

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

Separación por cromatografía en capa fina y cuantificación por densitometría UV de cotrimoxazol (trimetoprim + sulfametoxazol); -[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidindiamina y 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazol) bencensulfonamida en tabletas y suspensión.

Informe Final de Tesis

Presentado por

Annabella Cardona Sandoval

Para optar al título de

Química

Guatemala, marzo 2010

ACTO QUE DEDICO

A Dios

A mis padres: Jannette Sandoval de Cardona
 Hugo Cardona Galindo

A mis hermanos: Cynthia y Hugo René

A mi Waldo y a mi Ceci con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala por darme educación.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por enseñarme química.

Al Laboratorio de Análisis y Servicios, S.A. (Laser), por permitirme realizar este trabajo, específicamente al Licenciado Oscar Benedicto Monzón Barrientos, por su apoyo.

Indice

		Pàgina
I.	Resumen	6
II.	Introducción	7
III.	Antecedentes	9
3.1.	Investigaciones Previas	9
3.2.	Cotrimoxazol, una sulfonamida antibacteriana	11
3.2.1.	Trimetoprim	11
3.2.2.	Sulfametoxazol	12
3.2.3.	Espectro antibacteriano del cotrimoxazol	13
3.2.4.	Formas comerciales frecuentes	13
3.2.5.	Indicaciones del cotrimoxazol	14
3.2.6.	Farmacología del cotrimoxazol	14
3.2.7.	Metodologías analíticas aplicadas al cotrimoxazol	15
3.3.	Utilización de la técnica cromatográfica en la determinación de medicamentos	16
3.3.1.	Antecedentes históricos de la cromatografía en capa fina y densitometría	17
3.3.1.1.	Fundamentos de densitometría	18
3.3.2.	Aspectos Teóricos y mecanismo de la cromatografía en capa fina	18
3.3.2.1.	¿Qué influye en la separación de la muestra y de que manera?	22
	a) La fase estacionaria (el adsorbente)	22
3.3.3.	Técnica general de la cromatografía en capa fina	24
3.3.3.1.	Valores de relación de frente (Rf) y distancia recorrida por sustancia patrón (Rx)	25
3.3.3.2.	Reproducibilidad de los valores de relación de frente (Rf)	26
3.3.3.3.	Artefactos y zonas anormales	26
3.3.3.4.	Composición y preparación de las placas cromatográficas	27
3.3.3.5.	Selección de sistemas de disolventes	28
3.3.3.6.		
	Métodos de desarrollo en cromatografía de capa fina	28
3.3.3.7		
	Localización de zonas. Identificación y documentación	29
	a) Localización	29
	b) Identificación	29
	c) Documentación	30

	3.3.3.8.	Aplicador utilizado en la cuantificación de cotrimoxazol	30
	3.3.3.9.	Densitómetro utilizado en la cuantificación de cotrimoxazol	30
	3.3.4.	Aplicación de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC)	31
IV.		Justificación	33
V.		Objetivos	35
	5.1.	Objetivo General	35
	5.2.	Objetivos Específicos	35
VI.		Hipótesis	36
VII.		Materiales y métodos	37
	7.1.	Universo	37
	7.2.	Muestra	37
	7.3.	Materiales	37
	7.3.1.	Equipo	37
	7.3.2.	Reactivos	37
	7.3.3.	Cristalería	37
	7.4.	Método	38
	7.4.1	Diseño de la investigación	38
	7.4.2	Recopilación de información previa	38
	7.4.3	Muestreo	38
	7.4.4.	Procedimiento para aplicación de la técnica de cromatografía en capa fina	39
	7.4.4.1.	Preparación de estándares	39
		a) Trimetoprim 4.0 mg/mL	39
		b) Sulfametoxazol 4.0 mg/mL	39
	7.4.4.2.	Preparación de muestras	39
		a) Tabletas	39
		b) Suspensiones	39
	7.4.4.3.	Aplicación de estándares y muestras	40
	7.4.4.4.	Desarrollo de la cromatoplaca	40
	7.4.4.5.	Cuantificación de estándares y muestras	40
	7.4.5.	Procedimiento para aplicación de la técnica de HPLC	40
	7.4.5.1.	Preparación de la fase móvil	40
	7.4.5.2.	Preparación de estándar	41
	7.4.5.3.	Preparación de valoración de suspensión	41
	7.4.5.4.	Sistema cromatográfico	41
	7.4.5.5.	Procedimiento	42
	7.4.5.6.	Preparación de valoración de tabletas	42
	7.4.5.7.	Procedimiento	42
	7.5.	Análisis Estadístico	43
VIII.		Resultados	44

IX.	Discusión de resultados	49
X.	Conclusiones	57
XI.	Recomendaciones	58
XII.	Referencias	60
XIII.	Anexos	63

I. Resumen

La cromatografía en capa fina es una técnica de gran importancia en la determinación, cuantificación y control de calidad de principios activos en medicamentos dado que sus ventajas tales como la posibilidad de acoplarse a equipos instrumentales diversos, consumo de muestra bajo, necesidad de poca preparación de la muestra, necesidad de pequeñas cantidades de solventes y generación de pocas cantidades de desechos contaminantes la convierten en una opción viable, económica y amigable con el ambiente.

En esta investigación se separaron y cuantificaron los compuestos 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidindiamina (trimetoprim) y 4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazol)bensulfonamida (sulfametoxazol) del cotrimoxazol en tabletas y suspensión, a través de la aplicación de esta técnica cromatográfica. Para ello, se determinaron las condiciones óptimas que favorecieron la separación de los compuestos de manera selectiva y eficaz. La cuantificación se llevó a cabo utilizando la técnica de densitometría UV.

En la investigación se encontró que la fase móvil mas adecuada para la separación y cuantificación del trimetoprim y el sulfametoxazol es la constituida por cloroformo-metanol-agua en cantidades de 4.6-0.38-0.025 mL respectivamente y se requiere que la detección y cuantificación en el densitómetro se haga a 285 nm.

Los resultados obtenidos se compararon con los que se obtuvieron aplicando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución y la diferencia entre ambas técnicas resultó ser estadísticamente no significativa para la separación, identificación y cuantificación de trimetoprim y sulfametoxazol del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones.

Por otra parte se pudo constatar que la aplicación de la técnica por cromatografía en capa fina no tiene efecto adverso sobre la separación, identificación y cuantificación del trimetoprim del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones y si lo llegara a tener este es pequeño, por lo que los resultados obtenidos al aplicar la técnica deben ser considerados tan validos como los de la cromatografía líquida de alta resolución. Mientras que para el sulfametoxazol el efecto es pequeño y estadísticamente no significativo, por lo que los resultados obtenidos al aplicar la técnica deben ser considerados tan válidos como los de la cromatografía líquida de alta resolución.

II. Introducción

La importancia en la determinación de la identidad, la cuantificación y el control de calidad de principios activos en medicamentos ha llevado a la adaptación de técnicas analíticas diversas según la naturaleza química de estas sustancias. Una de estas técnicas es la cromatografía en capa fina, la cual fue de las primeras utilizadas para la labor química de identificación y cuantificación de sustancias sobre todo por los recientes y rápidos avances en otros campos de la cromatografía.

Esta es una técnica relativamente sencilla que presenta varias ventajas frente a otras metodologías analíticas entre las cuales se cuentan, la posibilidad de ser acoplada a equipos de análisis químico instrumental, un consumo de muestra bajo, necesidad de poca purificación de la muestra, uso de pequeñas cantidades de solventes en comparación con otras técnicas similares, y por lo tanto genera menos desechos contaminantes.

Por otra parte, los avances tecnológicos han permitido el desarrollo de equipos que permiten que la cromatografía en capa fina sea hoy en día, una técnica más automatizada, con alta exactitud y precisión.

El objetivo principal de esta investigación fue separar y cuantificar los compuestos 5-[(3,4,5-trimetoxi-fenil)metil]-2,4-pirimidindiamina (trimetoprim) y 4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazol)bensulfonamida (sulfametoxazol) del cotrimoxazol en tabletas y suspensión, a través de la aplicación de esta técnica cromatográfica. Para ello, se determinaron las condiciones óptimas que favorecieron la separación de los compuestos de manera selectiva y eficaz. Tales condiciones fueron para la composición de la fase móvil una mezcla de cloroformo-metanol-agua en cantidades de 4.6-0.38-0.025 mL respectivamente. En cuanto a la fase estacionaria se utilizaron placas TLC60₂₅₄ en cámara cromatográfica saturada por 10 minutos. El proceso se llevó a cabo en condiciones de trabajo a temperatura de 25°C y 62% de humedad. La cuantificación se efectuó utilizando la técnica de densitometría UV con una lámpara de deuterio a una longitud de onda de 285 nm. Las disoluciones de las muestras se prepararon a una concentración de 4 mg/mL tanto de compuestos 5-[(3,4,5-trimetoxi-fenil)metil]-2,4-pirimidindiamina (trimetoprim) como de 4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazol)bensulfonamida (sulfametoxazol) y en la cromatopla se aplicaron 2 uL de la disolución preparada dando como resultado 8 ug de ingrediente en la cromatopla. Los resultados obtenidos se

compararon con los que se obtuvieron aplicando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución y la diferencia entre ambas técnicas resultó ser estadísticamente no significativa para la separación, identificación y cuantificación de trimetoprim y sulfametoxazol del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones.

La investigación efectuada se justificó, dado que constituyó el desarrollo de una técnica instrumental alternativa que superó a la variante preparativa en cuanto a que no fue únicamente para identificación, sino que se logró determinar la concentración de manera eficaz de los compuestos. Por otra parte la detección fue altamente sensible, debido a la aplicación de la técnica densitométrica.

Además, la técnica desarrollada tiene varias ventajas sobre la técnica de HPLC, recomendada como principal alternativa por las farmacopeas, ya que se puede apreciar la separación cromatográfica completa, pudiendo observar al mismo tiempo la relación de componentes y la formación indeseable de colas o manchas arrastradas. A esto se agrega que la técnica permitió evitar la contaminación por muestras anteriores ya que el sistema de separación se utilizó una única vez, sin incrementar los costos significativamente utilizando pre-columnas o complicando el procedimiento como lo supone el reacondicionamiento de la columna o el cambio de la misma.

Para determinar si la metodología es adecuada para la cuantificación de los principios activos, se hizo uso de estándares de pureza certificada para ambos ingredientes y también se compararon los resultados obtenidos con los del método de referencia (HPLC).

La implementación de esta técnica analítica para la determinación y cuantificación de un bactericida de amplio espectro, representa un beneficio para Guatemala, dado que disminuye los impactos ambientales que se generan por el análisis y constituye un procedimiento que disminuye los costos significativamente.

III. Antecedentes

3.1. Investigaciones Previas.

La cromatografía en capa fina es una técnica muy utilizada desde hace muchos años para la separación e identificación de sustancias, a continuación se mencionarán las investigaciones más recientes, realizadas en la Universidad de San Carlos de Guatemala.

En el año 2000 González Pellecer, realizó una caracterización de metabolitos primarios y secundarios en frijoles del género *Phaseolus*, especies: *P. lunatus* L., *P. acutifolius* Gray, y *P. vulgaris* L. del sur occidente de Guatemala, para lo que utilizó la técnica en cromatografía en capa fina.⁽¹⁷⁾

López García, también en el año 2000, realizó el tamizaje fitoquímico de cuatro especies del subgénero *Trichosalpinx* (*Trichosalpinx triangulipetala*, *Trichosalpinx blaisdellii*, *Trichosalpinx ciliaris* y *Trichosalpinx memor*) y cuatro del subgénero *Tubella* (*Tubella broadwayi*, *Tubella foliata*, *Tubella cedralensis* y *Tubella fruticosa*) del género *Trichosalpinx* existente en Guatemala utilizando la cromatografía en capa fina para su separación e identificación.⁽¹⁸⁾

Cano, et al, (2002), obtuvieron capsaicina a través del fraccionamiento de las oleorresinas de 3 especies de *Capsicum*, por medio de la cromatografía de capa fina.⁽¹⁹⁾

Cáceres, et al, realizaron la determinación fitoquímica y actividad antifúngica de cultivares de *Solanum americanum* Miller y caracterización de preparaciones para la industria fitofarmacéutica mediante ensayos macro, semimicro y cromatografía en capa fina (CCF) identificándose los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos los cuales fueron alcaloides y saponinas.⁽²⁰⁾

Zuleta realizó en 2005 un estudio sobre el perfil fitoquímico de *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger proveniente de 5 regiones de Guatemala. El trabajo de investigación se realizó con el fin de determinar la existencia de diferencias cualitativas en la composición química de los rizomas de *Phlebodium pseudoaureum* provenientes de cinco regiones diferentes del país. En esta investigación se analizó el rizoma y las escamas de *P. pseudoaureum* de regiones de El Quiché, Guatemala, Jalapa, Baja Verapaz y Huehuetenango. Se realizaron ensayos fitoquímicos para la determinación de alcaloides por cromatografía en capa fina, presentando tanto para el rizoma y las escamas un resultado positivo para esta prueba. Se analizó la presencia de taninos en las cinco muestras en forma macro, presentando estas un resultado positivo para la misma.

Se analizó la presencia de flavonoides, saponinas y sesquiterpenlactonas por medio de cromatografía en capa fina confirmándose la presencia de estos metabolitos secundarios en cada una de las muestras seleccionadas.⁽²¹⁾

También en el 2005, Cruz de Paz, realizó la evaluación de la actividad biocida e identificación química de valepotriatos en tres plantas reconocidas popularmente en Guatemala como Valeriana utilizando la cromatografía en capa fina para la identificación de los mismos.⁽²²⁾

Vielman y Saravia realizaron en 2004 un estudio sobre la evaluación de la actividad analgésica de los extractos etanólico, hexánico, cloroformo, acetato de etilo y acuoso de las hojas de *Catopheria chiapensis* (linimento). En esta investigación se estudió la actividad analgésica de la planta medicinal y su utilización como medicina alternativa. Por la respuesta analgésica obtenida para el extracto de acetato de etilo, se llevó a cabo la caracterización fitoquímica preliminar, al cual se le realizó un tamizaje fitoquímico utilizando ensayos macro y semimicro y técnicas de cromatografía en capa fina (CCF) que evidenciaron la existencia de alcaloides, antraquinonas, flavonoides, antocianinas, cardenólidos, bufadienólicos, principios activos amargos y aceites esenciales.⁽²³⁾

En un estudio más reciente en el año 2008, Villatoro Castillo, realizó el tamizaje fitoquímico de las partes aéreas (hojas, tallo, flores y fruto) de *Garrya corvorum* Standl. & Steyerl. (GARRYACEAE) especie endémica de Guatemala, en la cual utilizó la cromatografía en capa fina para separación e identificación de algunos metabolitos de la planta.⁽²⁴⁾

Como se puede observar en estas y muchas más investigaciones realizadas en Guatemala la cromatografía en capa fina es una técnica ampliamente utilizada para la separación e identificación de sustancias químicas, pero no es aprovechada para la cuantificación de las mismas siendo esto factible actualmente, gracias a equipos modernos como lo son los densitómetros.

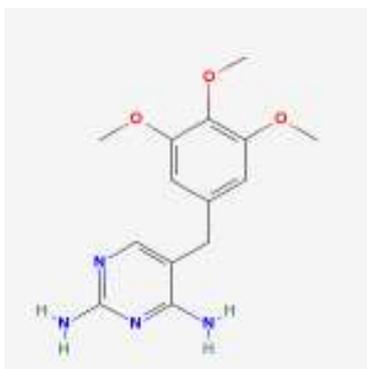
3.2. Cotrimoxazol, una sulfonamida antibacteriana.

El cotrimoxazol (trimetoprim + sulfametoxazol), está clasificada como una droga sistemática antibacterial, de la familia de las sulfonamidas. La asociación de una sulfonamida con trimetoprim permite obtener una acción antibacteriana, sinérgica y secuencial por inhibición de la síntesis de nucleoproteínas: la sulfonamida bloquea la síntesis bacteriana del ácido dihidrofólico (por competición con el ácido para-aminobenzoico) además de constituir una sustancia de eliminación lenta y la trimetoprim bloquea la transformación del ácido dihidrofólico en ácido tetrahidrofólico (inhibición de la dihidrofolato reductasa) con lo cual se obtiene una acción sinérgica secuencial sobre numerosas bacterias y algunos protozoarios.

Por tanto el espectro antibacteriano es mucho más amplio por la suma de los espectros de los componentes aislados y esto a pesar que los componentes separados son únicamente bacteriostáticos, la combinación resultante es bactericida.⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

3.2.1. Trimetoprim

Estructura bidimensional:

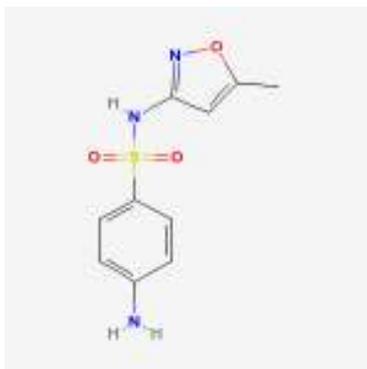
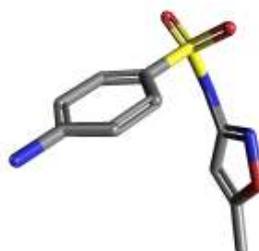


Estructura tridimensional:



Propiedades calculadas desde la estructura:

Peso molecular	290.31772 [g/mol]
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃
XLogP3	0.9
H-Enlace Donador	2
H-Enlace Aceptor	7
Conteo de enlaces rotables	5
Conteo de tautómeros	9
Masa exacta	290.13789
Masa monoisotópica	290.13789
Superficie de área topológica polar	106
Conteo de átomos pesados	21
Carga formal	0
Complejidad	307
Conteo de isótopos atómicos	0
Conteo de átomos estereocéntricos definidos	0
Conteo de átomos estereocéntricos no definidos	0
Conteo de enlaces estereocéntricos definidos	0
Conteo de enlaces estereocéntricos no definidos	0
Conteo de unidades covalentemente enlazadas	1

3.2.2. Sulfametoxazol**Estructura bidimensional:****Estructura bidimensional:**

Propiedades calculadas desde la estructura:

Peso molecular	253.27764 [g/mol]
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
XlogP3	0.9
H-Enlace Donador	2
H-Enlace Aceptor	6
Conteo de enlaces rotables	3
Conteo de tautómeros	2
Masa exacta	253.052112
Masa monoisotópica	253.052112
Superficie de área topológica polar	98.2
Conteo de átomos pesados	17
Carga formal	0
Complejidad	346
Conteo de isótopos atómicos	0
Conteo de átomos estereocéntricos definidos	0
Conteo de átomos estereocéntricos no definidos	0
Conteo de enlaces esterocéntricos definidos	0
Conteo de enlaces esterocéntricos no definidos	0
Conteo de unidades covalentemente enlazadas	1

3.2.3. Espectro antibacteriano del cotrimoxazol.

Las cepas bacterianas que resultan casi siempre sensibles a la acción del cotrimoxazol son: *Streptococcus pneumoniae*, *Corinebacterium diphtheriae*, *Neisseria meningitidis*. Por otra parte las cepas que resultan a muy a menudo sensibles a su acción son: *Staphylococcus aureus* (comprendidas cepas resistentes a la cloxacilina), *Streptococcus pyogenes*, *S. viridans*, *S. faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* (varias especies), especies de *Salmonella* y *Shigella*, *Pseudomonas pseudomallei* y *serratia*, *Vibrio cholerae*. Otras cepas que bastante a menudo resultan sensibles a la acción del cotrimoxazol son: *Brucilla abortus*, *Pasterurella haemolytica*, *Nocardia asteroides*, *Toxoplasma gondii*, diversas especies de *Legionella*, *Klebsiella* y *Yersinia*. Sin embargo *Pseudomonas aeruginosa* presenta resistencia frecuente y el bacilo tuberculoso, treponemas, micoplasmas, *Campylobacter*, *Leptospira*, *Chlamydia* y *Rickettsia* presenta resistencia constante.⁽¹⁾⁽²⁾

3.2.4. Formas comerciales frecuentes

En el mercado se encuentran diversos medicamentos cuyo principio activo es el cotrimoxazol, a nivel local e internacional los más reconocidos son Adrenal® (Fabra).

Bactigel® (Bagó), Bactrim® (Roche), Cotrimoxazol® (Richet), Danferane® (Rivero), Dosulfín® (Labinca), Netocur® (Duncan), Spectrobid® (Tuteur), Sulfatrin® (Richmond), Triseptazol® (Sintyal). Además se encuentran una gran cantidad de presentaciones farmacéuticas de tipo genérico que presentan a esta mezcla de compuestos como ingrediente activo.⁽¹⁾⁽²⁾

3.2.5. Indicaciones del cotrimoxazol.

El medicamento es recetado en caso de los siguientes padecimientos:

- Infecciones urinarias complicadas y/o altas; el cotrimoxazol no se recomienda en las infecciones urinarias bajas, no complicadas, debido a la posibilidad de efectos adversos.
- Prostatitis aguda o crónica: Exacerbaciones agudas de la bronquitis crónica.
- Otitis y sinusitis agudas.
- Neuropatía por *Pneumocystis carinii*.
- Infecciones gastrointestinales por *Shigella*, por *Yersinia enterocolitica*, o por cepas patógenas de colibacilos.
- Fiebres tifoideas y paratifoideas en caso de resistencia al cloranfenicol y a la ampicilina.
- Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*): formas graves, generalizadas, en caso de inmunosupresión; formas congénitas; coriorretinitis.
- Chancro blando.
- Melioidosis.
- Brucelosis: en caso de intolerancia a las tetraciclinas.
- Cólera: para disminuir la duración de la diarrea y la proliferación de gérmenes en los niños.⁽¹⁾

3.2.6. Farmacología del cotrimoxazol.

El trimetoprim se absorbe por vía digestiva más rápidamente que el sulfametoxazol; la administración de sulfametoxazol y trimetoprim en la proporción de 5/1 alcanza a nivel de los tejidos una relación de 20/1 (actividad antibacteriana óptima); después de la administración por vía oral se alcanza el pico sérico en el curso de 2-3 horas.⁽¹⁾

La vida media plasmática es de 10 horas, aproximadamente para el sulfametoxazol y de 16 horas para el trimetoprim; el cotrimoxazol presenta unión con las proteínas plasmáticas de alrededor del 70%; al cabo de 24 horas, 30 a 50% de sulfametoxazol (sobre todo conjugado) y 50 a 60% de trimetoprim (metabolizada en parte) son eliminados en la orina; la eliminación urinaria disminuye en caso de insuficiencia renal; por otra parte tienen una buena penetración en el líquido cefalorraquídeo.

En su posología se recomienda tomar precauciones en cuanto a mantener una buena hidratación, reducir las dosis en caso de insuficiencia renal, administración prudente en pacientes de más de 60 años, en caso de tratamiento prolongado mantener vigilancia hematológica.

El cotrimoxazol debe evitarse en caso de antecedentes de intolerancia o alergia a cualquiera de sus componentes, en recién nacidos y prematuros, en caso de anemias megaloblásticas y trombocitopenia, en neuropatías progresivas, en anemias megaloblásticas y en embarazo.⁽¹⁾

3.2.7. Metodologías analíticas aplicadas al cotrimoxazol.

Entre los métodos analíticos que se realizan a muestras de cotrimoxazol esta la cromatografía en capa fina, utilizada para determinar la pureza de los ingredientes activos tanto en tabletas como en suspensiones. Mediante la cromatografía en capa fina se puede determinar los distintos productos de degradación del trimetoprim y del sulfametoxazol, y verificar si cumple con los límites permitidos para los mismos.

La metodología en sí referente a cromatografía en capa fina implica la aplicación de estándares y muestras en una placa de silica gel y después del desarrollo de la placa en su respectiva fase móvil, se revelan las manchas con un reactivo de Ehrlich modificado, el reactivo está compuesto de 100 miligramos de p-dimetilaminobenzaldehído en 1 mililitro de ácido clorhídrico, diluido hasta 100 mililitros con etanol. Las manchas reveladas se cuantifican comparativamente contra los estándares.

El método analítico más utilizado para la cuantificación de cotrimoxazol actualmente es la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), La cual requiere un detector a 254 nm. Esta técnica se aplica tanto a tabletas como a suspensiones de cotrimoxazol y sirve para verificar la uniformidad de las unidades de dosificación.

Igualmente que en la cromatografía en capa fina, en la cromatografía líquida de alta resolución se preparan estándares y muestras los cuales se inyectan en la columna

cromatográfica eluyéndose con su respectiva fase móvil y obteniéndose los picos correspondientes para su posterior cuantificación.⁽²⁾⁽⁵⁾

3.3. Utilización de la técnica cromatográfica en la determinación de medicamentos.

En años recientes, en el análisis de medicamentos se ha incrementado la necesidad de herramientas que permitan asegurar los resultados analíticos en cuanto a la capacidad de determinar la identidad, el grado de pureza y la calidad de los mismos. En la mayor parte de los casos, se necesitan metodologías de prueba tanto físicas como químicas y la técnica cromatográfica a emergido como una técnica y tecnología a la vez, de alto rendimiento y muy versátil que puede ser aplicada para la identificación, cuantificación y verificación de la calidad de los productos farmacéuticos.

Sin embargo las técnicas generalmente aplicadas como lo son la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC, por sus siglas en inglés) y la cromatografía de gases (cuando es factible utilizarla, sobre todo para materiales de origen botánico) usualmente requieren de readecuación de la metodología a seguir, equipos altamente sofisticados, empleo de reactivos, gases o solventes ultrapuros, columnas de separación cromatográfica muy específicas, lo cual redundo en un aumento significativo de los costos.

Es entonces cuando técnicas como la cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés o CCF en español) surgen como alternativas, ya que su tecnología es altamente efectiva en costos, sin perjuicio de la versatilidad y alto rendimiento en la identificación, cuantificación y aseguramiento de la calidad en principios activos farmacéuticos.

La técnica de la cromatografía en capa fina es de alguna manera familiar para la mayoría de químicos analíticos y en términos generales hay una percepción de que hay métodos químicos específicos de análisis como el HPLC que tienden a dejar a la cromatografía en capa fina en estado obsoleto. Sin embargo la TLC o CCF ha demostrado ser una herramienta analítica de alto valor para los modernos farmacognocistas.

3.3.1. Antecedentes históricos de la cromatografía en capa fina y densitometría

El principio que rige la cromatografía en general es la adsorción, la cual consiste en el depósito y retención selectiva de sustancias sobre una superficie de sólidos finamente divididos por efecto de fuerzas fisicoquímicas.

La cromatografía (del griego chroma = color, graphos = escritura) es un procedimiento fisicoquímico que permite separar los componentes o sustancias integrantes de una mezcla en movimiento por adsorción o separación diferencial de estos componentes sobre una superficie estacionaria o inmóvil. El botánico ruso Mikhail Tswett (1872-1919) estableció entre 1903 – 1910, las ventajas de la cromatografía y la adopción parcial de su terminología, así como haber sentado las bases de los principales procedimientos experimentales relativos a esta técnica.⁽⁶⁾⁽⁷⁾

Hasta 1931, Kuhn y Lederer despertaron el interés de los químicos en la cromatografía demostrando lo ventajoso de su empleo en la separación de numerosos productos naturales. En 1938, Reinchstein demostró la utilidad de la cromatografía líquida, y en 1941, Martin y Synge. El éxito de esta cromatografía los llevó a pensar en la posibilidad de separar pequeñísimas cantidades de aminoácidos, desplazándolos sobre una fase estacionaria de papel que se iba saturando de agua, a medida que se movía el frente de disolvente saturado de agua.⁽⁶⁾⁽⁷⁾

Otros investigadores, como Izmailov y Shraiber (1938), colocaron sobre láminas de vidrio dispuestas horizontalmente capas muy delgadas de absorbentes y a continuación una gota de extractos vegetales. La adición lenta de etanol al centro de la mancha, le permitió separar e identificar diversos productos farmacéuticos.⁽⁶⁾⁽⁷⁾

En 1949, Meinhard y Hall separaron iones inorgánicos mediante portaobjetos embadurnados con óxido de aluminio y celita, utilizando almidón como aglutinante. En 1951, Kirchner y sus colaboradores prepararon placas de gel de sílice para separar los aceites esenciales, y continuaron perfeccionando la técnica. En 1954 Reitsema, interesado en el estudio de aceites esenciales, utilizó barras de adsorbente y sugirió procedimientos de elaboración de placas de adsorbente en condiciones reproducibles. Kirchner descubrió en 1954 un aplicador sencillo. En 1956, Stahl, muy interesado en la

separación de los componentes de las células, diseñó un aparato aplicador que permite elaborar con facilidad placas de comportamiento reproducible y le dio el nombre de cromatografía en capa fina (Dünnschichtchromatographie). Posteriormente, este autor y sus estudiantes han seguido demostrando las ventajas de la cromatografía en capa fina e inventaron nuevos dispositivos y técnicas que aumentan su versatilidad.⁽⁶⁾⁽⁷⁾

3.3.1.1. Fundamentos de densitometría

Es posible usar un sistema escalado para pixeles que tenga una correspondencia uno a uno con la concentración de lo que se está estudiando. La concentración de la muestra puede ser determinada utilizando técnicas ópticas, electrónicas y más importante aun técnicas basadas en imágenes. La ciencia de la densitometría fue descrita originalmente por Bouguer y Lambert que describió la pérdida de radiación (o luz) al pasar a través de un medio. Posteriormente, Beer encontró que esa pérdida de radiación en un medio es la función de la concentración o molaridad de la sustancia. De acuerdo con la ley de Beer, la concentración es proporcional a la densidad óptica (DO). La escala de la densidad óptica logarítmica, y la integral neta de los valores de densidad para un objeto en una imagen es la medida propia para usarse en la cuantificación. De acuerdo con la ley de Beer, la densidad en un punto es el logaritmo de la razón de la luz incidente sobre el mismo y la luz transmitida a través del mismo.

$$DO = \text{Log}_{10}(I_0 / I)$$

Donde DO es la densidad óptica, I_0 es la intensidad de la luz incidente e I es la intensidad de la luz transmitida.

Hay varios métodos estandarizados utilizados para encontrar la densidad de un objeto, o un punto en una imagen. Los densitómetros de escaneo controlan o conocen los niveles de iluminación, luego miden la luz transmitida a través de un objeto como un negativo de una fotografía. Debido a que tanto la luz incidente como la luz transmitida son cantidades conocidas, el dispositivo puede computar esta razón directamente.

3.3.2. Aspectos Teóricos y mecanismo de la cromatografía en capa fina.

El proceso cromatográfico implica la distribución diferencial de un soluto o sustancia adsorbible entre dos fases, una de las cuales está inmóvil o estacionaria

(adsorbente) y la otra móvil (disolvente). En cierta forma, lo anterior corresponde al paso sucesivo a contracorriente de un soluto entre numerosísimos embudos de separación unidos secuencialmente o como una serie de platos de destilación que contienen el disolvente. Así la fase móvil se pone en equilibrio con una porción de la fase estacionaria y luego fluye hacia la siguiente porción estacionaria, donde vuelve a ponerse en equilibrio, y a continuación fluye hacia la tercera fase estacionaria y así sucesivamente, alcanzando el equilibrio de reparto en cada uno de ellos.

La velocidad del movimiento de un soluto depende de su solubilidad relativa en las dos fases, lo cual resumió Nernst, en el llamado coeficiente de reparto K , que se define como el cociente de la concentración del soluto en una fase móvil A y su concentración en la fase estacionaria E , una vez alcanzado el equilibrio a una temperatura determinada.⁽⁶⁾

$$K = \frac{A \text{ (móvil)}}{E \text{ (estacionaria)}}$$

En la separación cromatográfica, el disolvente, el adsorbente y los componentes de la mezcla que se está separando o resolviendo, interactúan entre sí y por ello constituyen un *sistema cromatográfico*. La interacción de los elementos de este sistema determina el grado de separación que se consigue en las condiciones de trabajo. Los estudios teóricos sobre la cromatografía no bastan para anticipar las condiciones óptimas requeridas para una separación específica.

De hecho, es poco probable que se logre el equilibrio en algún punto del adsorbente cromatográfico, ya que la cromatografía opera bajo un flujo continuo. Pero hay una porción o longitud del adsorbente que la disolución del soluto debe recorrer para conseguir el mismo grado de separación que en una etapa equilibrada, de ahí que se hable del número de platos experimentales.

Tanto en la cromatografía de adsorción, como en la de reparto, es muy importante la relación entre la velocidad de movimientos del soluto y la velocidad de movimiento del disolvente de desarrollo, o sea la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\textit{Velocidad de movimiento del soluto}}{\textit{Velocidad de movimiento del disolvente}}$$

Es claro que si el disolvente y el soluto empiezan a moverse al mismo tiempo, la relación anterior puede expresarse en términos de las distancias recorridas por cada uno.⁽⁶⁾

$$R_f = \frac{\textit{Distancia recorrida por el soluto}}{\textit{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

En la práctica, la distancia recorrida por el soluto en un tiempo determinado se mide desde el punto de aplicación del soluto hasta el centro de su zona de distribución, en tanto que la distancia recorrida por el disolvente se mide desde el mismo origen hasta el extremo de su máximo recorrido. El movimiento del soluto a lo largo de la fase inmóvil depende de factores muy diversos.⁽⁶⁾

La separación cromatográfica de mezclas depende de que tan compactas estén las zonas formadas por cada soluto, así como de la distancia que mantengan entre sí durante el desplazamiento. Con frecuencia, una separación fracasa porque las zonas tienden a superponerse en parte. Para evitar o atenuar esta superposición conviene conocer tres causas de su ocurrencia.

- La difusión ordinaria. Consiste en la migración del soluto de regiones en que está muy concentrado a otras en donde su concentración es menor.
- La difusión de Eddy. En los medios porosos, unas moléculas toman caminos menos directos que otras, lo que, junto con la diferencia de flujo de disolvente en unas y en otras partes favorece el traslape o su superposición parcial de zonas.

- El equilibrio incompleto. Por contacto incompleto de fases inmóviles y móviles en zonas localizadas.⁽⁶⁾

La eficacia de separación del sistema de cromatografía en capa fina se manifiesta en el ensanchamiento que experimenta la mancha aplicada de la sustancia a lo largo del recorrido cromatográfico.

Se describe por el número de platos teóricos, N, o la altura de plato H.

$$N = 16 \left(\frac{X}{W} \right)^2$$

$$H = \frac{W^2}{16x}$$

Donde x expresa la distancia entre una mancha de sustancia y el punto de partida y W el diámetro de la mancha. Para el recorrido de 10 cm, N alcanza valores de hasta 5000 en placas de cromatografía de capa fina de alta eficacia (HPTLC).⁽⁶⁾

Hay que distinguir la selectividad de la eficacia de separación. Mientras la eficacia de separación hace referencia al ensanchamiento del pico, la selectividad expresa la diferencia entre los Rfs de las sustancias separadas.

Para la aplicación práctica, lo decisivo es la calidad de la separación, de dos sustancias distintas en un sistema de cromatografía en capa fina dado (eluyente + fase estacionaria). Ésta depende tanto de la eficacia de separación como de la selectividad del sistema de separación. El parámetro correspondiente es la resolución, Rs.

$$R_s = \frac{d}{\frac{1}{2} W_1 + \frac{1}{2} W_2}$$

Así W expresa el diámetro de las manchas de dos sustancias 1 y 2, y d es la distancia entre los centros de las manchas. Es evidente que cuanto mayor es la distancia

y menores los diámetros medios de las manchas de las sustancias, mejor es la resolución. Cuando $\frac{1}{2} W_1 + \frac{1}{2} W_2 = d$, entonces $R_s = 1$ y las sustancias están “separadas por línea base”, es decir, la respuesta cromatográfica vuelve entre ellas a la línea base.⁽⁵⁾

Kaiser introdujo un parámetro adicional de gran utilidad, el número de separación, SN. Este parámetro expresa el máximo número de sustancias que un sistema de cromatografía en capa fina puede separar idealmente de manera completa en un determinado recorrido. En este caso ideal, todos los pares de sustancias vecinas estarían separados con una resolución 1.

La determinación experimental de este parámetro SN (Separation Number) es realmente sencilla:

- Se cromatografía una mezcla de sustancias cuyos Rfs son distintos y se encuentran distribuidas por todo el cromatograma.
- Con un densitómetro se registra un densitograma y se representa en una escala ampliada el ancho de la mancha, medida a la mitad de la altura de pico, frente al recorrido respectivo Z_f .
- Los puntos obtenidos se unen por una recta y se extrapolan los anchos de mancha b_0 y b_1 a $Z_f = 0$ y $Z_f = 1$ respectivamente.
- Se calcula SN (magnitud adimensional) según la relación simplificada:

$$SN = \frac{Z_f}{b_0 + b_1} - 1$$

Donde Z_f es el recorrido hasta el frente.⁽⁶⁾

3.3.2.1. ¿Qué influye en la separación de la muestra y de que manera?

a) La fase estacionaria (el adsorbente)

Las características principales y los parámetros de los adsorbentes se resumen en los tres apartados siguientes:

(1) Composición química y estructura.

Los numerosos adsorbentes se clasifican básicamente en dos tipos: Fases polares (hidrófilas), también llamadas fases normales. Fases apolares (lipófilas), también llamadas fase reversa. En medio se encuentran las fases medianamente polares, en su mayoría se trata de adsorbentes modificados y sus propiedades se asemejan a las de la fase normal o reversa dependiendo del eluyente.

Las fases polares se combinan en general con eluyentes no polares como cloroformo/metanol. Por el contrario, las fases reversas se combinan con eluyentes con alto contenido en agua, al cambiar la fase directa a fase reversa se invierte el orden de elución.⁽⁶⁾⁽⁷⁾

Los adsorbentes de mayor significación práctica son el gel de sílice, el gel de sílice modificado, el óxido de aluminio y la celulosa.

Cerca de un 90 % de las separaciones se realizan sobre gel de sílice, un polvo poroso y amorfo. Contiene en su superficie grupos Si-OH que pueden formar enlaces por puente de hidrógeno entre ellos o con sustancias polares.

(2) Características de grano y de poro.

La eficacia de separación de un adsorbente está determinada por su estructura geométrica. También forman parte de ella el tamaño de partícula y su distribución. La selectividad de un adsorbente depende, por el contrario, de la estructura química del material.

En el diámetro de partícula, en principio se cumple que cuanto menores son las partículas y cuánto más estrecha es la distribución de tamaños de grano tanto mejor es la eficacia de separación. Los diámetros de partículas deberían ser además lo más uniformes posible (distribución de tamaño de partícula estrecha). El diámetro de partícula de los geles de sílice comerciales oscila entre los 5 y los 40 μm .

La superficie se expresa en m^2/g . A mayor superficie, más intensas son las interacciones entre muestra y fase estacionaria. El poder de adsorción es mayor, es decir, la retención es más fuerte.

El volumen de poro y su distribución se expresa en mL/g (un valor típico es 0.8 mL/g). Una variable relacionada es el diámetro de poro, expresado en nm (un valor típico es 6 nm).⁽⁵⁾⁽⁸⁾

(3) Parámetro de capa

El espesor de las capas de separación analíticas se sitúa típicamente entre 100 y 250 μm , y el de las capas de cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPTLC) alrededor de los 200 μm . También influyen en las propiedades de las capas los aglomerantes empleados, que aumentan su estabilidad y fijación. ⁽⁶⁾⁽⁷⁾

3.3.3. Técnica general de la cromatografía en capa fina.

En la cromatografía en capa fina (CCF), se coloca la muestra por lo menos a 1 cm del borde de la placa, es importante conocer el sitio en donde fue colocada la muestra para calcular el R_f posteriormente.

La muestra colocada se deja secar un tiempo prudente dependiendo del solvente en el que se encuentra para evitar coleos y superposición de los analitos presentes en la misma. El extremo de la placa más próximo al sitio o punto donde se colocó la muestra, se sumerge en un disolvente apropiado contenido en la cámara adecuada. El origen, sitio donde se colocó la muestra debe quedar por fuera de la superficie del disolvente.

El recipiente se tapa inmediatamente y se observa el movimiento ascendente del frente del disolvente sobre la placa y las sustancias o componentes de la muestra que se desplazan a diferentes velocidades.

En la cromatografía ascendente se saca la placa de la cámara cuando el frente ha recorrido la distancia deseada. Con un lápiz de grafito se marca la posición alcanzada por el frente del disolvente. Se deja secar la placa y se observa y registra la posición de las manchas observables con luz natural, después las que aparecen al examinar el papel con luz ultravioleta y finalmente, las que se forman por la acción de agentes cromógenos. Cuando las mezclas son complejas, suele resultar insuficiente un sistema de disolventes para separar todos sus componentes. En estos casos, conviene aplicar la cromatografía bidimensional, desplazando la mezcla primero con un sistema disolvente y después con otro sistema que se desplace en dirección perpendicular al primero, lo que casi duplica el camino recorrido por los componentes de la mezcla y, por entrar en juego dos sistemas de disolventes de polaridad diferente, se favorece aún más la separación o resolución de los componentes. ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

El movimiento diferencial de los solutos es consecuencia de la distribución selectiva entre la fase estacionaria, constituida por la sílica gel o las sustancias adheridas a ella, y el disolvente (fase móvil), que puede ser totalmente orgánico o una solución orgánica saturada de agua u otras sustancia inorgánicas.⁽⁷⁾⁽⁸⁾

Las placas cromatográficas deben cortarse cuidadosamente evitando que sufran daño, descascaramiento o dobleces.

En toda la cromatografía, se intenta conseguir una buena resolución o separación de los componentes de una mezcla y reproducibilidad de los valores de R_f . Es decir, que no se superpongan las manchas de cada componente, que estas manchas sean lo más compactas posible y que, con un control mínimo, sean reproducibles las velocidades con que se mueven las sustancias y el frente del disolvente.

Los disolventes constituyen el factor más importante en la cromatografía en capa fina. Su selección es crítica, ya que los disolventes determinan la selectividad del sistema cromatográfico. Para escogerlos hay que considerar la naturaleza química de las sustancias que se desean separar y la viscosidad y la polaridad del disolvente. Se ha utilizado miles de sistemas de disolventes; sin embargo, la experiencia de numerosos investigadores aconseja tabular los más efectivos de acuerdo con su polaridad creciente.⁽⁷⁾

Por lo general, los disolventes están constituidos por dos fases, la orgánica y la acuosa. La atmósfera de la cámara cromatográfica debe estar saturada de ambas fases. Las separaciones logradas con estos sistemas se deben primordialmente a la separación selectiva de los solutos entre ambos líquidos.

3.3.3.1. Valores de relación de frente (R_f) y distancia recorrida por sustancia patrón (R_x).

En la cromatografía, el comportamiento migratorio de una sustancia se describe en función de la relación de frente (R_f). Es decir, el cociente de la distancia recorrida por la mancha de la sustancia y la distancia recorrida, al mismo tiempo, por el disolvente. Si se

considera la distancia recorrida por una sustancia patrón x, los valores se denominan R_x . La distancia de migración del soluto se puede medir desde el punto de origen hasta el centro geométrico de la mancha o punto de máximo ascenso de la mancha o a los límites de la mancha principal o a los de su cola. Lo que importa es la constancia en la forma de medir las distancias.

3.3.3.2. Reproducibilidad de los valores de relación de frente (R_f).

Las condiciones experimentales influyen considerablemente en los valores de R_f , por lo que, por sí solos, no bastan para identificar inequívocamente a una sustancia. Entre los factores que influyen en el valor de R_f están: el envejecimiento y composición del disolvente; la naturaleza, humedad y tratamiento de la placa; el flujo de aire en la cámara; la temperatura, condiciones de equilibrio, cambio en la composición del disolvente al fluir sobre la placa; las dimensiones de la cámara de desarrollo; las impurezas de la muestra. Todas estas variables influyen muy poco en los valores de R_x y en consecuencia estos son más reproducibles.

Para incrementar la reproducibilidad de los R_f conviene:

- Mantener la cámara de desarrollo a una temperatura prácticamente constante, cambios menores de $\pm 5^\circ\text{C}$.
- Preparar la fase móvil cuando se va a utilizar mezclándola bien.
- Saturar la cámara cromatográfica un tiempo definido para que siempre sea igual para ese procedimiento.
- Almacenar las placas cromatográficas adecuadamente, con baja humedad.
- Dejar que las manchas aplicadas en la placa sequen por un tiempo definido para evitar las colas.
- Mantener la cámara herméticamente cerrada durante el desarrollo cromatográfico.
- Dejar secar la placa tiempo suficiente después de haber sido desarrollada.⁽⁷⁾

3.3.3.3. Artefactos y zonas anormales.

Idealmente, cada soluto deberá localizarse como una mancha compacta redonda u ovalada. En la práctica después del desarrollo, se encuentran zonas con colas o porciones difusas, aplanadas o con otras distorsiones. Hay compuestos que pueden dar dos o más manchas bien definidas (multiplicación de zonas). Aunque las manchas

formadas no tengan el tamaño y forma ideal, el sistema cromatográfico puede ser útil si la reproducibilidad proporciona la separación deseada. Las manchas se deforman por numerosas causas, con frecuencia desconocidas, si bien en muchos casos se sabe cómo evitarlas. Por ejemplo, aplicando las muestras en disolución lo más diluida posible y también que el flujo del disolvente sea constante.

Las colas pueden desaparecer si se disminuye la concentración de la mancha, si se modifica la fase estacionaria, también si se seca la mancha antes del desarrollo de la placa.⁽⁴⁾

3.3.3.4. Composición y preparación de las placas cromatográficas.

El adsorbente se mezcla con un aglutinante, a menudo yeso; esta mezcla se suspende en agua y se deposita sobre una placa de vidrio o sobre una superficie plana rígida, metálica o de un material plástico, por medio de un dispositivo embadurnador apropiado. Al secarse, la suspensión queda adherida a la placa de vidrio, bien directamente o por efecto de un aglutinante, como una capa fina y rugosa de adsorbente de un espesor de 0.1 a 2 mm. Esta capa puede utilizarse en cromatografía en forma similar a una hoja de papel. Pero, ahora la separación depende de las propiedades adsorbentes de la capa, tal como si el adsorbente estuviera rellenando una columna. Por esta razón, a la cromatografía en capa fina se le ha llamado a veces cromatografía en columna abierta.⁽⁶⁾⁽⁷⁾

Además de los adsorbentes tradicionales, hay técnicas basadas en el empleo de capas de cambiadores iónicos, geles de filtración y sólidos cubiertos de líquido. Actualmente se utilizan estos materiales y sus combinaciones, junto con muchas variedades de disolventes, en la separación de todo tipo de compuestos. Lo anterior hace de la cromatografía en capa fina un método analítico versátil, sensible en alto grado y rápido para separar en forma bien definida compuestos estructuralmente parecidos.⁽⁷⁾

En la superficie de un adsorbente se encuentra un elevado número de centros activos en los que pueden adsorberse sustancias. La cantidad de sustancia adsorbida y la estabilidad de la adsorción dependen (siendo los demás factores constantes) de la fuerza de los centros activos (energía superficial por unidad de superficie) y su número (superficie por unidad de peso). Cuanto mayores sean ambos parámetros mayor es la

actividad del adsorbente y por tanto adsorción-desorción se desplaza hacia la adsorción, lo que en la práctica significa recorridos más cortos y R_f s menores.⁽⁹⁾

3.3.3.5. Selección de sistemas de disolventes.

Dependiendo del adsorbente, de su actividad y de la clase de los compuestos empleados como solutos, se pueden usar una gran variedad de disolventes: disolventes puros de las series eluotrópicas, mezcla de disolventes y también disolventes totalmente acuosos, totalmente orgánicos, acuoso orgánicos e iónicos.⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾

Si un disolvente puro no separa bien la mancha, se ensayan mezclas de disolventes que contengan uno que la desplace mucho y otro que no la mueva. Al usar mezclas de disolventes, conviene recordar que pequeñas variaciones en composición pueden cambiar mucho los valores de R_f , así como también la resolución de la separación.

Mezclas diversas de disolventes pueden originar iguales desplazamientos de una misma mancha. A estas mezclas se les llama equieluotrópicas.

La elección del eluyente también influye decisivamente en la separación. El eluyente disuelve del adsorbente las sustancias a separar, haciéndolas avanzar. Cuanto más eluyente se adsorbe sobre el adsorbente, mayor es el poder de elución de éste. Si la sustancia tiene mayor afinidad por el eluyente que por el adsorbente, se eluye más próxima al frente.

Se ha comprobado la utilidad de ordenar los eluyentes en una sucesión de poder de elución creciente. Esta "serie eluotrópica" se corresponde esencialmente con la ordenación de los eluyentes según su polaridad o su constante dieléctrica. Estrictamente hablando, una serie eluotrópica es válida sólo para un adsorbente determinado.⁽⁶⁾

3.3.3.6. Métodos de desarrollo en cromatografía de capa fina.

El desarrollo unidimensional ascendente es el método más sencillo en cromatografía en capa fina y en consecuencia el más usado. La fuerza gravitatoria limita el ascenso de disolventes y manchas. Las placas se acomodan en cámaras de vidrio de fondo plano, en cuyas paredes se ha colocado un papel filtro empapado en el disolvente

que cubre el fondo de la cámara. Esto asegura buena y rápida saturación de la cámara con el vapor del disolvente. El borde inferior de la placa se sumerge unos 5 a 10 mm en el disolvente, sin que llegue a la línea de origen. Se ha comprobado que el ángulo de colocación de la placa influye en la forma de las manchas y en la velocidad del desarrollo.⁽⁶⁾

El interior de las cámaras de pequeño volumen se satura rápidamente de los vapores del disolvente, lo cual acelera la cromatografía y aumenta la resolución.

Otros métodos de desarrollo son el desarrollo descendente, el desarrollo horizontal, pero estos son poco utilizados en cromatografía en capa fina. El desarrollo múltiple, en el que la placa se desarrolla en una fase móvil hasta una altura determinada, luego se saca y seca, y se desarrolla en la misma mezcla de disolvente pero en distinta proporción hasta una altura mayor que la anterior y así sucesivamente; de esta manera se acrecienta la longitud de desarrollo. El desarrollo bidimensional (2 dimensiones) también es muy utilizado.⁽⁶⁾

3.3.3.7 Localización de zonas. Identificación y documentación.

a) Localización

Luego del desarrollo se deben localizar las manchas en la placa mediante algún mecanismo revelador si las manchas fueran incoloras, esto mediante la utilización de luz ultravioleta 254 nm, un agente cromógeno, u otro método, actualmente existen equipos especializados (scanner o densitómetros) que permiten la localización de la mancha de una manera automatizada, haciendo un barrido a diferentes longitudes de onda, mediante la utilización de lámparas específicas, sobre la placa estudiada, dando por resultado la localización exacta de la mancha.⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾

b) Identificación

Las manchas se identifican comparando la migración con la de un compuesto de referencia, y mediante los densitómetros se puede determinar la longitud de onda exacta a la cual el analito tiene su pico de mayor absorbancia o fluorescencia.⁽¹³⁾

c) Documentación

Hay varias maneras de conservar las separaciones en cromatografía en capa fina. Las manchas separadas pueden delinearse sobre la placa, puede guardarse un registro fotográfico y al mismo tiempo también debe guardarse el espectro que proporciona el densitómetro.

3.3.3.8. Aplicador utilizado en la cuantificación de cotrimoxazol.

En el mercado existen distintas marcas de aplicadores, los cuales se acoplan a la técnica de cromatografía en capa fina para que la aplicación se lleve a cabo de una forma sistemática y uniforme que permita una mejor cuantificación al identificar la muestra. El utilizado en esta investigación es el Camag Linomat 5.⁽¹³⁾

El Camag Linomat 5 es un dispositivo aplicador semiautomático de muestra para utilizar en el la cromatografía cualitativa, cuantitativa y preparativa. El Linomat 5 esta controlado por un software recientemente diseñado “winCATS Planar Chromatography Manager”. winCATS maneja, monitorea y reporta todos los parámetros y pasos del análisis de cromatografía en capa fina incluyendo la definición del material de la placa, la aplicación de la muestra, derivatización, desarrollo y evaluación. (CAMAG LINOMAT 5 Instruction Manual, 0.1-05-E, Manual, January 2005).⁽¹³⁾

3.3.3.9. Densitómetro utilizado en la cuantificación de cotrimoxazol.

En el mercado existen distintas marcas de densitómetros, los cuales se acoplan a la técnica de cromatografía en capa fina para la identificación de las muestras aplicadas. El utilizado en esta investigación es el Camag TLC Scanner 3.

El Camag TLC Scanner 3 está diseñado para mediciones densitométricas en cromatografía en capa fina y otros objetos hasta un tamaño de 200 x 200 mm.

El scanner por el mismo realiza la medición densitométrica; los datos obtenidos son procesados por la computadora conectada corriendo el programa de Camag TLC Evaluations software (CATS).

El Scanner fue fabricado para asegurar la conformidad con BPL (Buenas prácticas de laboratorio). (CAMAG TLC SCANNER 3, Instruction Manual, 0.1-0.7-E, Manual, Septiembre 2000-AG / January 2007).⁽¹³⁾

3.3.4. Aplicación de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC)

La cromatografía líquida de alta precisión, resolución o eficacia, o *high performance liquid chromatography* (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en química analítica en general y considerada fundamental en el análisis de principios activos de medicamentos. También se la denomina a veces cromatografía líquida de alta presión o *High pressure liquid chromatography* (HPLC), aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso. La HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica tal y como lo indican los fundamentos de separación cromatográfica presentados hasta este momento en secciones previas de esta investigación.

El fundamento que rige esta técnica es aquel en el cual el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como *elución en gradiente*. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de

acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas con tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.

IV. Justificación

La cromatografía en capa fina es de las primeras técnicas utilizadas para la labor química de identificación y cuantificación de sustancias, aún frente a los recientes y rápidos avances de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Sin embargo, no es una técnica que deba dejarse a un lado sobre todo por las ventajas que la misma presenta. Es una técnica relativamente sencilla que puede ser acoplada a equipos de análisis químico instrumental, el consumo de muestra es bajo, necesita poca purificación de la muestra, utiliza pequeñas cantidades de solventes en comparación con otras técnicas similares, y por lo tanto genera menos desechos contaminantes que representan un riesgo ambiental significativo. Debido a los avances tecnológicos existen equipos que permiten que la cromatografía en capa fina sea hoy en día, una técnica más automatizada, proporcionándole mayor exactitud y precisión.

La separación, identificación y cuantificación de 5-[(3,4,5-trimetoxi-fenil)metil]-2,4-pirimidindiamina (trimetoprim) y 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazol) bencensulfonamida (sulfametoxazol) del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones se encuentra descrita en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y se lleva a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), dado que es la técnica que en los últimos años ha avanzado más rápido en instrumentación y por tanto, en estandarización de metodologías. Y dado que dicha farmacopea es usualmente la primera referencia para metodologías utilizadas en el análisis de estos compuestos, es la técnica de aplicación más extendida. La Farmacopea Internacional, la USP y la Farmacopea Japonesa también proponen como alternativa la cromatografía en capa fina preparativa, sin embargo esta técnica se utiliza con fines de identificación cualitativa y hasta cierto punto semicuantitativa. Esto último dado que únicamente se utiliza para verificar si los principios activos se encuentran en un rango de concentraciones en la presentación farmacéutica.

La investigación efectuada constituye el desarrollo de una técnica instrumental alternativa que supera a la variante preparativa en cuanto a que no es únicamente para identificación, sino que se logra determinar la concentración de manera eficaz de los compuestos 5-[(3,4,5-trimetoxi-fenil)metil]-2,4-pirimidindiamina (trimetoprim) y 4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazol)bencensulfonamida (sulfametoxazol) del cotrimoxazol en concentraciones variables que dependen de la presentación, uso y forma farmacéutica

del medicamento en particular que se está analizando. Por otra parte la detección es altamente sensible, debido a la aplicación de la técnica densitométrica.

Por otra parte, la técnica desarrollada tiene varias ventajas sobre la técnica de HPLC ya que se puede apreciar la separación cromatográfica completa pudiendo observar al mismo tiempo la relación de componentes y la formación de colas o manchas arrastradas que se conocen como "coleo". Además, la técnica permite evitar la contaminación por muestras anteriores ya que el sistema de separación se utiliza una única vez, sin incrementar los costos significativamente utilizando pre-columnas o complicando el procedimiento como lo supone el reacondicionamiento de la columna o el cambio de la misma. Y la optimización de la metodología de separación para los compuestos en particular se efectúa de forma rápida y económica, factor de mucho peso cuando se optimizan metodologías en HPLC donde la fase estacionaria representa un obstáculo económico sobre todo.

Un factor, que en el caso de la cuantificación de trimetoprim y del sulfametoxazol del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones resulta útil, es la posibilidad de separar el mayor número posible de muestras simultáneamente; ahorrando tiempo y costo. Además de eluir a la vez las sustancias estándar bajo condiciones idénticas.

Considerando además, que las determinaciones de trimetoprim y del sulfametoxazol del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones se llevan a cabo con alta frecuencia en laboratorios de análisis de medicamentos, dado que las variadas presentaciones farmacéuticas constituyen sustancias antibacterianas de amplio espectro, se propone una técnica analítica alternativa viable con gran potencial y que es poco utilizada en la región Centroamericana. Por tanto, el desarrollo de la misma en Guatemala es de gran importancia.

Por tanto, considerando el uso extendido que tiene la técnica de HPLC como ya se señaló y considerando las ventajas que representa la técnica de capa fina; se evaluaron los resultados de ambas técnicas y en función de la media de las diferencias de estos, se estableció que la técnica en capa fina es adecuada para separar y cuantificar los compuestos 5-[(3,4,5-trimetoxi-fenil)metil]-2,4-pirimidindiamina (trimetoprim) y 4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazol)bensulfonamida (sulfametoxazol) del cotrimoxazol en tabletas y suspensión.

V. Objetivos

5.1. Objetivo General

4.1.1. Separar y cuantificar los compuestos 5-[(3,4,5-trimetoxi-fenil)metil]-2,4-pirimidindiamina (trimetoprim) y 4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazol)bensulfonamida (sulfametoxazol) del cotrimoxazol en tabletas y suspensión.

5.2. Objetivos Específicos

5.2.1. Aplicar la técnica de cromatografía en capa fina para separar los compuestos 5-[(3,4,5-trimetoxi-fenil)metil]-2,4-pirimidindiamina (trimetoprim) y 4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazol)ben sulfonamida (sulfametoxazol) del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones.

5.2.2. Identificar los compuestos 5-[(3,4,5-trimetoxi-fenil)metil]-2,4-pirimidindiamina (trimetoprim) y 4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazol)bensulfonamida (sulfametoxazol) del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones, empleando estándares de pureza certificada para el proceso de comparación de las relaciones de flujo (Rf).

5.2.3. Seleccionar el mejor sistema de solventes para la fase móvil de tal manera que se obtenga la separación de los compuestos de manera selectiva y eficaz, sin porciones difusas ni distorsiones del analito en la fase estacionaria.

5.2.4. Cuantificar utilizando las técnicas de densitometría UV y HPLC, los compuestos 5-[(3,4,5-trimetoxi-fenil)metil]-2,4-pirimidindiamina (trimetoprim) y 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazol)bensulfonamida (sulfametoxazol) del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones.

5.2.5. Comparar la media de las diferencias de los resultados obtenidos por medio de cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta resolución, para establecer si la técnica en capa fina es adecuada para la separación y cuantificación de los compuestos 5-[(3,4,5-trimetoxi-fenil)metil]-2,4-pirimidindiamina (trimetoprim) y 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazol)bensulfonamida (sulfametoxazol) del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones.

VI. Hipótesis

6.1. La media de las diferencias de los resultados obtenidos por medio de cromatografía de capa fina y por medio de cromatografía líquida de alta resolución es igual a cero al aplicar la prueba de t de Student pareada con un intervalo de confianza del 95%.

VII. Materiales y métodos

7.1. Universo

Productos farmacéuticos en tabletas y suspensión de cotrimoxazol ingresadas al Laboratorio de Análisis y Servicios, S.A. (Laser).

7.2. Muestra

Muestras que contienen cotrimoxazol para cuantificación ingresadas al Laboratorio de Análisis y Servicios, S.A. (Laser) ingresadas en el período comprendido entre enero y mayo de 2009. Siendo el total de muestras ingresadas en ese período de 19.

7.3. Materiales

7.3.1. Equipo

- Aplicador de muestras Linomat 5 Camag
- Densitómetro TLC Scanner 3 Camag
- Balanza analítica Sartorius TE214S
- Baño ultrasónico Branson 1510
- Pipeta automática 5 mL Thermo Finnpiette
- Pipeta automática 10 µL Brand Transferpette S
- Estufa con agitación CORNING

7.3.2. Reactivos

- Estándar de trimetoprim
- Estándar de sulfametoxazol
- Cloroformo (grado analítico)
- Metanol (grado analítico)
- Agua desmineralizada
- Nitrógeno gaseoso al 99.95 %
- Placas cromatográficas TLC sílica gel 60 F₂₅₄

7.3.3. Cristalería

- Cámara cromatográfica de 20 x 10 cm
- Cámara cromatográfica de 10 x 10 cm

- Cámaras cromatográfica de 5 x 5 cm
- Balones volumétricos de 25 mL
- Puntas para pipeta automática 5 mL
- Puntas para pipeta automática de 10 µL
- Mortero
- Pistilo
- Embudos plásticos
- Beakers de 50 mL
- Jeringa de 100 µL
- Espátula

7.4. Método

7.4.1. Diseño de la investigación

Investigación aplicada según su propósito y descriptiva según su nivel de explicación, en la cual se determinó si la técnica de cromatografía en capa fina es pertinente para la separación, identificación y cuantificación de los compuestos 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4- pirimidindiamina (trimetoprim) y 4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazol) bencensulfonamida (sulfametoxazol) del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones.

7.4.2. Recopilación de información previa

Se recopiló información obtenida de estudios descriptivos previos en los cuales a través de técnicas analíticas instrumentales se realizaron determinaciones de cotrimoxazol.

7.4.3. Muestreo

Se tomaron las muestras que contienen cotrimoxazol para cuantificación ingresadas al Laboratorio de Análisis y Servicios, S.A. (Laser) ingresadas en el período comprendido entre enero y mayo de 2009, que en total suman 19 muestras.

7.4.4. Procedimiento para aplicación de la técnica de cromatografía en capa fina

7.4.4.1. Preparación de estándares

a) Trimetoprim 4.0 mg/mL

- Pesar 0.1 g de estándar de trimetoprim
- Aforar en un balón de 25 mL con metanol
- Sonicar durante 5 minutos

b) Sulfametoxazol 4.0 mg/mL

- Pesar 0.1 g de estándar de sulfametoxazol
- Aforar en un balón de 25 mL con metanol
- Sonicar durante 5 minutos

7.4.4.2. Preparación de muestras

a) Tabletas

- Pesar 10 tabletas para masa promedio
- Pulverizar 5 tabletas
- Pesar la masa equivalente que contenga 100 miligramos de trimetoprim
- Aforar en un balón de 25 mL con metanol
- Sonicar durante 5 minutos
- Pesar la masa equivalente que contenga 100 miligramos de sulfametoxazol
- Aforar en un balón de 25 mL con metanol
- Sonicar durante 5 minutos

b) Suspensiones

- Agitar fuertemente la muestra para homogenizarla
- Medir el volumen equivalente que contenga 100 miligramos de trimetoprim
- Aforar en un balón de 25 mL con metanol
- Sonicar durante 5 minutos
- Medir el volumen equivalente que contenga 100 miligramos de sulfametoxazol
- Aforar en un balón de 25 mL con metanol

- Sonicar durante 5 minutos

7.4.4.3. Aplicación de estándares y muestras

- Aplicar 2 μ L de estándares a 1 cm del borde inferior de la placa cromatográfica.
- Aplicar 2 μ L de muestras a 1 cm del borde inferior de la placa cromatográfica.

7.4.4.4. Desarrollo de la cromatoplaça

- Colocar papel filtro dentro de la cámara cromatográfica
- Medir y colocar en la cámara cromatográfica 4.6 mL de cloroformo, 0.38 mL de metanol y 0.025 mL de agua.
- Mezclar y dejar saturar la cámara cromatográfica durante 10 minutos.
- Colocar la placa cromatográfica dentro de la cámara y dejar correr 6 cm.
- Retirar la placa de la cámara cromatográfica
- Dejar secar la placa durante 10 minutos.

7.4.4.5. Cuantificación de estándares y muestras

- Introducir la cromatoplaça en el densitómetro
- Escanear la cromatoplaça a 285 nanómetros utilizando la lámpara de deuterio.
- Determinar la concentración de estándares y muestras

7.4.5. Procedimiento para aplicación de la técnica de HPLC

7.4.5.1. Preparación de la fase móvil

- Mezclar 1400 mL de agua, 400 mL de acetonitrilo y 2.0 mL de trietilamina en un matraz volumétrico de 2000 mL.
- Dejar que se equilibre a temperatura ambiente y ajustar con hidróxido de sodio 0.2 N o diluir ácido acético glacial (1 en 100) a un pH de 5.9 +/- 0.1.
- Diluir a volumen con agua y filtrar a través de una membrana de 0.45 μ m, haciendo ajustes si fuera necesario.

7.4.5.2. Preparación de estándar

- Disolver en metanol cantidades de trimetoprim y de sulfametoxazol pesadas con exactitud y diluir cuantitativamente con metanol para obtener una solución que contenga, en cada mL, aproximadamente 0.32 mg y 0.32J mg, respectivamente, siendo J el cociente de la cantidad declarada, en mg de sulfametoxazol entre la cantidad declarada, en mg, de trimetoprim en la forma farmacéutica.
- Transferir 5.0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil y mezclar para obtener una preparación estándar con una concentración conocida de aproximadamente 0.032 mg de trimetoprim por mL y de 0.032J mg de sulfametoxazol por mL.

7.4.5.3. Preparación de valoración de suspensión

- Transferir un volumen de suspensión oral medido con exactitud, que equivalga aproximadamente a 80 mg de sulfametoxazol, a un matraz volumétrico de 50 mL con ayuda de aproximadamente 30 mL de metanol.
- Someter la mezcla a ultrasonido durante aproximadamente 10 minutos, agitando ocasionalmente.
- Dejar que se equilibre a temperatura ambiente, diluir a volumen con metanol, mezclar y centrifugar.
- Transferir 5.0 mL del sobrenadante a un segundo matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil, mezclar y filtrar.

7.4.5.4. Sistema cromatográfico

- Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 3.9 mm x 30 cm rellena con material adecuado para la separación (columna 100 RP-18 de fase reversa para separación por adsorción). Utilizando la fase móvil descrita en 7.4.5.1., la velocidad de flujo debe ser aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar la preparación estándar y registrar el cromatograma; los tiempos de retención relativos son de aproximadamente 1.0 para trimetoprim y 1.8 para sulfametoxazol, la resolución, R, entre sulfametoxazol y trimetoprim no es menor de 5.0; el factor de asimetría para los picos de trimetoprim y sulfametoxazol no es mayor de 2.0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2.0%.

7.4.5.5. Procedimiento

- Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 20 μL) de la preparación estándar y de la preparación de valoración en el cromatógrafo, registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a los picos principales.
- Calcular las cantidades, en mg, de trimetoprim y de sulfametoxazol en cada mL de la suspensión oral tomada, por la fórmula:

$$(500 C / V)(r_v / r_s)$$

En donde C es la concentración, en mg por mL, del estándar de referencia apropiado en la preparación estándar; V es el volumen, en mL, de la suspensión oral tomada; y r_v y r_s son las respuestas de los picos del analito correspondiente obtenidos a partir de la preparación de valoración y de la preparación estándar respectivamente.

7.4.5.6. Preparación de valoración tabletas

- Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 tabletas. Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL una porción del polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 160 mg de sulfametoxazol.
- Agregar aproximadamente 50 mL de metanol y someter a ultrasonido, con agitación intermitente, durante 5 minutos.
- Dejar que se equilibre a temperatura ambiente, diluir a volumen con metanol, mezclar y filtrar.
- Transferir 5.0 mL de filtrado transparente a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil y mezclar.

7.4.5.7. Procedimiento

- Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μL) de la preparación estándar y de la preparación de valoración, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales.

- Calcular las cantidades, en mg, de trimetoprim y sulfametoxazol en la porción de tabletas tomada, por la fórmula:

$$1000 C(r_v / r_s)$$

En donde C es la concentración, en mg por mL, del estándar de referencia apropiado en la preparación estándar; y r_v y r_s son las respuestas del analito correspondiente obtenidas de la preparación de valoración y de la preparación estándar, respectivamente.

7.5. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó aplicando una prueba de *t de Student pareada*, se comparó el resultado cuantitativo de las muestras trabajadas por cromatografía de capa fina y las mismas muestras trabajadas por cromatografía de alta resolución, a partir de muestras ingresadas al Laboratorio de Análisis y Servicios, S.A. en el periodo, siendo n_A el tamaño de la primera muestra y n_B el de la segunda, la cantidad:

$$t = \frac{(\bar{y}_B - \bar{y}_A) - (\mu_B - \mu_A)}{s \sqrt{1/n_A + 1/n_B}}$$

(donde \bar{y}_B \bar{y}_A son las medias muestrales, μ_B μ_A las correspondientes medias poblacionales, s la desviación típica muestral conjunta), se distribuye como una *t de Student* con $n_A + n_B - 2$ grados de libertad, proporcionando una referencia probabilística con la cual juzgar si el valor observado de diferencia de medias nos permitiría mantener la hipótesis planteada, que era habitualmente la hipótesis de igualdad de las medias, o lo que es lo mismo nos permitiría verificar si era razonable admitir que $\mu_B - \mu_A = 0$ a la luz de los datos obtenidos en el análisis.

Para cada una de las muestras evaluadas, según la 29va edición de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés), la variación permitida para el trimetoprim y el sulfametoxazol en las presentaciones de tabletas y suspensiones entre el valor reportado y el valor obtenido como respuesta analítica debe estar comprendido del 90% al 110%.

VIII. Resultados

Tabla I
Trimetoprim + Sulfametoxazol en diferentes fases móviles

Estándar	Masa estándar (g)	Solvente	Anexo	Fase móvil	Longitud de Onda (nm)	Observaciones
Trimetoprim Sulfametoxazol	0.1004 0.1010	metanol	1	Cloroformo- metanol-agua 4.6-0.38- 0.025 mL	285	Separación y corrimiento adecuado, mancha no presenta cola ni es amorfa
Trimetoprim Sulfametoxazol	0.1004 0.1010	metanol	2	Etanol-agua- hidróxido de amonio 4.25- 0.55-0.2 mL	285	Poca separación de picos, manchas corren con solvente hasta el frente presenta cola y es amorfa
Trimetoprim Sulfametoxazol	0.1004 0.1010	metanol	3	Benceno- acetato de etilo 4.75-0.25 mL	285	Poca separación de picos, poco corrimiento
Trimetoprim Sulfametoxazol	0.1004 0.1010	metanol	4	Isopropanol- agua- cloroformo 5-2-1 mL	285	Separación adecuada, corrimiento adecuado, manchas amorfas
Trimetoprim Sulfametoxazol	0.1004 0.1010	metanol	5	Cloroformo- etanol 3-2 mL	285	Separación adecuada, corrimiento adecuado, manchas amorfas presencia de colas
Trimetoprim Sulfametoxazol	0.1004 0.1010	metanol	6	Butanol-agua- hidróxido de amonio 3.25- 1.10-0.65 mL	285	Separación adecuada, corrimiento adecuado, manchas amorfas presencia de colas

Fuente: resultados experimentales

Tabla II

Resultados para el trimetoprim

Fase móvil: cloroformo – metanol – agua (4.6 - 0.38 – 0.025 mL)

Longitud de onda de lectura: 285 nm

Muestra No.	mg trimetoprim teóricos	mg trimetoprim obtenidos por CCF	mg trimetoprim obtenidos por HPLC	Diferencia mg trimetoprim obtenidos por CCF y HPLC	% de trimetoprim en la muestra según CCF	% de trimetoprim en la muestra según HPLC
1	40.00	39.61	37.14	2.47	99.03	92.86
2	160.00	159.49	153.85	5.64	99.68	96.16
3	40.00	39.20	37.24	1.96	98.01	93.11
4	40.00	39.06	36.93	2.13	97.66	92.33
5	160.00	157.47	163.35	-5.88	98.42	102.09
6	40.00	38.28	36.33	1.95	95.71	90.83
7	40.00	39.76	42.00	-2.24	99.40	105.00
8	40.00	37.05	40.49	-3.44	92.62	101.22
9	40.00	39.64	38.06	1.58	99.10	95.15
10	40.00	39.74	42.74	-3.00	99.35	106.85
11	160.00	146.97	157.62	-10.65	91.86	98.51
12	40.00	37.02	40.89	-3.87	92.54	102.22
13	40.00	37.56	39.85	-2.29	93.90	99.63
14	80.00	47.71	42.07	5.64	59.64	52.59
15	40.00	40.20	36.53	3.67	100.50	91.32
16	40.00	38.99	37.12	1.87	97.47	92.79
17	40.00	37.54	43.19	-5.65	93.85	107.97
18	40.00	38.15	36.04	2.11	95.38	90.11
19	40.00	37.59	42.13	-4.54	93.97	105.32

Fuente: resultados experimentales

Tabla III

Resultados estadísticos para trimetoprim

Grupo	mg trimetoprim obtenidos por HPLC	mg trimetoprim obtenidos por CCF
Media	57.4226	58.0826
Desviación estándar	43.3695	44.6647
Error estándar de la media	9.9496	10.2468
Número de datos	19	19

Fuente: resultados experimentales

Tabla IV

Resultados t Student pareada para trimetoprim

Probabilidad	0.5189
Media de mg de trimetoprim obtenidos por HPLC menos mg trimetoprim obtenidos por CCF	-0.6600
Intervalo de confianza 95 % para la media	de -2.7675 a 1.4475
t Student	0.6579
Grados de Libertad	18
Error estándar de la diferencia	1.003

Fuente: resultados experimentales

Tabla V

Resultados para el sulfametoxazol

Fase móvil: cloroformo – metanol – agua (4.6 - 0.38 – 0.025 mL)

Longitud de onda de lectura: 285 nm

Muestra No.	mg sulfametoxazol teóricos	mg sulfametoxazol obtenidos por CCF	mg sulfametoxazol obtenidos por HPLC	Diferencia mg sulfametoxazol obtenidos por CCF y HPLC	% de sulfametoxazol en la muestra según CCF	% de sulfametoxazol en la muestra según HPLC
1	200.00	199.72	196.72	3.00	99.86	98.36
2	800.00	795.78	801.41	-5.63	99.47	100.18
3	200.00	197.58	188.84	8.74	98.79	94.42
4	200.00	194.87	196.37	-1.50	97.44	98.19
5	800.00	795.76	799.01	-3.25	99.47	99.88
6	200.00	191.13	188.13	3.00	95.56	94.06
7	200.00	205.59	206.18	-0.59	102.80	103.09
8	200.00	182.08	188.63	-6.55	91.04	94.32
9	200.00	203.55	195.21	8.34	101.78	97.61
10	200.00	202.60	199.73	2.87	101.30	99.87
11	800.00	737.30	742.47	-5.17	92.16	92.81
12	200.00	183.86	187.19	-3.33	91.93	93.59
13	200.00	183.02	190.24	-7.22	91.51	95.12
14	400.00	246.60	247.11	-0.51	61.65	61.78
15	200.00	202.26	197.41	4.85	101.13	98.71
16	200.00	197.09	196.73	0.36	98.55	98.37
17	200.00	182.74	185.88	-3.14	91.37	92.94
18	200.00	186.73	189.84	-3.11	93.36	94.92
19	200.00	195.00	202.36	-7.36	97.50	101.18

Fuente: resultados experimentales

Tabla VI

Resultados estadísticos para sulfametoxazol

Grupo	mg sulfametoxazol obtenidos por HPLC	mg sulfametoxazol obtenidos por CCF
Media	288.5926	289.4453
Desviación estándar	217.7111	219.3496
Error estándar de la media	49.9464	50.3222
Número de datos	19	19

Fuente: resultados experimentales

Tabla VII

Resultados t Student pareada para sulfametoxazol

Probabilidad	0.4548
Media de mg de sulfametoxazol obtenidos por HPLC menos mg sulfametoxazol obtenidos por CCF	-0.8526
95 % de intervalo de confianza de la diferencia anterior	de -3.2185 a 1.5132
t Student	0.7572
Grados de libertad	18
Error estándar de la diferencia	1.126

Fuente: resultados experimentales

IX. Discusión de resultados

Como se observa en la tabla I se preparó una solución de trimetoprim y sulfametoxazol en metanol, la cual se corrió en varias fases móviles, para lograr una separación adecuada de ambos ingredientes, un R_f apropiado; siendo importante que las manchas no presenten colas ni sean amorfas para una mejor cuantificación por parte del escáner. Algunas de las fases móviles seleccionadas para el corrimiento de las muestras fueron recomendadas por la bibliografía y otras fueron seleccionadas debido a su característica química de polaridad.

Otra razón importante del corrimiento de los ingredientes en distintas fases móviles fue la verificación del máximo de longitud de onda a la que debía leerse cada ingrediente, en este caso el máximo de longitud de onda determinado tanto para el trimetoprim como para el sulfametoxazol fue de 285 nm, en las distintas fases móviles utilizadas.

Un R_f apropiado según lo observado debe llevar la mancha del ingrediente aproximadamente a la mitad del trayecto o dicho de otro modo a la mitad de la placa cromatográfica del tamaño a utilizar, la razón de esta disposición es debido a que el R_f de la mancha cambiará de manera considerable según las condiciones ambientales del día de trabajo, temperatura y humedad; entonces si el R_f del analito es pequeño, es decir se encuentra cerca al punto de aplicación de la muestra, ciertas condiciones ambientales (humedad relativa y temperatura altas) favorecerán a que el ingrediente no se separe de su punto de aplicación, también cuando la mancha se desplace muy cerca del frente del solvente las condiciones ambientales (humedad relativa y temperatura bajas) pueden favorecer que la mancha se desplace hasta el frente del solvente. Para ambas situaciones la cuantificación se verá afectada, de ahí que se prefieran R_f s con valores aproximados a la mitad del recorrido del solvente.

Del párrafo anterior podemos deducir que el R_f de un ingrediente no es de ninguna manera confiable para la identificación del mismo, sino que en la cromatografía de capa fina debe correrse siempre un estándar del ingrediente en la misma placa cromatográfica que permita su inequívoca identificación.

Por tanto de la Tabla I de resultados se pudo establecer que las condiciones óptimas para llevar a cabo la cromatografía en capa fina son para la mezcla de fase móvil: cloroformo-metanol-agua en cantidades de 4.6-0.38-0.025 mL respectivamente.

La hipótesis planteada para este estudio fue que la media de las diferencias de los resultados obtenidos por medio de cromatografía de capa fina y por medio de cromatografía líquida de alta resolución es igual a cero al aplicar la prueba de t de Student pareada con un intervalo de confianza del 95%. Se planteó una prueba pareada dado que uno de los supuestos sobre el que habitualmente se fundamentan las pruebas estadísticas de comparación de grupos es que las observaciones pertenecientes a cada una de las muestras son independientes entre si, es decir, que no guardan relación. Esto dado que se asume es ese uno de los objetivos de la aleatorización. Sin embargo, en este estudio en particular, existe una falta de independencia entre las observaciones de los grupos dado que los valores de mg de cada principio activo en las distintas muestras es teóricamente uno que sólo ese par comparte y por tanto es una característica de diseño del estudio por lo que la prueba pareada da una mayor eficiencia al contraste estadístico al disminuir la variabilidad. Además con este tipo de diseño pareado lo que se dio es una mayor validez a las inferencias obtenidas, controlando y eliminando la influencia de variables extrañas cuyo efecto ya es conocido como la diferencia de cantidad de solventes, cantidad de muestra, condiciones ambientales y que se desea que no intervengan en el estudio al enmascarar los resultados al aplicar la cromatografía en capa fina o la cromatografía líquida de alta resolución.

Como se observa en la tabla III y en la tabla VI si se comparan los resultados cuantitativos en los dos grupos de datos obtenidos de la cromatografía líquida de alta resolución y de la cromatografía en capa fina, a partir de muestras extraídas de forma aleatoria de una población normal, como lo son las muestras que ingresan al laboratorio; los valores observados de diferencia de medias permite mantener la hipótesis planteada, la hipótesis de igualdad de las medias, o lo que es lo mismo permite verificar que es razonable admitir que la diferencia entre las medias poblacionales correspondientes es igual a 0, con 36 grados de libertad. Esto puede comprobarse a través de la aplicación de una prueba no pareada, pero no es este el objetivo del estudio.

Si se observan las tablas IV y VII, al ser la probabilidad muy próxima a 0.5 en ambos casos, se aprecia que hay razones para rechazar la hipótesis de que no existe diferencia entre la cuantificación de los ingredientes trimetoprim y sulfametoxazol por cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución. Los valores de probabilidad indican que estos dos grupos podrían o no ser iguales.

Ahora bien se sabe que hay varias variables que influyeron en los resultados obtenidos entre la que se cuenta la fase estacionaria utilizada por ambos métodos, siendo una placa de sílica gel en la cromatografía en capa fina y una columna con relleno del tipo 100 RP-18 de fase reversa para un proceso de adsorción en la de cromatografía líquida de alta resolución. También los efectos que los solventes provocan en cada sistema son diferentes, la cantidad de muestra utilizada para cada método difiere sustancialmente, esto aún sin tomar en cuenta las condiciones en la que cada experimento se lleva a cabo según sus requerimientos.

Es importante considerar que en este estudio se efectuó una comparación entre dos métodos y en este tipo de comparaciones “estadísticamente significativa no es científicamente importante”. Antes de interpretar el valor de probabilidad o el intervalo de confianza calculados a partir de los datos obtenidos, se debe pensar el tamaño de la diferencia que se está buscando. ¿Cuan grande será la diferencia para considerarla científicamente importante? O ¿cuan pequeña será para considerarla científicamente trivial? Se debe usar el sentido común para responder estas preguntas y las respuestas dependen del contexto del experimento realizado. Es por eso que se lleva a cabo el siguiente análisis.

En este caso la USP permite variaciones entre el 90 y el 110 % para este tipo de medicamentos y como se observa en la tabla II y V tanto los datos obtenidos por cromatografía en capa fina como los obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución se encuentran dentro de este rango excepto por una pareja de datos.

La pareja de datos número 14 como se observa en la tabla II y V tanto en cromatografía en capa fina como en cromatografía líquida de alta resolución presentan bajas concentraciones según lo reportado para el medicamento, aproximadamente 50 por

ciento, al investigar la procedencia de la muestra se observó que el medicamento fue manufacturado para uso veterinario, por lo que los controles de producción son diferentes de los medicamentos para uso humano y no existe una regulación para los mismos.

En la Gráfica no. 1 en Anexos puede observarse la diferencia que existe entre determinar la concentración del trimetoprim por el método de cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución. Como es claramente apreciable, la distribución por arriba y por abajo del 0 que corresponde a la hipótesis planteada es completamente aleatoria en ambos casos por lo cual no es evidente una mayor puntuación por término medio para ninguna de las dos técnicas aplicadas.

Luego, para confirmar esta observación cualitativa se aplicó la prueba pareada en la cual para el trimetoprim se obtuvieron los datos que se presentan en la tabla IV todo sobre la diferencia cuantitativa entre los pares. Los resultados de la media, de la t de Student que se distribuye ahora con 18 grados de libertad, y del intervalo de confianza inducen al valor más importante que es de la probabilidad a través de los cálculos respectivos.

Primero es necesario considerar que aunque se pierden grados de libertad, siendo por ese lado la prueba menos potente, sin embargo al disminuir la variabilidad, se aumenta la eficiencia de la prueba.

El valor de probabilidad, el cual es un valor que puede ir de cero a 1 indica la diferencia que hay entre ambas poblaciones. Un valor de probabilidad pequeño indicaría que la diferencia entre la aplicación de las dos técnicas no es una coincidencia, lo que induciría a concluir que la aplicación de ambas técnicas tiene distintas medias. Sin embargo el valor obtenido de 0.5189 es alto por lo cual el proceso analítico deductivo es el siguiente. Este valor indica que al aplicar las técnicas de cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución existe una diferencia que es una coincidencia producto de la aleatoriedad, lo que lleva a concluir que la aplicación de ambas técnicas tiene medias iguales, lo que es posible observar como ya se mencionó en la tabla III y mucho mas evidente en la Gráfica no. 1 de Anexos.

El valor obtenido de 0.5189 significa que hay un 51.89% de probabilidad de observar una diferencia tan grande como la observada aún cuando los resultados provenientes de la aplicación de ambas técnicas fuera sobre alícuotas de una misma muestra en condiciones idénticas. Visto de otra manera, si en una muestra idéntica se toman alícuotas al azar y una se corre por cromatografía en capa fina y la otra en cromatografía líquida de alta resolución, se obtendrá una diferencia menor que la observada en este estudio el 48.11% de los casos y más grande en el 51.89% de los casos.

Según este análisis y por los criterios convencionales aplicados a la prueba pareada, la diferencia de la aplicación de la técnica de cromatografía en capa fina y la técnica de cromatografía líquida de alta resolución es considerada no estadísticamente significativa para el análisis de trimetoprim.

Considerando el valor de probabilidad obtenido, no se tiene ninguna razón para concluir que la aplicación de alguna técnica tuvo algún efecto sobre el resultado obtenido. Que no es lo mismo que afirmar que la aplicación de la técnica no tuvo efecto. Únicamente no hay evidencia de tal efecto.

Sin embargo surge una cuestión interesante, ¿cuán grande puede ser el efecto de la aplicación de la técnica de cromatografía en capa fina en realidad? El promedio de la diferencia entre pares en este experimento no iguala la verdadera diferencia entre pares debido al azar. No existe forma de saber cual es la verdadera diferencia. El análisis estadístico que se obtuvo gracias al software del Departamento de Farmacología de la Universidad de San Diego en California presenta una incertidumbre del 95% como intervalo de confianza, lo que se traduce en que se puede estar 95% seguro que este intervalo contiene el efecto verdadero de la aplicación de la técnica. Y dado que el valor de probabilidad es mayor que 0.05, el intervalo de confianza al 95% inicia con un valor negativo de -2.7675 (representando una disminución) y aumentando hacia un valor positivo de 1.4475.

El intervalo de confianza entonces puede analizarse de distintas formas en un contexto científico más que estadístico y con ello concluir si se es científicamente importante o si no es necesario darle importancia. Considerando que la USP señala que las variaciones del trimetoprim deben estar entre un 90% y un 110% del valor reportado y que las variaciones obtenidas según los límites superior e inferior del intervalo de confianza con respecto a esos porcentajes marcan una disminución no significativa en cuanto al límite de confianza inferior y también un aumento no significativo en el límite de confianza superior, se puede llegar a una conclusión clara. La aplicación de la técnica por cromatografía en capa fina no tiene efecto y si lo llegara a tener este es pequeño.

En la Gráfica no. 2 en Anexos puede observarse la diferencia que existe entre determinar la concentración del sulfametoxazol por el método de cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución. En este caso aún no habiendo una tendencia completa, hay una mayor concentración de pares en los cuales el resultado obtenido en la cromatografía en capa fina es mayor al del HPLC. Se pudiera preveer una mayor puntuación por término medio para la cromatografía en capa fina pero confirmable únicamente a través del análisis estadístico.

En la aplicación de la prueba pareada para el sulfametoxazol se obtuvieron los datos que se presentan en la tabla VII, teniendo como fuente la diferencia cuantitativa entre los pares. Los resultados de la media, de la t de Student que se distribuye ahora con 18 grados de libertad, y del intervalo de confianza inducen igual que en el caso anterior al valor más importante que es de la probabilidad a través de los cálculos respectivos.

Aquí también se produce una pérdida de grados de libertad, teniendo el mismo efecto de volver la prueba menos potente, sin embargo al disminuir la variabilidad, se aumenta la eficiencia de la prueba.

En este caso el valor obtenido de 0.4588 es también alto por lo cual el proceso analítico deductivo es similar al anterior utilizado en el trimetoprim. Este valor indica que al aplicar las técnicas de cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución existe una diferencia que es una coincidencia producto de la aleatoriedad, lo

que lleva a concluir que la aplicación de ambas técnicas tiene medias iguales, lo que es posible observar como ya se mencionó en la tabla VII y en la Gráfica no. 2 de Anexos.

El valor obtenido de 0.4588 significa que hay un 45.88% de probabilidad de observar una diferencia tan grande como la observada aún cuando los resultados provenientes de la aplicación de ambas técnicas fuera sobre alícuotas de una misma muestra en condiciones idénticas. Visto de otra manera, si en una muestra idéntica se toman alícuotas al azar y una se corre por cromatografía en capa fina y la otra en cromatografía líquida de alta resolución, se obtendrá una diferencia menor que la observada en este estudio el 45.88% de los casos y mas grande en el 54.12% de los casos.

Según este análisis y por los criterios convencionales aplicados a la prueba pareada, la diferencia de la aplicación de la técnica de cromatografía en capa fina y la técnica de cromatografía líquida de alta resolución es considerada no estadísticamente significativa para el análisis de sulfametoxazol. Considerando el valor de probabilidad obtenido, no se tiene ninguna razón para concluir que la aplicación de alguna técnica tuvo algún efecto sobre el resultado obtenido. No hay evidencia de tal efecto.

El análisis estadístico que se obtuvo gracias al software del Departamento de Farmacología de la Universidad de San Diego en California presenta una incertidumbre del 95% como intervalo de confianza, lo que se traduce en que se puede estar 95% seguro que este intervalo contiene el efecto verdadero de la aplicación de la técnica. Y dado que el valor de probabilidad es mayor que 0.05, el intervalo de confianza al 95% inicia con un valor negativo de -3.2185 (representando una disminución) y aumentando hacia un valor positivo de 1.5132.

Considerando que la USP señala que las variaciones del sulfametoxazol debe estar entre un 90% y un 110% del valor reportado y que las variaciones obtenidas según los límites superior e inferior del intervalo de confianza con respecto a esos porcentajes marcan una disminución trivial en cuanto al límite de confianza inferior y también un aumento trivial en el límite de confianza superior, se puede llegar a una conclusión clara. La aplicación de la técnica por cromatografía en capa fina tiene un efecto muy pequeño

en la cuantificación del sulfametoxazol pero este se considera trivial por lo que la técnica es adecuada para tal efecto.

En cuanto a la hipótesis planteada, la media de las diferencias de los resultados obtenidos por medio de cromatografía de capa fina y por medio de cromatografía líquida de alta resolución no es igual a cero al aplicar la prueba de t de Student pareada con un intervalo de confianza del 95% por lo que la hipótesis se rechaza. Sin embargo la diferencia no es estadísticamente significativa y se debe a la aleatoriedad.

X. Conclusiones

- Para una mejor cuantificación se debe seleccionar la fase móvil que permita la presencia de una mancha sin colas ni amorfa para los ingredientes. La fase móvil mas adecuada para la separación y cuantificación del trimetoprim y el sulfametoxazol es la constituida por cloroformo-metanol-agua en cantidades de 4.6-0.38-0.025 mL respectivamente, cuando se usa la técnica de cromatografía en capa fina.
- Para determinar el máximo de longitud de onda cada ingrediente debe ser desarrollado en distintas fases móviles. La experimentación hizo evidente que la fase móvil descrita cloroformo-metanol-agua en cantidades de 4.6-0.38-0.025 mL respectivamente, requiere que la detección y cuantificación en el densitómetro se haga a 285 nm.
- La diferencia de la aplicación de la técnica de cromatografía en capa fina y la técnica de cromatografía líquida de alta resolución es considerada estadísticamente no significativa para la separación, identificación y cuantificación de trimetoprim y sulfametoxazol del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones.
- La aplicación de la técnica por cromatografía en capa fina no tiene efecto adverso sobre la separación, identificación y cuantificación del trimetoprim y tiene un efecto pequeño y estadísticamente no significativo para el sulfametoxazol del cotrimoxazol en tabletas y suspensiones por lo que los resultados obtenidos al aplicar la técnica deben ser considerados tan validos como los de la cromatografía líquida de alta resolución.
- La media de las diferencias de los resultados obtenidos por medio de cromatografía de capa fina y por medio de cromatografía líquida de alta resolución no es igual a cero al aplicar la prueba de t de Student pareada con un intervalo de confianza del 95% por lo que la hipótesis se rechaza. Sin embargo la diferencia no es estadísticamente significativa y se debe a la aleatoriedad.

XI. Recomendaciones

- Ampliar la aplicación de la técnica de cromatografía en capa fina a otros principios activos y probarlos en distintas fases móviles para seleccionar la mas adecuada para la separación, identificación y cuantificación.
- Desarrollar dichos principios activos en distintas fases móviles para determinar el máximo de longitud de onda a la que deben ser cuantificados.
- Es importante controlar la uniformidad de las condiciones ambientales referentes a temperatura y humedad para mejorar la exactitud en los distintos análisis.
- Correr siempre un estándar del ingrediente en la placa cromatográfica para la identificación del mismo.
- Respecto a los estándares de los ingredientes, deben prepararse aproximadamente a la misma concentración del ingrediente a aplicar, debido a que para algunos ingredientes más o menos concentración cambiará significativamente el Rf y se facilita el cálculo de la concentración de la muestra al utilizar el escáner para cuantificar.
- Debido a la matriz o a los excipientes presentes en la muestra algunas veces los estándares presentarán un Rf distinto al de los ingredientes presentes en la muestra, la diferencia sin embargo será mínima y por lo tanto despreciable.
- Cuando se utiliza un escáner para cuantificar el ingrediente en la cromatoplaça es importante la preparación del estándar a la misma concentración de la muestra a trabajar.
- Despreciar los cambios mínimos al Rf de la muestra debido a que pueden ser causados por la matriz o los excipientes de la misma.

- Evaluar la viabilidad de aplicar la técnica de cromatografía en capa fina al comparar los resultados obtenidos con los de las técnicas oficialmente propuestas por la USP a través de pruebas pareadas.

XII. Referencias

1. Fattorusso V., Ritter, O.; **Vademecum Clínico del diagnóstico al tratamiento**; Editorial El Ateneo; 2001; Pp. 51-53
2. **USP 30 Farmacopea de los Estados Unidos de América, NF 25 Formulario Nacional**; Editorial Port City Press; 2007; Pp. 3536-3539.
3. O'Neil, J., et. al.; **The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**; 14th Edition; Merck & Co. Inc.; Whitehouse Station; NY, USA; 2006. Pp. 6234.
4. Merck; **Cromatografía en la química farmacéutica**, Manual Práctico, HPLC, CL, CCF, HPTLC; 2005; Pp. 40-41.
5. Tammilehto, S.; **High-performance thin-layer chromatographic determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in pharmaceutical dosage forms**; J. Chromatogr. 1985; Pp. 323, 456-461.
6. Bauer, K., et. al.: **Thin Layer Chromatography –An Introduction-**; Merck; Germany; 1991; Pp 324.
7. Reich, E., Schibli, A.; **High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants**; Thieme; New York-Stuttgart; 2007; Pp. 435.
8. Han-Deinstrop, E.; **Applied Thin-Layer Chromatography. Best Practice and Avoidance of Mistakes**. John Wiley – VCH. Estados Unidos; 2002; Pp. 223.
9. Wall, P.; **Thin Layer Chromatography. A practical approach**. Royal Society of Chemistry, Inglaterra; 2005. Pp. 184.
10. Agbaba, D., et al; **Simultaneous TLC determination of cotrimoxazole and impurities of sulfanilamide and sulfanilic acid in pharmaceuticals**; J. Chromatogr. Sci. 1996; Pp. 34, 460-464.
11. Salomies, H.; **Quantitative HPTLC of sulfonamides in pharmaceutical preparations**; J. Planar Chromatogr. 1993; Pp. 6, 337-340.
12. Bhushan, R., Ali, I.; **TLC separation of sulfonamides on impregnated silica gel layers, and their quantitative estimation by spectroscopy**; J. Planar Chromatogr. 1995; Pp. 8, 245-247.
13. Camag; **Application Notes “ Instrumental Thin Layer Chromatography ”; Assay control of trimethoprim and sulfamethoxazol isolated from cotrimoxazol**. 2008; Pp. 5.

14. Kenyon, A., et al; **Rapid screening of pharmaceuticals by thin-layer chromatography: Analysis of essential drugs by visual methods**; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1995; Pp. 78, 41-49.
15. Williams, L., Bergensen, O.; **Towards an integrated platform for combinatorial library synthesis and screening**; Proc. Intern. Symp. On Planar Separations, Planar Chromatography; 2001; Pp. 81-90.
16. Babic, S., et al; **Determination of sulfonamides and trimethoprim in spiked water samples by solid-phase extraction and thin-layer chromatography**; J. Planar Chromatogr. 2005; Pp. 18, 423-426.
17. González, R.; **Caracterización de metabolitos primarios y secundarios en frijoles del género *Phaseolus*, especies: *P. lunatus L.*, *P. acutifolius Gray*, y *P. vulgaris L.* del sur occidente de Guatemala**; Guatemala, USAC, 2000; Pp. 93.
18. López, P.; **Tamizaje fitoquímico de cuatro especies del subgénero *Trichosalpinx* (*Trichosalpinx triangulipetala*, *Trichosalpinx blaisdellii*, *Trichosalpinx ciliaris* y *Trichosalpinx memor*) y cuatro del subgénero *Tubella* (*Trichosalpinx broadwayi*, *Trichosalpinx foliata*, *Trichosalpinx cedralensis* y *Trichosalpinx fruticosa*) del género *Trichosalpinx* existente en Guatemala**; Guatemala, USAC, 2000; Pp. 45.
19. Cano, T., et al; **Obtención y caracterización de capsaicina, ingrediente activo de productos fitofarmacéuticos y agroindustriales de 3 especies de *Capsicum* (*Capsicum chinense*, *capsicum annum L.V. capsicum annum*) cultivadas en Guatemala.**; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONCYT. 2000; Pp. 63.
20. Cáceres, V., et al; **“Determinación fotoquímica y de actividad antifúngica de cultivares de *Solanum americanum* Miller Y caracterización de preparaciones para la industria fitofarmacéutica”**; Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas ; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; Universidad de San Carlos de Guatemala ; Vol. 4 No. 1 Revista Científica; Edición especial. 2008; Pp. 30.
21. Zuleta, E; **Perfil fitoquímico de *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger Proveniente de 5 regiones de Guatemala**; Guatemala, 2005; Pp. 44.

22. Cruz, A.; **Evaluación de la actividad biocida e identificación química de valepotriatos en tres plantas reconocidas popularmente en Guatemala como Valeriana.** Guatemala, USAC, 2005; Pp. 46.
23. Vielman N, Saravia A.; **Evaluación de la actividad analgésica de los extractos etanólico, hexánico, cloroformo, acetato de etilo y acuoso de las hojas de *Catopheria chiapensis* (linimento),** Guatemala, USAC. 2004; Pp. 89.
24. Villatoro Castillo, Carol Ivòn; **Tamizaje fitoquímico de las partes aéreas (hojas, tallo, flores y fruto) de *Garrya corvorum* Standl.& Steyerm. (GARRYACEAE) especie endémica de Guatemala;** Guatemala, USAC, 2008; Pp. 57.

XIII. Anexos

13.1. Definiciones y términos usados en la cromatografía en capa fina.

En esta investigación se han empleado términos de uso común a las técnicas cromatográficas, sin embargo dado que la cromatografía en capa fina constituye en si misma una técnica especializada, requiere del dominio de algunos términos específicos definidos a continuación:

- Soporte: La placa de vidrio, papel, plástico o metal sobre la que se deposita la fase estacionaria, sea adsorbente sólido, gel de reparto o resina de intercambio iónico.
- Resolución: la mínima distancia a que pueden hallarse dos manchas que aún pueden distinguirse individualmente. El grado de separación entre dos sustancias contiguas sobre el cromatograma. Eficiencia de la separación cromatográfica.
- Desarrollo: el movimiento diferencial de los componentes de la muestra al ser transportados por la fase móvil o disolvente. Por su dirección, el desarrollo es ascendente, si el disolvente o fase móvil se desplaza hacia arriba; descendente, si la fase móvil baja, y horizontal si la fase móvil se desplaza horizontalmente. Por la técnica usada puede ser sencillo, múltiple, continuo, escalonado, circular, en cuña o bidimensional.
- Disolvente: sustancia o mezcla de sustancias fluidas que constituyen la fase móvil (portadora) en una cromatografía. Generalmente se emplean líquidos con alta presión de vapor.
- Sistema cromatográfico: condiciones de temperatura, humedad relativa, disolventes, etc., empleados en cromatografía.
- Aplicación: colocar en el punto de origen la mezcla cuyas sustancias se desea separar sobre la placa cromatográfica.
- Revelador: agente físico o químico que hace visibles las sustancias separadas por cromatografía en capa fina.
- Revelado o visualización: procedimientos químicos, físicos o biológicos aplicados a la placa para hacer visibles los depósitos (manchas) de las sustancias separadas por cromatografía.

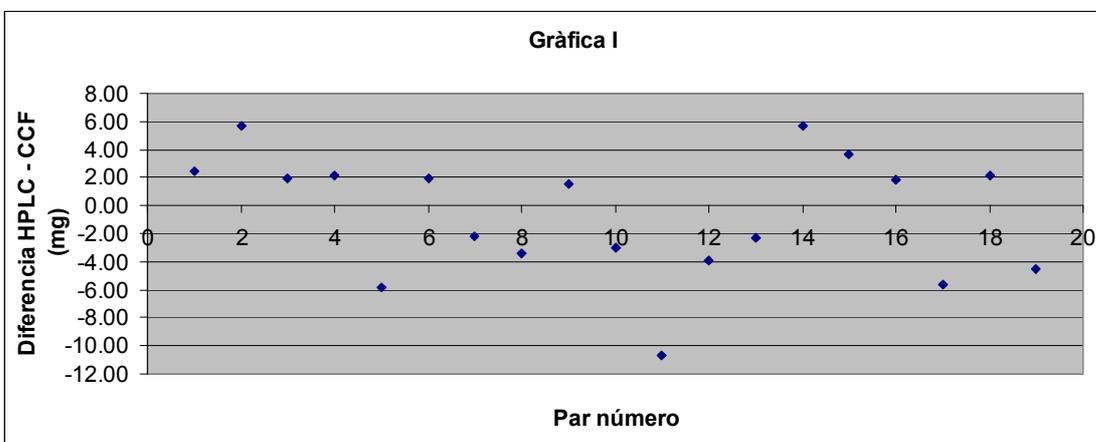
- Agente cromógeno: agente físico o químico que actúa sobre o reacciona con las sustancias separadas por cromatografía y da coloraciones perceptibles a simple vista.⁽⁷⁾
- Frente de disolvente: línea frontal de la fase móvil, visible durante el desarrollo.
- Longitud del recorrido: la distancia recorrida por la fase móvil, visible durante el desarrollo.
- R_f (relación del flujo): la razón o cociente de las distancias recorridas simultáneamente desde el origen hasta el centro de la mancha de una sustancia y el frente de la fase móvil (disolvente).
- Adsorbente: sólido finamente pulverizado que, por energía de superficie, deposita en su superficie a las moléculas que lo rodean.
- Adsorción: concentración en la superficie de un sólido de las partículas de una sustancia en disolución.
- Eluente: disolvente polar usado en la cromatografías en papel y en capa fina para extraer las sustancias separadas.
- Carga: sustancias iónicas o polares que se incorporan a la capa para cromatografía y modifican sus propiedades como fase estacionaria.
- Placa: fase estacionaria (inmóvil) untada o embadurnada homogéneamente sobre un soporte. Si el espesor no supera los 0.3 mm, se considera fina; si es mayor, hasta unos 2 mm, se estima gruesa.
- Cámara o cuba de desarrollo: recipiente con una tapa que cierra herméticamente, donde se forma el cromatograma.
- Cromatograma: placa donde las sustancias se despliegan después de su separación.
- Origen: zona donde se aplica la muestra como círculo o línea en la disolución de la mezcla que se va a separar.
- Patrón de caracterización: un patrón o conjunto de características obtenidas sobre el papel o la placa después del desarrollo y de la aplicación de agentes cromógenos; está dado por la posición, color, forma y tamaño de las moléculas.
- Impregnación: Modificación de las propiedades de separación de una placa mediante aditivos apropiados.

- Valores guía o valores relativos: relación entre la distancia recorrida por la sustancia objeto de estudio y la distancia recorrida por una sustancia conocida, que sirve de patrón.
- Placa con gradiente: desarrollo en que se recurre a una transición continua o escalonada de un disolvente a otro.
- Extinción de la fluorescencia: la aparición de zonas oscuras sobre una placa fluorescente.
- Saturación de la cámara de desarrollo: distribución uniforme en la cámara de la fase de vapor del disolvente hasta que se alcanza el equilibrio antes de iniciar el desarrollo. El término “equilibrio” se refiere a la saturación de la fase estacionaria pasando por la fase de vapor.

13.2. Diferencias de concentración de los principios activos utilizados en el análisis estadístico.

Gráfica I

Diferencia de concentración de trimetoprim (HPLC – CCF)



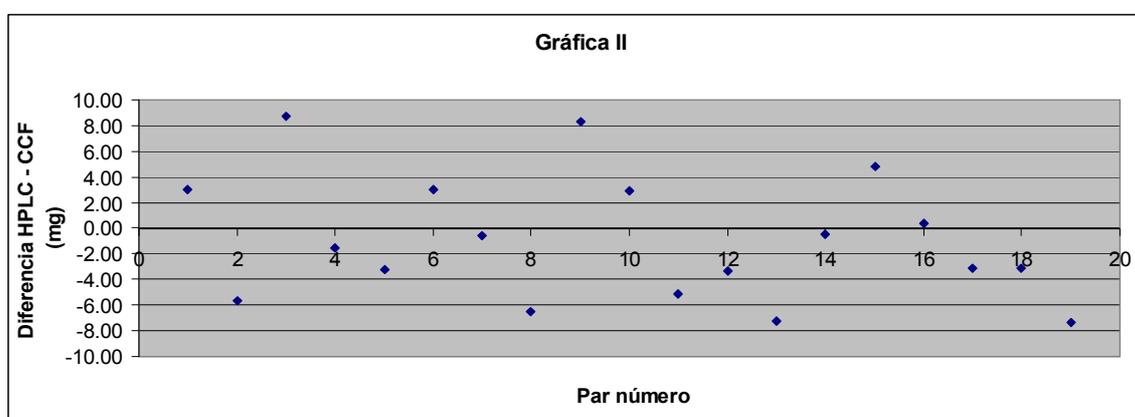
Fuente: resultados experimentales

En la gráfica puede observarse la diferencia que existe entre determinar la concentración del trimetoprim por el método de cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución. Como es claramente apreciable, la distribución por arriba y por abajo del 0 que corresponde a la hipótesis planteada es completamente

aleatoria en ambos casos por lo cual no es evidente una mayor puntuación por término medio para ninguna de las dos técnicas aplicadas.

Gráfica II

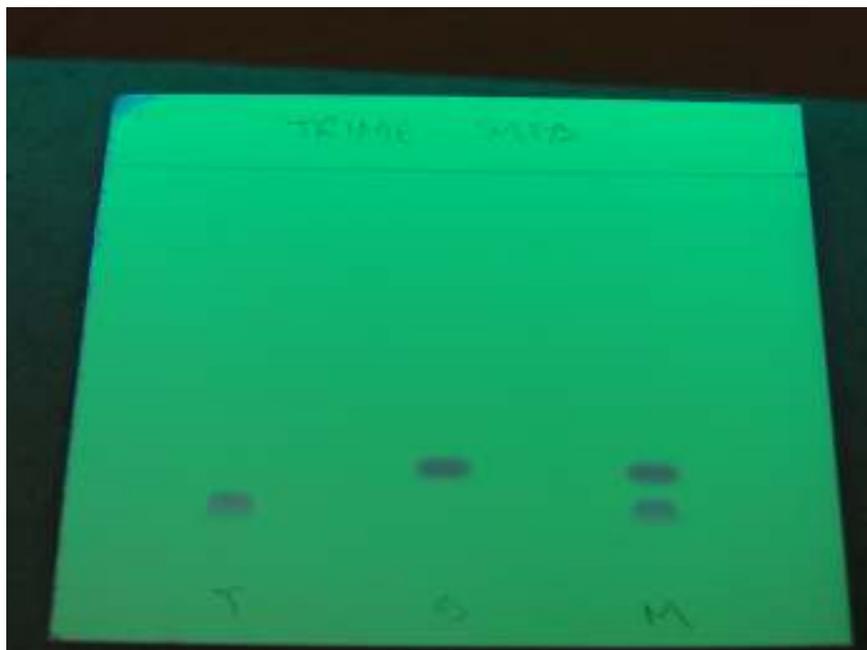
Diferencia de concentración de sulfametoxazol (HPLC – CCF)



Fuente: resultados experimentales

En la gráfica puede observarse la diferencia que existe entre determinar la concentración del sulfametoxazol por el método de cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución. En este caso aún no habiendo una tendencia completa, hay una mayor concentración de pares en los cuales el resultado obtenido en la cromatografía en capa fina es mayor al del HPLC. Se pudiera preveer una mayor puntuación por término medio para la cromatografía en capa fina pero resultó estadísticamente no significativo luego del análisis estadístico.

13.3. Cromatoplaqa de estándares y muestra analizadas por cromatografía en capa fina.



Fuente: Experimental

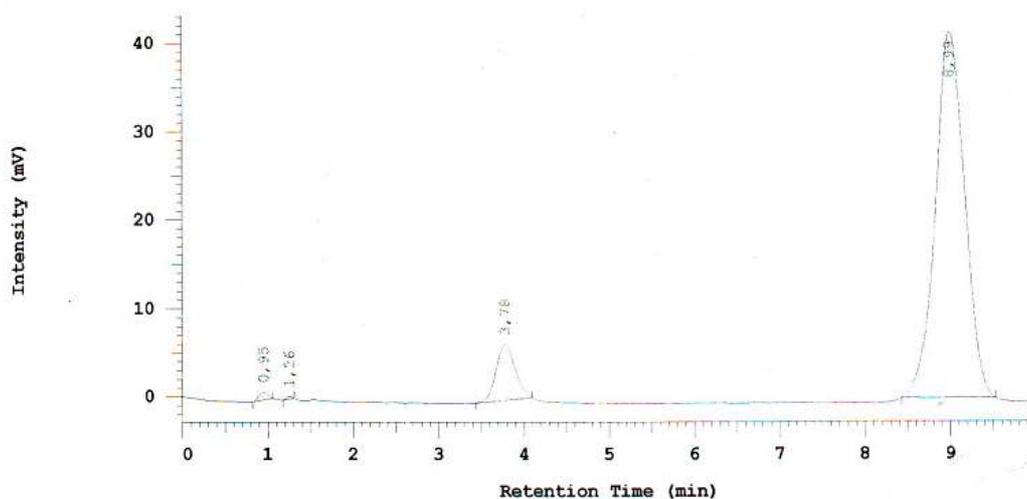
En la fotografía se puede apreciar a la izquierda el estándar de trimetoprim y al centro el sulfametoxazol, aplicados bajo las condiciones experimentales óptimas descritas en este estudio. A la derecha se aprecia una muestra con ambos ingredientes.

13.4. Cromatogramas de estándar y muestra analizados por HPLC.

Sample Name: Estándar 134554
 Injection from this vial: 2 of 2
 Sample Description:

Vial Type: STD1
 Volume: 10,0 ul

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Sulfametoxazol y trimetoprim

Peak Quantitation: AREA
 Calculation Method: EXT-STD
 Scale Factor 1: 1,000

No.	RT	Area	Height	BC
1	0,95	6204	871	BB
2	1,26	1200	292	BB
3	3,78	98472	6320	BB
4	8,99	986885	41451	BB
		1092761	48934	

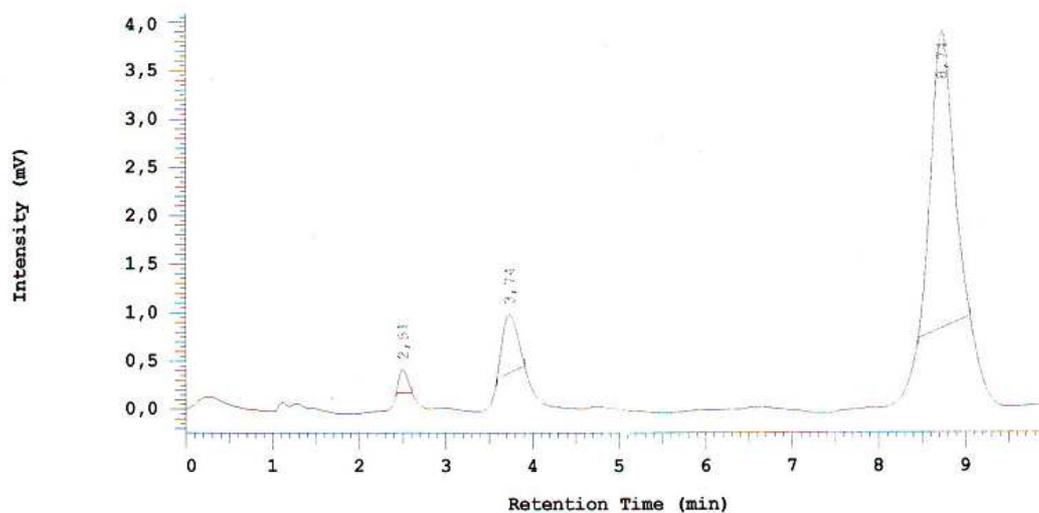
Fuente: Experimental

En el cromatograma pueden apreciarse los tiempos de retención, las áreas y la altura de picos que corresponden a los estándares de trimetoprim y sulfametoxazol separados utilizando la técnica de HPLC bajo las condiciones descritas en esta investigación.

Sample Name: 134554 3
 Injection from this vial: 1 of 1
 Sample Description:

Vial Type: UNK
 Volume: 10,0 ul

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Sulfametoxazol y trimetoprim

No.	RT	Area	Height	BC
1	2,51	1600	243	BB
2	3,74	6867	596	BB
3	8,74	53520	3048	BB
		61987	3887	

Fuente: Experimental

En el cromatograma pueden apreciarse los tiempos de retención, las áreas y la altura de picos que corresponden a una muestra de trimetoprim y sulfametoxazol separados utilizando la técnica de HPLC bajo las condiciones descritas en esta investigación.