO PRÁCTICO Nº 5: VOLUMETRIA IODOMETRICA DE ANTIBIOTICOS β -LACTÁMICOS

1. Objetivos

Mediante la realización del presente Trabajo Práctico de Laboratorio, el alumno podrá aplicar una volumetría iodométrica codificada tanto en la FA como en la USP y BP para la cuantificación de antibióticos β -lactámicos, y evitar la utilización de un método de valoración microbiológico.

2. Introducción Teórica

La Amoxicilina es un antibiótico β -lactámico perteneciente al grupo de las penicilinas semisintéticas, que son activas por vía oral, con acción bactericida y un amplio espectro antimicrobiano. Es relativamente estable en medio ácido y se absorbe muy bien aún en presencia de alimentos. Alcanza niveles hemáticos altos inmediatamente después de su ingestión y se difunde rápidamente por el organismo, lo que responde a su eficacia terapéutica. Tiene una toxicidad primaria baja, aún en dosis elevadas, no presenta acción hepatotóxica, nefrotóxica, ni ototóxica. En base a todas las propiedades terapéuticas de Amoxicilina, se han desarrollado formulaciones de uso pediátrico.

Una suspensión farmacéutica se define como una dispersión grosera que contiene material insoluble, finamente dividido, suspendido en un medio líquido. Hay ciertos criterios que una suspensión bien formulada debe cumplir:

- 1) Asegurar la dispersión adecuada de las partículas en el vehículo.
- 2) Reducir al mínimo la sedimentación de las partículas dispersas.
- 3) Prevenir que estas partículas formen una pasta dura en el caso que sedimenten.

Con el fin de asegurar que la suspensión elaborada cumple con los criterios mencionados anteriormente es necesario controlar los siguientes parámetros: a- *velocidad de sedimentación* y b- *volumen de sedimentación*.

a- La *velocidad de sedimentación* en una suspensión está relacionada con el tamaño de las partículas así como con la densidad y la viscosidad del medio de suspensión, se rige por la ley de Stokes:

$$v = \frac{2}{9} \frac{r^2(\rho_1 - \rho_2)g}{\eta}$$

donde v es la velocidad final en cm/seg, r es el radio de las partículas en cm, ρ_1 y ρ_2 son las densidades (g/cm^3) de la fase dispersa y del medio de dispersión, respectivamente; g es la aceleración debida a la gravedad ($980,7 \text{ cm/seg}^2$) y η es la viscosidad del medio de dispersión en poises (g/cm/seg).

b- El *volumen de sedimentación*, F , es la relación entre el volumen de equilibrio del sedimento, V_u , y el volumen total de la suspensión, V_o .

$$F = V_u/V_o$$

Es deseable que una suspensión no muestre sedimentación ni compactación, de manera que tenga una apariencia agradable y no presente un sobrenadante claro visible. Según sea la resultante entre las fuerzas de atracción y repulsión interparticulares, se pueden presentar dos situaciones bien diferentes:

I)-*Sistema Defloculado*: Las fuerzas de repulsión entre dos partículas en suspensión son mayores que las de atracción, en consecuencia se dispersan. La velocidad de sedimentación es baja, dado que cada partícula sedimenta por separado y el tamaño de la partícula es el mínimo. El volumen de sedimentación es pequeño pero el sedimento formado es más compacto. II)-*Sistema Floculado*: las partículas en suspensión están próximas entre sí, forman agregados laxos llamados **flóculos**. La velocidad de sedimentación es alta y el volumen de sedimentación es grande, el sobrenadante es claramente visible. Puesto que las partículas tienen un potencial bajo, son fáciles de resuspender.

La Calidad de una suspensión se puede determinar mediante diferentes ensayos, dentro de los cuales cabe mencionar:

- Fotomicroscopía (se determina el tamaño y la floculación de las partículas).
- Estabilidad física (determina el grado de sedimentación)se realiza sobre el producto reconstituido luego de 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento:
 - Volumen de sedimentación
 - Aspecto del sobrenadante
 - Tamaño de las partículas en el sedimento
 - Redispersión por agitación
- Viscosidad del producto final y del agente suspensor (Viscosímetro de Brookfield).
- Pruebas microbiológicas (prueba la eficacia del conservador).
- Pruebas de envejecimiento (evalúa las características de la formulación en lo que respecta a la estabilidad y el tiempo útil).
- Cuantificación del PA inmediatamente después de agitar la suspensión.
- Determinación del tamaño de partícula en suspensiones oftálmicas, ya que no debe sobrepasar un determinado tamaño.

La estabilidad química de las suspensiones es evaluada empleando un método simple, que permite determinar la estabilidad de las drogas en tales suspensiones, y que sigue las siguientes premisas:

1. La degradación solo tiene lugar en las soluciones y sigue una cinética de primer orden.

2. El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la droga y la velocidad de reacción sigue la teoría clásica.
3. La disolución no es una limitante de la velocidad de degradación.

La estabilidad química de la suspensión se realiza sobre el producto reconstituido almacenado entre 2-8°C a los 1, 5, 7, 10, 15 y 20 días, y consiste en realizar las siguientes pruebas:

- Determinación de pH
- Valoración (método iodométrico)
- Análisis de las gráficas obtenidas de concentración en función del tiempo

Método Iodométrico

El Método Iodométrico fue ideado por Alicino en 1946, y se fundamenta en que si bien las moléculas de los antibióticos β -lactámicos (Penicilinas y Cefalosporinas) no consumen yodo, si lo hacen sus productos de inactivación con álcali.

Es un método empírico de análisis, que se basa en la inactivación de las Penicilinas por rompimiento hidrolítico del anillo β -lactámico bajo la influencia catalítica de un álcali. El producto resultante es el Ácido Peniciloico el cual consume Yodo y luego se titula el exceso de Yodo con Tiosulfato de Sodio.

Se debe realizar un blanco que contiene Penicilina que no ha sido inactivada, para determinar los contaminantes que absorben Yodo, incluyendo precursores y productos de degradación. En algunos casos se han realizado modificaciones, como por ejemplo, el uso de penicilinasa para la inactivación.

El mecanismo de reacción del Yodo con la Penicilina degradada es excesivamente complejo. Glambitza y Pallenbach, identificaron un gran número de productos de reacción cuando se llega a la degradación total, que incluyen penicilamina, glioxal, dióxido de carbono, amoníaco, etc. Se estudiaron los efectos que tienen la concentración de Yodo, pH, temperatura y tiempo de reacción sobre el número de equivalentes consumidos. Por lo tanto, es necesario cumplir estrictamente los pasos especificados en el método.

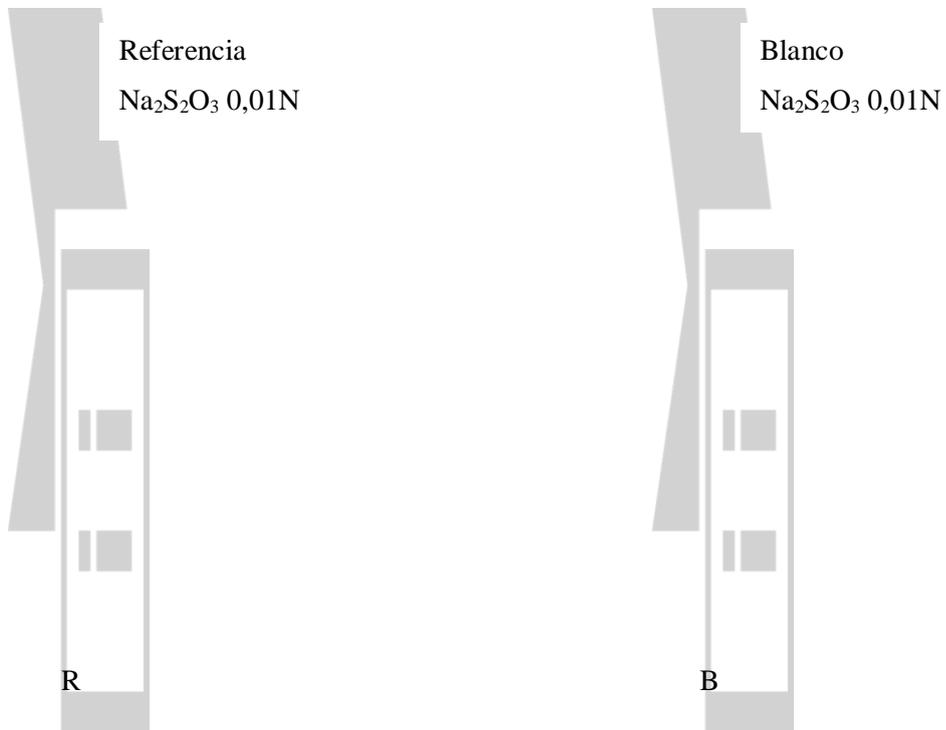
La utilidad de esta volumetría se ve reflejada en la amplia adopción por parte de distintas farmacopeas tales como la FA, USP, BP, Francesa, de Canadá, etc., para el análisis de varias penicilinas y cefalosporinas.

Este método no se aplica a aquellos antibióticos β -lactámicos que tienen cadenas laterales no saturadas debido a que consumen Yodo.



Determinación del título de la solución de Yodo

El título de la solución de Yodo se determina experimentalmente utilizando una Penicilina patrón. La solución patrón contiene 1mg de Penicilina en 1ml de solución, por lo tanto en los 2ml colocados en el erlenmeyer hay 2 mg de droga. El blanco, teóricamente no debe consumir Yodo, pero puede hacerlo por ser la Penicilina fácilmente degradable.



2mg de Penicilina R
 2ml sol. NaOH 1N
 15 minutos de reposo
 2,4ml HCl 1N

2mg de Penicilina R

+ 10 ml solución Yodo 0,01N

Volumen de solución de Tiosulfato de Sodio gastado en la titulación del blanco (*B*) – Volumen de solución de Tiosulfato de Sodio gastado en la titulación de la solución testigo (*R*) = Volumen de solución de Yodo consumido por la Penicilina referencia (*D*).

$$\begin{array}{l} D \text{ (ml de sol. de Yodo consumido)} \text{-----} 2 \text{ mg} \\ 1 \text{ ml} \text{-----} A \text{ mg} \end{array}$$

La potencia de Penicilina G sódica se expresa en unidades internacionales (U.I.).

1 U.I. = 0,6 µg del patrón internacional de Penicilina G sódica.

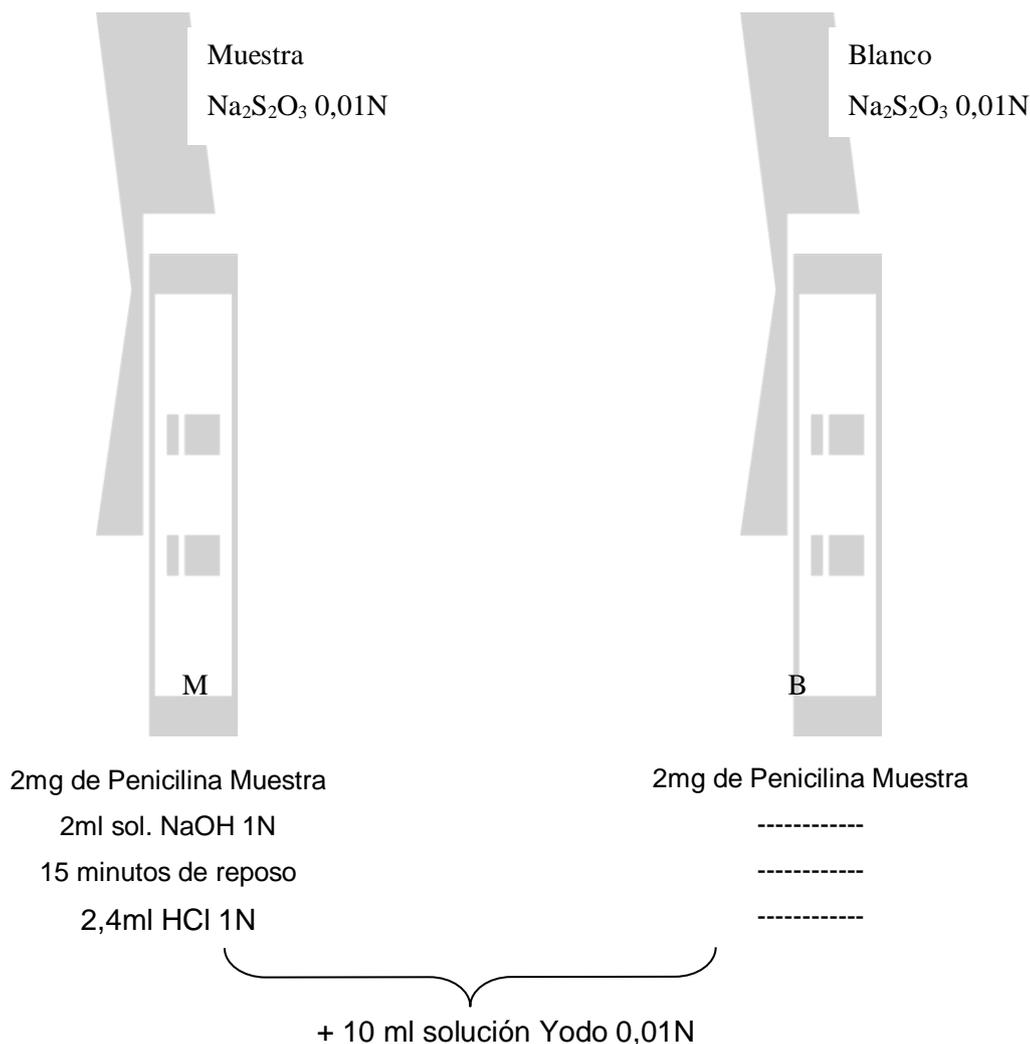
$$A \times 1000 = A' \mu\text{g}$$

$$0,6 \mu\text{g} \text{-----} 1 \text{ UI}$$

$$A' \mu\text{g} \text{-----} B \text{ UI} \text{-----} 1 \text{ ml sol. Yodo } 0,01N$$

Valoración de la Muestra

A partir del título de la solución de Yodo y teniendo en cuenta la dilución efectuada se realiza el cálculo para la muestra.



1 ml de sol. 0,01N de Yodo -----B UI Penicilina G sódica

(B' - M) ml ----- x UI

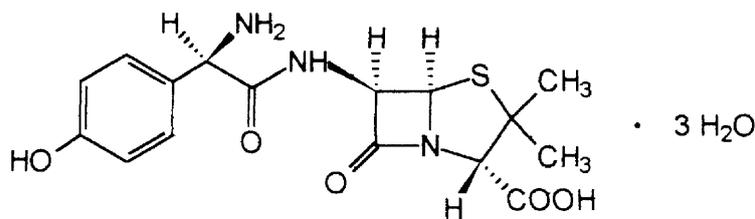
Esas unidades internacionales estarán en 2 ml de muestra. Efectuar cálculos para referir al total.

3. Actividades a realizar

- Determinar Amoxicilina en suspensiones orales empleando el método iodométrico para su valoración.
- Interpretar de los resultados obtenidos, calcular del porcentaje de pureza. Aceptar o rechazar del lote de acuerdo al criterio de aceptación establecido.

Protocolo de Análisis de Amoxicilina para Suspensión Oral según USP XXIII NF 18 1995

Amoxicilina para suspensión oral debe contener no menos de 90% y no más de 120% de Amoxicilina base.



Amoxicilina

Fórmula: C₁₆H₁₉N₃O₅S · 3H₂O *PM:* 419,45 g/mol

Acción terapéutica: antibiótico.

Test de Identificación: Por cromatografía en capa fina.

Determinación de pH: el pH de la suspensión oral de Amoxicilina debe estar comprendido entre 5,0 y 7,5.

Valoración

Reactivos:

Solución de Amoxicilina estándar.

Solución 1 N de NaOH.

Solución 1 N de HCl.

Solución 0,01N de Yodo.

Solución 0,01N de Tiosulfato de Sodio.

Técnica:

Determinación de la equivalencia entre 1 ml de la solución de Yodo 0,01N y los mg de Amoxicilina.

a) Amoxicilina de Referencia

Se prepara la solución de Amoxicilina, pesando 100 mg de Amoxicilina y llevando a 100 ml con agua destilada en matraz aforado, de manera que la concentración final sea de 1mg por ml. De esta solución tomar 2 ml y colocarlos en un erlenmeyer de 125 ml con tapa esmerilada. Añadir 2 ml de NaOH 1 N. Dejar reposar durante 15 minutos. Luego agregar 2,4 ml de HCl 1N y 10ml de la solución de Yodo. Titular con la solución de Tiosulfato de Sodio 0,01N, usando como indicador solución de almidón. Anotar los ml empleados (R).

Determinación del blanco de Referencia:

Tomar 2 ml de la solución de Amoxicilina Referencia y llevarlos a un erlenmeyer de 125ml con tapa, añadir 10ml de la solución de Yodo, 2 gotas del indicador y titular inmediatamente con Tiosulfato de Sodio 0,01N. Anotar los ml gastados (B).

$$\begin{aligned} (B- R) \text{ ml de solución de Yodo consumidos} & \text{-----} 2\text{mg de Amoxicilina} \\ 1 \text{ ml} & \text{-----} x = \text{Amg de Amoxicilina} \end{aligned}$$

a) Amoxicilina Muestra

Pesar 100mg de Amoxicilina Muestra y llevar a volumen con agua destilada en un matraz de 100ml. Tomar 2 ml de esta solución e incorporarlos en un erlenmeyer de 125ml con tapa. Añadir 2ml de solución de NaOH 1N y dejar reposar 15 minutos. Agregar 2,4ml de HCl 1N y 10 ml de solución de Yodo. Incorporar el indicador y valorar con solución de Tiosulfato de Sodio 0,01N. Anotar los ml gastados. (M).

Determinación del blanco de Muestra:

Tomar 2 ml de la solución de Amoxicilina Muestra y llevarlos a un erlenmeyer de 125ml con tapa, añadir 10ml de la solución de Yodo y previo agregado de 2 gotas del indicador valorar con solución de Tiosulfato de Sodio 0,01N. Anotar los ml gastados (B).

$$\begin{aligned} 1 \text{ ml} & \text{-----} \text{Amg de Amoxicilina} \\ (B- M) \text{ ml de solución de Yodo consumidos} & \text{-----} x = \text{mg de Amoxicilina} \end{aligned}$$

Estos mg están en 2 ml de solución Muestra. Realizar los cálculos correspondientes para referir al total.

Problemas Prácticos

1. Para la valoración de Amoxicilina 500 mg comprimidos por método iodométrico se preparó una solución patrón de Amoxicilina cuya concentración final fue de 1 mg/ml. En el erlenmeyer blanco del patrón (BP) y en el erlenmeyer patrón (P) se agregaron 2 ml de la solución. Calcule el título de la solución de Iodo, sabiendo que en la valoración se gastaron 9,9 ml de Tiosulfato de sodio 0,01N y 4,5 ml de Tiosulfato de sodio 0,01N respectivamente. Al mismo tiempo se preparó la muestra pulverizando 10 comprimidos y tomando como muestra analítica una cantidad de polvo equivalente a 0,5 g de Amoxicilina y se disolvió en 500 ml de agua. Para realizar el ensayo se adicionó 2 ml de esta solución para el blanco de muestra (BM) y para la muestra (M) gastándose en la titulación 9,8 ml de Tiosulfato de sodio 0,01N y 4,6 ml de Tiosulfato de sodio 0,01N respectivamente.

Calcular la cantidad de Amoxicilina por comprimido.

Expresar la concentración en % e indicar si cumple con los criterios de calidad correspondientes sabiendo que debe estar comprendido entre un 90% y un 120% de Amoxicilina. PM Amoxicilina TH: 419,4 g/mol. PM Amoxicilina anh. 365,4 g/mol

2. Para la valoración de Amoxicilina 250 mg/5 ml suspensión extemporánea frasco por 120 ml, por método iodométrico se prepara un solución patrón de Amoxicilina trihidrato pesando se 11 mg y llevando a volumen final de 10 ml con agua.

Calcular el título de la solución de Iodo, sabiendo que se utilizó 2 ml de la solución en el erlenmeyer blanco del patrón y en el erlenmeyer patrón donde se gastaron 9,8 ml de Tiosulfato de sodio 0,01N y 4,6 ml de Tiosulfato de sodio 0,01N respectivamente. Al mismo tiempo se preparó la muestra tomando 5 ml de la suspensión y llevando a volumen final de 250 ml con agua. Para realizar el ensayo se adicionó 2 ml de esta solución para el blanco de muestra y para la muestra gastándose en la titulación 9,8 ml de Tiosulfato de sodio 0,01N y 4,4 ml de Tiosulfato de sodio 0,01N respectivamente.

Calcular la cantidad de Amoxicilina cada 5 ml de suspensión y por frasco.

Expresar la concentración en % e indicar si cumple con los criterios de calidad correspondientes sabiendo que debe estar comprendido entre un 90% y un 120% de Amoxicilina PM Amoxicilina TH: 419,4 g/mol. PM Amoxicilina anh. 365,4 g/mol

4. Bibliografía

- Farmacopea Argentina (2014). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud de la Nación.
- The United States Pharmacopeial (2018). Rockville, Estados Unidos de América.
- British Pharmacopoeia (2013). London, Reino Unido.

TRABAJO PRÁCTICO Nº 6: ENSAYOS BIOFARMACEUTICOS

1. Objetivos

Mediante la realización del presente Trabajo Práctico de Laboratorio, el alumno tendrá una visión acerca de los métodos oficiales de disolución *in vitro* registrados en la USP y BP, analizándolas variables que pueden modificar los resultados experimentales de una prueba de disolución.

2. Introducción Teórica

En las Farmacopeas existen métodos *in vitro* que permiten evaluar las características de disolución de un IFA a partir de una forma farmacéutica sólida.

Ensayo de disgregación: El ensayo de disgregación de comprimidos determina si los comprimidos se disgregan en un tiempo preestablecido cuando son colocados en un medio líquido bajo condiciones experimentales también preestablecidas.

Se considera que el comprimido se ha disgregado cuando no quedan residuos, excepto fragmentos de cubiertas insolubles o cuando se ha transformado en una masa blanda sin restos duros palpables.

El equipo en el cual se practica el ensayo está constituido por un vaso cilíndrico de un litro de capacidad, que contiene agua o el líquido de disgregación, y un soporte formado por dos discos plásticos con seis perforaciones cada uno, donde se colocan seis tubos abiertos en ambos extremos. El disco superior lleva en el centro una barra de longitud apropiada para imprimir mecánicamente al soporte un movimiento vertical, hacia arriba y hacia abajo, de no menos de 5cm de amplitud. El líquido se mantiene durante el ensayo a una temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ (**Fig. 9**).

Los tubos se mantienen en su posición, además de las perforaciones de los discos, por una tela metálica fijada en el disco inferior.

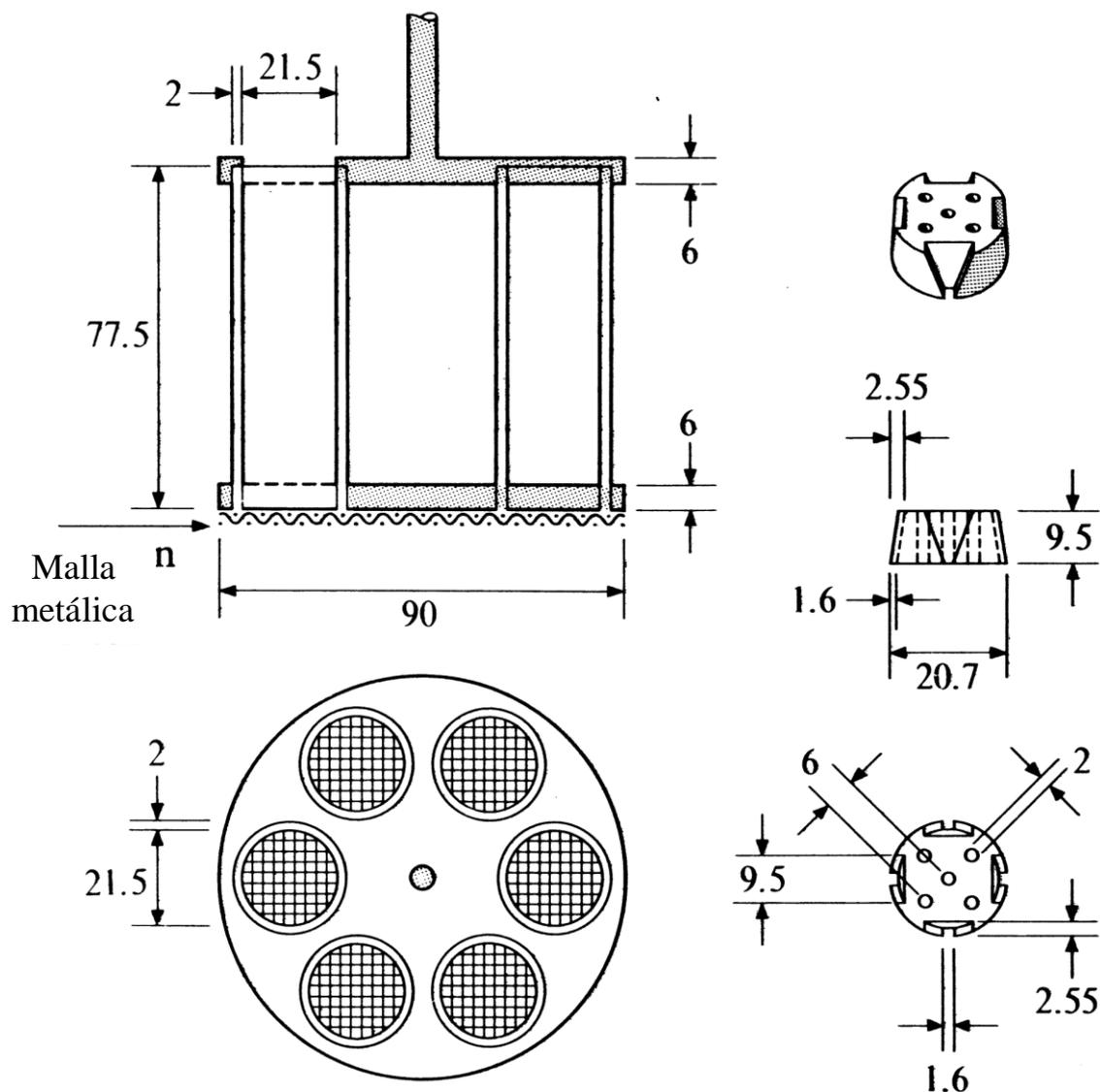


Figura 9- Esquema gráfico del equipo utilizado para realizar el ensayo de desintegración de formas farmacéuticas sólidas.

Ensayo de disolución: El Ensayo de Disolución se encuentra descrito en la mayoría de las Farmacopeas reconocidas internacionalmente, entre ellas la BP y la USP. En la FA el capítulo <320> es el correspondiente al Ensayo de Disolución. En él se describen dos equipos para evaluar la disolución de formas sólidas orales comunes (**Figs. 10 y 11**):

Aparato I (o Método del canastillo)

Aparato II (o Método de la paleta).

La USP describe también los aparatos I y II, y otros cinco equipos adicionales, siendo algunos de ellos específicos para otras formas de dosificación. Básicamente un equipo de disolución consta de:

- 1- Un baño termoregulado
- 2- Seis u ocho vasos de fondo redondo.
- 3- Sistema de agitación (seis u ocho paletas o canastillos intercambiables)
- 4- Sistema de muestreo (automático o manual).

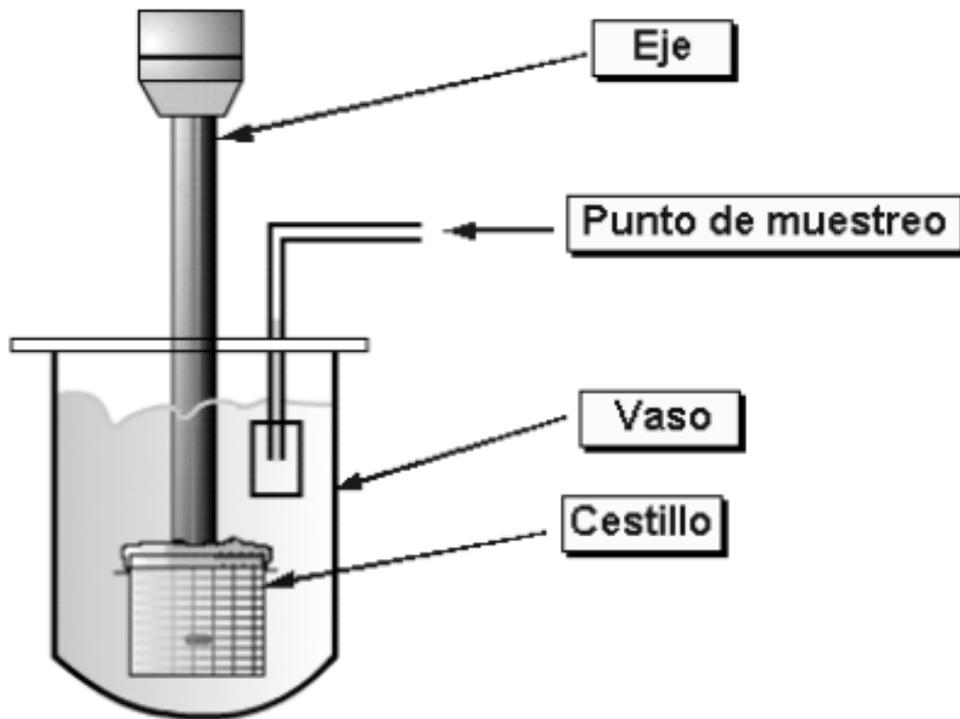


Figura 10- Aparato I (o Método del canastillo) codificado en la FA para realizar el ensayo de disolución de formas farmacéuticas sólidas orales comunes.

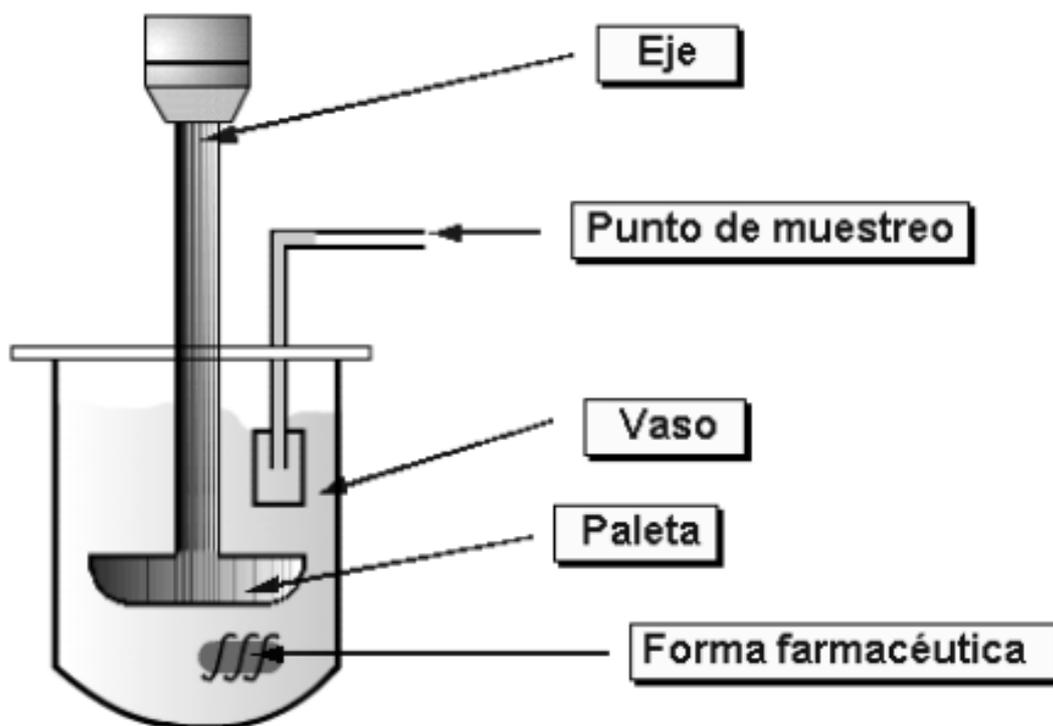


Figura 11- Aparato I (o Método de lapaleta) codificado en la FA para realizar el ensayo de disolución de formas farmacéuticas sólidas orales comunes.

Para realizar el test se sumerge la forma farmacéutica en el medio de disolución, en el tiempo cero se acciona el sistema de agitación a la velocidad especificada en la monografía correspondiente. La temperatura se mantiene entre 36,5°C y 37,5°C durante todo el ensayo. Luego mediante el sistema de muestreo, al tiempo establecido por la monografía, se extrae una alícuota filtrada y se analiza el porcentaje disuelto del principio activo.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos se cumplen si la cantidad de IFA disuelto se ajusta a las tablas de aceptación de la Farmacopea que establece tres etapas (E_1 , E_2 y E_3).

La cantidad, Q , es la cantidad de IFA disuelto, especificada en la monografía correspondiente, expresada como un porcentaje del contenido declarado. En caso que los resultados obtenidos no se ajusten al límite especificado en E_1 se debe continuar el ensayo y pasar a E_2 , de no cumplir con la exigencia de E_2 se debe proseguir hasta E_3 .

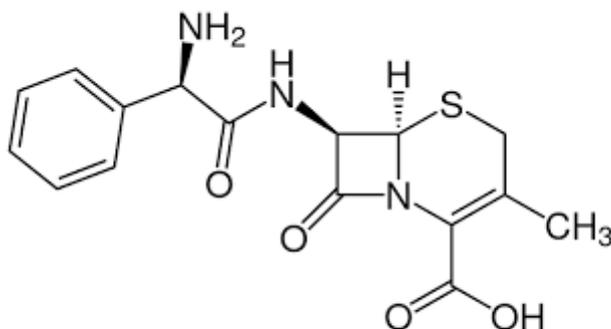
3. Actividades a realizar

- Realizar el ensayo de disolución de formas farmacéuticas sólidas orales comunes, según lo especificado en la correspondiente Farmacopea.

- Interpretar de los resultados obtenidos, calcular del porcentaje de pureza. Aceptar o rechazar del lote de acuerdo al criterio de aceptación establecido.

Protocolo de Análisis de Comprimidos de Cefalexina según Farmacopea Argentina Séptima Edición

Los comprimidos de Cefalexina deben contener el equivalente a no menos de 90,0 y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de Cefalexina ($C_{16}H_{17}N_3O_4S$) y deben cumplir con las siguientes especificaciones.



Cefalexina **Fórmula:** $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ **PM:** 347,39 g/mol

Conservación: en envases de cierre perfecto.

Identificación:

Examinar los cromatogramas obtenidos en la *valoración*. El *tiempo de retención* del pico principal en el cromatograma a partir de la **preparación muestra** se debe corresponder con el de la **preparación estándar**.

Ensayo de Disolución <320>:

- *Aparato 1:* 100 rpm
- *Medio:* agua; 900ml
- *Tiempo de Muestreo:* 30 minutos

Procedimiento:

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario y determinar la cantidad de $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ disuelta a

partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 262 nm, comparando con una *solución estándar* de concentración conocida de Cefalexina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia: No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de C₁₆H₁₇N₃O₄S se debe disolver en 30 minutos.

Criterio de Aceptación Etapa 1: En la primera etapa del test se ensayan 6 unidades, donde cada unidad no debe ser inferior a Q% + 5%. Si este criterio no se cumple, pasar a la segunda etapa.

Criterio de Aceptación Etapa 2: En la segunda etapa se ensayan 6 unidades, donde ninguna unidad deberá ser menor Q%-15% y el promedio de la primera y segunda etapa (12 unidades) deberá ser igual o mayor que Q%. Si no se cumple con lo especificado en la etapa 2, pasar a la tercera etapa.

Criterio de Aceptación Etapa 3: En la tercera etapa se ensayan 12 unidades, donde no más de dos unidades puede ser menor que Q%-15% y ninguna unidad puede ser menor que Q%-25% y el promedio de la primera, segunda y tercera etapa (24 unidades) deberá ser igual o mayor que Q%.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>: debe cumplir con los requisitos.

Control higiénico de productos no obligatoriamente estériles <90>: debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Determinación de agua <120>: Titulación volumétrica directa. No más de 9%

Valoración.

4. Bibliografía

- Farmacopea Argentina (2014). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud de la Nación.
- The United States Pharmacopeial (2018). Rockville, Estados Unidos de América.
- British Pharmacopoeia (2013). London, Reino Unido.