


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or scholar, seated and holding a book. Above the figure is a crown or tiara. The seal is surrounded by Latin text: "UNIVERSITAS CONSPICUA + CAROLINA ACADEMIA" at the top and "SANTO CAROLO + GUATEMALENSIS INTER" at the bottom. The seal is rendered in a light gray, semi-transparent style.


**“COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) Y EL MÉTODO DE TITULACIÓN
POTENCIOMÉTRICA ÁCIDO-BASE PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE ALENDRONATO UTILIZADOS EN EL LABORATORIO
NACIONAL DE SALUD”**

MARILYN DEL ROSARIO VALDÉS PÉREZ

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Guatemala, Marzo del 2006.

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**“COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) Y EL MÉTODO DE TITULACIÓN
POTENCIOMÉTRICA ÁCIDO-BASE PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE ALENDRONATO UTILIZADOS EN EL LABORATORIO
NACIONAL DE SALUD”**

INFORME FINAL DE TESIS

Presentado por:

MARILYN DEL ROSARIO VALDÉS PÉREZ

**Estudiante de la carrera de
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

Guatemala, Marzo del 2006.

ÍNDICE

| TEMA | Pag. |
|-------------------------------------|-------------|
| 1. RESUMEN----- | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN----- | 2 |
| 3. ANTECEDENTES----- | 3 |
| 4. JUSTIFICACIÓN----- | 14 |
| 5. OBJETIVOS----- | 15 |
| 6. HIPÓTESIS----- | 16 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS----- | 17 |
| 8. RESULTADOS----- | 29 |
| 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS----- | 35 |
| 10. CONCLUSIONES----- | 37 |
| 11. RECOMENDACIONES----- | 38 |
| 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS----- | 39 |
| 13. ANEXOS----- | 42 |

1. RESUMEN

El presente trabajo de investigación comparó los métodos de titulación potenciométrica ácido-base y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizados para la cuantificación de alendronato de sodio, métodos utilizados en el Laboratorio Nacional de Salud. Para la comparación se evaluó el tiempo, costos, precisión, exactitud y la concordancia entre ambos métodos analíticos.

En el trabajo se analiza una muestra homogénea de tabletas de Alendronato de sodio, a la cual se le cuantifica el principio activo por medio de los métodos de titulación potenciométrica ácido-base y HPLC. Los análisis se llevan a cabo en la Unidad de Físico-Químico de Medicamentos del Laboratorio Nacional de Salud.

Además, se determina la precisión, exactitud, concordancia, costo y tiempo de los métodos utilizando como medida estadística el coeficiente de varianza, coeficiente de correlación y el coeficiente de concordancia o correlación intraclass (Rc). Entre los resultados se encontró una mayor precisión para el método de titulación potenciométrica y no existe diferencia significativa para la exactitud de ambos métodos; también se determinó que ambos métodos son comparables al encontrarse un $R_c = 0.82$. Con respecto a tiempo y costo es preferible utilizar el método de titulación potenciométrica ante el de HPLC, por presentar la ventaja comparativa de ser tres veces más económico que con el HPLC. Por lo que según los resultados encontrados ambos métodos son equivalentes y sustituibles uno con otro al utilizarse para la cuantificación de Alendronato en tabletas.

2. INTRODUCCIÓN

Los bisfosfonatos se conocen desde hace más de 100 años, pero sólo en la última década se ha demostrado un efecto benéfico en el tratamiento de la osteoporosis. Son sustancias análogas al pirofosfato y tienen una estructura característica, P - C - P, que les permite adherirse a los cristales de hidroxiapatita; por ello, en la actualidad son medicamentos utilizados para combatir la osteoporosis.

Recientemente se ha introducido, además del anterior, un nuevo bisfosfonato, que es un aminofosfonato 100 veces más potente y menos tóxico que el Etidronato y que no interfiere con la mineralización ósea en dosis terapéuticas; es el Alendronato de Sodio.

Para el control de calidad físico-químico del Alendronato, especialmente la cuantificación de éste principio activo en la forma de tabletas, el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) utiliza la metodología de titulación ácido-base, la cual es una metodología validada, sin embargo, actualmente se está utilizando un nuevo método, aplicado a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de la cual se carecen de datos analíticos comparativos de otros análisis que se realicen en otros laboratorios y que sirvan para comparar las ventajas y desventajas de los resultados que se obtienen en ambos. Es hasta el año 2,005 que la Farmacopea Estadounidense (USP XXVIII) publica la monografía oficial del Ácido Alendrónico y del Alendronato de Sodio en tabletas (que será oficial en julio del 2,006), que es la forma farmacéutica más comercializada y pueda tenerse un método de referencia.

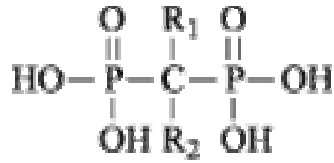
3. ANTECEDENTES

3.1 BISFOSFONATOS:

Los bisfosfonatos son análogos del pirofosfato, en los cuales el enlace P-O-P ha sido reemplazado con un enlace P-C-P no hidrolizable por las fosfatasas. Éstos retardan la formación y disolución de cristales de hidroxiapatita dentro y fuera del sistema esquelético del ser humano.

Los principales bisfosfonatos aprobados en E.E.U.U. para uso clínico son: El etidronato de sodio (bisfosfonato de primera generación), risedronato, tilodronato y Alendronato de sodio (bisfosfonato de segunda generación) ^(1,2 y 3).

| <u>Bisfosfonatos y su Potencia</u> | | | |
|------------------------------------|----|--|--------------|
| Bisfosfonato | R1 | R2 | Potencia |
| Clodronato | Cl | Cl | ≈10 |
| Etidronato | OH | CH ₃ | ≈1 |
| Pamidronato | OH | (CH ₂) ₂ NH ₂ | >100-<1000 |
| Alendronato | OH | (CH ₂) ₃ NH ₂ | ≈100 |
| Neridronato | OH | (CH ₂) ₅ NH ₂ | ≈ |
| Olpadronato | OH | (CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂ | >100-<1000 |
| Ibandronato | OH | (CH ₂) ₂ N(CH ₃)(CH ₂) ₄ CH ₃ | >1000->10000 |
| Risedronato | OH | CH ₂ -3-piridina | >1000-<10000 |
| Zolendronato | OH | CH ₂ -imidazol | >10000 |



Estructura química del ácido pirofosfórico

3.2 ALENDRONATO:

3.2.1 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS:

El Alendronato es un bisfosfonato de segunda generación, primer fármaco que no sólo previene la pérdida de calcio en el hueso, sino que origina su endurecimiento. Se trata de un potente inhibidor de la resorción ósea, pero a diferencia del etidronato (bisfosfonato de la primera generación) no inhibe la mineralización ósea.

En el hombre, una dosis oral de 10 mg de Alendronato es tan eficaz como la dosis de 1500 mg de Etidronato, siendo aquel de 100 a 1000 veces más potente que éste; a la vez, reduce la hipercalcemia en las enfermedades óseas tumorales, osteoporosis, etcétera ^(1 y 20).

3.2.1.1 Mecanismo de acción:

Actúa igual que los demás bisfosfonatos. Al unirse a las sales de calcio, el Alendronato bloquea la transformación de fosfato cálcico a hidroxiapatita y, por lo tanto, inhibe la formación, agregación y disolución de cristales de esta última sustancia en el hueso. Mientras que la inhibición de los cristales de hidroxiapatita puede explicar los efectos del fármaco sobre la inhibición de la mineralización ósea observada en dosis altas, no explica sus efectos sobre la resorción ósea.

No se conoce el mecanismo por el cual los bisfosfonatos inhiben esta resorción ⁽²⁰⁾.

3.2.1.2 Farmacocinética:

El Alendronato se absorbe poco (sólo un 7 %) por la vía oral; su absorción se reduce aún más al ingerirlo con los alimentos, especialmente con aquellos que contienen calcio u otros cationes polivalentes (calcio, magnesio y otros). Tiene mucha afinidad por los huesos y se retiene en el cuerpo por períodos largos. Se excreta sin cambios en la orina. Se une en un 78% aproximadamente a las proteínas del plasma ^(3 y 20).

3.2.1.3 Usos y Administración:

Se utiliza en las siguientes patologías:

- Neoplasma maligno de los huesos.
- Hiperparatiroidismo.
- Osteoporosis (tratamiento y prevención en mujeres postmenopáusicas).
- Polimiositis y dermatomiositis.

Su administración puede ser oral o intravenosa.

3.2.1.4 Posología:

La dosis recomendada es de 10 mg una vez al día para mujeres y hombres. Las mujeres posmenopáusicas deben tomar una dosis única semanal de 70 mg para el tratamiento de osteoporosis y como profilaxis de 35 mg semanal. Para adultos con enfermedad de Paget en los huesos, la dosis recomendada es de 40 mg diarios por 6 meses y el tratamiento puede repetirse en un lapso de tiempo no mayor de seis meses ⁽³⁾.

3.2.1.5 Efectos Adversos:

- Irritación local de la mucosa de la parte superior del aparato digestivo (esofagitis y úlceras o erosiones esofágicas).

3.2.1.6 Interacciones:

- La absorción oral del Alendronato puede ser nula si el fármaco es administrado dentro de las dos horas siguientes al desayuno. Tan sólo un zumo de naranja o un café pueden afectar la absorción del Alendronato.
- Por lo menos hay que dejar que transcurran 30 minutos antes de administrar un segundo fármaco o un antiácido.
- La administración concomitante de Alendronato con suplementos vitamínicos, minerales o medicamentos que contengan sales de calcio, hierro, aluminio o magnesio, interfieren con la absorción oral del fármaco.
- Personas que consumen medicamentos antagonistas H₂ son más propensos a sufrir de los efectos adversos ⁽²⁰⁾.

3.2.1.7 Contraindicaciones:

- Anormalidades en el esófago, como estenosis, acalasia u otra que retrase el vaciamiento de este conducto.
- Imposibilidad de permanecer en posición sentada erguida o en bipedestación durante al menos 30 minutos.
- Hipersensibilidad a cualquier componente del producto.
- Hipocalcemia y en pacientes con aclaramiento de creatinina <35 ml/min ⁽⁴⁾.
- No en niños con hipocalcemia ⁽²⁰⁾.
- No administrar a embarazadas ⁽²⁰⁾.

3.2.1.8 Presentaciones:

- Tabletas de 5, 10, 35 y 70 mg.
- Solución inyectable de 70 mg.

3.2.1.9 Sobredosificación:

- Tras la administración de una dosis oral única, se apreció una letalidad significativa en ratas y ratones hembras al aplicar 552

mg/kg (3.256 mg/m²) y 966 mg/kg (2.898 mg/m²) (equivalentes a dosis orales humanas de 27.600 y 48.300 mg), respectivamente ⁽²⁰⁾.

3.2.2 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL ALENDRONATO:

3.2.2.1 Ácido Alendrónico:

Nombre químico: Ácido Aminohidroxitilideno-difosfónico.

Fórmula molecular: C₄H₁₃NO₇P₂.

3.2.2.2 Alendronato de Sodio:

Nombre Químico: (4- amino-1 hidroxitilideno) difosfonato trihidrato.

Fórmula molecular: C₄H₁₂NNaO₇P₂·3H₂O.

Peso molecular: 325.1 g/mol.

Características físicas: Polvo fino blanco, soluble en agua, insoluble en diclorometano, muy poco soluble en alcohol metílico. Una solución al 1% en agua tiene un pH de 4-5 ⁽⁵⁾.

3.3 REACTIVOS DE DERIVATIZACIÓN:

La derivatización puede ser llevada a cabo antes de la separación. Debe ocurrir cuantitativamente para producir productos sencillos para cada aminoácido, el reactivo no debe interferir. Es probable que la derivatización genere productos que son más parecidos el uno al otro; de cualquier modo, la alta selectividad de separación de los sistemas cromatográficos implica que raramente haya problemas. La derivatización precolumna puede ser llevada a cabo automáticamente justo antes de la separación. La derivatización tras la separación requiere, en general, una complejidad instrumental mayor. Los instrumentos comerciales a menudo necesitan ser optimizados para alcanzar sensibilidad de detección más alta ⁽²³⁾.

3.3.1 9-Fluoroenilmetil cloroformato (FMOC-Cl):

El FMOC-Cl reacciona con grupos amino para formar derivados carbamados altamente fluorescentes y estables. Este agente altamente reactivo, originalmente y todavía usado como grupo amino protector en síntesis de péptidos, fue aplicado como un agente derivatizante en precolumna para análisis de aminoácidos. El FMOC-Cl reacciona con todos los aminoácidos a pH alcalino y temperatura ambiente para producir derivados aminoacídicos altamente estables.

Durante la reacción con FMOC-Cl, los productos de hidrólisis del reactivo que se forman tienen fluorescencia parecida a la de los derivados aminoacídicos. Estos productos interfieren en la separación por cromatografía de fase reversa a menos que sean eliminados por el disolvente orgánico de extracción, antes de aplicar la muestra a la columna de cromatografía de fase reversa. Una versión automatizada de este procedimiento de derivatización ha sido desarrollada y comercializada.

Betnér y Foldi solucionaron el problema de las interferencias por la elución de grandes picos de FMOC-Cl y sus productos de hidrólisis, FMOC-OH, que son eluidos en la misma región cromatográfica que muchos de los aminoácidos FMOC, por derivatización del volumen de exceso FMOC-Cl con una amina hidrofóbica. El derivado resultante es eluido más tarde en el cromatograma después de todos los aminoácidos FMOC ^(22 y 25).

3.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN:

En la actualidad la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha llegado a ser una de las técnicas del laboratorio moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos, utilizada en una diversidad de

campos. Día a día aumentan los requerimientos de confiabilidad de los datos analíticos y de eficiencia en el flujo de trabajo de laboratorio, para un desarrollo más rápido de nuevas drogas, mejorar la seguridad de los alimentos y cumplir con estándares más altos en las regulaciones.

El HPLC no se encuentra limitado por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra; es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. La separación cromatográfica en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra con ambas fases, móvil y estacionaria. Tales interacciones esencialmente no existen en la fase móvil para la cromatografía de gases. Ofrece una gran variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación ^(6 y 21).

Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos esteroidales, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas ⁽⁷⁾.

3.4.1 Métodos de Filtración de Solventes en HPLC

Hay tres métodos comunes que se utilizan hoy para la filtración previa de los solventes en HPLC :

- Filtro a la entrada del solvente
- Filtración al vacío
- Filtración en línea

3.4.2 Métodos de Desgasificación de solventes en HPLC

Existen cuatro métodos comunes usados para desgasificar solventes en HPLC previos a su uso:

- Sonificación
- Burbujear Helio
- Desgasificación electrónica en la línea del flujo

3.4.3 Los tipos de detectores en HPLC se clasifican en:

- Detectores basados en una propiedad de la fase móvil. *Ejemplo: Detector de Índice de Refracción*
- Detectores basados en una propiedad de la sustancia a separar. *Ejemplo: Detector de Fluorescencia, Detector Ultravioleta (Diodos).*

3.4.4 Derivatización

Existen dos tendencias:

- Pre-Columna.
- Post-Columna.

3.4.5 Problemas más comunes encontrados en HPLC:

Esta es una lista de los problemas normalmente encontrados en HPLC, sus posibles causas y cómo solucionarlos.

- Presión alta.
- Pérdida de la resolución.
- Picos hendidos.
- Variación en los tiempos de retención.
- Variaciones de la línea base.

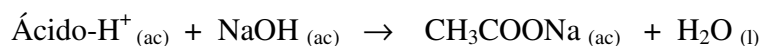
- Línea base con mucho ruido.
- Picos falsos (Detectores Electroquímicos y de Fluorescencia)
- Baja o ninguna presión ⁽²¹⁾.

3.5 TITULACIÓN POTENCIOMÉTRICA ÁCIDO-BASE:

La titulación es un método volumétrico que lleva a cabo una reacción ácido-base, utilizando para ello una disolución patrón, un potenciómetro con medidor de voltaje y un indicador ácido base para que la determinación del punto final sea más exacto.

Este método volumétrico analiza la cantidad de sustancia de forma indirecta, ya que mide el volumen de la disolución patrón que tiene una concentración conocida para que reaccione con el constituyente buscado. A éste proceso se le denomina valoración.

El ácido (en agua) reacciona con una base hidróxido de sodio (NaOH) solución valorada en agua, como sigue:



¿Cómo ocurre? Primero, una cierta cantidad del ácido es pipeteado volumetricamente y llevado al interior de un matraz erlenmeyer. Luego, desde una bureta, es adicionada lentamente una solución de hidróxido de sodio de normalidad conocida. Reaccionando inmediatamente gotas de hidróxido de sodio con ácido de acuerdo a la reacción. La titulación procede lentamente hasta el punto donde todo el ácido ha reaccionado. A esto se le llama *punto equivalencia*.

El punto de equivalencia puede ser apreciado por efecto de un color llamado punto final. El punto final de la titulación es observado de incoloro a rosa (fenolftaleína). Para notar el efecto del color se adiciona gotas de fenolftaleína antes

de la titulación. La fenolftaleína es uno de muchos indicadores ácido-base. Los indicadores ácido-base tienen la especial propiedad para formar compuestos de diferentes colores, dependiendo si es un reactivo ácido o básico. Es suficiente conocer que la fenolftaleína con NaOH en solución forma un compuesto púrpura.



Así, durante la titulación, el NaOH reacciona primero al ácido del matraz. Si todo el ácido presente reacciona con el NaOH. Este reacciona con la fenolftaleína tornándose de color rosado. Siendo éste un buen indicador para el punto final ^(8 y 25).

3.6 ESTUDIOS PREVIOS:

No se han encontrado estudios referentes propiamente al análisis cuantitativo de Alendronato; en comparación de métodos, se citan los siguientes:

3.6.1 Santisteban, 2003, realizó el estudio “Evaluación de la Eficiencia de los Métodos de Espectrofotometría Infrarrojo y HPLC para la Cuantificación de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina en Soluciones Inyectables”. En éste trabajo se evaluaron los costos, tiempo y consumo de reactivos necesarios para la realización de ambos métodos, cuando se analizan muestras de éstas vitaminas en soluciones inyectables ⁽⁹⁾.

3.6.2 Mata, 2003, realizó el estudio “Comparación del método espectrofotométrico de fosfomolibdovanadato y el método de titulación potenciométrica ácido base para la cuantificación de fosfatos en detergentes en polvo”. Donde se comparan y demuestran las ventajas que presenta el uno sobre el otro con respecto a precisión, confiabilidad, reproducibilidad, ahorro de tiempo y costos ⁽¹⁰⁾.

3.6.3 Figueroa, 2000, realizó el estudio “Comparación de la reproducibilidad de dos métodos para la determinación de azúcares reductores en el jugo de caña de azúcar”. Demuestra la importancia de los métodos comparativos al descubrir cual de los métodos es más reproducible ⁽¹¹⁾.

3.6.4 Cordon, 1995, realizó el estudio “Comparación de dos métodos alternativos para la cuantificación de sodio y potasio en sales de rehidratación oral, fabricadas en el laboratorio de producción de medicamentos (LAPROMED) de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia”. Encontró que para esa determinación la fotometría de llama y el electrodo selectivo de iones son técnicas equivalentes ⁽¹²⁾.

3.6.5 Vargas, 1994, realizó el “Estudio comparativo de dos métodos (método por cromatografía de gas (CG) y método por electrodo selectivo de flúor) para determinar flúor en crema dental”. Éste trabajo comparó dos métodos de análisis para determinar flúor en cremas dentales por CG (métodos propuesto por la Comisión Guatemalteca de Normas) y el método por electrodo selectivo de flúor. Se concluye en que el método de gas es más preciso que el otro, pero presentando ambos exactitud aceptable; además calculó el costo de cada método en lo que a tiempo y enseres se refiere ⁽¹³⁾.

4. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo propone evaluar las ventajas y desventajas en cuanto a tiempo de análisis, costos, precisión y exactitud en los resultados del método de titulación potenciométrica ácido-base, utilizado de forma ordinaria y eficaz en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) y compararlo con el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que es el método oficial según la USP XXVIII, utilizando para ello cierto número de análisis de la misma muestra.

Al culminar el estudio comparativo de ambos métodos, los resultados de éste permitirán al LNS, como laboratorio nacional de referencia, utilizar un método analítico cuantitativo confiable en las muestras de Alendronato que en el futuro se reciban, obteniendo con ello un respaldo que ampare la utilización del método con respecto al otro.

5. OBJETIVOS

4.1 General:

- Comparar el método de cromatografía líquida de alta resolución y el método de titulación potenciométrica ácido-base en el análisis cuantitativo de Alendronato, en cuanto a ventajas, desventajas, tiempo, costos, precisión y exactitud.

4.2 Específicos:

- Evaluar la eficiencia del método de titulación potenciométrica ácido-base frente a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la cuantificación de Alendronato en tabletas.
- Establecer tiempos reales de análisis al utilizar ambos métodos analíticos.
- Calcular los costos de análisis de ambos métodos analíticos.
- Determinar la precisión del HPLC y la titulación potenciométrica ácido-base en la cuantificación de Alendronato.
- Evaluar la exactitud de los resultados obtenidos al implementar ambos métodos a las muestras de Alendronato.
- Comparar los datos obtenidos de ambos métodos y especificar ventajas y desventajas de cada uno.

6. HIPÓTESIS

El análisis cuantitativo de Alendronato en tabletas por el método de titulación potenciométrica ácido-base reduce el tiempo empleado en el análisis, baja los costos de operación, es preciso y exacto en los resultados, por lo que genera resultados confiables como los del método de cromatografía líquida de alta resolución.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA:

Se trabajó en la unidad de Físico-Químico de Medicamentos del Laboratorio Nacional de Salud, utilizando una muestra homogénea de tabletas de Alendronato luego de su análisis y con dictamen por parte del Laboratorio Nacional de Salud. El método de análisis fue la Titulación Ácido-Base y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

7.2 RECURSOS:

7.2.1 Recursos Humanos:

- Autor: Br. Marilyn del Rosario Valdés Pérez.
- Asesora: Licda. Julia Amparo García Bolaños.
- Co-asesora: Licda. Millie Elizabeth Cruz Aguilar.

7.2.2 Recursos Institucionales:

- Biblioteca Central de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala.
- Biblioteca de la Universidad Francisco Marroquín.
- Centro Guatemalteco de Información de Medicamentos (CEGIMED).
- Sección de Físico-Químico de Medicamentos del Laboratorio Nacional de Salud.

7.2.3 Recursos Materiales:

7.2.3.1 Equipo:

- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución, Hewlett Packard, Agilent, serie 1100 con detector de diodos DE33220791.
- Impresora Hewlett Packard Laser Jet 1100.
- Balanza analítica Metler Toledo, AE260 Delta Range
- Ultrasonido Branson 5510.
- Bomba de Vacío Millipore 18739
- Computadora Hewlett Packard, vectra VE.
- Sostenedor de Buretas con base de porcelana.
- Centrífuga.
- Potenciómetro Termo Orion model 410A+.

7.2.3.2 Materiales:

- Columna para HPLC L-21, de 250 mm de largo y 4.1 μm de diametro.
- Filtros cartucho de 0.45 μm .
- Filtros Wathman No. 5.
- Papel pH.
- Espátula
- Varilla de agitación.
- Membranas hidrofílicas 0.45 μm .
- Papel bond para impresora.

7.2.3.3 Cristalería:

- Balones de aforo de 5, 10, 25, 50, 100 y 1000 mL.
- Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL.
- Beacker de 400 mL.

- Pipetas volumétricas de 1, 2, 4, 5, 10 y 25 mL.
- Probetas de 50,100 y 1000 mL.
- Kitazato de 1000 mL.
- Bureta de 10 mL.
- Morteros con pistilo de porcelana.
- Tubos de polipropileno para centrífuga de 50 mL.

7.2.3.4 Reactivos:

- Agua desmineralizada.
- Hidróxido de Sodio Titrisol (NaOH) 0.01 N.
- Indicador Fenolftaleína TS.
- Agua grado HPLC.
- Acetonitrilo grado HPLC.
- Citrato de sodio dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$).
- Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4).
- Ácido fosfórico (H_3PO_4) – al 85 %.
- 9-Fluorenilmetil cloroformato ($C_{15}H_{11}ClO_2$)= Fmoc.
- Borato de Sodio decahidratado ($Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$).
- Metanol grado HPLC (CH_3OH).
- Cloruro de metileno (CH_2Cl_2).
- Estándar de Alendronato.

7.3 PROCEDIMIENTO:

7.3.1 Selección de la Muestra y Recolección de Datos:

Se seleccionó una muestra homogénea de tabletas de Alendronato las cuales tenían igual fecha de manufactura, vencimiento y número de lote a la vez que se dispuso de un número de tabletas suficiente para poder realizar la

cantidad de análisis necesarios para que el estudio presentara significancia estadística.

7.3.2 Análisis de Muestra:

7.3.2.1 Método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC): ⁽¹⁷⁾

7.3.2.1.1 Se prepararon las siguientes soluciones:

- a. 9-Fluorenilmetil cloroformato al 0.1%:
 - Pesar 25 mg. De FMOC en un matraz volumétrico seco de 25 mL.
 - Disolver y diluir con acetonitrilo hasta el aforo.
 - Mezclar bien.

- b. Buffer de borato de sodio 0.1 M (pH original ~ 9.3):
 - Disolver 38.1 g. de borato de sodio decahidratado en 900 mL de agua aproximadamente.
 - Diluir con agua hasta 1000 mL. y mezclar bien.

- c. Diluyente:

Solución amortiguadora de citrato y fosfato ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 0.05 M, Na_2HPO_4 0.05 M, pH 8.0):

 - Disolver 14.7 g de citrato de sodio dihidratado y 7.05 g. de fosfato dibásico de sodio anhidro en 900 mL. de agua.
 - Ajustar el pH a 8.0 con ácido fosfórico.
 - Diluir con agua hasta 1000 mL y mezclar bien.

- d. Citrato de sodio 0.1 M:
- Pesar 29.4 g de citrato de sodio dihidratado en un recipiente adecuado.
 - Disolver en 1000 mL de agua y mezclar bien.
- e. Fase Móvil (acetonitrilo:metanol:solución amortiguadora de citrato y fosfato, 20:5:75):
- Mezclar perfectamente:
- 200 mL. de acetonitrilo
 - 50 mL de metanol
 - 750 mL de solución amortiguadora de citrato y fosfato.

7.3.2.1.2 Condiciones cromatográficas:

| | |
|-----------------------|--|
| Columna: | Empaquetada L-21, 4.1 μ m de tamaño de partícula, 250 mm de largo. |
| Volumen de inyección: | 50 μ l. |
| Flujo: | 1.0 mL./minuto. |
| Detector: | Absorbancia en UV a 266 nm. |
| Temperatura: | 35° C. |
| Tiempo de corrida: | 10 minutos. |

7.3.2.1.3 Preparación de estándar:

- a. Solución concentrada del estándar:
- Pesar 19.6 mg del estándar de referencia de Alendronato de sodio en un matraz volumétrico de 25 mL.
 - Disolver y diluir con citrato de sodio 0.1 M hasta la marca del aforo, mezclar bien, para dar una solución

de 0.784 mg/mL. de Alendronato de sodio en citrato de sodio 0.1 M.

b. Solución de estándar al 50%:

- Preparar una dilución 1 en 2 de la solución de trabajo del estándar en citrato de sodio 0.1 M.
- Pipetear volumetricamente 5 mL a un matraz volumétrico de 10 mL.
- Diluir con citrato de sodio 0.1 M hasta aforar, para dar un concentración de 0.392 mg/ml.

7.3.2.1.4 Preparación de la muestra:

a. Solución madre:

- Pesar en conjunto 20 tabletas de Alendronato y calcular el peso promedio.
- Triturar en un mortero las tabletas y pesar el equivalente a 20 mg de Alendronato.
- Llevarlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL.
- Diluir con citrato de sodio 0.1 M hasta la marca del aforo.
- Agitar y sonificar la solución por 5 minutos.

b. Solución de trabajo:

- Tomar una alícuota de 5 mL de la solución madre a un matraz volumétrico de 10 mL
- Aforar con citrato de sodio 0.1 M, mezclar bien y filtrar con papel Wathman No.5.

7.3.2.1.5 Derivatización de la molécula:

- Pipetear a un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL y en el siguiente orden:

| BLANCO | ESTANDAR [] | ESTANDAR 50% | MUESTRA |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 5 mL de agua | 5 mL St. [] | 5 mL St. a 50 % | 5 mL de Sol. madre |
| 5 mL de borato de sodio | 5 mL de borato de sodio | 5 mL de borato de sodio | 5 mL de borato de sodio |
| 4 mL de FMOC | 4 mL de FMOC | 4 mL de FMOC | 4 mL de FMOC |

- Mezclar en un agitador de vórtice durante ~ 30 segundos (la mezcla manual no basta).
- Dejar en reposo los tubos a temperatura ambiente durante 25 minutos desde el momento de adición del reactivo de FMOC.
- Agregar 25 mL de cloruro de metileno, agitar durante 30 a 45 segundos aproximadamente. Aflojar el tapón para liberar la presión del tubo y volver a apretar el tapón.
- Centrifugar durante 10 minutos (~ 1500 p.m.).
- Trasladar una porción de la capa acuosa superior a un vial de muestra para realizar el análisis por HPLC. Tener cuidado en no agregar cloruro de metileno residual al vial para HPLC.

7.3.2.1.6 Adecuación del sistema y procedimiento:

- a. Encender el aparato y esperar a que se estabilice, dejando correr para ello la fase móvil.
- b. Inyectar un blanco que ha sido derivatizado y proceder con su cromatografía por alrededor de 25 minutos.
- c. Inyectar la solución de trabajo del estándar que ha sido derivatizada, repetir 5 veces ésta inyección.
- d. Inyectar la solución estándar al 50% sometida a derivatización. Inyectar por duplicado la solución de trabajo de la muestra sometida a derivatización.

7.3.2.1.7 Cálculos:

$$\frac{(Au)(Ws)(Du)(P)(F)(100)}{(As)(Ds)(N)(LC)} = \% \text{ de Alendronato (eq. a Acido Alendrónico.)}$$

Donde:

Au = Área del pico de Alendronato en el cromatograma de trabajo de la muestra.

As = Área del pico del Alendronato en el cromatograma de trabajo del estándar.

Ws= Peso del estándar de referencia de Alendronato de sodio en mg.

P = Pureza del estándar de referencia de Alendronato de sodio expresada como una fracción decimal.

Du = Factor de dilución de la muestra.

Ds. = Factor de dilución del estándar.

LC= Cantidad teórica en mg/tableta.

F = Factor de conversión de la sal de sodio al ácido libre = 0.919.

N = Número de tabletas empleado:

Ensayo de muestra compuesta = 10

Uniformidad de contenido = 1.

7.3.2.2 Titulación Potenciométrica Ácido-Base:

7.3.2.2.1 Preparación de la muestra:

Pesar en conjunto 20 tabletas y calcular el promedio del peso de una tableta. Triturar las tabletas en un mortero.

7.3.2.2.2 Valoración del principio activo:

Pesar el equivalente de 10 mg de Alendronato. Transferir cuantitativamente a un matraz erlenmeyer de 250 mL, adicionar 50 mL de agua desionizada y sonificar durante 10 minutos, agregar tres gotas de fenolftaleína y titular con solución de hidróxido de sodio 0.01 N en el potenciómetro hasta que haga el viraje de pH correspondiente. Anotar el volumen de NaOH gastado. Cada mililitro de hidróxido de sodio 0.01 N es equivalente a 2.711 mg de alendronato sódico.

7.3.2.2.3 Realizar un blanco, adicionando 50 mL de agua desionizada y tres gotas de fenolftaleína, titular con solución de hidróxido de sodio 0.01 N en el potenciómetro hasta que haga el viraje de pH correspondiente. Anotar el volumen gastado de NaOH y realizar los cálculos como se indica en el siguiente inciso.

7.3.2.2.3 Cálculos:

$$\% = [(V_{mta} - V_{bco})(Eq)(FN)(303.1/325.12)(P_{mta})/100].$$

Donde:

V_{mta} = Volumen de NaOH 0.01 N de la muestra.

V_{bco} = Volumen de NaOH 0.01 N del blanco.

Eq = Equivalente 2.711 mg/ml.

FN = Factor de normalidad NaOH 0.01 N.

303.1 = Peso molecular de alendronato base.

325.12 = Peso molecular de alendronato sódico.

P_{mta} = Peso de la muestra en mg.

100 = Peso promedio teórico.

7.3.3 Diseño Estadístico:

7.3.3.1 Precisión:

Se midió el grado de concordancia entre los valores obtenidos al aplicar el método analítico a una muestra homogénea de concentración conocida, estableciéndola en base a la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados.

7.3.3.1.1 Repetibilidad:

Se determinó por el grado de variación que se obtuvo al aplicar cada método por el mismo analista. La muestra homogénea se analizó por el mismo analista doce veces; se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de varianza.

7.3.3.1.2 Reproducibilidad:

Se determinó por el grado de variación que se obtuvo en los resultados, al ser aplicados los métodos por cuatro analistas diferentes. Cada analista efectuó cuatro veces el análisis. La variante en las condiciones de análisis fue el día de elaboración del análisis. La reproducibilidad en los métodos se determinó por la media, desviación estándar y coeficiente de varianza.

7.3.3.2 Exactitud:

La muestra homogénea fue analizada por ambos métodos y por el mismo analista realizando para ello, una curva de calibración que incluyó cinco concentraciones diferentes, tomando como concentración al 100% la utilizada para la determinación de repetibilidad en la prueba de precisión según sea el método analítico. Se determinó por el grado de concordancia entre el valor experimental obtenido por el método instrumental y el valor teórico. Los resultados se analizaron calculando el promedio, desviación estándar y coeficiente de correlación lineal (r) de los porcentajes obtenidos por ambos métodos, aceptando como mínimo un $r = 0.997$ y $r^2 = 0.995$ para ambos métodos ^(14, 15 y 16).

7.3.3.3 Prueba de comparación de métodos:

Se evaluaron los métodos por medio del coeficiente de correlación intraclase, midiendo la concordancia entre ellos. Donde el resultado >0.75 se tomó como un resultado positivo para la comparación de los métodos y <0.75 negativo para la comparación. El coeficiente de correlación intraclase esta dado por la siguiente fórmula:

$$R_C = \frac{S_A^2 + S_B^2 - (S_{A-B})^2}{S_A^2 + S_B^2 - (X_A - X_B)^2}$$

Donde:

S_A = Desviación estandar de los resultados obtenidos por el método de titulación potenciométrica.

S_B = Desviación estandar de los resultados obtenidos por el método de HPLC.

X_A = Promedio de los resultados obtenidos por el método de titulación potenciométrica.

X_B = Promedio de los resultados obtenidos por el método de HPLC.

8. RESULTADOS

8.1 PRECISIÓN

8.1.1 Repetibilidad

Tabla 8.1.1.1 Resultados obtenidos por análisis de Alendronato por HPLC

| MUESTRA | PESO (g) | ÁREA | PORCENTAJE (%) |
|---------|----------|------------|----------------|
| M1 | 0.1009 | 5392.33008 | 105.1 |
| M2 | 0.1019 | 5457.06152 | 105.3 |
| M3 | 0.1068 | 5226.91797 | 96.2 |
| M4 | 0.1001 | 4881.98389 | 99.7 |
| M5 | 0.1044 | 5319.80127 | 99.7 |
| M6 | 0.1024 | 5395.98389 | 103.1 |
| M7 | 0.1004 | 5420.27881 | 105.3 |
| M8 | 0.1033 | 5320.52148 | 100.5 |
| M9 | 0.1004 | 5179.08984 | 100.7 |
| M10 | 0.1034 | 5401.65674 | 102.5 |
| M11 | 0.1061 | 5577.31982 | 103.2 |
| M12 | 0.1012 | 5402.47070 | 104.8 |

| | |
|--------------------|---------------|
| Promedio = | 102.2 |
| Des. St. = | 2.8579 |
| Coef. Var.= | 2.7966 |

Tabla 8.1.2.1 Resultados obtenidos por análisis de Alendronato por Titulación Potenciométrica Ácido-Base.

| MUESTRA | PESO (g) | VOLUMEN mL | PORCENTAJE % |
|---------|----------|------------|--------------|
| M1 | 0.0491 | 4.15 | 100.2 |
| M2 | 0.0508 | 4.25 | 99.4 |
| M3 | 0.0506 | 4.25 | 99.7 |
| M4 | 0.0500 | 4.25 | 100.7 |
| M5 | 0.0500 | 4.30 | 102.2 |
| M6 | 0.0501 | 4.20 | 99.5 |
| M7 | 0.0509 | 4.35 | 101.7 |
| M8 | 0.0509 | 4.40 | 102.9 |
| M9 | 0.0500 | 4.25 | 100.9 |
| M10 | 0.0493 | 4.25 | 102.4 |
| M11 | 0.0498 | 4.26 | 101.5 |
| M12 | 0.0513 | 4.35 | 100.9 |

| | |
|-------------|---------------|
| Promedio = | 101.0 |
| Desv. St. = | 1.1679 |
| Coef. Var.= | 1.1565 |

8.1.2 Reproducibilidad:

Tabla 8.1.2.1 Resultados obtenidos de análisis de Alendronato por HPLC

| MUESTRA | PESO | ÀREA | RESULTADO |
|----------------|-------------|-------------|------------------|
| M1 | 0.1016 | 4989.17676 | 96.8 |
| M2 | 0.1020 | 5341.48828 | 103.2 |
| M3 | 0.1010 | 5030.30176 | 98.2 |
| M4 | 0.1005 | 3945.92285 | 95.4 |

| | |
|--------------------|---------------|
| Promedio = | 98.4 |
| Des. St. = | 3.3998 |
| Coef. Var.= | 3.4554 |

Tabla 8.1.2.2 Resultados obtenidos de análisis de Alendronato por
Titulación Potenciométrica Ácido-Base

| ANALISTA | PESO (g) | VOLUMEN (mL) | PORCENTAJE (%) |
|-----------------|---------------------|-------------------------|---------------------------|
| A-1 | 0.0509 | 4.40 | 110.4 |
| A-2 | 0.0511 | 4.35 | 108.6 |
| A-3 | 0.0504 | 4.35 | 110.1 |
| A-4 | 0.0502 | 4.45 | 113.3 |

| | |
|--------------------|---------------|
| Promedio = | 110.6 |
| Des. St. = | 1.9471 |
| Coef. Var.= | 1.7605 |

8.2 EXACTITUD:

Tabla 8.2.1 Curva de calibración del análisis de estandar de Alendronato por el método de HPLC

| ESTANDAR | ÁREA | CONCENTRACIÓN [mg/ml] |
|-----------------|-------------|------------------------------------|
| St-60 % | 547.39 | 0.1012 |
| St-80 % | 1226.70 | 0.2024 |
| St-100 % | 1938.47 | 0.3036 |
| St-120 % | 2525.14 | 0.4048 |
| St-140 % | 3334.92 | 0.5060 |

$$\begin{aligned}r &= \mathbf{0.9991} \\r^2 &= \mathbf{0.9982}\end{aligned}$$

Tabla 8.2.3 Curva de calibración de estandar de Alendronato por el método de Titulación Potenciométrica Ácido-Base.

| St. | VOLUMEN (mL) | Cantidad de St. (g) |
|------------|-------------------------|--------------------------------|
| 1 | 1.90 | 5.0440 |
| 2 | 3.35 | 10.0880 |
| 3 | 5.15 | 15.1320 |
| 4 | 7.10 | 20.1760 |
| 5 | 8.53 | 25.2200 |

$$\begin{aligned}r &= \mathbf{0.9986} \\r^2 &= \mathbf{0.9972}\end{aligned}$$

8.3 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS:

Tabla 8.3.1 Resultados obtenidos de análisis de Alendronato por Titulación Potenciométrica Ácido-Base

$$R_C = \frac{S_A^2 + S_B^2 - (S_{A-B})^2}{S_A^2 + S_B^2 - (X_A - X_B)^2}$$

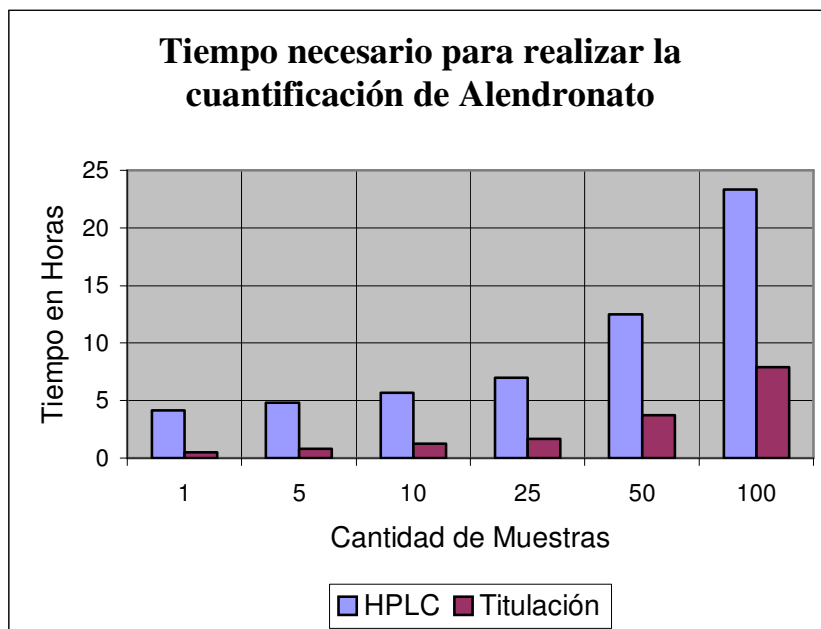
$$R_C = \frac{8.1676 + 1.3640 - (2.8561)^2}{8.1676 + 1.3640 - (1.4400)^2} = \frac{6.68}{8.09} = 0.82532 > 0.75$$

> 0.75 = MÉTODOS COMPARABLES

< 0.75 = MÉTODOS NO COMPARABLES

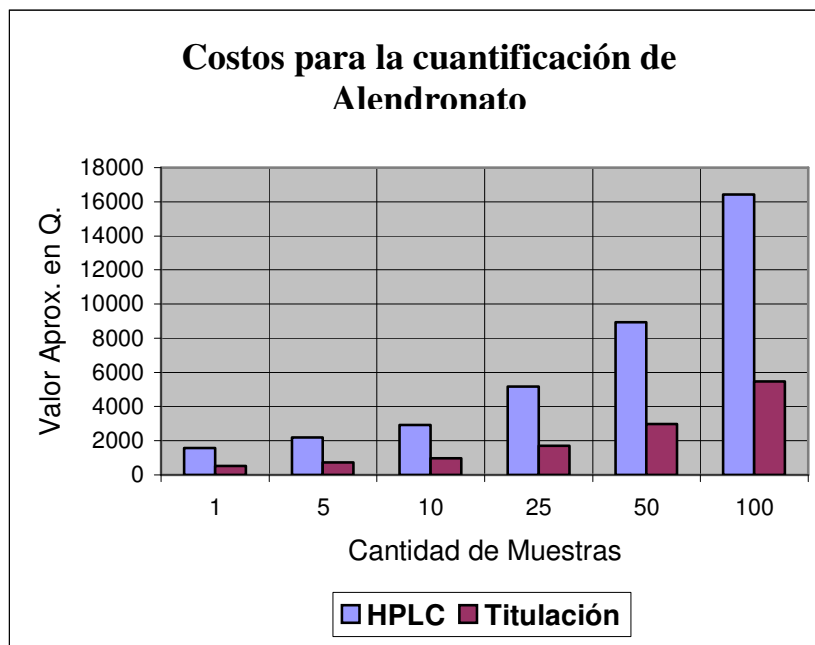
8.4 TIEMPO

Gráfica 8.4.1



8.5 COSTO

Gráfica 8.5.1



9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la presente investigación se compararon los métodos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la titulación potenciométrica ácido-base, utilizados para el análisis químico cuantitativo de Alendronato; evaluando la precisión, exactitud, concordancia, tiempo y costo de ambos métodos.

La precisión de ambos métodos se determinó de acuerdo a la repetibilidad y reproducibilidad en sus resultados, utilizando como medida estadística el coeficiente de varianza resultante del análisis de ambos métodos a una muestra homogénea. En los resultados se muestran los datos de precisión obtenidos en la investigación donde se observa que el coeficiente de varianza de los métodos de titulación potenciométrica y HPLC es de 1.16 y 2.79 para la repetibilidad y de 1.79 y 3.46 para la reproducibilidad, respectivamente. Manifestándose un coeficiente de varianza mayor para el método de HPLC que para la titulación potenciométrica, lo que indica que los datos por HPLC tienden a estar en un rango de valor mayor que para el método potenciométrico. Cabe mencionar que estos resultados se deben a que en la realización de la cuantificación de Alendronato por HPLC aumenta la manipulación de la muestra por parte del analista, desde el período que se pesa la muestra (y se agregan los reactivos de derivatización), hasta que se coloca en el sistema cromatográfico; por otro lado, el método potenciométrico es más directo y breve en lo que a obtención de resultados se refiere.

La exactitud se midió por medio de los factores de correlación (r), el cual indica que la proporción con la que aumentan las concentraciones en un método debe ser directamente proporcional a la medida de su respuesta. En el caso del HPLC su respuesta se mide por medio de áreas y en el caso de la titulación por medio de volumen gastado. Se realizó una curva de calibración con el estandar de Alendronato para cada método, donde se compararon los “ r ” obtenidos. El factor de correlación encontrados para HPLC y Titulación fue de 0.999 y 0.998, respectivamente; este dato demuestra que el método de HPLC es 0.1% más exacto que el método de Titulación, pero ambos están arriba del

mínimo permitido (0.997). Por lo que la Titulación potenciométrica presenta exactitud aceptable para la cuantificación de Alendronato.

Se midió el coeficiente de correlación de concordancia o intraclase (R_c) obteniendo un valor de 0.82532 (tabla 8.3.1), lo cual indica que ambos métodos son equivalentes, sustituibles y comparables al ser mayor de 0.75 el valor obtenido. El coeficiente de correlación de concordancia se utiliza para comparaciones, ya que da una respuesta a la reproducibilidad de las medidas de dos variables.

Con respecto al tiempo y número de muestras a analizar por ambos métodos, el método de titulación potenciométrica utiliza el 30 % del tiempo necesario para analizar una muestra por HPLC y que aunque el número de muestras aumente la razón del tiempo se mantiene constante, por lo que la utilización de un equipo cromatográfico con automuestreador inclusive, no favorece el tiempo para la obtención de resultados.

Al evaluar el costo de los métodos utilizados en el método de HPLC el costo del análisis es mayor que en la titulación potenciométrica, no tomando en cuenta que la disponibilidad y mantenimiento del equipo de HPLC es también mayor que la de un potenciómetro. En la gráfica 8.5.1 se expone cómo los costos no se compensan al aumentar el número de muestras a 100 y cómo es que el método potenciométrico se mantiene en un 30% por debajo de lo que significa utilizar el método de HPLC.

Por lo tanto, el método de titulación potenciométrica ácido-base demuestra que es comparable al método de HPLC, presentando el primero mayor ventaja al ser un método sencillo, directo, de elevada precisión, aceptada exactitud, breve y económico, por lo que con el método potenciométrico se obtienen resultados confiables y equivalentes al HPLC. Con estos resultados se demuestra que la hipótesis planteada es verdadera, y así se propone la titulación potenciométrica ácido-base como un método eficiente para el control de calidad de Alendronato en tabletas.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 El método de titulación potenciométrica ácido-base es eficiente para el análisis químico cuantitativo de Alendronato en tabletas a comparación del método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- 10.2 La utilización de la titulación potenciométrica para la cuantificación de Alendronato disminuye el tiempo a un 30% del necesario para el método por HPLC.
- 10.3 El método de titulación potenciométrica ácido-base genera menos costos de análisis que el generado por el método de HPLC para la cuantificación de Alendronato.
- 10.4 El rango de variabilidad en los resultados para la cuantificación de Alendronato es mayor en el método de HPLC que en la titulación potenciométrica, lo que demuestra que el método potenciométrico es más preciso.
- 10.5 La exactitud de los métodos de titulación potenciométrica y HPLC no tienen diferencia significativa y cumplen con los límites mínimos permitidos.
- 10.6 Los métodos de titulación potenciométrica ácido-base y HPLC utilizados para la cuantificación de Alendronato de Sodio son comparables, equivalentes y sustituibles.
- 10.7 El método de titulación potenciométrica ácido-base presenta mejores ventajas en cuanto a tiempo y costo que el de HPLC para el análisis químico cuantitativo de Alendronato.
- 10.8 Los resultados en el análisis cuantitativo de Alendronato en tabletas por el método de titulación potenciométrica ácido-base son confiables y sustituibles con los del método de HPLC.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Implementar y validar el método de titulación potenciométrica ácido-base para la cuantificación de Alendronato de sodio dentro de la Unidad de Físico-Químico de Medicamentos del Laboratorio Nacional de Salud, como método oficial para éste principio activo por ser un método comparable al de HPLC y con el cual se obtienen resultados confiables, rápidos y económicos.

- 11.2 Continuar la investigación en la comparación de métodos analíticos aplicados a otros principios activos, ya que permite encontrar alternativas de análisis ante metodologías complejas y que proporcionan mejores ventajas sobre costo, tiempo, exactitud y precisión; sin afectar la calidad de los resultados.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Society of Health – System Pharmacists. 2,005. DRUG INFORMATION. USA. Pp. 3606-3609.
2. Katzun B. 2,002. FARMACOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA. 8ª Edición. México. Editorial Manual Moderno. Pp. 832,835,843-4.
3. Martindale, 2,005. THE COMPLETE DRUG REFERENCE. Trad. Sean C. Sweetman. 34ª. Edición. USA. Editorial Pharmaceutical Press. Pp. 765-7.
4. Davis L. 1,998. Prevention of bone loss with alendronate in postmenopausal women under 60 years of age. J Nurse Midwifery Sep-Oct 43:5. USA. Pp.395-6.
5. THE INDEX MERCK. 2001. 13ª. Edición. USA. Pp. 44, 1082, 1537 y 1545.
6. Hobart H. W., At. Al. 1,992. MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS. USA. Editorial Iberoamericana. Pp. 569-641.
7. Skoog L. 2,000. ANÁLISIS INSTRUMENTAL. 8ª. Edición. México. Editorial Mc. Graw Hill. Pp. 730-775.
8. Ayres, G. 2,001. ANÁLISIS QUÍMICO CUANTITATIVO. 4ª Edición. México. Editorial Oxford. Pp. 279-286.
9. Santisteban Paz, M. 2,003. “Evaluación de la Eficiencia de los Métodos de Espectrofotometría IR y HPLC para Cuantificación de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina en Soluciones Inyectables”. Tesis de Licenciatura en Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. Pp. 3-25.
10. Mata Lemus, I. 2,003. “Comparación del Método Espectrofotométrico de Fosfomolibdovanadato y el Método de Titulación Potenciométrica Ácido Base para la Cuantificación de Fosfatos en Detergentes en Polvo”. Tesis de Licenciatura en Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. Pp.46.
11. Figueroa, 2,000, “Comparación de la reproducibilidad de dos métodos para la determinación de azúcares reductores en el jugo de caña de azúcar”, Tesis de

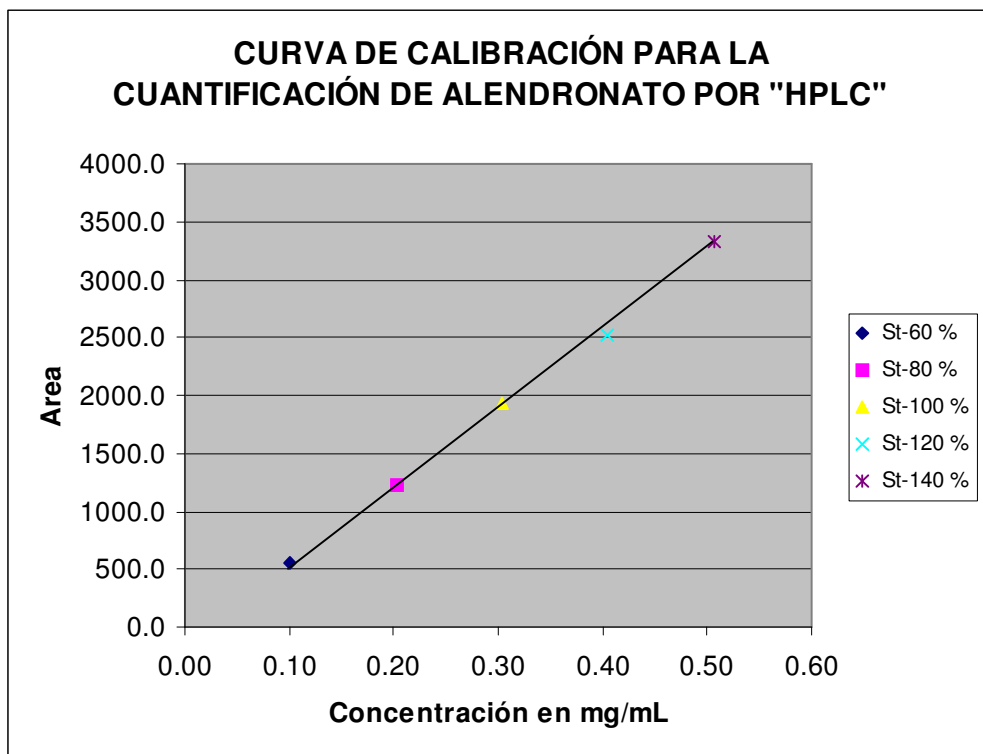
- Licenciatura en Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. Pp. 14-16.
12. Cordón, R. 1995, “Comparación de dos Métodos Alternativos para la Cuantificación de Sodio y Potasio en Sales de rehidratación oral, Fabricadas en el Laboratorio de Producción de Medicamentos (LAPROMED) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia”. Tesis de Licenciatura en Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. Pp. 15-9.
 13. Vargas, 1994. “Estudio comparativo de dos métodos (método por cromatografía de gas y método por electrodo selectivo de flúor) para determinar flúor en crema dental”. Tesis de Licenciatura en Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. Pp. 6.
 14. Daniel, W. 2,002. “Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud”. Cuarta Edición. México. Editorial Limusa. Pp. 400-440.
 15. Bloch DA. 1989. Chmura Kraemer H. 2x2 Kappa coefficients: measures of agreement or association. USA. Biometrics: 45 (1): 269-287.
 16. Lawrence IL. 1989. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. USA. Biometrics; 45 (1): 255-268.
 17. THE UNITED STATES PHARMACOPEA XXVIII, NF 23. 2,005. USA. National Publishing. Pp. 64-66.
 18. CATÁLOGO MERCK, Reactivos Productos Químicos. 2,000. Alemania. Merck Publishing. Pp. 709,1189-91.
 19. Goodman & Gilman. 2,002. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Trad. José Blengio, Bernardo Rivera y Guillermo Di Girolamo. 10ª Edición. México. Editorial Mc Graw Hill. Volumen II. Pp. 1754-5 y 1759.
 20. Instituto Químico Biológico, OMC, “Vademecum, Farmacos de la A a la Z, Alendronato”, 2004. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a033.htm>

21. Red Latinoamericana de Química, Cortez Ruben, "Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia". Disponible en: <http://latina.chem.cinvestav.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm#Qué%20es>
22. Burriel, Oscar, at. ol., "Derivatización pre-columna frente a post-columna.", 2003, Argentina. Disponible en: <http://www.ilustrados.com/publicaciones/EpyuVFuZuFPEPxsPZH.php>
23. Sinexi, Morea Lucas, "Análisis del contenido aminoacídico de los alimentos con fines nutricionales, Reactivos de Derivatización", 1997, México. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos7/amin/amin2.shtml>
24. Pavape, Inés, "Planificación de la Unidad Didáctica para el curso de Química General", 2004, España. Disponible en: http://www.alejandria.cl/recursos/planificaciones/Ines_Palape.doc
25. Química Nova Vol. 28, Christian Fernandes; Rodrigo Souza Leite; Fernando Mauro Lanças, Universidad de Sao Paulo, Brazil, 2005,"Bisfosfonatos: Síntesis, Análisis Químico y Aplicaciones Farmacológicas", disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422005000200019&script=sci_arttext&tlng=pt

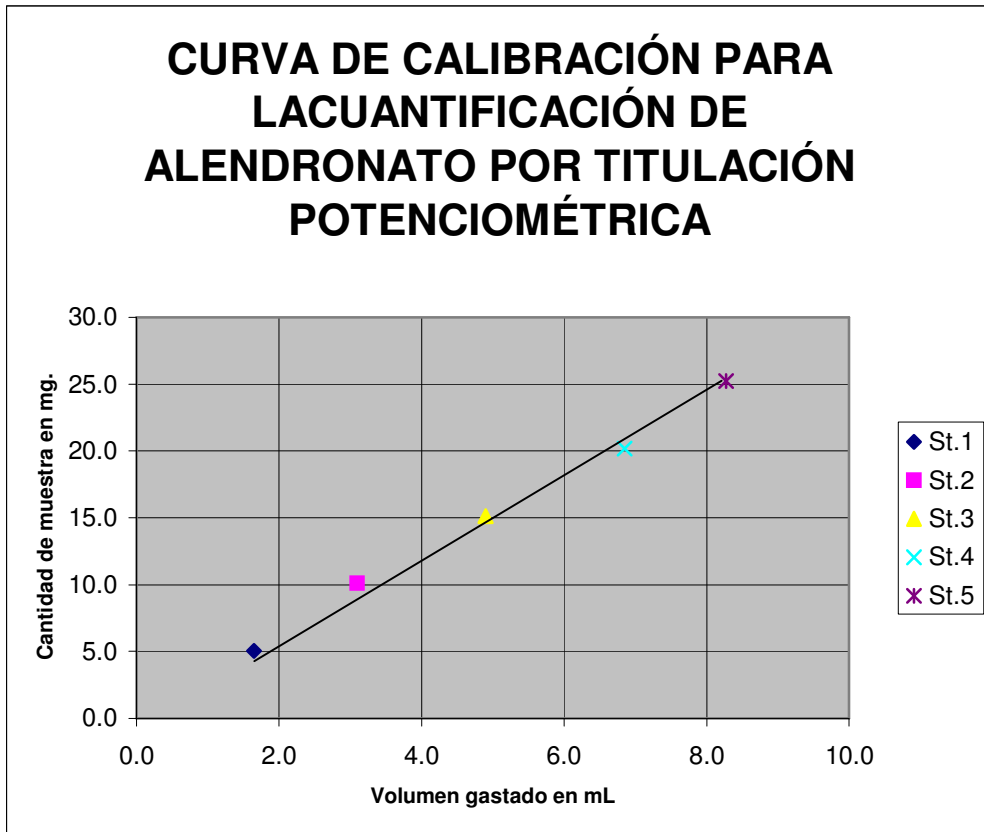
13. ANEXOS

ANEXO 1

GRÁFICA 1.1



GRÁFICA No. 1.2



ANEXO 2

Calculos realizados para la cuantificación de Alendronato por HPLC:

**Calculos realizados para la cuantificación de Alendronato por titulación
potenciométrica ácido-base:**

Marilyn del Rosario Valdés Pérez

Autora

Licda. Julia Amparo García Bolaños

Asesora

Licda. Millie Cruz

Co-Asesora

Licda. Lillian Irving Antillón, M.A.

Directora

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán

Decano