



Facultad de Farmacia

Química y Farmacia

VALIDACIÓN DE TITULACIÓN VOLUMÉTRICA COMO MÉTODO PARA LA  
DETERMINACIÓN DE ALUMINIO EN VACUNAS, MEDIANTE EL EQUIPO  
TITULADOR AUTOMÁTICO T70

Internado para optar al Título de Químico Farmacéutico

Valerie Francesca Gómez Ahumada

Director de Internado: QF. Marco Carmona Báez

Co-Director de Internado: Prof. Alexis Aceituno Álvarez, PhD

2014



*Dedicado a mis padres que lo han  
dado todo por mí...*

## **Agradecimientos.**

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional durante todos estos años, por todo su cariño, confianza y compañía en todos los momentos, sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

A mi director de internado, Q.F. Marco Carmona, por el tiempo y conocimientos entregados durante todo el periodo, además de su apoyo y enseñanzas, que hicieron de este proceso una excelente experiencia.

A mi co-director de internado, profesor Alexis Aceituno, por la oportunidad, el apoyo y ayuda entregada en la realización de mi trabajo.

Al Subdepartamento Laboratorio Nacional de Control, en especial a la sección Análisis Físico-Químicos, por la oportunidad, ayuda, buenos momentos, apoyo, cariño y enseñanzas brindadas durante todo el trabajo de internado, que permitieron que esta fuera una gran experiencia personal y de aprendizaje.

A mis amigos de siempre por el apoyo y preocupación constante, a mis amigos de la universidad por compartir excelentes momentos juntos, el apoyo en los buenos y malos momentos y hacer de ésta etapa una de las mejores de la vida y a los amigos que hice durante este último año que sin pensar, se convirtieron en personas muy importantes para mí, gracias a todos.

Finalmente agradezco a todas las personas, que de una u otro forma, permitieron que este trabajo se realizara.

## Índice.

1.1.- Instituto de Salud Pública de Chile.....	1
1.1.1.- Análisis realizados en el Subdepto. Laboratorio Nacional de control. ....	2
1.2.- Aluminio en vacunas.....	2
1.2.1.- Uso de aluminio en vacunas.....	2
1.2.2.- Aluminio como adyuvante.....	3
1.2.3.- Mecanismo de acción.....	5
1.2.4.- Efectos adversos.....	5
1.2.5.- Contenido de aluminio en las vacunas.....	6
1.2.6.- Exposición al aluminio.....	7
1.2.7.- Vacunas que contienen aluminio.....	7
1.3.- Volumetría.....	9
1.3.1.- Definición.....	9
1.3.2.- Clasificación de los métodos volumétricos.....	12
1.4.- Volumetrías de formación de complejos.....	14
1.4.1.- Valoraciones con ácidos aminocarboxílicos.....	15
1.4.2.- Métodos de valoración con EDTA.....	18
1.5.- Titulador automático.....	18
1.6.- Determinación de aluminio.....	19
1.6.1.- Titulación complejométrica.....	19
1.6.2.- Otras técnicas.....	21
1.7.- Métodos automatizados de análisis.....	21
1.8.- Calificación de equipos.....	22
1.9.- Validación de procedimientos analíticos.....	23
1.9.1.- Definición.....	23
1.9.2.- Características de desempeño analítico.....	24
2.- Objetivos.....	27
2.1.- Objetivo General.....	27
2.2.- Objetivos Específicos.....	27

3.- Materiales y Métodos.....	28
3.1.- Materiales.....	28
3.2.- Métodos.....	30
3.2.1.- Documentación de calidad del equipo. ....	30
3.2.2.- Instalación de la metodología analítica. ....	30
3.2.3.- Estabilidad de las soluciones. ....	34
3.2.4.- Calificación de equipos.....	35
3.2.5.- Validación de la metodología analítica.....	37
3.2.6.- Comparación de métodos.....	46
4.- Resultados.....	48
4.1.- Documentación de calidad del equipo. ....	48
4.2.- Instalación de la metodología analítica. ....	48
4.3.- Estabilidad de las soluciones. ....	49
4.4.- Calificación de equipos.....	55
4.5.- Validación de la metodología analítica. ....	57
4.6.- Comparación de métodos.....	66
5.- Discusión. ....	68
5.1.- Documentación de calidad del equipo. ....	68
5.2.- Instalación de la metodología analítica. ....	68
5.3.- Estabilidad de las soluciones. ....	69
5.4.- Calificación de equipos.....	69
5.5.- Validación de la metodología analítica. ....	70
5.6.- Comparación de métodos.....	72
6.- Conclusiones. ....	73
7.- Referencias.....	74
8.- Anexos. ....	78

## **Resumen.**

Los laboratorios de análisis y control de calidad de productos farmacéuticos desarrollan metodologías analíticas, las cuales deben demostrar a través de la validación, mediante la determinación de parámetros de desempeño analítico, que son aptas para su uso, que entregan resultados confiables y reproducibles. Además, durante los análisis se utilizan equipos o instrumentos que deben estar previamente calificados para demostrar que cumplen con las especificaciones y funcionan adecuadamente.

En este trabajo, realizado en el Subdepartamento Laboratorio Nacional de Control, se implementó y validó la metodología analítica para la determinación cuantitativa de aluminio presente en vacunas, además se calificó el equipo utilizado para estas mediciones, que corresponde a un titulador automático. El aluminio forma parte de las vacunas principalmente para mejorar la respuesta del sistema inmunitario, la técnica utilizada en el laboratorio para determinarlo, es la titulación complejométrica por retroceso en exceso de EDTA.

Los resultados obtenidos permiten demostrar que, tanto la metodología analítica como el equipo utilizado son aptos para la determinación cuantitativa de aluminio, y que además la titulación automatizada se puede usar como método que reemplace a la titulación manual, debido a las ventajas que presenta la automatización de métodos y a que los resultados obtenidos por ambos procedimientos son equivalentes.

**Abstract.**

Laboratories and quality control analysis of pharmaceutical products develop analytical methodologies, these must demonstrate throughout validation determined by parameters of analytical performance that are suitable for use and obtention of reliable and repeatable results. In addition, prior to the analysis the equipments or instruments must be previously qualified to prove that they comply with their specifications and work properly.

In this work, an analytical methodology for the quantitative determination of aluminium in vaccines was implemented and validated at the National Control Laboratory Subdeparment; in addition, the equipment used for these measurements, which is an automatic titrator, was qualified. Aluminum is used in vaccines primarily to improve the response of the immune system, the technique used in the laboratory, is a complexometric back titration in excess of EDTA.

The results demonstrate that both the analytical methodology and the equipment used are suitable for the quantitative determination of Aluminum, and also the automated titration can be used as a method to replace the manual titration, as the results obtained by both methods were equivalent but automatic method is advantageous.

## **1.- Introducción.**

### **1.1.- Instituto de Salud Pública de Chile.**

El Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) es un servicio público descentralizado que contribuye al cuidado y mejoramiento de la salud de la población. La Dirección del Instituto dispuso la creación del Departamento Agencia Nacional de Medicamentos (ANAMED), continuador legal del Departamento Control Nacional, el cual tiene entre sus funciones el control de los productos farmacéuticos, cosméticos y dispositivos médicos autorizados por ley que se fabrican localmente o se importan para ser comercializados en el país, garantizando su calidad, seguridad y eficacia, también se encarga de otorgar las autorizaciones sanitarias y registros de estos productos; además del rol de ejercer fiscalización y vigilancia de los mismos.<sup>1</sup>

ANAMED se divide en seis Subdepartamentos, uno de ellos es el Subdepto. Laboratorio Nacional de Control, el cual tiene entre sus funciones efectuar el control de calidad de los productos farmacéuticos sometidos a control sanitario, en su calidad de Laboratorio Oficial del Estado. De esta forma durante el año realiza distintos programas que permiten asegurar que los ingredientes farmacéuticos activos, excipientes y productos farmacéuticos cumplen con las especificaciones establecidas.

En la actualidad el ISP se encuentra en proceso de acreditación de la Norma chilena NCh-ISO 17025 sobre “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración” y, al mismo tiempo ANAMED está en proceso de pre calificación OPS/OMS como autoridad regulatoria de referencia<sup>1</sup>, que le permitiría demostrar su competencia técnica ante los laboratorios que fiscaliza y frente a otras autoridades sanitarias a nivel mundial.

### **1.1.1.- Análisis realizados en el Subdepto. Laboratorio Nacional de control.**

Además de realizar el control de calidad a los productos farmacéuticos sometidos a control sanitario, de acuerdo al DS 03/10, al Subdepto. Laboratorio Nacional de Control le corresponde realizar el Control de Serie, donde se analizan previa distribución y comercialización, aquellos medicamentos biológicos, con el fin de autorizar su liberación de lote si corresponde, entre ellos se incluyen sueros de origen humano y animal, hemoderivados, biotecnológicos, hormonas, antibióticos, vacunas, entre otros.<sup>1</sup>

Entre los análisis realizados se encuentra la determinación de aluminio por titulación volumétrica, para dar garantía de los resultados analíticos obtenidos es necesario contar con personal y equipos calificados, instalaciones adecuadas, procedimientos operativos estándares y métodos de ensayo validados.

A continuación se presenta el trabajo realizado en la Sección Físico-químico del Subdepto. Laboratorio Nacional de Control.

### **1.2.- Aluminio en vacunas.**

#### **1.2.1.- Uso de aluminio en vacunas.**

El aluminio en las vacunas tiene varias funciones, principalmente es adsorbente y adyuvante; y se encuentra en forma de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato potásico de aluminio. Estas sales adsorben toxinas, activan la respuesta inmune Th2, incluyendo la respuesta de los anticuerpos IgG e IgE, pueden reducir la toxicidad de antígenos como la difteria y el tétanos, solubilizar componentes de las vacunas, resolver problemas en la formulación y en la estabilidad.<sup>2,3,4</sup>

### 1.2.2.- Aluminio como adyuvante.

La palabra adyuvante deriva del latín “adjuvare” que significa ayuda. Las sustancias utilizadas para mejorar la respuesta inmunitaria se denominan adyuvantes, éstas permiten que se use una menor cantidad de antígeno en las vacunas, lo que se traduce en una menor dosis y deben cumplir algunas características como, mejorar el contacto inmunológico, aumentar la respuesta de los anticuerpos, prolongar e influir en el tipo de respuesta inmune, todo esto sin aumentar los efectos adversos.<sup>3, 4, 5</sup>

Las sales de aluminio se vienen utilizando en las vacunas hace más de 70 años para activar y mejorar la respuesta inmunitaria, producen inmunidad rápida, eficiente y prolongada, por esto son considerados como agentes que aumentan la intensidad de la respuesta inmune.<sup>4, 5, 6</sup>

Los primeros usos del aluminio como adyuvante fueron reportados en el año 1926 en un estudio que investigó la inmunogenicidad en la toxina de la difteria y demostró que la adición de sulfato potásico de aluminio, o alumbre ( $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ), a la toxina producía un precipitado que cuando se inyectaba a los animales de estudio generaba una respuesta antigénica más alta en comparación con el toxoide fluido (no precipitado). A partir de los estudios se concluyó que existen dos métodos para preparar las vacunas con aluminio. El primero, implica la adición de una solución de alumbre a un antígeno para formar un precipitado de aluminio con el antígeno, de esta forma, las vacunas preparadas por este principio se conocen como vacunas precipitadas en alumbre. El segundo método consiste en la adición de un antígeno a geles hidratados preformados de hidróxido de aluminio, lo que produce vacunas adsorbidas en aluminio. Poco más tarde se introdujo el uso de fosfato de aluminio ya que demostró que también actuaba como adsorbente y adyuvante con el toxoide de la difteria.<sup>6, 7</sup>

La adsorción del antígeno se produce en el intervalo de pH entre el punto isoeléctrico del antígeno y el punto de carga cero del aluminio, donde adyuvante y antígeno tienen

cargas eléctricas opuestas que facilitan la atracción electrostática y la adsorción. Esto se explica en la figura n°1 y permite concluir que el hidróxido de aluminio es mejor que el fosfato de aluminio para la adsorción de proteínas con punto isoelectrico ácido y fosfato de aluminio es mejor para proteínas con punto isoelectrico alcalino. Con esto se puede decir que los factores que influyen en la adsorción son el punto isoelectrico de las proteínas, el punto de carga cero del aluminio, la interferencia de aniones, el efecto del pH, tratamiento con agentes tensoactivos, la atracción electrostática y el intercambio de ligandos aniónicos.<sup>6</sup>

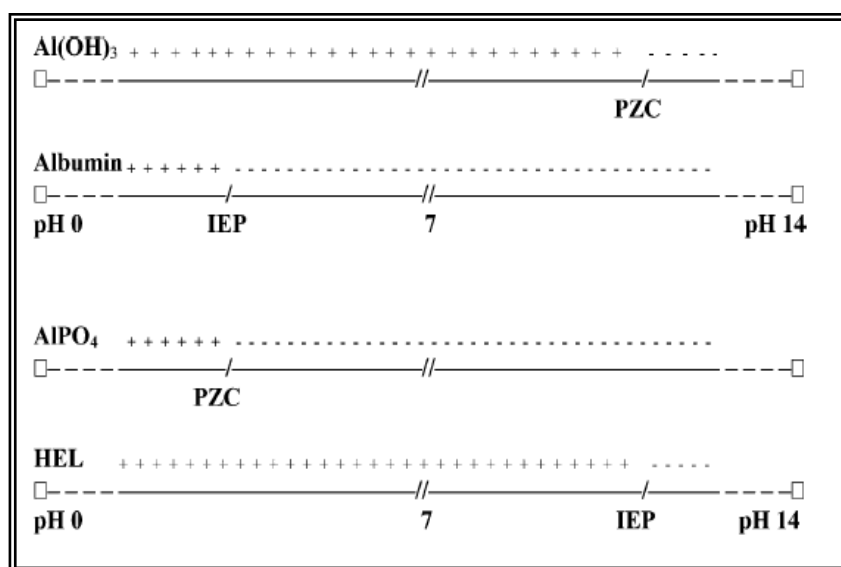


Figura n°1: En el rango de pH entre el punto isoelectrico (IEP) del antígeno y el punto de carga cero (PZC) del adyuvante se produce atracción electrostática. El PZC básico del Al(OH)<sub>3</sub> produce mejor adsorción de proteínas con IEP ácido, por ejemplo la albúmina. Al contrario, el PZC ácido del AlPO<sub>4</sub> produce mejor adsorción de proteínas con IEP básicos como la lisozima (HEL).<sup>6</sup>

El efecto de los antígenos adsorbidos en aluminio depende de varios factores, los más importantes son el grado de adsorción y la dosis del adyuvante. Según esto, hidróxido de aluminio ha demostrado que tiene un efecto más potente que el fosfato de aluminio, debido a su mayor capacidad de adsorción y a que adsorbe mejor ciertos antígenos a pH neutro.<sup>7</sup> En conclusión, las sales de aluminio tienen diferentes puntos

isoelectrónicos y propiedades, por lo que no se pueden intercambiar fácilmente, además su eficacia depende de las características de los antígenos de las vacunas.<sup>3</sup>

### **1.2.3.- Mecanismo de acción.**

El efecto inmunoestimulante del aluminio se atribuye a varios mecanismos, en su forma más simple es un adyuvante de depósito, provoca la formación de un foco inflamatorio que atrae a las células presentadoras de antígenos poco después de la inyección formando un depósito de antígenos en los tejidos que produce una exposición prolongada al sistema inmune, además activa el complemento, estimula los macrófagos para inducir la retención y activación de linfocitos, provoca una respuesta inmune de tipo II, estimulación de células T, inducción de linfocitos Th2 y producción de inmunoglobulinas IgE e IgG1.<sup>3, 4, 6</sup>

### **1.2.4.- Efectos adversos.**

En general, las vacunas con aluminio, han demostrado ser seguras durante décadas, aún así, han sido asociadas a reacciones locales severas, en gran medida dependientes de la dosis, como eritema, nódulos subcutáneos, hipersensibilidad de contacto e inflamación granulomatosa. Ninguna de estas reacciones, sin embargo, ha sido de suficiente frecuencia como para causar preocupación. Se ha reportado que el hidróxido de aluminio atrae eosinófilos al sitio de inyección y puede aumentar el nivel de anticuerpos IgE, pero ha sido difícil demostrar casos en que haya dado lugar a alergias mediadas por IgE.<sup>3, 6, 7</sup>

Las sales de aluminio no han demostrado evidencia de reacciones inmunológicas dañinas, carcinogenicidad, ni teratogenicidad, pero pueden causar una ligera irritación y dermatitis de contacto con la piel, al contacto con los ojos pueden causar enrojecimiento, conjuntivitis e irritación leve, la ingestión de grandes cantidades puede causar irritación gastrointestinal, la inhalación del producto seco puede causar irritación respiratoria y tos; y después de la administración parenteral se han reportado, aunque rara vez, reacciones de hipersensibilidad tipo I.<sup>2, 6</sup>

Se han informado casos, en pacientes con función renal alterada, de acumulación sistémica de aluminio, que se ha asociado a trastornos nerviosos y a enfermedades óseas. La mayor parte del aluminio que ingresa al organismo es eliminado rápidamente, esto puede explicar sus excelentes antecedentes de seguridad.<sup>3, 7</sup> La totalidad del aluminio presente en las vacunas ingresa al torrente sanguíneo, y la mayor parte es fijado de forma inmediata a la proteína transferrina que lo traslada a los riñones, desde donde se elimina del organismo, la cantidad que no es eliminada comienza a acumularse, la mayor parte en los huesos, un poco en los pulmones y en el cerebro. Cuando un niño alcanza la edad adulta, habrá acumulado entre 50 y 100 mg de aluminio, que proviene casi en su totalidad de los alimentos, ya que la cantidad proveniente de las vacunas es mucho menor que la recibida por la dieta o por medicamentos.<sup>5,7</sup>

En el año 1993 se descubrió el síndrome denominado miofascitis macrofágica (MFM), que se caracteriza por signos y síntomas sistémicos que incluyen dolores musculares, articulares y disturbios cognitivos, se cree que su causa es atribuida a los adyuvantes de aluminio<sup>8</sup>, sin embargo es necesario realizar más estudios para determinar el papel del aluminio en la fisiopatología de la MFM, debido a que estas lesiones pueden ser consecuencia de la respuesta inmune normal.<sup>3</sup>

Finalmente, para que el aluminio sea perjudicial se deben cumplir dos condiciones, primero, que las personas tengan problemas renales, y segundo, que reciban cantidades muy grandes de aluminio durante meses o años. En estos casos no se eliminaría una cantidad suficiente y se acumularía, aún así, tal cantidad es minúscula comparada con la necesaria para causar daño.<sup>5</sup>

#### **1.2.5.- Contenido de aluminio en las vacunas.**

Las sales de aluminio son aceptadas en vacunas parenterales humanas y veterinarias, los límites para uso humano oscilan entre 0,85 (FDA) y 1,25 mg de aluminio por dosis (OMS), para uso veterinario no hay límites establecidos. Esta cantidad fue

seleccionada empíricamente en ensayos piloto a partir de datos que demostraban que tal cantidad mejoraba la inmunidad y eficacia de la vacuna.<sup>2, 6, 7</sup>

### **1.2.6.- Exposición al aluminio.**

La principal fuente de exposición al aluminio son los alimentos y el agua potable. Estudios avalan que la cantidad de aluminio administrada en la vacunación no contribuye significativamente a los niveles séricos y que varía dependiendo de la vacuna administrada. Durante los primeros seis meses de vida, los lactantes pueden recibir alrededor de 4 mg de aluminio, al año pueden recibir entre 1,6 mg a 4,1 mg, a los 5 años estarían expuestos a una cantidad similar de aluminio, de 1,9 a 4,9 mg, en adultos la cantidad recibida depende del número de vacunas administradas.<sup>5, 6, 7</sup>

La exposición diaria al aluminio va entre los 10 a 15 mg, donde la mayor parte proviene de los alimentos, debido a esto, se encuentran abundantes datos acerca de los niveles de riesgo para el aluminio que es ingerido, pero pocos datos para la vía inyectable. El nivel de riesgo por vía oral está en el intervalo de 2 a 60 mg de aluminio/Kg por día, no hay datos comparables para aluminio inyectado. En el 2004 la FDA definió el umbral máximo de aluminio de fuente parenteral para individuos con insuficiencia renal y para recién nacidos prematuros entre 4 y 5 µg/Kg de masa corporal/día, sin embargo se requieren más estudios relacionados a estos niveles de riesgo.<sup>3, 8</sup>

### **1.2.7.- Vacunas que contienen aluminio.**

El aluminio como adyuvante se acepta para uso en vacunas humanas y veterinarias, en EE.UU. se ha utilizado principalmente en vacunas contra el tétanos, difteria, tos ferina, poliomielitis, hepatitis A, hepatitis B, también en vacunas contra el *Haemophilus influenzae* tipo b, papiloma humano y neumococo, además de vacunas para la enfermedad de Lyme, ántrax y rabia.<sup>3, 5, 6</sup> Las vacunas que en Chile actualmente contienen aluminio se indican en la tabla n°1.

Tabla n°1: Vacunas que contienen aluminio.

Vacuna	Descripción	Aluminio	
		Formulación	por dosis
Actacel	Vacuna DTP	F	0,33 mg
Adacel	Vacuna DTP	F	0,33 mg
Avaxim	Vacuna antihepatitis A	H	0,3 mg
Avaxim pediátrico	Vacuna antihepatitis A	H	0,15 mg
Boostrix	Vacuna DTP	H y F	0,5 mg
Cervarix	Vacuna antivirul papiloma humano	H	0,5 mg
Easyfive	Vacuna DTP-HBV-Hib	F	0,25 mg
Engerix B	Vacuna antihepatitis B	H	0,95 mg
Gardasil	Vacuna antivirul papiloma humano	HFS	0,225 mg
Havrix adulto	Vacuna antihepatitis A	H	0,5 mg
Havrix junior	Vacuna antihepatitis A	H	0,250 mg
Heberbiobac HB	Vacuna antihepatitis B	H	0,5 mg
Hepavax Gene TF	Vacuna antihepatitis B	H	≤ 1,25 mg
Imovax adulto	Vacuna DT	H	≤ 1,25 mg
Infanrix-Hexa	Vacuna DTP + HB + IPV + Hib	H y F	0,70 mg
Neisvac-C	Vacuna contra meningococo de grupo C	H	0,5 mg
Prevenar (7-valente)	Vacuna pneumocócica	F	0,125 mg
Prevenar (13-valente)	Vacuna pneumocócica	F	0,125 mg
Quinvaxem	Vacuna DTP + HB + Hib	F	0,3 mg
Recomvax-B	Vacuna antihepatitis B	H	0,50 mg
Synflorix	Vacuna neomococica y NTHi	F	0,5 mg
Tetatox	Vacuna antitetánica	H	≤ 1,25 mg
Tetavax	Vacuna antitetánica	H	0,6 mg
Tritanrix HB + Hiberix	Vacuna DTP + HB +Hib	H	0,63 mg
Twinrix	Vacuna antihepatitis A y B	H y F	0,45 mg
Vacuna TD adsorbida	Vacuna DT	F	≤ 1,25 mg
Vacuna triple adsorbida	Vacuna DTP	H	≤ 1,25 mg

DTP: contra difteria, tétanos, pertusis; HBV: contra hepatitis B; Hib: contra Haemophilus influenzae tipo b; DT: contra difteria, tétanos; IPV: contra la poliomielitis; NTHi: contra Haemophilus influenzae no tipificable, F: Fosfato de aluminio, H: Hidróxido de aluminio, HFS: Hidroxifosfato sulfato de aluminio.

El aluminio no está presente en vacunas que contienen virus vivos, como las que previenen el sarampión, paperas, rubéola, varicela y rotavirus. Para uso veterinario se ha utilizado en formulaciones contra enfermedades virales, bacterianas y en intentos de vacunas antiparásitos.<sup>6</sup>

### **1.3.- Volumetría.**

#### **1.3.1.- Definición.**

Los métodos analíticos se pueden clasificar de distintas formas, una de ellas es según el tipo de método, donde se encuentran los métodos primarios y secundarios. La definición de método primario según el CCQM (Consultative Committee for Quantity of Matter) es la siguiente: “Un método primario de medición es un método que tiene la más alta calidad Metrológica, cuya operación se describe y comprende completamente, para el cual se tiene una declaración completa de incertidumbre que puede ser escrita en términos de unidades del SI (Sistema Internacional de unidades) y cuyos resultados son, por lo tanto, aceptados sin referencia a un estándar de la misma magnitud que es medida”.<sup>9</sup> Por otra parte, los métodos secundarios son aquellos que no tienen trazabilidad con el SI y requieren de un estándar para la identificación y cuantificación del analito, ejemplos de éstos son: HPLC (High Performance Liquid Chromatography), Espectrofotometría UV, GC (gas Chromatography), etc. Los métodos primarios más importantes según CCQM son espectrometría de masas por dilución de isótopos (IDMS), gravimetría, coulometría y volumetría.<sup>9</sup>

Los métodos volumétricos son ampliamente utilizados en química analítica para la determinación de ácidos, bases, oxidantes, reductores, iones metálicos, proteínas y muchas otras especies y se definen como aquellos métodos en los que el análisis se determina con la medición del volumen de una solución de concentración conocida, necesario para reaccionar cuantitativamente con la sustancia a determinar, de esta manera la cantidad de analito investigada se cuantifica indirectamente. Como la cantidad de reactivo de concentración conocida necesaria para alcanzar la equivalencia química se puede relacionar con la cantidad de analito presente, la titulación se considera un tipo de comparación química. Ocasionalmente, puede resultar conveniente o necesario realizar el análisis añadiendo un exceso medido del

reactivo y determinar este exceso por valoración por retroceso con un segundo reactivo de concentración conocida, que recibe el nombre de solución patrón.<sup>10, 11, 12, 13</sup>

En las titulaciones el analito reacciona con un reactivo estandarizado (titulante) en una reacción estequiométrica conocida, donde la cantidad de titulante varía hasta el punto en que la cantidad de reactivo patrón añadido equivale exactamente a la del analito y donde se alcanza el punto de equivalencia. Este punto es un concepto teórico, en realidad, sólo podemos evaluar con más o menos exactitud su posición observando cambios físicos determinados, que se producen en sus proximidades, en el denominado punto final de la valoración, este punto (experimental) debe estar localizado lo más próximo al punto estequiométrico (teórico), debido a esto la diferencia de volumen entre ambos es pequeña, aunque muchas veces existen diferencias entre ellos, debidas a que los cambios físicos son inadecuados o a que no podemos observarlos correctamente.<sup>10, 11, 12, 13</sup>

El método más simple y conveniente para determinar el punto final, es mediante el uso de indicadores. Estas sustancias químicas, generalmente coloreadas, responden a cambios de concentración en la solución antes y después del punto de equivalencia, presentando cambios de color que se pueden detectar visualmente como el punto final y que constituyen una estimación confiable del punto de equivalencia.<sup>11, 14</sup>

En muchos casos se utilizan instrumentos para detectar el punto final, éstos responden a propiedades de la disolución que se modifican de manera característica durante la valoración. Los colorímetros, turbidímetros, monitores de temperatura, refractómetros, voltímetros, medidores de corriente y de conductividad son algunos de estos instrumentos<sup>9</sup> y se utilizan cuando la detección del punto final usando indicadores colorimétricos se hace difícil, especialmente, si la solución que se va a titular es coloreada o turbia. En tales casos, por ejemplo, el punto final puede ser indicado de modo potenciométrico utilizando un electrodo indicador, sensible a la concentración de la especie sometida a la reacción volumétrica y un electrodo de referencia cuyo potencial no es sensible a ninguna especie disuelta. La diferencia de

potencial entre los electrodos se puede evaluar con un medidor de pH que permite seguir el curso de la reacción, si es posible graficar correctamente dichos cambios se obtiene una curva sigmoidea con una porción que cambia rápidamente (punto de “ruptura”) cerca del punto de equivalencia, esto debido a que en la mayoría de las titulaciones el potencial existente a través de los electrodos sufre un cambio brusco en el punto de equivalencia. El punto medio de esta porción vertical o punto de inflexión se puede considerar como punto final y corresponde al punto en que un indicador sufre un cambio pronunciado de color. En algunas titulaciones ni el cambio de color ni el de potencial es brusco en el punto final, en estos casos es necesaria la titulación a un voltaje o desviación de voltaje predeterminado.<sup>14, 15</sup>

Como se mencionó anteriormente, el punto final es una estimación del punto de equivalencia de la reacción, depende de la naturaleza de las sustancias a valorar y de la concentración de la solución volumétrica. Para aumentar la confiabilidad de la determinación de este punto se realiza una corrección con un blanco, ésta se obtiene habitualmente mediante una valoración residual del blanco, en la que se repiten todos los detalles del procedimiento excepto que la muestra en análisis se omite. En tales casos, el volumen real de solución volumétrica es la diferencia entre el volumen consumido en la valoración del blanco y el consumido en la valoración de la muestra, y se utiliza para calcular la cantidad de sustancia valorada.<sup>14</sup>

Cuando se realizan análisis volumétricos, es común comprobar el contenido del valorante determinando el título. Este es un procedimiento basado en una reacción química con estequiometría exactamente conocida, llevada a cabo con estándares primarios y debe realizarse al menos una vez. La frecuencia de determinación del título depende de la estabilidad del valorante (sensibilidad a la luz, al ambiente y a la humedad), la exactitud requerida u otras necesidades.<sup>12</sup>

Entonces, para realizar un análisis volumétrico se deben cumplir las siguientes condiciones:

- La reacción entre analito y valorante debe ser representada por una ecuación química definida, sencilla y sustentada por la calibración frente a patrones primarios o secundarios.
- La velocidad de reacción debe ser elevada para poder realizar el análisis en el menor tiempo posible, de lo contrario el proceso en conjunto resulta largo y tedioso.
- La reacción debe ser completa en el momento en que se han añadido las cantidades estequiométricas de las sustancias reaccionantes.
- Se debe disponer de una solución valorante de concentración exactamente conocida.
- Tiene que existir un método para reconocer el punto final de la reacción, por ejemplo con el uso de indicadores.<sup>11, 12</sup>

Los métodos volumétricos están entre los procedimientos analíticos más precisos y con frecuencia tienen una exactitud equivalente a los procedimientos gravimétricos, son rápidos y sencillos; por estas razones su uso es extendido.<sup>11, 13</sup>

### **1.3.2.- Clasificación de los métodos volumétricos.**

Los métodos volumétricos se pueden clasificar principalmente según el tipo de reacciones en las que se basan y la forma en que se desarrollan. Estas categorías difieren en los tipos de equilibrios que participan, en las clases de indicadores empleados, en la naturaleza de los reactivos, en las sustancias tipo primario y en las definiciones de peso equivalente, y se clasifican de la siguiente forma: <sup>11</sup>

***Volumetrías de precipitación:*** a este grupo pertenecen las reacciones en las que se produce un material insoluble (precipitado), donde se mide el volumen de valorante necesario para precipitar exactamente la especie de interés.<sup>12</sup>

***Volumetrías ácido-base:*** a este grupo pertenecen las reacciones que involucran transferencia de protones y se denominan reacciones de neutralización. Según el tipo de valorante utilizado se subdividen en acidimetría y alcalimetría.<sup>12</sup>

***Volumetrías de formación de complejos:*** son aquellas en las que se forman especies complejas solubles por la adición de un valorante que tiene en su estructura química pares de electrones libres, y un ion metálico, por lo general de transición.<sup>12</sup>

***Volumetrías de oxidación-reducción (rédox):*** estas reacciones implican cambios en los números de oxidación de los elementos implicados en el análisis. Esto es, el agente reductor transfiere electrones (se oxida) al agente oxidante (se reduce).<sup>12</sup>

***Volumetrías directas:*** es el tratamiento de una sustancia soluble en solución con una solución estandarizada apropiada (valorante), donde el punto final se determina en forma instrumental o visualmente con ayuda de un indicador adecuado.<sup>14</sup>

***Volumetrías residuales:*** algunas valoraciones requieren la adición de un volumen determinado de solución volumétrica, en exceso del necesario para reaccionar con la sustancia a valorar. Después, el excedente de esta solución se valora con una segunda solución volumétrica. Esto constituye una volumetría residual, también se conocen como “retrovaloración”, “valoración por retorno o por retroceso”. La cantidad de sustancia valorada se puede calcular a partir de la diferencia entre el volumen de la solución volumétrica que se agregó originalmente, corregido por un blanco, y el volumen consumido por la solución volumétrica en la retrovaloración.<sup>14</sup> Estas volumetrías son necesarias cuando la velocidad de reacción entre analito y reactivo es lenta o cuando la disolución patrón carece de estabilidad.<sup>10</sup>

***Volumetrías en disolventes no-acuosos:*** muchos compuestos insolubles en agua adquieren mejores propiedades ácidas o básicas en disolventes orgánicos, de esta manera, eligiendo el disolvente y el valorante adecuado se pueden valorar estas sustancias selectivamente. Para volumetrías de compuestos básicos se prefiere una solución volumétrica de ácido perclórico en ácido acético glacial y para compuestos ácidos, se dispone de dos clases de soluciones volumétricas: los alcóxidos de metales alcalinos y los hidróxidos de tetraalquilamonio.<sup>14</sup>

#### **1.4.- Volumetrías de formación de complejos.**

Las reacciones de formación de complejos se han empleado en química analítica durante más de un siglo, donde una de sus primeras aplicaciones fue en la valoración de cationes. Los reactivos más útiles para la formación de complejos son compuestos orgánicos que contienen varios grupos dadores de electrones, los que deben tener por lo menos un par de electrones sin compartir disponibles para la formación de enlaces covalentes múltiples con iones metálicos neutros.<sup>10</sup>

Las volumetrías de formación de complejos son métodos de análisis cuantitativos donde se forman especies complejas de alta estabilidad entre iones metálicos y ligandos monodentados o polidentados que forman complejos cíclicos (quelatos). Un quelato se produce cuando un ion metálico se coordina con dos o más grupos dadores de un mismo ligando para formar un anillo heterocíclico de cinco o seis eslabones. Los ligandos que tienen un solo grupo dador se denominan monodentados, mientras que los que tienen dos grupos disponibles, se denominan bidentados. También existen ligandos tridentados, tetradentados, pentadentados y hexadentados. La fuerza de unión del enlace aumenta con la facilidad con la que el ion metálico acepta electrones, con la que el ligando dona electrones y con la carga del ion metálico.<sup>10, 12, 16</sup>

Como valorantes los ligandos polidentados, en particular los de cuatro o seis grupos dadores, tienen ventajas sobre los monodentados, debido a que su reacción con los cationes es más completa, proporcionan puntos finales más nítidos, reaccionan con los iones metálicos en una sola etapa y forman complejos 1:1 con los metales.<sup>10</sup>

El éxito de las valoraciones complejométricas depende de varios factores. La constante de equilibrio de formación del complejo valorante-analito debe ser lo suficientemente grande como para que, en el punto final, casi el 100% del analito haya formado el complejo y éste se debe formar lo suficientemente rápido para que el tiempo de análisis sea práctico.<sup>14</sup> Además, la estabilidad de los complejos se relaciona con la selectividad del ligando por el ion metálico, cuanto mayor sea la constante de

formación del complejo metal-ligando, mayor es la selectividad del ligando por ese metal.<sup>10</sup>

Los indicadores usados para las valoraciones complejométricas son en sí mismos agentes formadores de complejos, forman complejos coloreados con ciertos iones metálicos, y son designados con el nombre de indicadores metalocrómicos. Éstos pueden actuar de dos modos: si el catión que se valora produce una coloración con el indicador, el punto final se caracteriza por la desaparición de la misma y si el catión no da ningún complejo coloreado, se introduce un segundo catión que sí lo dé, el primer exceso de valorante decolora el complejo. El complejo formado en la reacción analítica tiene que ser suficientemente estable para impedir que el valorante descomponga al complejo indicador-metal antes de que se haya alcanzado el punto de equivalencia, además la reacción entre el ion metálico y el indicador debe ser rápido y reversible. La constante de formación del complejo metal-indicador debe ser lo suficientemente grande como para producir un cambio de color marcado pero debe ser menor que la correspondiente al complejo metal-valorante. Además se debe considerar que la elección del indicador está limitada por el intervalo de pH en el que se debe efectuar la reacción de formación del complejo y por la interferencia de otros iones presentes en la muestra o en la solución amortiguadora. Debido a esto, la elección del indicador metalocrómico para una valoración se hace muchas veces, simplemente por tanteo, a causa del gran número de equilibrios que ejercen influencia sobre la valoración y sobre el comportamiento del propio indicador.<sup>11, 14</sup>

#### **1.4.1.- Valoraciones con ácidos aminocarboxílicos.**

Hay muchos agentes complejantes orgánicos importantes por su sensibilidad y selectividad al reaccionar con iones metálicos. Varias aminas terciarias que contienen grupos carboxílicos forman complejos muy estables con diversos metales, entre ellas se encuentra el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el cual tiene la siguiente estructura: <sup>10, 11</sup>

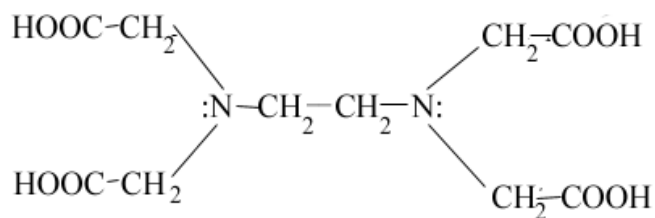


Figura n°2: estructura del EDTA.

La molécula de EDTA contiene seis posibles sitios de enlace con un ion metálico: cuatro grupos carboxilo y dos grupos amino, estos últimos con un par de electrones no compartidos. Así, el EDTA es un ligando hexadentado y se encuentra entre los reactivos más importantes y más usados en valoraciones. Es un ácido débil, para el cual  $pK_1=2,0$ ,  $pK_2=2,67$ ,  $pK_3=6,16$  y  $pK_4=10,26$ , estos valores indican que los dos primeros protones se disocian mucho más fácilmente que los dos restantes. Para referirse al EDTA y sus iones, se emplean las siguientes abreviaciones:  $H_4Y$ ,  $H_3Y^-$ ,  $H_2Y^{2-}$ , etc.<sup>10, 11</sup>

En general este reactivo forma complejos 1:1 con los iones metálicos independientemente de la carga del ion y con muchos metales polivalentes para constituir un quelato no disociado.<sup>15</sup> Además, existe cierta relación entre la carga iónica del catión y la estabilidad del complejo resultante. De esta forma, los complejos de EDTA con cationes divalentes son muy estables en soluciones básicas o débilmente ácidas, los complejos de cationes trivalentes son estables aún en el rango de pH de 1 a 2 y los de cationes tetravalentes son estables en muchos casos incluso a pH menor que 1.<sup>11</sup> La formación de los complejos es afectada notablemente por el pH, debido a esto, las valoraciones con EDTA siempre se llevan a cabo en disoluciones tamponadas a un pH conocido para evitar la interferencia de otros cationes o para asegurar el comportamiento satisfactorio del indicador. En la figura n°3 se muestran los pH para valorar de forma satisfactoria diversos cationes.<sup>10</sup>

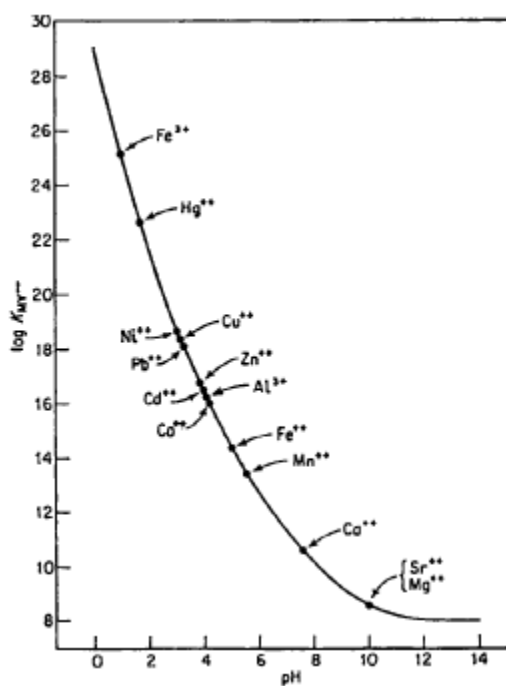


Figura n°3: pH mínimo para obtener puntos finales adecuados en la valoración de diversos cationes con EDTA.<sup>10</sup>

El EDTA reacciona con casi todos los cationes, con la excepción de los metales alcalinos, forma complejos muy estables por la presencia de varios grupos complejantes en la molécula, que dan lugar a estructuras en forma de jaula, en la que el catión queda rodeado y aislado de moléculas de disolvente.<sup>10, 11</sup>. En la figura n°4 se muestra el quelato formado entre un metal y el EDTA.

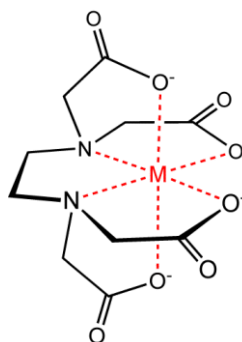


Figura n°4: complejo Metal-EDTA.

### 1.4.2.- Métodos de valoración con EDTA.

En análisis volumétricos existen varios procedimientos para el uso del EDTA:

**Valoración directa:** la valoración directa de iones metálicos con solución de EDTA es factible siempre que se disponga de algún método adecuado para la detección del punto final.<sup>11</sup> Algunos métodos se basan en utilizar indicadores que responden al propio analito, mientras que otros, muy comunes, se basan en agregar un ion metálico, para el cual se tiene un indicador apropiado, donde el ion metálico debe formar un complejo menos estable que el analito.<sup>10</sup>

**Valoraciones por retroceso:** son útiles cuando los iones metálicos forman complejos estables con el EDTA y no se dispone de indicadores satisfactorios, cuando la reacción entre analito y EDTA es lenta o cuando el analito precipita al pH necesario para su valoración. En estos casos se agrega un exceso medido de EDTA a la solución problema y se valora con una solución de un ion. El complejo que forma el EDTA con el metal a determinar tiene que ser más estable que el formado con el ion de la solución valorante, pues de otra forma, éste desplazaría al ion metálico.<sup>10, 11</sup>

**Valoraciones por desplazamiento:** esta técnica es útil cuando no se dispone de un indicador satisfactorio para el ion metálico a determinar. En ellas se introduce un exceso de solución del complejo de EDTA con zinc o magnesio; si el ion metálico a valorar forma con el EDTA un complejo más estable que el del magnesio o zinc ocurre la reacción de desplazamiento.<sup>11</sup>

### 1.5.- Titulador automático.

En este trabajo la determinación de aluminio se realizó utilizando un titulador automático. Existen dos tipos de tituladores electrométricos, el primero agrega la solución volumétrica automáticamente y registra las diferencias de potencial del electrodo durante el curso de la titulación dando la curva sigmoidea esperada. El segundo tipo, agrega la solución volumétrica automáticamente hasta que alcanza un

potencial o pH preseleccionado, que representa el punto final, en ese momento cesa el agregado de solución volumétrica.<sup>14</sup>

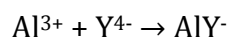
Estos equipos se utilizan para titulaciones que requieren alta precisión, funcionan con buretas con pistón que permiten dosificar la solución valorante automáticamente y obtener óptimos resultados en relación al tiempo de análisis. La alta precisión en la dosificación del volumen es causada por impulsos controlados por un motor y por la precisión de los componentes de la bureta.<sup>12, 17</sup>

El titulador automático permite obtener resultados de forma rápida y sencilla, con él podemos realizar diversos tipos de titulaciones debido a los distintos electrodos que utiliza para la detección del punto final, esto lo convierte en un equipo muy versátil. Además permite realizar valoraciones de forma simultánea y análisis secuenciales, que disminuyen el tiempo de análisis y aumentan la productividad. También permite realizar análisis de forma rápida, confiable y segura, se eliminan los errores de manejo, debido a que cuenta con sistemas de reconocimiento de buretas, electrodos y otros dispositivos que verifican los parámetros antes de comenzar cada análisis, además su diseño modular permite ampliar el sistema, esto significa que puede crecer según las necesidades de los usuarios. De esta forma se puede concluir que el uso de este equipo es muy beneficioso para los análisis en el laboratorio.

## **1.6.- Determinación de aluminio.**

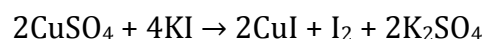
### **1.6.1.- Titulación complejométrica.**

El aluminio se determina mejor mediante titulación complejométrica por retroceso en exceso de EDTA y calentamiento para formar un complejo estable en una reacción lenta,<sup>18</sup> esta reacción es la siguiente:

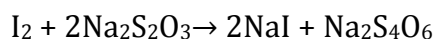


La muestra se debe controlar en una solución tampón a pH 4,4; para evitar la interferencia de metales alcalinos térreos, manganeso y magnesio, se debe agregar

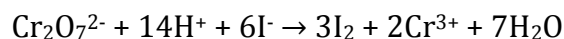
una cantidad conocida de EDTA en exceso, la solución se calienta, se agrega el indicador y se titula por retroceso el EDTA no quelado con una solución valorante estandarizada<sup>18</sup> de concentración conocida que puede prepararse de forma directa o indirecta por estandarización frente a un patrón primario que tiene una composición claramente definida, un alto grado de pureza, alto peso equivalente, no es higroscópico, ni sensible al oxígeno y/o al CO<sub>2</sub>, es estable en solución y fácilmente soluble en los solventes adecuados, presenta una reacción rápida y estequiométrica con el valorante. En este caso, la solución valorante es sulfato de cobre y su estandarización se realiza de modo indirecto, debido a que no cumple las características de patrón primario. Para ello se pesa una cantidad con cierta aproximación y se diluye hasta un volumen determinado, luego se determina el volumen de valorante que reacciona estequiométricamente con una cantidad exactamente pesada de un patrón primario y a partir de esto se determina su concentración.<sup>12</sup> Sulfato de cobre se debe estandarizar con tiosulfato de sodio en presencia de ioduro de potasio. Las reacciones que se producen son las siguientes:<sup>15, 19</sup>



Luego el yodo liberado es titulado con tiosulfato de sodio:



El tiosulfato de sodio es estandarizado con dicromato de potasio como patrón primario en exceso de ioduro de potasio, donde se libera yodo que es titulado con tiosulfato:<sup>15</sup>



Para la detección del punto final se usa el sistema Cu-PAN como indicador, este consiste en el indicador de metal 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) junto con una pequeña cantidad de Cu(II)-EDTA. Antes de agregar el indicador la solución se debe

calentar debido a que la formación del complejo Al-EDTA se incrementa con 2-3 minutos de calentamiento.<sup>16,20</sup>

### **1.6.2.- Otras técnicas.**

Los metales en general, se pueden determinar mediante diversas técnicas incluyendo métodos colorimétricos, absorción atómica, espectrometría de emisión atómica, difracción de rayos X, métodos de fluorescencia, análisis de activación de neutrones, métodos con electrodos ion-selectivos, cromatografía iónica, electroforesis, titulación rédox y gravimetría. Aunque todas estas técnicas tienen ventajas y limitaciones, espectroscopía atómica es la herramienta analítica más ampliamente utilizada para el análisis industrial de metales y se aplica para la determinación de éstos en matrices acuosas y no acuosas. Espectrometría de absorción atómica (AAS) y de emisión atómica (AES) proporcionan determinaciones rápidas y de varios metales en niveles bajos (ppm y ppb),<sup>16</sup> sin embargo, el método establecido para la determinación de aluminio presente en vacunas es el método volumétrico.

### **1.7.- Métodos automatizados de análisis.**

Cuando un número grande de muestras van a someterse al mismo tipo de examen, los métodos automatizados de análisis pueden resultar mucho más eficaces y precisos que los métodos manuales, por esta razón se ha encontrado cómodo usarlos como alternativas a los métodos farmacopeicos, además que permiten eliminar errores humanos, incrementar la productividad y reducir el tiempo necesario para realizar el análisis, sin comprometer la exactitud y reproducibilidad del método ni la calidad del producto. Pero antes de adoptarlos como alternativa se debe establecer que los resultados obtenidos son equivalentes en precisión y exactitud a los obtenidos mediante el método farmacopeico prescrito, esto depende del ajuste del equipo, de modo que todas las preparaciones estándar y de prueba se exponen a manipulaciones físicas y químicas idénticas durante intervalos de tiempo idénticos. Cuando los

sistemas automatizados demuestran operar con fiabilidad, su precisión muchas veces puede superar la del procedimiento manual.<sup>12, 21</sup>

Al realizar un método manual el aparato necesario es, en general, menos complicado que el de los sistemas automatizados, sin embargo, debido a su versatilidad, los sistemas automatizados a menudo pueden modificarse fácilmente mediante la adición de módulos y accesorios que permiten la determinación de una o más sustancias en una forma farmacéutica.<sup>21</sup>

### **1.8.- Calificación de equipos.**

Con la creciente sofisticación y automatización de los instrumentos analíticos, y con el fin de garantizar que los datos adquiridos son confiables se está exigiendo cada vez más la calificación de los instrumentos.<sup>22</sup>

Existe una diferencia entre el concepto de validación y calificación, el término validación se usa para procesos de fabricación, procedimientos analíticos y de software, y el de calificación se emplea para instrumentos, de esta forma, la frase “calificación de instrumentos analíticos” se usa para el procedimiento de garantizar, probar y documentar que un instrumento funciona adecuadamente para el uso al que está destinado y cumple con las especificaciones requeridas. Este proceso dependerá de la complejidad y del uso previsto de los instrumentos. La calificación se considera como uno de los componentes principales para generar datos confiables, repetibles y de calidad. Durante la calificación de equipos se realiza la verificación de los mismos, mediante una serie de pruebas que verifican el desempeño aceptable del equipo o instrumento, generalmente estas pruebas se basan en aplicaciones típicas del instrumento en el sitio de uso y pueden consistir en análisis de estándares o componentes conocidos, la cantidad de pruebas a realizar depende de las aplicaciones previstas para el instrumento.<sup>22, 23, 24</sup>

## **1.9.- Validación de procedimientos analíticos.**

### **1.9.1.- Definición.**

Los laboratorios de control de calidad, industrias e instituciones donde se realizan análisis químicos en general deben utilizar métodos de análisis rápidos y altamente eficientes, para ello es necesario validar cada uno de los métodos utilizados. Esto se debe a que el propósito de todas las medidas y determinaciones es generar resultados correctos y para lograrlos se deben aplicar métodos detallados, que describan desde el muestreo hasta el resultado, por lo tanto, si el método puede producir resultados correctos o no, implica que tiene que ser validado.<sup>12</sup>

Tanto la Food and Drug Administration (FDA) como la United States Pharmacopeia (USP) tienen un interés vital en la validación de los métodos de ensayo para asegurar que dichos métodos son lo que pretenden ser, debido a que todos los procedimientos analíticos empleados para análisis deben ser adecuados para el uso al que están destinados.<sup>15, 23</sup> De esta forma la validación de un procedimiento analítico se puede definir como el proceso que establece mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Este proceso consiste en demostrar estadísticamente, a través de pruebas documentadas, que el método es adecuado para un propósito y uso determinado, esto es, que posee alto grado de confiabilidad, puede ser aplicado a un amplio número de muestras y matrices; y que es práctico en relación al costo y tiempo requerido en el análisis.<sup>25, 26</sup> La validación debe realizarse de acuerdo al protocolo de validación y los resultados deben ser documentados en el informe de validación.<sup>23</sup>

Las características de desempeño analítico que deben considerarse en la validación de los procedimientos son exactitud, precisión, especificidad, límite de detección y cuantificación, linealidad, intervalo y robustez, la selección de estos parámetros depende de lo que se quiere demostrar y del tiempo requerido para la validación. En

algunas ocasiones, sólo basta con unos pocos parámetros para demostrar la competencia en un campo determinado.<sup>25, 26</sup>

### **1.9.2.- Características de desempeño analítico.**

**Exactitud:** es la proximidad entre los resultados obtenidos y el valor verdadero. La exactitud debe establecerse en todo su intervalo y se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado.<sup>25</sup>

**Precisión:** es el grado de concordancia entre los resultados cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea, habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones y puede ser medida como reproducibilidad, repetibilidad o precisión intermedia.<sup>25</sup>

**Reproducibilidad:** se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración.<sup>25</sup>

**Precisión intermedia:** expresa la variación o la concordancia entre los resultados obtenidos, por ejemplo, en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio.<sup>25, 26</sup>

**Repetibilidad:** se refiere a la concordancia entre los resultados obtenidos en un laboratorio mediante el procedimiento analítico durante un periodo corto, bajo las mismas condiciones por el mismo analista con el mismo equipo.<sup>25, 26</sup>

**Especificidad:** es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya existencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.<sup>25</sup>

**Límite de detección:** es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas y se puede diferenciar de la respuesta dada por el blanco con un nivel de confianza específico. Se expresa como concentración de analito en la muestra.<sup>25, 26</sup>

**Límite de cuantificación:** es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. Se expresa como concentración de analito en la muestra.<sup>25</sup>

**Linealidad:** es la capacidad del procedimiento para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado y debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico.<sup>25</sup>

**Intervalo:** es la amplitud entre la concentración inferior y superior de analito (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento descrito. Se expresa en las mismas unidades que los resultados obtenidos en el procedimiento analítico.<sup>25</sup>

**Robustez:** es la capacidad del procedimiento analítico para no ser afectado por pequeñas variaciones deliberadas en los parámetros del procedimiento y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso.<sup>25</sup>

La validación de los procedimientos farmacopeicos puede involucrar algunas o todas las características analíticas que se usan en la validación de métodos y se categorizan según el tipo de método analítico, estas categorías son las siguientes: <sup>25</sup>

**Categoría I:** procedimientos analíticos para la cuantificación de componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos en productos farmacéuticos terminados.<sup>25</sup>

**Categoría II:** procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.<sup>25</sup>

**Categoría III:** procedimientos analíticos para determinar las características de desempeño.<sup>25</sup>

**Categoría IV:** pruebas de identificación.<sup>25</sup>

En la tabla n°2 se detallan las características de desempeño analítico que se deben aplicar según la categoría del método.

Tabla n°2: Datos requeridos para la Validación.

Característica de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativos	Pruebas de límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de Detección	No	No	Sí	*	No
Límite de Cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

\* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

En las siguientes páginas se presenta el trabajo realizado en la Sección Físico-químico del Subdepto. Laboratorio Nacional de Control.

## **2.- Objetivos.**

### **2.1.- Objetivo General.**

- ❖ Implementar y validar una metodología analítica para la determinación cuantitativa de aluminio, presente en productos farmacéuticos biológicos (vacunas de origen bacteriano y viral inactivadas), por retrovaloración mediante el uso de un titulador automático.

### **2.2.- Objetivos Específicos.**

- ❖ Conocer, a través de revisión bibliográfica los temas a desarrollar como la metodología a emplear, los productos que se analizarán, los tipos de vacunas, los excipientes que contiene cada formulación y la interferencia con el aluminio, además conocer la función del aluminio en el organismo y dentro de la formulación.
- ❖ Comprobar que el equipo titulador automático Titration Excellence modelo T70 de Mettler Toledo es adecuado para el uso al que está destinado, mediante la verificación del equipo.
- ❖ Demostrar experimentalmente que la metodología analítica es apta para las aplicaciones destinadas, entregando resultados confiables y reproducibles.
- ❖ Determinar los parámetros de desempeño analítico para la validación de métodos, y de esta forma demostrar que el procedimiento es adecuado para su uso.
- ❖ Describir el procedimiento para realizar la determinación cuantitativa de aluminio.
- ❖ Determinar si la titulación automatizada se puede utilizar como alternativa a la titulación manual establecida en la farmacopea, mediante la comparación de los métodos.

### 3.- Materiales y Métodos.

#### 3.1.- Materiales.

❖ *Documentos.*

- IT, Instructivo Determinación del contenido de aluminio en vacunas por titulación volumétrica.
- PR-420.00-003, Procedimiento de validación para métodos analíticos Físico-químicos.
- IT-420.00-040, Calificación de equipos e instrumentos.
- Annex 5: Qualification of automatic titrators, OMCL Network of the Council of Europe Quality Management Document.
- Manual de instrucciones de manejo, Guía rápida del equipo Titration Excellence modelo T70, Mettler Toledo.

❖ *Reactivos.*

- Acetato de sodio trihidratado p.a. Merck.
- Acetato de amonio p.a. Merck.
- Ácido acético glacial HPLC, J. T. Baker.
- Ácido clorhídrico, J. T. Baker.
- Ácido nítrico, J. T. Baker.
- Ácido sulfúrico, Fluka.
- Anaranjado de metilo, Merck.
- Bicarbonato de sodio p.a. Merck.
- Carbonato de sodio p.a. Merck.
- Cloruro de potasio, Winkler.
- Cloruro de sodio, Winkler.
- Di-sodio hidrogenofosfato anhidro p.a. Merck.
- Di-sodio tetraborato decahidrato p.a. Merck.
- EDTA, sal disódica dihidrato, Calbiochem.

- Etanol HPLC, Merck.
- Formaldehído, Sigma-Aldrich.
- Fosfato de potasio monobásico, J. T. Baker.
- Glicina, Applichem.
- Hidróxido de sodio, Winkler.
- Ioduro de potasio, Chemix.
- 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), Merck.
- Sodio dihidrogenofosfato dihidratado, Merck.
- Sulfato de cobre pentahidratado p.a. Merck.
- Timerosal 100%, USP.
- Tiosulfato de sodio anhidro, Merck.
- Tween 20, J. T. Baker.

❖ ***Estándares de referencia.***

- Aluminio solución estándar,  $\text{Al}(\text{NO}_3)$  en  $\text{HNO}_3$  0,5 mol/L,  $1000 \pm 5$  mg Al/L, Merck.
- Dicromato de potasio  $99,7 \pm 0,05\%$ , Merck.

❖ ***Equipos.***

- Agitador magnético con placa térmica Torrey, modelo HS-11-2.
- Balanza analítica Sartorius, modelos ED2245 y CP225D.
- Balanza granataria Belltronic, modelo Es-6000H.
- Balanza semi-analítica Sartorius, modelo Extend ED323SCW.
- Densitómetro Krüss, modelo DS 7000.
- Estufa de secado al vacío ShellLab, modelo 1425-2.
- pH-metro Fisher Scientific, modelo Accumet 15.
- Purificador de agua Millipore, modelo Synergy UV.
- Titulador automático Titration Excellence Mettler Toledo, modelo T70.
  - Cambiador de muestras Rondo 30.

- Electroodos.
  - Redox: InLab Redox.
  - Fototrodo: Phototrode DP5.
- Buretas de 20 mL DV 1020.
- Agitador de hélice, modelo Compact stirrer Mini-DIN.

❖ **Materialles.**

- Buretas.
- Matraces.
- Pipetas aforadas y graduadas.
- Vasos de valoración.
- Perlas de ebullición.

### **3.2.- Métodos.**

#### **3.2.1.- Documentación de calidad del equipo.**

Dentro de la calificación de los equipos se debe realizar la documentación de calidad de cada uno de ellos. Para determinar la documentación necesaria se tomó como referencia el Instructivo de calificación de equipos e instrumentos, <sup>24</sup> finalmente los documentos elaborados son los siguientes:

- Ficha de vida del equipo para el registro de mantenciones y reparaciones.
- Instructivo de uso del equipo.
- Bitácora de uso.<sup>24</sup>

#### **3.2.2.- Instalación de la metodología analítica.**

La instalación de la metodología analítica para la determinación de aluminio en vacunas se realizó en el equipo titulador automático Titration Excellence, modelo T70 y para ello se tomó como referencia la USP 34<sup>27</sup>, el Instructivo Determinación del

contenido de aluminio en vacunas por titulación volumétrica<sup>28</sup> y la Farmacopea Europea<sup>29</sup>.

La metodología analítica se dividió en tres etapas:

- 1- Estandarización tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) con dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ).
- 2- Estandarización sulfato de cobre penta-hidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) con tiosulfato de sodio.
- 3- Determinación de aluminio.

❖ **Etapa 1:** Estandarización  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  con  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .<sup>27, 28</sup>

La figura n°5 muestra el procedimiento para determinar el título del  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

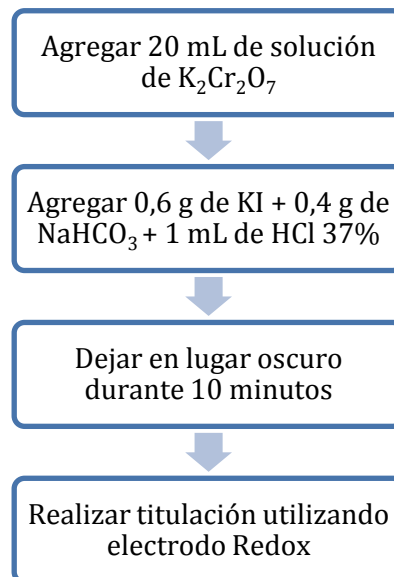


Figura n°5: Procedimiento para determinar el título de tiosulfato de sodio.

❖ **Etapa 2:** Estandarización  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .<sup>28</sup>

El  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  no es patrón primario, por lo que debe ser estandarizado, para ello se utiliza como solución patrón  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , que es previamente estandarizado con  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .<sup>28</sup> La figura n°6 muestra el procedimiento para estandarizar el  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

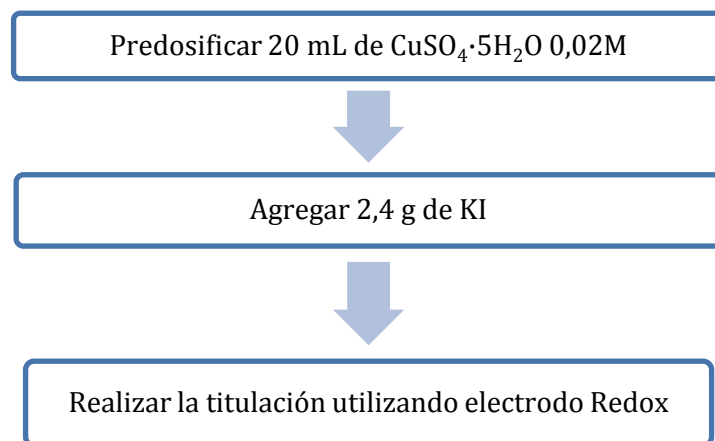


Figura n°6: Procedimiento para la estandarización de sulfato de cobre penta-hidratado.

❖ **Etapa 3:** Determinación de aluminio.

Para determinar el contenido de aluminio se debía realizar un tratamiento previo a las muestras, en base a lo establecido en la Farmacopea europea y al instructivo del laboratorio, este tratamiento se explica en la figura n°7.

Además se debe considerar que, antes de realizar un análisis de determinación del contenido de aluminio se debe realizar un blanco, este se prepara de la misma forma que las muestras, pero utilizando agua destilada en reemplazo de la muestra.

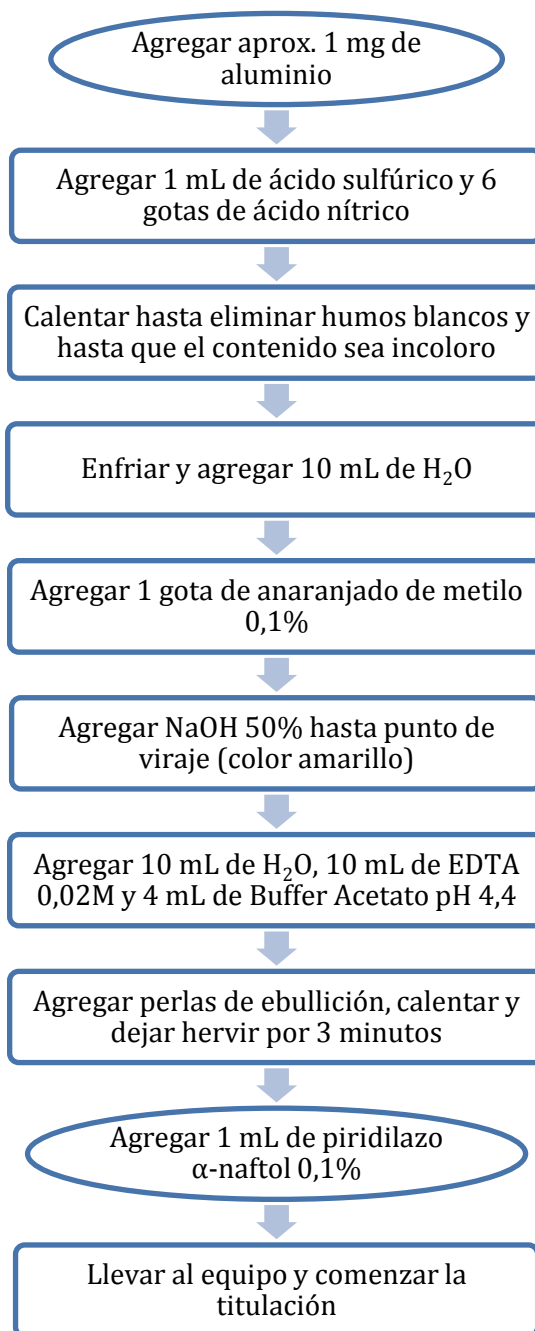


Figura n°7: Preparación de las muestras para la determinación de aluminio.

### 3.2.3.- Estabilidad de las soluciones.

Antes de realizar la validación de la metodología analítica se determinó la estabilidad de las soluciones volumétricas que se emplean en el método, éstas son las siguientes:

- Buffer acetato pH 4,4.
- Dicromato de potasio.
- EDTA 0,02M.
- Indicador anaranjado de metilo 0,1%.
- Hidróxido de sodio 50%.
- Indicador 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) 0,1%.
- Sulfato de cobre penta-hidratado 0,02M.
- Tiosulfato de sodio 0,02M.

Las pruebas realizadas a las soluciones fueron inspección visual, medición del pH (utilizando un pH-metro), densidad (utilizando un densitómetro) y determinación de la concentración (título). Éstas se realizaron aproximadamente durante un mes. En la tabla n°3 se detallan las pruebas realizadas a cada solución.

La estabilidad de las soluciones se determinó debido a la necesidad de conocer el tiempo durante el cual éstas se pueden utilizar, ya que al prepararlas cada vez que se realice el ensayo disminuye el tiempo destinado para el análisis de cuantificación de aluminio. De esta forma al conocer el periodo de estabilidad se disminuye tiempo de preparación de soluciones, tiempo de análisis de muestras, además se reducen costos y aumenta la productividad.

Tabla n° 3: pruebas realizadas para determinar estabilidad de las soluciones.

Solución	Parámetro			
	Inspección visual	pH	Densidad	Título
Buffer acetato	x	x	x	-
Dicromato de potasio	x	x	x	-
EDTA	x	x	x	-
Anaranjado de metilo	x	x	x	-
Hidróxido de sodio	x	-	x	-
PAN	x	-	x	-
Sulfato de cobre	x	x	x	x *
Tiosulfato de sodio	x	x	x	x *

X: pruebas realizadas; \* soluciones estándar valorantes que deben mantener la trazabilidad del patrón primario a las muestras.

### 3.2.4.- Calificación de equipos.

Para realizar la calificación del equipo se usó como referencia el Annex 5: Qualification of automatic titrators<sup>30</sup>.

#### ❖ Verificación del equipo.

Durante la calificación se realizó una serie de pruebas para verificar el desempeño aceptable del equipo, éstas fueron precisión, exactitud y linealidad<sup>30</sup>; y se realizaron en la estandarización de tiosulfato de sodio.

#### ➤ *Linealidad.*

Para determinar la linealidad se prepararon 6 soluciones de  $K_2Cr_2O_7$  de distinta concentración con pesada independiente de estándar y se realizaron 3 mediciones del título de  $Na_2S_2O_3$  en cada nivel de concentración. Las soluciones preparadas se resumen en la tabla n°4.

La linealidad fue evaluada mediante regresión lineal entre el volumen de valorante ( $Na_2S_2O_3$ ) en mL versus tamaño de muestra ( $K_2Cr_2O_7$ ) en mg/mL, luego con los datos obtenidos se determinó el valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ), que debe ser  $\geq 0,9990$ .

Tabla n°4: Soluciones de dicromato de potasio preparadas para la linealidad.

<b>Dicromato de potasio</b>					
<b>Nivel</b>	<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (mg)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>	<b>Alícuota (mL)</b>	<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (mg/mL)</b>	<b>%</b>
<b>N1</b>	50,06	100	20	0,5006	67,33
<b>N2</b>	56,78	100	20	0,5678	76,37
<b>N3</b>	74,35	100	20	0,7435	100,00
<b>N4</b>	90,68	100	20	0,9068	121,96
<b>N5</b>	98,08	100	20	0,9808	131,92
<b>N6</b>	112,23	100	20	1,1223	150,95

➤ **Precisión.**

Para determinar la precisión se prepararon 3 soluciones de estándar de dicromato de potasio con pesada independiente, detalladas en la tabla n°5, y con cada una se realizó la determinación del título de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, por triplicado.

Tabla n°5: Soluciones de dicromato de potasio preparadas por nivel.

<b>Dicromato de potasio</b>					
<b>Nivel</b>	<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (mg)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>	<b>Alícuota (mL)</b>	<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (mg/mL)</b>	<b>%</b>
<b>N1</b>	56,78	100	20	0,5678	76,37
<b>N2</b>	74,35	100	20	0,7435	100,00
<b>N3</b>	98,08	100	20	0,9808	131,92

Con los valores obtenidos del gasto de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (mL) y del título (M) se calculó el coeficiente de variación (CV), el cual debe ser ≤ 0,2%, mediante la siguiente fórmula:

$$C.V. = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

Donde: *S* corresponde a la desviación estándar y  $\bar{x}$  al promedio de los datos.

➤ **Exactitud.**

Para evaluar la exactitud se realizó la determinación del título de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , por triplicado, usando 3 soluciones de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  de distinta concentración preparadas con pesadas independientes de estándar, estas se indican en la tabla n°6.

Tabla n°6: Soluciones de dicromato de potasio preparadas para la exactitud.

Dicromato de potasio					
Nivel	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (mg)	Volumen final (mL)	Alícuota (mL)	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (mg/mL)	%
N1	56,78	100	20	0,5678	76,37
N2	74,35	100	20	0,7435	100,00
N3	98,08	100	20	0,9808	131,92

Con los resultados del volumen gastado y del título de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , se determinó el error de las mediciones por nivel, que debe ser  $\leq 0,5\%$ , y fue calculado de la siguiente forma:

$$\% \text{ Error} = \left| \frac{\text{Valor teórico} - \text{Valor experimental}}{\text{Valor teórico}} \right| \times 100$$

Donde el valor teórico es la concentración de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  y el experimental se obtiene reemplazando el volumen de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastado en la ecuación de la recta.

### 3.2.5.- Validación de la metodología analítica.

Para validar la metodología analítica se tomó como referencia el Procedimiento de validación para métodos analíticos Físico-químicos<sup>31</sup> utilizado en el laboratorio. Los parámetros de desempeño analítico analizados fueron los siguientes:

- ✓ Especificidad.
- ✓ Linealidad.
- ✓ Precisión.
- ✓ Exactitud.
- ✓ Límite de detección y cuantificación.
- ✓ Intervalo.

El procedimiento realizado fue el siguiente:

❖ **Especificidad.**

Para evaluar la especificidad se revisaron formulaciones de vacunas que contienen aluminio, para determinar los excipientes de cada una. Luego según la cantidad presente en cada formulación se pesaron los excipientes disponibles, la cantidad de cada uno que fue utilizada se muestra en la tabla n°7.

Tabla n°7: Excipientes utilizados en la determinación de la especificidad.

<b>Excipiente</b>	<b>Cantidad</b>
Bórax	19,68 mg
Cloruro de potasio	11,78 mg
Cloruro de sodio	22,02 mg
Formaldehído	3,0 mL
Fosfato de potasio monobásico	10,94 mg
Fosfato de sodio dibásico	13,25 mg
Fosfato de sodio dihidrato	14,61 mg
Glicina	11,66 mg
Timerosal	27,09 mg
Tween 20	125 µL

Luego se realizó la determinación de una solución blanco, en triplicado, y una titulación de cada excipiente por separado para determinar el gasto de solución valorante. Con los valores obtenidos se calculó la diferencia, en porcentaje, con respecto al valor del blanco.

❖ **Linealidad.**

Para determinar la linealidad se prepararon 7 soluciones, cada una con pesada independiente de estándar de aluminio, las que se muestran en la tabla n°8.

Tabla n°8: Niveles de cantidad de aluminio para determinar la linealidad.

Nivel	Estándar (g)	Volumen (mL)	Alícuota (mL)	Al (mg)	%
N1	5,0274	50	5	0,5027	50,20
N2	3,0141	25	5	0,6028	60,20
N3	4,0099	25	5	0,8020	80,09
N4	5,0068	25	5	1,0014	100,00
N5	6,0232	25	5	1,2046	120,30
N6	7,0191	25	5	1,4038	140,19
N7	14,8172	50	5	1,4817	147,97

Luego se realizó la determinación de la solución blanco, en triplicado, y 3 titulaciones por cada nivel. Con los resultados obtenidos del gasto de valorante se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada nivel a través de la siguiente fórmula:

$$C.V. = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

También se determinó el Factor de Respuesta (FR) de todos los puntos y el CV de éstos, el cual debe ser  $\leq 5\%$ .<sup>31</sup> La fórmula para determinar el FR es la siguiente:

$$FR = \frac{\text{Respuesta}}{\text{Cantidad}}$$

Además, se realizó un gráfico entre la cantidad de aluminio (mg) versus la señal entregada por el equipo, que corresponde al consumo de valorante provocado por Al, expresado en volumen de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (mL) y se realizó inspección visual de los puntos obtenidos para determinar la tendencia de ellos y el tratamiento estadístico de los resultados y según esto, si se observa una tendencia lineal, se aplica el método de los mínimos cuadrados y se determina el  $r^2$ , que debe ser  $\geq 0,995$ .

Luego se determinó el intervalo de confianza del intercepto del eje "y", mediante el cálculo de la desviación estándar residual y la desviación estándar del intercepto, este intervalo debe incluir el cero.<sup>31</sup>

✓ Desviación estándar residual ( $S_{y/x}$ ).

La fórmula con la que se determinó la  $S_{y/x}$  es la siguiente:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Donde:  $y_i$  es la respuesta obtenida por el equipo,  $\hat{y}$  son los valores de  $\hat{y}$  para un valor "x" dado (se calcula a partir de la ecuación de la recta) y n es el número de niveles de la curva de linealidad.

✓ Desviación estándar del intercepto ( $S_a$ ).

La  $S_a$  se calculó de la siguiente forma:

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Donde:  $S_{y/x}$  es la desviación estándar residual,  $x_i$  son los valores de los niveles de la linealidad,  $\bar{x}$  es el promedio de las cantidades de los niveles de trabajo y n es el número de niveles de la curva de la linealidad.

✓ Intervalo de confianza.

Finalmente el intervalo de confianza del intercepto se calculó de la siguiente forma:

$$a \pm t_{(n-2)} S_a$$

Donde: a es el intercepto del eje "y" cuando  $x=0$  en la ecuación de la recta  $y = b \cdot x + a$ ,  $S_a$  es la desviación estándar del intercepto y t es el valor de t de student para n-2 grados de libertad y un 95% de confianza.

#### ❖ *Precisión.*

Se estudió mediante repetibilidad y precisión intermedia, para cada una se prepararon 3 soluciones de estándar con pesada independiente, las que se detallan en las tablas n°9 y n°10, que representan un nivel bajo, medio y alto de la linealidad.

Tabla n°9: Soluciones preparadas para determinar la precisión intermedia.

Nivel	Estándar (g)	Volumen (mL)	Alícuota (mL)	Al (mg)	%
N1	5,0539	50	5	0,5054	50,4703
N2	10,0047	50	5	1,0005	99,9118
N3	14,8378	50	5	1,4838	148,1775

Tabla n°10: Soluciones preparadas para determinar la repetibilidad.

Nivel	Estándar (g)	Volumen (mL)	Alícuota (mL)	Al (mg)	%
N1	5,0813	50	5	0,5081	50,7447
N2	10,0037	50	5	1,0004	99,902
N3	14,8437	50	5	1,4844	148,2363

Primero se realizó la determinación de la solución blanco por triplicado y luego tres titulaciones por nivel, tanto para la precisión intermedia como para la repetibilidad. En la repetibilidad los 3 niveles se procesaron el mismo día de su preparación y en la precisión intermedia el análisis se realizó en las mismas condiciones y el mismo día debido a que el parámetro cambiado fue la pesada, ya que las soluciones fueron preparadas con pesada independiente de estándar.

Con los resultados obtenidos del gasto de valorante se calculó el CV en cada nivel, el que debe ser  $\leq 2\%$ . Con los valores del consumo de aluminio también se calculó el CV más el FR de cada nivel, además, para la evaluación de los resultados de la precisión intermedia se aplicó el "Test de comparación de medias"<sup>31</sup>, el cual se realizó mediante los siguientes pasos:

✓ *Comparación de varianzas.*

Se realizó mediante el test de Fisher (F) a dos colas.

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Donde  $S_1^2$  corresponde a la varianza mayor y  $S_2^2$ , a la menor. El valor del F calculado debe ser menor al F tabulado<sup>31</sup>.

✓ *Determinación de la varianza común.*

Se determinó a través del cálculo de la varianza conjunta ( $S^2$ ) que es una estimación de la varianza común, mediante el siguiente cálculo:

$$S_{común} = \frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{(n_1+n_2-2)}$$

Donde  $S_1^2$  y  $S_2^2$  corresponden a la varianza mayor y menor; y n equivale al número de mediciones en cada nivel<sup>31</sup>.

✓ *Comparación de medias.*

Se evaluó mediante la prueba de  $t$  de student, aplicando la siguiente fórmula.

$$t_{exp} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S^2(1/n_1 + 1/n_2)}}$$

Luego se comparó el valor de  $t_{exp}$  con el valor de  $t_{crit}$  tabulado para  $(n_1+n_2-2)$  grados de libertad y un 95% de confianza, donde el valor de  $t_{exp}$  debe ser menor o igual al  $t_{crit}$ .<sup>31</sup>

✓ *Test de Cochran.*

Esta prueba se aplicó a uno de los niveles, debido a que no cumple el test de Fischer y se calcula con la siguiente fórmula:

$$t' = \frac{t_1 (S_1^2/n_1) + t_2 (S_2^2/n_2)}{(S_1^2)/n_1 + (S_2^2)/n_2}$$

Donde  $t_1$  y  $t_2$  son los valores de  $t$  para  $n_1-1$  y  $n_2-1$  grados de libertad.

❖ *Exactitud.*

Para determinar la exactitud se revisaron las formulaciones de las vacunas que contienen aluminio. Luego se preparó una solución blanco madre con las vacunas

disponibles, estas formulaciones se detallan en la tabla n°11 y en la tabla n°12 se muestra el blanco madre preparado.

Tabla n°11: Vacunas que componen el blanco madre.

<b>Vacuna</b>	<b>Al (mg)</b>	<b>Dosis (mL)</b>
Adacel	0,320	0,5
Avaxim adulto	0,310	0,5
Avaxim pediátrico	0,160	0,5
Boostrix	0,545	0,5
Cervarix	0,450	0,5
Engerix-B	0,410	1,0
Gardasil	0,215	0,5
Havrix Adulto	0,410	1,0
Havrix Junior	0,275	0,5
Infanrix	0,755	0,5
Quinvaxem	0,350	0,5
Recombax-B	1,000	1,0
Synflorix	0,420	0,5
Tetavax	0,315	0,5
Twinrix	0,400	1,0
Vacuna TD adultos y adolescentes	2,700	10,0

Tabla n°12: Solución Blanco Madre.

<b>Blanco madre</b>	
<b>Al (mg)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
8,4622	54

Además se preparó un estándar de trabajo cercano al 100% del intervalo de linealidad y una solución estándar madre, a partir de la cual se prepararon los 3 niveles para determinar la exactitud, que representan un nivel bajo, medio y alto del intervalo de linealidad, esta preparación se resume en la tabla n°13.

Tabla n°13: Preparación Solución estándar madre.

<b>Solución estándar madre</b>		
<b>Peso estándar (mg)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>	<b>Al (mg/mL)</b>
9,9802	100	0,0998

El aluminio presente en cada nivel proviene de alícuotas de solución estándar madre y blanco de trabajo (alícuotas de blanco madre). Se debe considerar que cada nivel contiene el mismo volumen de blanco de trabajo. Las alícuotas utilizadas y la cantidad de aluminio contenida se resumen en la tabla n°14.

Tabla n°14: Soluciones preparadas para determinar la exactitud.

Soluciones	Blanco Trabajo		St Madre		Total Al (mg)	%
	Alícuota (mL)	Al (mg)	Alícuota (mL)	Al (mg)		
<b>St Trabajo</b>	0	0	10	0,9980	0,9980	99,67
<b>St N1</b>	3	0,4548	2	0,1996	0,6544	65,35
<b>St N2</b>	3	0,4548	6	0,5988	1,0536	105,22
<b>St N3</b>	3	0,4548	10	0,9980	1,4528	145,09

Luego se realizó la titulación de 3 blancos, 3 blancos de trabajo, 3 estándar de trabajo y 3 titulaciones de cada nivel de aluminio.

La exactitud se informó como el porcentaje de recuperación en los tres niveles, mediante el volumen consumido y teórico de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , donde el valor teórico se obtiene a través de la fórmula empleada para calcular la cantidad de aluminio y a partir del estándar agregado en cada nivel, esta fórmula es la siguiente:

$$\text{mg Al} = \frac{(\text{Vol. gastado Blanco} - \text{Vol. gastado CuSO}_4) \times (0,5396 \times \text{título CuSO}_4)}{0,02}$$

El porcentaje de recuperación se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Vol. Gastado CuSO}_4}{\text{Vol. Teórico CuSO}_4} \times 100$$

Para analizar cantidades conocidas de aluminio (estándar) añadidas al blanco de trabajo la recuperación se analiza por la comparación de los volúmenes teóricos del gasto de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  con los volúmenes gastados, para esto se graficó en el eje "x" el volumen gastado y en el "y" el volumen teórico y mediante el método de los mínimos cuadrados se determinó el  $r^2$ , que debe ser mayor a 0,995, y la pendiente, que debe ser mayor a 0,95.

Además se realizó el test de  $100 \pm 4S$ , siendo  $S$  la desviación estándar de mayor valor obtenida en la precisión intermedia, expresada en porcentaje. Este test se cumple cuando el promedio del porcentaje de recuperación está dentro del  $100 \pm 4S$ .

❖ **Límite de detección y cuantificación.**

Se prepararon 3 soluciones, cada una con pesada independiente de estándar, cercanas al nivel más bajo de la linealidad, estas soluciones se resumen en la tabla n°15.

Tabla n°15: Soluciones preparadas para determinar el LD y LC.

Nivel	Peso estándar (mg)	Volumen final (mL)	Alícuota (mL)	Al alícuota (mg)
N1	3,0072	50	5	0,3007
N2	4,0099	50	5	0,4010
N3	4,9911	50	5	0,4991

Luego se realizó la titulación de la solución blanco, por triplicado, y tres lecturas de cada solución preparada.

Con los resultados obtenidos se determinó la desviación estándar de la respuesta, la cual se consideró como el gasto de  $\text{CuSO}_4$  (mL) que provocaba el aluminio. Con estos datos se realizaron dos gráficos, en el primero se graficó cantidad de aluminio (mg) v/s consumo de  $\text{CuSO}_4$  (mL) y en el segundo, cantidad de aluminio (mg) v/s desviación estándar del consumo de  $\text{CuSO}_4$ . Luego se determinó el intercepto de cada gráfico, donde el intercepto del primero es la señal del blanco ( $Y_b$ ) y el del segundo, corresponde a la desviación estándar del blanco ( $S_b$ ), estos valores se utilizaron para realizar el cálculo de los límites a través de las siguientes fórmulas:

✓ Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC):

$$LD = \frac{Y_b + 3,3 S_b}{m} \quad LC = \frac{Y_b + 10 S_b}{m}$$

Donde  $Y_b$  es la señal del blanco,  $S_b$  es la desviación estándar del blanco y  $m$  es la pendiente de la curva de la linealidad.

Luego se realizó la verificación de los límites, para esto se prepararon soluciones con la cantidad de aluminio resultante de los cálculos, las que se resumen en la tabla n°16. Luego se realizó la titulación de la solución blanco, en triplicado, y 3 determinaciones para el LD y LC respectivamente.

Tabla n°16: Soluciones para verificar LD y LC.

Límite	Peso estándar (mg)	Volumen final (mL)	Alícuota (mL)	Al (mg)
LD	3,8000	100	3	0,1140
LC	4,0315	100	5	0,2016

#### ❖ *Intervalo.*

El intervalo se determinó luego de realizar las pruebas de linealidad, precisión y exactitud y corresponde al rango de aluminio donde se cumplen éstos tres parámetros (cantidad mínima y máxima de aluminio).

#### 3.2.6.- Comparación de métodos.

Para comparar los métodos de determinación de aluminio (método manual y automatizado) se realizaron titulaciones de solución blanco, estándar y muestras por ambos métodos simultáneamente. Se titularon 3 blancos, 4 soluciones estándar y 4 muestras, la solución estándar preparada se resume en la tabla n°17.

Tabla n°17: Solución estándar preparada para la comparación de métodos.

Solución estándar			
Peso estándar (mg)	Volumen final (mL)	Alícuota (mL)	Al (mg)
19,8652	100	4	0,7946

Además se preparó un concentrado de vacunas, con formulaciones que contenían aluminio y de éste, se tomó una alícuota de 0,5 mL para realizar cada determinación. La cantidad de aluminio presente en el concentrado y en la alícuota se resume en la tabla n°18.

Tabla n°18: Contenido de aluminio en el concentrado.

<b>Muestras</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Al (mg)</b>
<b>Vacunas</b>	6	8,4
<b>Alícuota</b>	0,5	0,7

Cada solución fue analizada mediante el método manual, utilizando una bureta certificada de 25 mL, que fue previamente verificada, y por el titulador automático de forma simultánea. Luego los resultados se analizaron comparando los valores obtenidos (volumen gastado de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) por ambos métodos mediante el cálculo del promedio, desviación estándar, coeficiente de variación, varianzas y por el “Test de comparación de medias”.

## **4.- Resultados.**

### **4.1.- Documentación de calidad del equipo.**

Los documentos creados para el equipo, fueron:

-Ficha técnica equipo Titulador Titration Excellence. En ella se registraron los módulos del equipo, número de inventario, modelos, descripción de los accesorios, ubicación, mantenciones, reparaciones, calibraciones, verificaciones, incidentes y otros eventos, siguiendo el formato establecido para las fichas de equipos.

-Instructivo de uso equipo Titulador automático Titration Excellence T70, Mettler Toledo. Describe las instrucciones de uso, funcionamiento, creación de métodos, partes del equipo, entre otras características, según el formato establecido.

-Bitácora de uso equipo Titulador Titration Excellence. En este documento se registró la marca del equipo, modelo, código interno, número de inventario, sección/unidad, ubicación, responsable y encargado, siguiendo el formato para las bitácoras de uso. En ella se debe registrar, cada vez que se utilice el equipo, la muestra analizada, tipo de titulación realizada, electrodo utilizado, cantidad de muestras, analista que realiza el ensayo y observaciones pertinentes.

La elaboración de estos documentos permite cumplir con parte de los requerimientos necesarios para la calificación de los equipos, que es crear la documentación de calidad de cada uno para ingresar al Sistema de Gestión de Calidad, además esto permite contribuir al funcionamiento correcto y eficiente del laboratorio.

### **4.2.- Instalación de la metodología analítica.**

En la instalación de la metodología se ajustaron los parámetros para realizar el método de forma simple y rápida; y se fijaron tanto para el desarrollo de la metodología, como para el funcionamiento adecuado del equipo. Además en la estandarización de tiosulfato de sodio y de sulfato de cobre se modificó el

procedimiento para optimizar su desarrollo, eliminando el uso de la solución indicador de almidón, debido a que el equipo cuenta con un electrodo rédox para la detección del punto final, por lo que el uso de esta solución no es necesario.

Luego de ajustar los parámetros necesarios para la estandarización del tiosulfato de sodio, el sulfato de cobre penta-hidratado y para la determinación de aluminio fue elaborado el “Instructivo determinación del contenido de aluminio en vacunas por titulación automática”. En este documento se establecieron las instrucciones para determinar el contenido de aluminio en vacunas, indicando los materiales, insumos y equipos utilizados, las medidas de seguridad y bioseguridad que se deben cumplir, la preparación de soluciones utilizadas y el procedimiento de estandarización, los parámetros de ajuste del equipo, preparación del blanco y muestras, y las reacciones implicadas. Este documento fue elaborado siguiendo el formato de los instructivos de metodologías analíticas.

#### **4.3.- Estabilidad de las soluciones.**

Las soluciones analizadas fueron preparadas por triplicado, a excepción de la solución de dicromato de potasio y a cada una se le realizó inspección visual, observando el aspecto (transparente o turbio), color y partículas extrañas en suspensión, determinación de la densidad, pH y a las soluciones valorantes, determinación del título, y de esta forma encontrar una diferencia significativa en cada parámetro que indicara una alteración de su estabilidad. Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

##### **❖ *Inspección visual.***

En la tabla n°19 se indican las soluciones volumétricas a las cuales se les realizó inspección visual, las características observadas y cantidad de días que fueron analizadas.

Tabla n°19: Características observadas en las soluciones volumétricas.

<b>Inspección visual</b>		
<b>Solución</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Días</b>
<b>A. Metilo</b>	Transparente, color rojo, s/partículas extrañas	31
<b>B. acetato</b>	Transparente, incolora, s/partículas extrañas	37
<b>D. de potasio</b>	Transparente, color anaranjado, s/partículas extrañas	31
<b>EDTA</b>	Transparente, incolora, s/partículas extrañas	31
<b>H. de sodio</b>	Transparente, incolora, s/partículas extrañas	30
<b>PAN</b>	Transparente, color anaranjado, s/partículas extrañas	37
<b>S. de cobre</b>	Transparente, color celeste, s/partículas extrañas	31
<b>T. de sodio</b>	Transparente, incolora, s/partículas extrañas	31

La descripción del aspecto en cada solución se mantuvo constante durante todo el periodo de análisis, por lo que se puede decir que no sufrieron alteración.

❖ Densidad.

En la tabla n°20 se resume el promedio, la DS y el CV de las densidades obtenidas en cada solución analizada y en la figura n°8 su variación en los días de análisis.

Tabla n°20: Valores promedio, DS y CV de la densidad de las soluciones volumétricas.

<b>Densidad</b>								
<b>Solución</b>	<b>A. Metilo</b>	<b>B. acetato</b>	<b>D. de potasio</b>	<b>EDTA</b>	<b>H. de sodio</b>	<b>PAN</b>	<b>S. de cobre</b>	<b>T. de sodio</b>
<b>Promedio (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0,9993	1,0841	1,0006	1,0026	1,3740	0,7913	1,0023	1,0014
<b>DS</b>	0,0005	0,0008	0,0003	0,0004	0,0009	0,0014	0,0002	0,0008
<b>CV (%)</b>	<b>0,0457</b>	<b>0,0694</b>	<b>0,0257</b>	<b>0,0440</b>	<b>0,0619</b>	<b>0,1725</b>	<b>0,0180</b>	<b>0,0788</b>

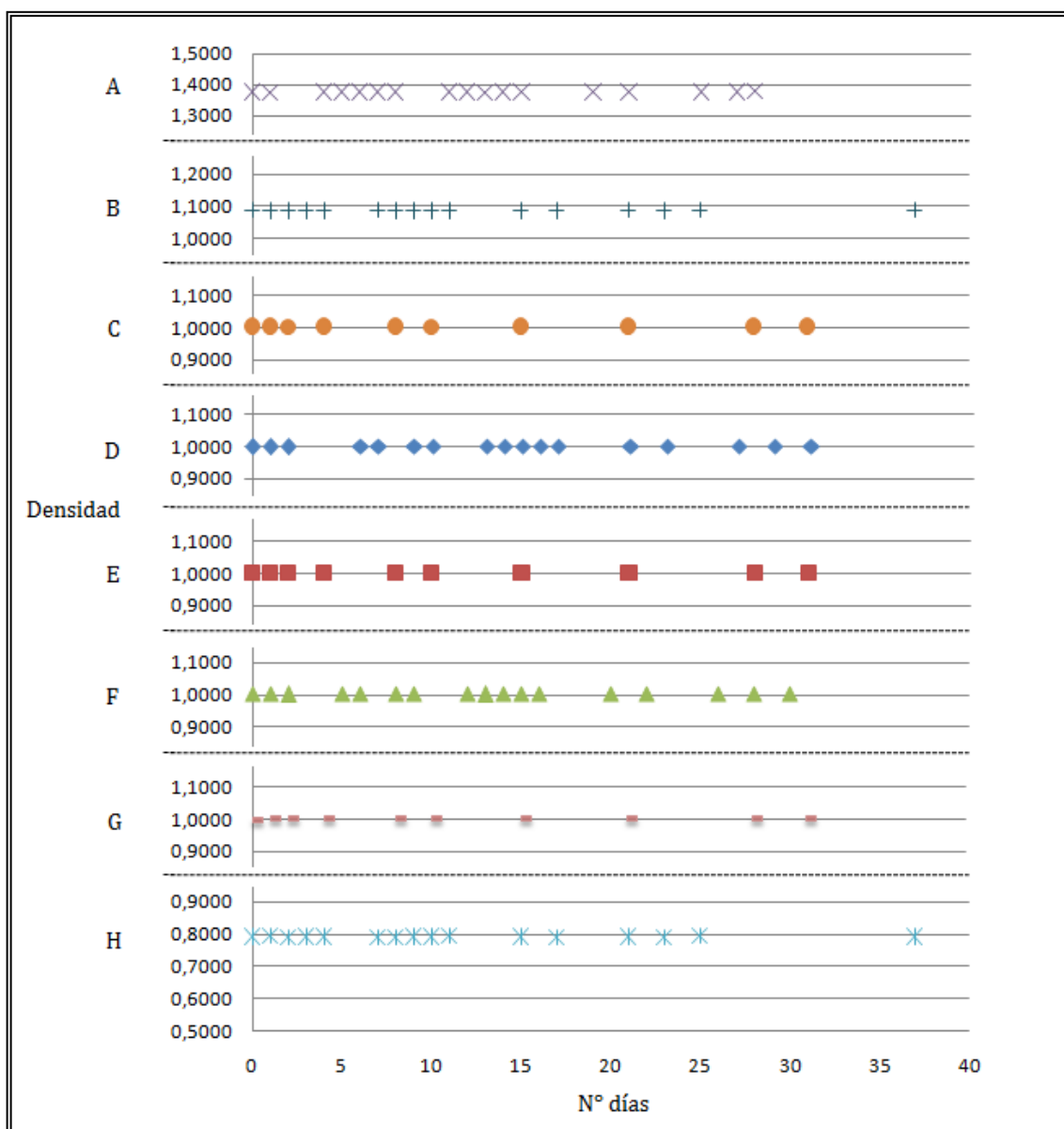


Figura n°8: Variación de la densidad de las soluciones volumétricas. A: Hidróxido de sodio, B: Buffer acetato, C: Sulfato de cobre, D: Anaranjado de metilo, E: Dicromato de potasio, F: EDTA, G: Tiosulfato de sodio y H: PAN.

Según los resultados obtenidos la variación de la densidad en cada solución no fue significativa, ya que en todas ellas cambió en menos de una unidad y el porcentaje de variación fue menor al valor aceptado, que corresponde a un 2%, lo que permite decir que este parámetro analizado se mantiene estable durante todo el intervalo de

mediciones y nos da cuenta, indirectamente, que la concentración de las soluciones se mantiene constante.

❖ **Determinación del pH.**

En la tabla n°21 se indica el valor promedio, la DS y el CV de las mediciones de pH obtenidas en cada solución analizada.

Tabla n°21: Valores promedio, DS y CV del pH de las soluciones volumétricas.

<b>pH</b>						
<b>Solución</b>	<b>A. Metilo</b>	<b>B. acetato</b>	<b>D. de potasio</b>	<b>EDTA</b>	<b>S. de cobre</b>	<b>T. de sodio</b>
<b>Promedio (pH)</b>	6,1026	4,5067	4,4162	4,5377	4,8366	9,5074
<b>DS</b>	0,1972	0,0531	0,0855	0,1284	0,0980	0,3829
<b>CV (%)</b>	<b>3,2286</b>	<b>1,1788</b>	<b>1,9352</b>	<b>2,8305</b>	<b>2,0261</b>	<b>4,0747</b>

En la figura n°9 se puede observar la variación del pH de cada solución durante el transcurso de los días, en cada una la variación es menor a 2 unidades, por otra parte el CV de las soluciones anaranjado de metilo, EDTA, sulfato de cobre y tiosulfato de sodio fue mayor al valor permitido, que es un 2%, pero esta variación no afectó a la valoración de las soluciones titulantes (como se puede observar en la figura n°10), al tratamiento de las muestras ni a la cuantificación de aluminio. Con estos resultados se puede decir que este parámetro se mantiene estable durante el periodo de análisis. La determinación del pH en las soluciones es importante debido a que juega un rol fundamental en la determinación del aluminio.

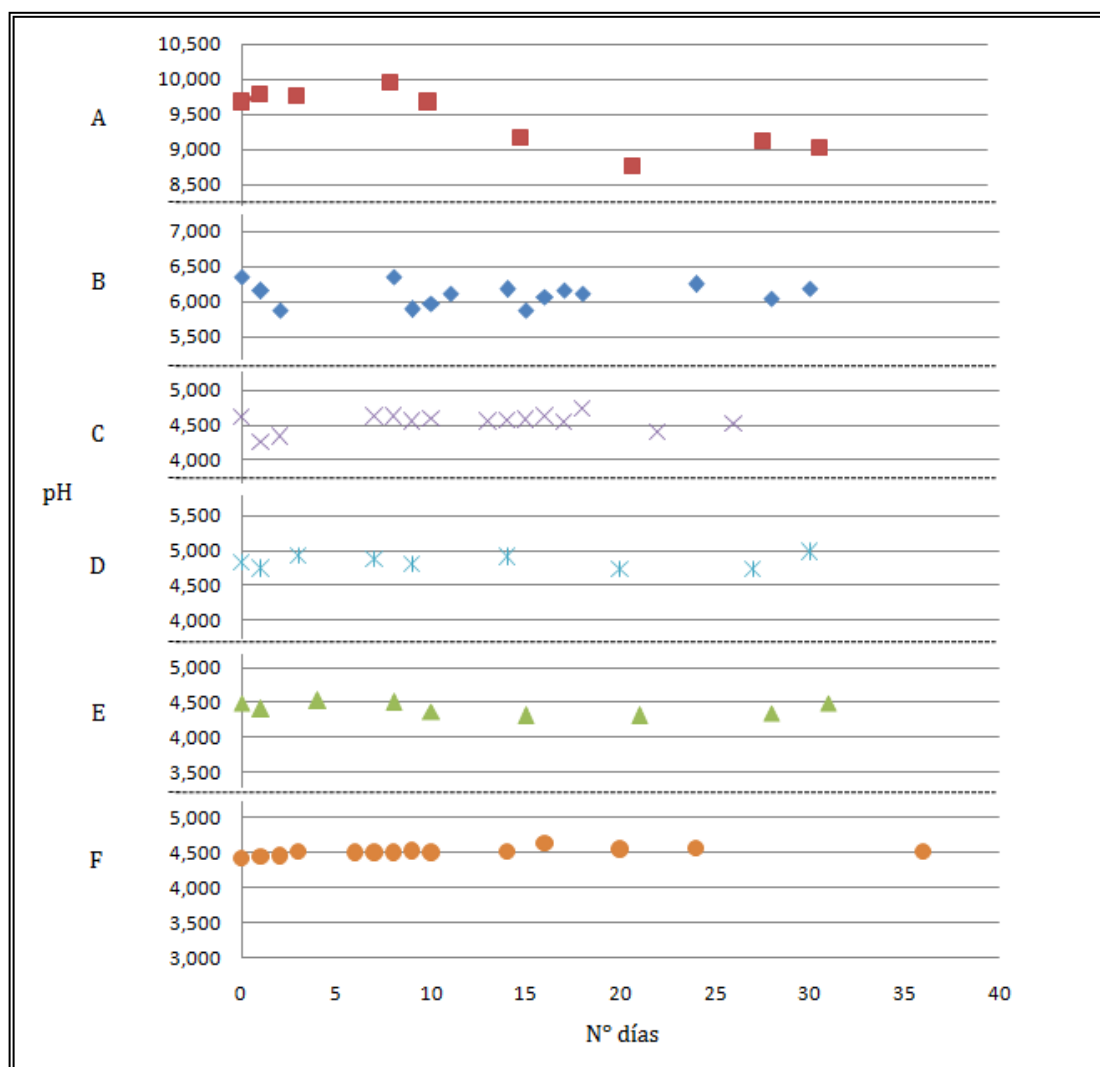


Figura nº9: Variación del pH de las soluciones volumétricas. A: Tiosulfato de sodio, B: Anaranjado de metilo, C: EDTA, D: Sulfato de cobre, E: Dicromato de potasio y F: Buffer acetato.

❖ ***Determinación del título de las soluciones valorantes.***

La tabla nº22 resume el promedio, la DS y el CV de los títulos obtenidos en las soluciones de tiosulfato de sodio y sulfato de cobre.

Tabla n°22: Promedio, DS y CV de los títulos de las soluciones volumétricas.

Título		
Solución	S. de cobre	T. de sodio
<b>Promedio (M)</b>	0,0201	0,0201
<b>DS</b>	0,0004	0,0002
<b>CV (%)</b>	<b>1,7940</b>	<b>1,2419</b>

La figura n°10 muestra la variación del título de las soluciones durante los 31 días que duró el análisis.

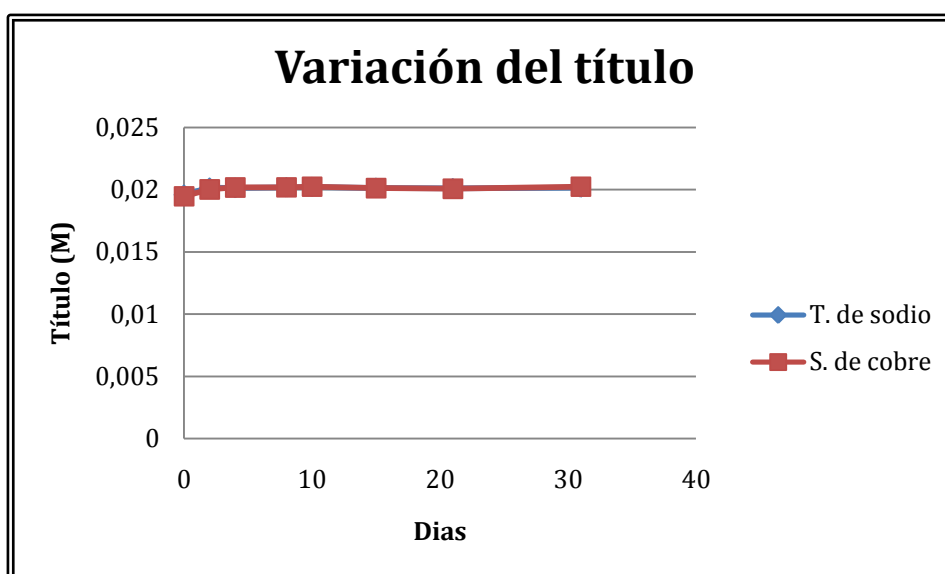


Figura n°10: Variación del título de las soluciones de tiosulfato de sodio y sulfato de cobre.

Los resultados obtenidos muestran que los títulos varían en menos de una unidad, el coeficiente de variación de ambas soluciones es menor al 2%, valor permitido, y la concentración se mantiene cercana al valor necesario para realizar la determinación de aluminio, que corresponde a 0,02M tanto para tiosulfato de sodio como para sulfato de cobre, de esta forma se puede decir que el título de ambas soluciones se mantiene estable durante los 31 días de análisis. Determinar este parámetro es muy importante debido a que conocer el contenido de las soluciones valorantes es un paso fundamental en las titulaciones volumétricas para conocer la cantidad de analito en las muestras.

#### 4.4.- Calificación de equipos.

##### ❖ *Linealidad.*

La tabla n°23 indica el valor promedio del volumen gastado de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , en las titulaciones de cada nivel de concentración de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .

Tabla n°23: Volumen promedio de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastado por nivel.

Nivel	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (mg/mL)	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (mL)
N1	0,5006	10,2216
N2	0,5678	11,5299
N3	0,7435	15,0920
N4	0,9068	18,3531
N5	0,9808	19,9041
N6	1,1223	22,8138

La linealidad fue evaluada por regresión lineal entre el volumen gastado de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (mL) v/s concentración de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (mg/mL) desde donde se obtiene la ecuación de la recta y el valor de  $r^2$ . Los resultados obtenidos se muestran en la figura n°11.

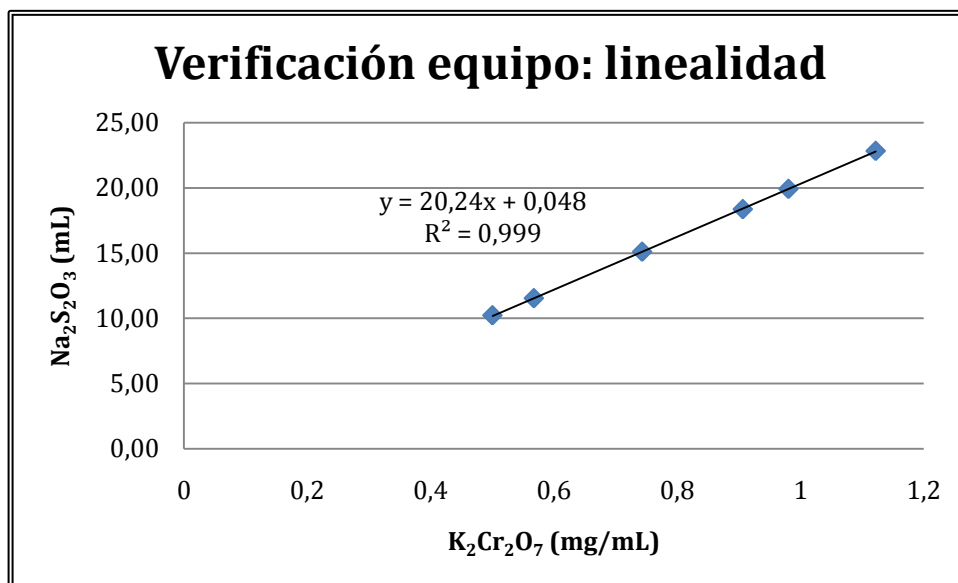


Figura n°11: Verificación del equipo, linealidad método  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

El coeficiente de determinación debe ser  $\geq 0,9990$ , el  $r^2$  obtenido fue 0,999, esto quiere decir que, la respuesta del equipo (gasto de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , en mL) es proporcional a las

concentraciones de  $K_2Cr_2O_7$ , por lo que el método de estandarización de tiosulfato de sodio es lineal.

❖ **Precisión.**

Para calcular la precisión se determinó el título de tiosulfato de sodio a 3 niveles de concentración de  $K_2Cr_2O_7$ . Con los valores del gasto de  $Na_2S_2O_3$  (mL) y los del título (M) se calculó el CV de cada nivel, estos resultados se resumen en la tabla n°24.

Tabla n°24: CV del volumen gastado y título del  $Na_2S_2O_3$  por nivel.

Nivel	CV (%)	
	Volumen $Na_2S_2O_3$	Título $Na_2S_2O_3$
N1	0,0650	0,0650
N2	0,0421	0,0421
N3	0,1260	0,1259

El CV debe ser  $\leq 0,2\%$  y según los resultados obtenidos el CV en todos los niveles fue menor al valor indicado, por lo que se puede decir que las determinaciones son precisas.

❖ **Exactitud.**

La exactitud se calculó mediante el porcentaje de error de las mediciones, para los cálculos se utilizaron los valores promedio del gasto de  $Na_2S_2O_3$  por nivel, y con ellos se obtuvo el valor real de  $K_2Cr_2O_7$ , estos resultados se resumen en la tabla n°25.

Tabla n°25: Porcentaje de error para determinar la exactitud.

Nivel	$K_2Cr_2O_7$ (mg/mL)		% Error
	Valor teórico	Valor experimental	
N1	0,5678	0,5671	0,1245
N2	0,7435	0,7430	0,0641
N3	0,9808	0,9807	0,0109

El porcentaje de error debe ser  $\leq 0,5\%$  por nivel, los resultados obtenidos en los tres niveles fueron menores a este valor, de esta forma se puede decir que las determinaciones realizadas por el equipo son exactas.

#### 4.5.- Validación de la metodología analítica.

##### ❖ *Especificidad.*

Para determinar la especificidad se calculó la diferencia, en porcentaje, entre el volumen de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  gastado en el blanco y el consumido en la titulación de cada excipiente. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla n°26.

Tabla n°26: Resultados especificidad, en porcentaje de diferencia.

Excipiente	% Diferencia
Glicina	1,1254
Cloruro de potasio	0,7204
Fosfato de sodio dibásico	0,9904
Fosfato de sodio dihidrato	1,2133
Bórax	0,2766
Timerosal	0,3537
Formaldehído	0,9600
Tween 20	1,2007
Cloruro de sodio	0,5817
Fosfato de potasio monobásico	0,8165

Con esta prueba se evaluó la diferencia entre la solución blanco y los excipientes, los resultados obtenidos fueron porcentajes de diferencia menores al 1,5%, debido a que el gasto de valorante es similar al gasto del blanco, esto comprueba que el método es capaz de cuantificar aluminio en presencia de otros compuestos existentes en la formulación sin causar interferencia, por lo tanto, el método es específico.

##### ❖ *Linealidad.*

Con el gasto de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  se calculó el CV de cada nivel, este debe ser  $\leq 2\%$ . Además con el consumo de aluminio obtenido se determinó el factor de respuesta de cada nivel (FR) y el CV de los FR, éstos deben ser semejantes entre sí, cercanos al valor de la pendiente y el CV de ellos debe ser  $\leq 5\%$  para ser considerado lineal, los resultados obtenidos se resumen en la tabla n°27.

Tabla n°27: Coeficiente de variación y FR, linealidad.

Niveles	CV (%)	FR
N1	0,1057	1,8062
N2	0,2189	1,8107
N3	0,3792	1,8296
N4	0,0954	1,8239
N5	0,3470	1,8269
N6	0,3792	1,8395
N7	0,9804	1,8062
	<b>CV (%)</b>	<b>0,7092</b>

Según los resultados obtenidos los 7 niveles analizados cumplen con un CV menor al límite establecido, los valores individuales de los FR son semejantes entre si y a la pendiente de la curva ( $m=1,828$ ) y el CV de éstos fue 0,7092%, por lo que se puede decir que la respuesta es lineal a la cantidad de aluminio. Luego se graficó el consumo de Al, expresado en mL de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , versus cantidad de aluminio y, mediante inspección visual de los puntos de la curva se determinó que éstos seguían un comportamiento lineal y, a través del método de los mínimos cuadrados se determinó la ecuación de la recta y el  $r^2$ . La gráfica obtenida se muestra en la figura n°12

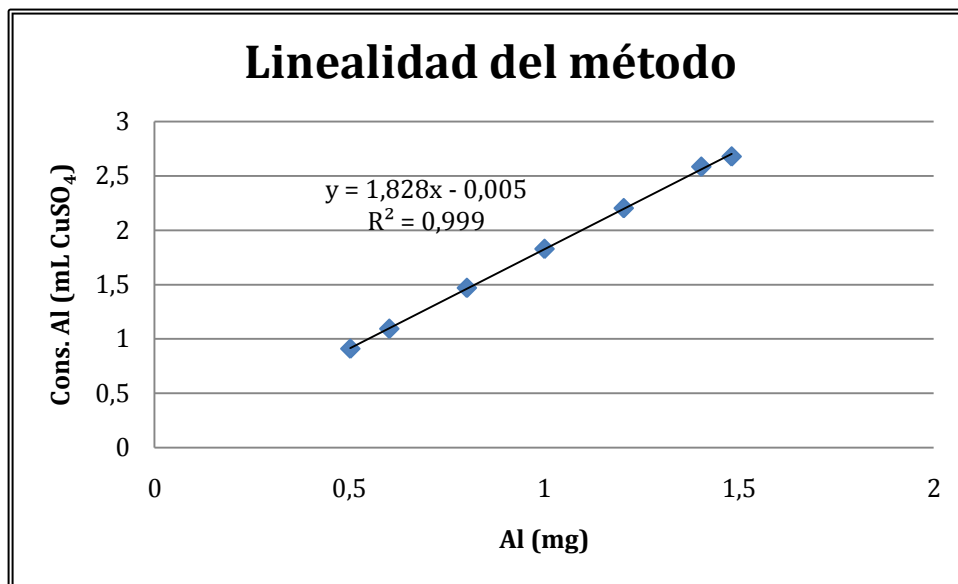


Figura n°12: Linealidad método determinación de aluminio.

El valor del coeficiente de determinación debe ser  $\geq 0,995$  y el obtenido fue 0,999, por lo tanto, la relación consumo versus cantidad de aluminio es lineal, esto quiere decir que la respuesta entregada por el equipo es proporcional a la cantidad de aluminio presente en las muestras.

Luego se determinó el intervalo de confianza del intercepto del eje “y”, mediante el cálculo de la desviación estándar residual y la desviación estándar del intercepto, los resultados se resumen en las tablas n°28 y n°29.

Tabla n°28: Desviación estándar residual y desviación estándar del intercepto.

Desviación Estándar residual	Desviación Estándar intercepto
0,0162	0,0183

Tabla n°29: Intervalo de confianza del intercepto.

Intervalo Confianza	$a \pm t_{(n-2)} * S_a$
Máx	0,0420
Mín	-0,0520

Mediante el cálculo del intervalo de confianza del intercepto también se puede estimar la linealidad, este valor debe incluir el cero. El intervalo obtenido indica que el intercepto pasa por cero, por lo que se considera lineal.

A través de todos los parámetros analizados se espera comprobar que la respuesta del equipo es proporcional a la cantidad de aluminio de la muestra, según los resultados obtenidos todos los parámetros cumplen con los criterios de aceptación, de esta forma se puede decir que, el método de determinación de aluminio por titulación volumétrica es lineal y que el intervalo de linealidad del método va entre 0,5027 a 1,4817 mg de aluminio.

❖ **Precisión.**

Fue determinada por precisión intermedia y repetibilidad, con los gastos de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (mL) se calculó el CV de cada nivel para ambas determinaciones. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla n°30.

Tabla n°30: CV del volumen de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  gastado en la precisión.

Nivel	CV Gasto $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (%)	
	Precisión intermedia	Repetibilidad
N1	0,3023	0,4994
N2	0,1841	0,4432
N3	0,1653	0,3058

El CV en cada nivel debe ser  $\leq 2\%$  y los resultados obtenidos fueron menores a este valor, lo que indica que se cumple este requisito y que la dispersión de los datos es baja.

Con el consumo de aluminio obtenido en cada nivel, expresado en mL de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , se determinó el CV y FR para precisión intermedia y repetibilidad. Además la precisión intermedia se evaluó con el “Test de comparación de medias”, mediante el Test de Fisher (F), la varianza común ( $S^2$ ),  $t$  de student ( $t_{\text{exp}}$ ) y el test de Cochran ( $t'$ ). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla n°31.

Tabla n°31: Resumen resultados precisión.

Nivel	N1		N2		N3	
	Prec. Int.	Repetib.	Prec. Int.	Repetib.	Prec. Int.	Repetib.
<b>Promedio (mL)</b>	0,9996	1,0206	1,9184	1,9281	2,7950	2,8196
<b>Varianza</b>	0,0007	0,0012	0,0002	0,0012	0,0001	0,0013
<b>CV (%)</b>	2,6811	4,3266	0,7625	1,8241	0,4180	1,2831
<b>FR</b>	1,9779	2,0087	1,9175	1,9273	1,8837	1,8995
<b>F</b>	2,7150		5,7808		9,5867	
<b><math>S^2</math></b>	0,0013		0,0007		0,0007	
<b><math>t_{\text{exp}}</math></b>	<b>0,7053</b>		<b>0,4396</b>		<b>1,1238</b>	
<b><math>t'</math></b>	4,3027		4,3027		4,3027	

En el test de Fisher se compara el valor de F calculado con el  $F_{crit}$  tabulado, donde  $F_{crit}$  debe ser  $\geq F$  calculado, en este caso el  $F_{crit}$  es 9,277 y los valores calculados de 2 niveles (N1 y N2) son menores al tabulado, con esto se concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los datos de repetibilidad y precisión intermedia de estos niveles.

Cuando las varianzas son iguales, se calcula la varianza conjunta que permite estimar la varianza común. Luego se realiza la comparación de medias, donde el valor de  $t_{exp}$  debe ser  $\leq t_{crit}$  tabulado, que para este análisis corresponde a 2,7765. En todos los niveles analizados el valor de  $t_{exp}$  es menor al tabulado, por lo que se concluye que no existe diferencia significativa entre las medias aritméticas de repetibilidad y precisión intermedia en cada nivel.

Si no se cumple la condición de varianzas iguales, como en el caso del nivel 3(N3) se debe aplicar el test de Cochran, donde el valor de  $t'$  calculado debe ser  $\geq t_{exp}$  obtenido en la comparación de medias. El valor obtenido fue mayor al  $t_{exp}$ , por lo que se puede decir que las medias de los datos de precisión intermedia y repetibilidad del nivel 3 son significativamente iguales.

Evaluar la precisión nos permite determinar el grado de concordancia entre los resultados obtenidos tras repetir el mismo procedimiento a una muestra, según los resultados obtenidos los parámetros analizados cumplen con los criterios de aceptación establecidos, de esta forma se puede decir que el método de determinación de aluminio por titulación volumétrica es preciso.

#### ❖ **Exactitud.**

La exactitud se evaluó mediante el porcentaje de recuperación, a través del volumen de valorante gastado y el teórico, y del promedio de la recuperación de los 3 niveles. Los resultados obtenidos en cada nivel se resumen en la tabla n°32.

Tabla n°32: Resumen resultados exactitud.

Nivel	Vol. Gastado (mL)	Vol. Teórico (mL)	Recuperación (%)
N1	8,6074	8,9001	96,7118
N2	7,9193	8,1490	97,1812
N3	7,2245	7,3979	97,6559
<b>Promedio (%)</b>			<b>97,1830</b>

El porcentaje de recuperación en los tres niveles debe estar en el rango 96-104%, los niveles analizados obtienen porcentajes mayores a 96%, por lo que se puede decir que se cumple este criterio para determinar la exactitud.

El gráfico de comparación de los volúmenes teóricos con los volúmenes gastados se muestra en la figura n°13, además mediante el método de los mínimos cuadrados, se obtiene el valor de  $r^2$  y de la pendiente, que deben ser  $\geq 0,995$  y  $\geq 0,95$  respectivamente. El valor de  $r^2$  obtenido fue 0,999 y el de la pendiente 1,085, por lo que se cumplen estos dos requisitos.

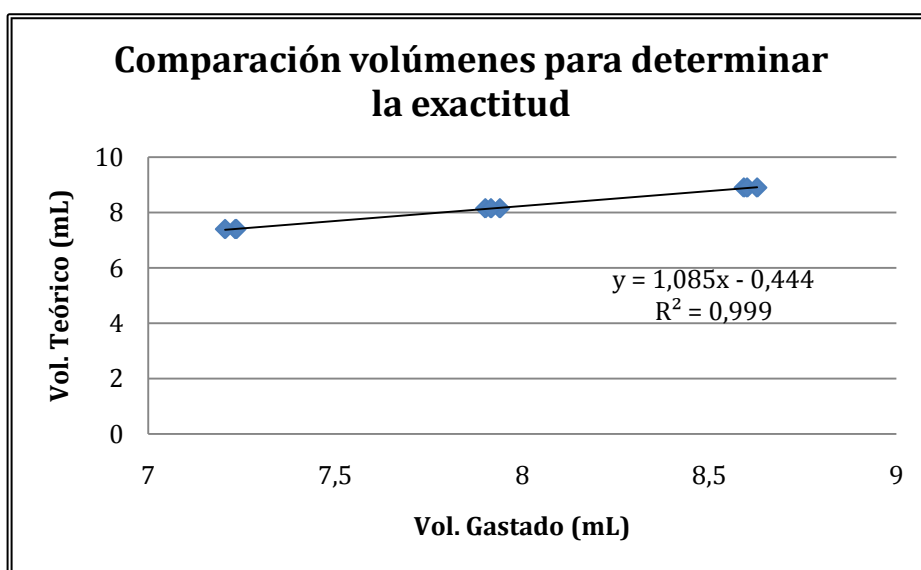


Figura n°13: Comparación volumen gastado vs. volumen teórico.

Luego se realizó la prueba de  $100 \pm 4S$ , utilizando el valor mayor de la desviación estándar ( $S$ ) de la precisión intermedia y el promedio del porcentaje de recuperación de los tres niveles, estos datos se resumen en la tabla n°33 y en la tabla n°34 el rango obtenido.

Tabla n°33: Valores del % Recuperación y desviación estándar.

Promedio % Recuperación	Desviación P. Intermedia
97,1830	2,9009

Tabla n°34: Prueba  $100 \pm 4S$ .

<b><math>100 \pm 4S</math></b>	
<b>Mín</b>	88,3963
<b>Máx</b>	111,6037

La prueba de  $100 \pm 4S$  se realiza cuando el método es muy preciso y se cumple cuando el promedio del porcentaje de recuperación está dentro del rango  $100 \pm 4S$ . El rango obtenido va desde 88,40-111,60% y el promedio de la recuperación es 97,18%, esto quiere decir que se cumple el criterio porque el promedio se encuentra dentro del intervalo.

Determinar la exactitud permite evaluar la proximidad de los resultados con el valor verdadero, los resultados obtenidos cumplen todos los criterios de aceptación analizados, de esta forma se puede decir que el método de determinación de aluminio es exacto.

❖ ***Límite de detección y cuantificación.***

Para determinar los límites se prepararon soluciones con aluminio en cantidades cercanas al nivel más bajo de la linealidad, luego se calculó la desviación estándar del volumen de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (mL) consumido por aluminio, estos resultados se resumen en la tabla n°35.

Tabla n°35: Resultados de la desviación estándar para determinar los límites.

Nivel	DS
N1	0,0189
N2	0,0263
N3	0,0174

A partir del gráfico cantidad de aluminio (mg) v/s consumo de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (mL consumo de aluminio) se determinó el intercepto, que representa la señal del blanco ( $Y_b$ ), este gráfico se muestra en la figura n°14.

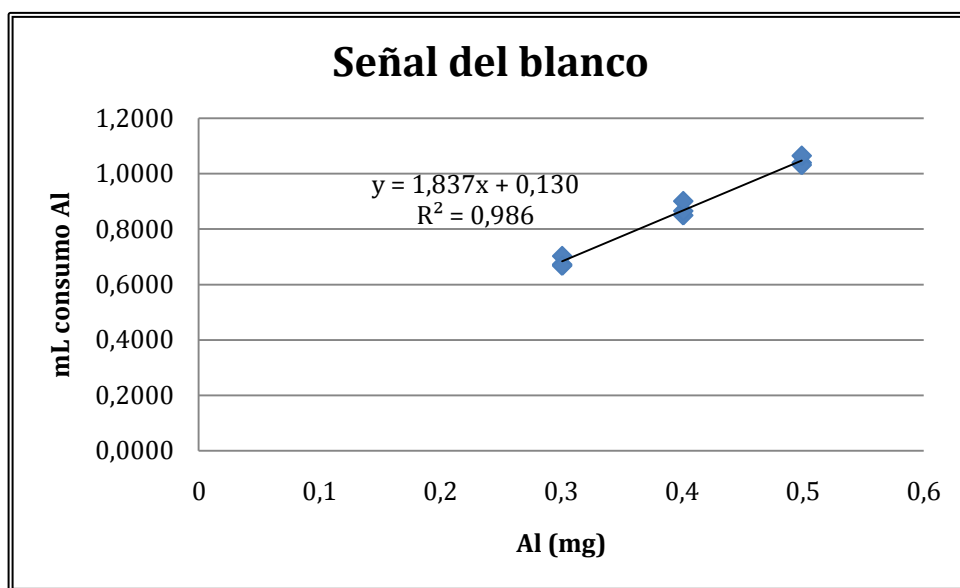


Figura n°14: Gráfico cantidad de analito vs. Respuesta para determinar la señal del blanco.

Del gráfico cantidad de aluminio (mg) v/s desviación estándar del consumo de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (mL consumo de aluminio), se obtiene el intercepto que corresponde a la desviación estándar del blanco ( $S_b$ ), esto se muestran en la figura n°15.

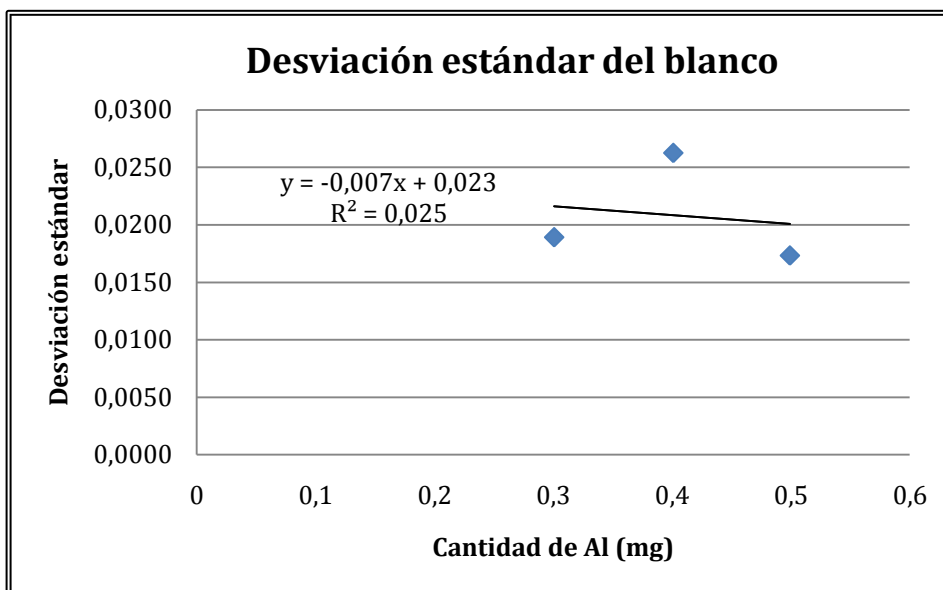


Figura n°15: Gráfico cantidad de analito v/s desviación estándar de la respuesta para determinar la desviación estándar del blanco.

En la tabla n°36 se muestran los valores obtenidos para el límite de detección (LD) y cuantificación (LC).

Tabla n°36: Límite de detección y de cuantificación.

Límites	Al (mg)	Gasto CuSO <sub>4</sub> (mL)
LD	0,1139	9,7268
LC	0,2013	9,5624

El cálculo de los límites nos permite conocer cuáles son las cantidades mínimas que el equipo puede detectar y determinar con precisión y exactitud. Según los resultados obtenidos, la mínima cantidad de aluminio que el equipo puede detectar de forma confiable son 0,1139 mg en las condiciones experimentales y la mínima cantidad que puede determinar con precisión y exactitud aceptable son 0,2013 mg. Luego de determinar los límites se realizó la verificación de los mismos y se comprueba experimentalmente que los valores obtenidos mediante el cálculo son correctos y que el equipo puede detectar y cuantificar estas cantidades de aluminio.

### ❖ *Intervalo.*

El intervalo es el rango entre la cantidad menor y mayor de analito que se puede determinar con exactitud, precisión y linealidad siguiendo el procedimiento descrito. Los rangos de cantidad de aluminio obtenidos en los parámetros antes mencionados, se indican en la tabla n°37.

Tabla n°37: Cantidades mínimas y máximas de Al para determinar el intervalo de validación.

Parámetro	Rango cantidad de Al (mg)	
	Mín.	Máx.
Linealidad	<b>0,5027</b>	1,4817
P. intermedia	0,5054	1,4838
Repetibilidad	0,5081	<b>1,4844</b>
Exactitud	0,9980	1,4528

Según los rangos obtenidos la cantidad mínima de aluminio se presentó en la linealidad y la máxima en la repetibilidad, de esta forma se puede decir que el intervalo de validación está comprendido entre 0,5027 a 1,4844 mg de aluminio.

#### **4.6.- Comparación de métodos.**

Para comparar los métodos, con el gasto de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (mL) en el blanco, en la solución estándar y en la muestra, se calculó el promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y varianza para ambos métodos. Además se realizó el Test de comparación de medias (TCM), a través del test de Fisher, la varianza común y  $t$  de student. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla n°38.

Tabla n°38: Resultados de la comparación de métodos.

TCM	Blanco		Estándar		Muestra	
	Equipo	Manual	Equipo	Manual	Equipo	Manual
<b>Promedio (mL)</b>	9,8740	9,8667	8,3964	8,4500	8,5504	8,4250
<b>DS</b>	0,0170	0,0577	0,0200	0,0577	0,1278	0,1258
<b>CV (%)</b>	<b>0,1726</b>	<b>0,5852</b>	<b>0,2382</b>	<b>0,6833</b>	<b>1,4945</b>	<b>1,4935</b>
<b>Varianza</b>	0,0003	0,0033	0,0004	0,0033	0,0163	0,0158
<b>F</b>	11,4716		8,3329		1,0313	
<b>S<sup>2</sup></b>	0,0018		0,0017		0,0161	
<b>t<sub>exp</sub></b>	<b>0,2120</b>		<b>1,8207</b>		<b>1,3987</b>	

El CV en cada solución analizada debe ser  $\leq 2\%$  y los resultados son menores al valor establecido, esto quiere decir que la variación en ambos métodos es baja. Para el TCM el valor de F obtenido en el Test de Fisher debe ser  $\leq F_{crit}$  tabulado y el valor de  $t_{exp}$ , de la prueba de  $t$  de student, debe ser  $\leq t_{crit}$  tabulado, de esta forma se puede decir lo siguiente:

- ✓ Solución blanco: los valores de F y  $t_{exp}$  calculados son menores a los tabulados ( $F_{crit}=19,000$ ;  $t_{crit}= 2,7765$ ), esto indica que no existe diferencia significativa entre las varianzas, ni entre las medias aritméticas de ambos métodos al analizar la solución blanco.
- ✓ Solución estándar y muestra: los valores calculados son menores a los tabulados ( $F_{crit}= 9,277$ ;  $t_{crit}= 2,4469$ ), esto permite decir que no existe diferencia significativa entre las varianzas, ni entre las medias aritméticas entre los dos métodos para cada solución.

## **5.- Discusión.**

### **5.1.- Documentación de calidad del equipo.**

La documentación es una parte esencial del sistema de gestión de calidad, debido a que es necesario mantener registros de cada equipo, instrumento o dispositivo usado para realizar ensayos, verificación y/o calibración, éstos deben estar fácilmente disponibles para el uso del personal del laboratorio.<sup>23</sup> Los documentos elaborados (ficha del equipo, instructivo y bitácora de uso) se realizaron exitosamente y su presencia permite cumplir con uno de los requerimientos necesarios en la calificación de los equipos, que corresponde a elaborar la documentación de calidad de cada uno y de esta forma contribuir al funcionamiento correcto y eficiente del laboratorio, asegurar la calidad de los resultados de los ensayos y dar confianza de que los productos o servicios satisfacen determinados requisitos de calidad.<sup>23, 24</sup>

### **5.2.- Instalación de la metodología analítica.**

Al instalar la metodología analítica se fijaron los parámetros para el funcionamiento óptimo del equipo en la determinación del contenido de aluminio, además la elaboración del instructivo de la metodología analítica permite llevar el procedimiento de forma óptima y segura. En él se explican de forma detallada todos los pasos a seguir, como la preparación y estandarización de soluciones, tratamiento de las muestras y de la solución blanco. De esta forma es posible que cualquier analista lleve a cabo el análisis de forma correcta. Este documento fue elaborado ya que, en el laboratorio deben existir procedimientos autorizados para realizar los análisis que suministren las instrucciones para efectuar operaciones generales y específicas, estos procedimientos e instrucciones se deben describir con los detalles necesarios para permitir al laboratorio garantizar la calidad de los resultados que genera.<sup>23</sup>

### **5.3.- Estabilidad de las soluciones.**

La estabilidad de las soluciones se determinó antes de realizar la validación de la metodología analítica debido a que esto permite conocer el tiempo durante el cual se podían utilizar las soluciones sin que se alteraran sus propiedades, el tiempo de almacenamiento e intervalo de preparación, esto es necesario considerarlo debido a que permite optimizar el trabajo y los tiempos de análisis de muestras.

A las soluciones se les realizó inspección visual (aspecto, color y presencia de partículas extrañas en suspensión), determinación de la densidad, pH y a las soluciones valorantes (tiosulfato de sodio y sulfato de cobre) se realizó además la determinación del título, donde lo que se buscaba era encontrar una diferencia significativa en el valor de cada parámetro para considerar que la solución ya no era estable. Estos parámetros se consideraron como indicadores de estabilidad debido a que son factores importantes en el desarrollo del método para la determinación de aluminio, ya que en él juega un rol importante la concentración de las soluciones valorantes y el control del pH es fundamental para evitar interferencias de otros metales y para permitir la obtención de un punto final adecuado de la reacción.

Según los resultados obtenidos, todas las soluciones analizadas se mantuvieron estables durante todo el periodo de análisis, aproximadamente un mes, de esta forma se puede asegurar que cada una se puede almacenar y utilizar durante este tiempo sin que pierdan la estabilidad.

### **5.4.- Calificación de equipos.**

Una parte de la calificación de equipos consiste en la verificación de los mismos, donde se realizan pruebas que permiten verificar su desempeño,<sup>24</sup> en esta oportunidad la verificación del titulador automático se realizó determinando la linealidad, precisión y exactitud en el método de estandarización del tiosulfato de sodio. Los criterios de aceptación establecidos para la calificación del titulador y la conclusión se muestran en la tabla n°39.

Tabla n°39: Resumen resultados calificación titulado automático.

<b>Parámetro</b>	<b>Criterio aceptación</b>	<b>Resultados</b>	<b>Calificación</b>
<b>Linealidad</b>	$r^2 \geq 0,9990$	$r^2 = 0,999$	<b>Cumple</b>
<b>Precisión</b>	CV $\leq 0,2\%$ por nivel	Vol. Gastado: N1=0,0650; N2=0,0421; N3=0,1260	<b>Cumple</b>
		Título: N1=0,0650; N2=0,0421; N3=0,1259	<b>Cumple</b>
<b>Exactitud</b>	Error $\leq 0,5\%$ por nivel	N1= 0,1245; N2= 0,0641; N3=0,0109	<b>Cumple</b>

Finalmente, debido a que se cumplen los criterios de aceptación de los parámetros evaluados se puede decir que el equipo está verificado y demuestra que es adecuado para la determinación cuantitativa de aluminio en vacunas, cumple con las especificaciones, funciona adecuadamente y contribuye a la obtención de datos confiables y de calidad.

### 5.5.- Validación de la metodología analítica.

Hoy en día los laboratorios deben asegurar la calidad de sus resultados, para ello la química analítica y los métodos estadísticos son herramientas importantes empleadas en la estimación de las posibles fuentes de error que podrían llegar a afectar las medidas y los resultados. En la evaluación de los errores y la comprobación de los métodos, la validación de procedimientos de análisis físico-químicos constituye una herramienta eficaz para hacerlo.<sup>26</sup> Para asegurar que un método está validado se deben determinar parámetros de desempeño analítico y éstos, a su vez deben cumplir los criterios de aceptación indicados para cada uno, y así demostrar que el método es adecuado para su uso. En la tabla n°40 se resumen los resultados obtenidos en la validación del método para la determinación de aluminio.

Tabla n°40: Resumen resultados validación.

Parámetro	Criterio de Aceptación	Resultado	Calificación	Observaciones
<b>Especificidad</b>	Valor obtenido debe ser similar al blanco	Valor obtenido fue similar al blanco	<b>Cumple</b>	Sin Observaciones
<b>Linealidad</b>	Inspección visual lineal	Gráfica Lineal	<b>Cumple</b>	Sin Observaciones
	$r^2 > 0,995$	$r^2 = 0,999$	<b>Cumple</b>	
	CV de cada nivel <2,0 %	CV <sub>N1</sub> = 0,1057%; CV <sub>N2</sub> = 0,2189%; CV <sub>N3</sub> = 0,3792%; CV <sub>N4</sub> = 0,0954%; CV <sub>N5</sub> = 0,3470%; CV <sub>N6</sub> = 0,3792%; CV <sub>N7</sub> = 0,9804%	<b>Cumple</b>	
	CV del factor de respuesta <5 %	CVFR(n=7) = 0,7092%	<b>Cumple</b>	
	Intervalo confianza incluye el cero	Intervalo confianza incluye el cero	<b>Cumple</b>	
<b>Precisión</b>	CV de cada nivel <2,0 %	CV <sub>N1</sub> = 0,4994%; CV <sub>N2</sub> = 0,4432%; CV <sub>N3</sub> = 0,3058%	<b>Cumple</b>	Sin Observaciones
<b>Repetibilidad</b>				
<b>Precisión Intermedia</b>	CV de cada nivel <2,0 %	CV <sub>N1</sub> = 0,3023%; CV <sub>N2</sub> = 0,1841%; CV <sub>N3</sub> = 0,1653%	<b>Cumple</b>	
	Comparación de Medias: estadístico <i>t</i> de student (0,95;(n <sub>1</sub> +n <sub>2</sub> -2)).Cumple si $t_{exp} < t_{crit}$ a dos colas	Nivel 1: $t_{exp} = 0,7053 < t_{crit} (2,7765)$ ; Nivel 2: $t_{exp} = 0,4396 < t_{crit} (2,7765)$ ; Nivel 3: $t_{exp} = 1,1238 < t_{crit} (2,7765)$	<b>Cumple</b>	
<b>Exactitud (Recuperación)</b>	Cada lectura entre el rango 96-104%	Valores encontrados entre 96,7118% y 97,6559%	<b>Cumple</b>	
	$r^2 > 0,995$	$r^2 = 0,999$	<b>Cumple</b>	
	$m > 0,95$	$m = 1,085$	<b>Cumple</b>	
	$100 \pm 4S$	$X3 = 97,6559\%$ ; $S = 2,9009$ ; (88,3963% a 111,6037)	<b>Cumple</b>	
<b>Límite de Detección</b>		0,1139 mg Al (9,7268 mL CuSO <sub>4</sub> )		Sin Observaciones
<b>Límite de Cuantificación</b>		0,2013 mg Al (9,5624 mL CuSO <sub>4</sub> )		

Finalmente, se demostró que el método está validado y es apto para la determinación cuantitativa de aluminio, ya que se cumplen los criterios de aceptación de cada parámetro analizado y de esta forma se puede asegurar que los resultados obtenidos

por este procedimiento son confiables y de calidad en el rango de validación que se encuentra comprendido entre 0,5027 a 1,4844 mg de aluminio.

### 5.6.- Comparación de métodos.

Los métodos manual y automatizado fueron comparados a través del CV y del test de comparación de medias, para esto se analizaron soluciones blanco, estándar y muestras por ambos métodos simultáneamente.

Con los resultados de los análisis de las soluciones se obtuvo que los CV son menores al 2%, y los resultados del test de comparación de medias se resumen en la tabla n°41.

Tabla n°41: Resumen test de comparación de medias, comparación de métodos.

TCM	Criterio aceptación	Blanco	Estándar	Muestra	Calificación
<b>F</b>	$F_{crit} > F$ ; $F_{crit}=19,000$ (blanco), 9,277 (estándar y muestra)	11,4716	8,3329	1,0313	<b>Cumple</b>
<b>t<sub>exp</sub></b>	$t_{exp} \leq t_{crit}$ ; $t_{crit}= 2,7765$ (blanco), 2,4469 (estándar y muestra)	0,2120	1,8207	1,3987	<b>Cumple</b>

Finalmente, se puede afirmar que los resultados obtenidos por el método manual y automatizado son equivalentes en exactitud y precisión, de modo que el uso del método automático se puede adoptar como alternativa al método farmacopeico para la determinación cuantitativa de aluminio.<sup>21</sup>

## **6.- Conclusiones.**

1.- La verificación del titulador automático, modelo T70, permite concluir que el equipo es adecuado para la determinación cuantitativa de aluminio, esto confirma que el equipo funciona de forma segura y que produce resultados confiables.

2.- A partir de la validación de la metodología analítica, mediante la determinación de la especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límites de determinación, cuantificación e intervalo; se demostró que el procedimiento analítico es adecuado para la determinación de aluminio, y que además, el desarrollo del método entrega resultados confiables y reproducibles.

3.- El detalle en la descripción del procedimiento para la determinación cuantitativa de aluminio proporciona las instrucciones y pasos a seguir para realizar el método, y además permite que cualquier analista lo realice de forma óptima y segura.

4.- En la comparación de los métodos se concluye que los resultados obtenidos son semejantes y que los métodos son equivalentes. Por esta razón y por las ventajas que presentan los métodos automatizados, como la reducción del tiempo de análisis, disminución de errores y optimización de la productividad, se puede concluir que este método se puede utilizar como alternativa al método farmacopeico oficial.

5.- Finalmente, se puede decir que mediante la verificación del titulador automático, la implementación y validación de la metodología analítica y comparación con el método oficial, la determinación cuantitativa de aluminio presente en vacunas por titulación por retroceso, se puede realizar de forma óptima y confiable, lo que permite asegurar la calidad de los productos farmacéuticos analizados por este método.

## 7.- Referencias.

- 1.- ISP. Instituto de Salud Pública de Chile. <http://www.ispch.cl/> (página visitada el 21 de octubre del 2013).
- 2.- Rowe R. Sheskey P. Quinn M. 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Sixth edition. Pharmaceutical Press. 34-35, 38-39 pp.
- 3.- Eickhoff T. Myers M. 2002. Workshop summary. Aluminum in vaccines. *Vaccine*. 20; Suppl 3:S1-S4.
- 4.- Hunter R. 2002. Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine*. 20; Suppl 3:S7-S12.
- 5.- Vaccine Education Center. 2012. El aluminio en las vacunas: lo que debe saber. The Children's Hospital of Philadelphia. Número 4. <http://www.chop.edu> (página visitada el 06 de Noviembre del 2013).
- 6.- Lindblad E. 2004. Aluminium adjuvants in retrospect and prospect. *Vaccine* 22 (27-28): 3658-3668.
- 7.- Baylor N. Egan W. Richman P. 2002. Aluminum salts in vaccines-US perspective. *Vaccine*. 20; Suppl 3:S18-S23.
- 8.- EMMM. 2012. El aluminio y las vacunas. Estado actual de los conocimientos científicos. Ayuda a los enfermos de la Miofascitis Macrofágica. <http://es.myofasciitis.com/> (página visitada el 14 de Diciembre del 2013).
- 9.- Zschunke A. 2000. Reference Materials in Analytical Chemistry. A Guide for Selection and Use. Springer. U.S.A. 30-31 pp.

- 10.- Skoog D. West D. Holler F. Crouch S. 2005. Fundamentos de Química Analítica. Octava edición. Editorial Thomson. 341-342, 344, 372, 457-458, 463, 465-466, 469, 471, 479, 486-487 pp.
- 11.- Skoog D. West D. 2002. Introducción a la química analítica. Editorial Reverté. España. 179, 180, 181, 254-258 pp.
- 12.- Clavijo A. 2002. Fundamentos de Química Analítica. Equilibrio iónico y análisis químico. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 15, 23, 26, 28, 37-39, 111, 449-452, 455, 456, 462, 463 pp.
- 13.- Skoog D. Holler F. Crouch S. 2008. Principios de análisis instrumental. Sexta edición. Cengage Learning. México. 11 pp.
- 14.- Farmacopea de los Estados Unidos de América, Trigésima quinta revisión y Formulario Nacional, Trigésima edición. 2012. Capítulos Generales: <541> Volumetría. Rockville, MD. 219-222 pp.
- 15.- Gennaro A. 2003. Remington Farmacia. 20° edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 557, 562-563, 567-569 pp.
- 16.- Patnaik P. 2004. Dean's Analytical Chemistry Handbook. Second Edition. McGraw-Hill. 2.8, 2.10, 4.90, 21.31 pp.
- 17.- Hoffmann W. 1996. Computer controlled titration with piston burette or peristaltic pump – a comparison. Anal Bio anal Chem. 356 (3-4):303-305.
- 18.- Yang S. Tsai R. 2006. Complexometric Titration of Aluminum and Magnesium Ions in Commercial Antiacids. J. Chem. Educ. 83 (6): 906-906.
- 19.- Vogel A. 1983. Química Analítica Cualitativa. Sexta edición. Kapelusz. Buenos Aires, Argentina. 408 pp.

- 20.- Bányai E. Gere E. Erdey L. 1960. Complexometric determination of mercury and aluminium ions. *Talanta* 4: 133-140.
- 21.- Farmacopea de los Estados Unidos de América, Trigésima quinta revisión y Formulario Nacional, Trigésima edición. 2012. Capítulos Generales: <16> Métodos automatizados de análisis. Rockville, MD. 45-52 pp.
- 22.- Farmacopea de los Estados Unidos de América, Trigésima quinta revisión y Formulario Nacional, Trigésima edición. 2012. Capítulos Generales: <1058> Calificación de Instrumentos Analíticos. Rockville, MD. 648-653 pp.
- 23.- OMS. 2010. Anexo 1: Buenas Prácticas de la OMS para Laboratorios de Control de Calidad de productos farmacéuticos. Serie de Informes Técnicos de la OMS, N° 957.
- 24.- Subdepartamento Laboratorio Nacional de Control. 2009. Calificación de equipos e instrumentos. IT-420.00-040.
- 25.- Farmacopea de los Estados Unidos de América, Trigésima quinta revisión y Formulario Nacional, Trigésima edición. 2012. Capítulos Generales: <1225> Validación de procedimientos Farmacopeicos. Rockville, MD. 967-971 pp.
- 26.- Rodríguez M. 2007. Validación de Metodologías Analíticas. Edición 10. Miliequivalente, La revista de Química útil. ISSN 1692-4991. 9-11 pp.
- 27.- Farmacopea de los Estados Unidos de América, Trigésima cuarta revisión y Formulario Nacional, Vigésima novena edición. 2011. Soluciones Volumétricas. Rockville, MD. 1080 pp.
- 28.- Sección Físico-química Sub-Departamento Laboratorio Nacional de Control. 2013. Instructivo Determinación del contenido de aluminio en vacunas por titulación volumétrica.

29.- European Pharmacopoeia. 1997. 3<sup>rd</sup> edition. European Department for the Quality of Medicines within the Council of Europe, Strasbourg. 66 pp.

30.- Official Medicines Control Laboratories Network of the Council of Europe Quality, Management Document. 2012. PA/PH/OMCL (07) 108 4R-Annex 5: Qualification of automatic titrators.

31.- Sub-Departamento Laboratorio Nacional de Control. 2007. Procedimiento de validación para métodos analíticos Físico-químicos. PR-420.00-003.

## **8.- Anexos.**

8.1.- Resultados estabilidad de soluciones.

8.2.- Resultados calificación de equipos.

8.3.- Resultados validación de la metodología analítica.

8.4.- Resultados comparación de métodos.

## 8.1.- Resultados estabilidad de soluciones.

### ❖ *Buffer acetato y Dicromato de potasio*

Tabla: Valores de densidad y pH de las soluciones de buffer acetato.

Buffer acetato pH 4,4							
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )				pH			
N° día	A	B	C	N° día	A	B	C
0	1,0852	1,0849	1,0854	0	4,417	4,409	4,424
1	1,0840	1,0840	1,0849	1	4,439	4,435	4,441
2	1,0833	1,0832	1,0838	2	4,460	4,448	4,449
3	1,0844	1,0839	1,0847	3	4,519	4,506	4,507
4	1,0840	1,0837	1,0843	6	4,510	4,492	4,488
7	1,0844	1,0842	1,0849	7	4,513	4,500	4,498
8	1,0837	1,0835	1,0839	8	4,496	4,504	4,503
9	1,0830	1,0830	1,0836	9	4,525	4,528	4,525
10	1,0837	1,0836	1,0842	10	4,500	4,496	4,498
11	1,0843	1,0842	1,0849	14	4,517	4,504	4,506
15	1,0835	1,0832	1,0840	16	4,633	4,624	4,625
17	1,0833	1,0829	1,0835	20	4,599	4,521	4,513
21	1,0851	1,0847	1,0853	24	4,569	4,558	4,561
23	1,0839	1,0835	1,0842	36	4,510	4,504	4,508
25	1,0859	1,0858	1,0830	x	x	x	x
37	1,0849	1,0843	1,0850	x	x	x	x

Tabla: Valores de densidad y pH de la solución de dicromato de potasio.

Dicromato de potasio			
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )		pH	
N° día	A	N° día	A
0	1,0008	0	4,494
1	1,0004	1	4,403
2	1,0003	4	4,521
4	1,0003	8	4,503
8	1,0004	10	4,372
10	1,0006	15	4,310
15	1,0007	21	4,313
21	1,0010	28	4,345
28	1,0008	31	4,485
31	1,0009	x	x





❖ **Hidróxido de sodio 50%.**

Tabla: Valores de densidad de las soluciones de hidróxido de sodio.

<b>Hidróxido de sodio 50%</b>			
<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>			
<b>N° día</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
0	1,3750	1,3710	1,3742
1	1,3747	1,3705	1,3738
4	1,3762	1,3728	1,3759
5	1,3758	1,3717	1,3751
6	1,3763	1,3708	1,3741
7	1,3771	1,3717	1,3749
8	1,3757	1,3712	1,3741
11	1,3769	1,3716	1,3749
12	1,3757	1,3712	1,3738
13	1,3754	1,3704	1,3737
14	1,3759	1,3707	1,3737
15	1,3763	1,3713	1,3745
19	1,3762	1,3706	1,3737
21	1,3765	1,3705	1,3737
25	1,3776	1,3722	1,3753
27	1,3768	1,3713	1,3743
28	1,3783	1,3734	1,3763

❖ **1-(2-piridilazo)-2-naftol 0,1% (PAN).**

Tabla: Valores de densidad de las soluciones de PAN.

PAN			
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )			
Nº día	A	B	C
0	0,7935	0,7904	0,7899
1	0,7953	0,7911	0,7907
2	0,7907	0,7879	0,7876
3	0,7949	0,7911	0,7906
4	0,7958	0,7906	0,7903
7	0,7914	0,7899	0,7893
8	0,7888	0,7898	0,7889
9	0,7936	0,7901	0,7896
10	0,7935	0,7909	0,7904
11	0,7967	0,7924	0,7916
15	0,7920	0,7906	0,7896
17	0,7929	0,7896	0,7889
21	0,7938	0,7915	0,7908
23	0,7923	0,7900	0,7891
25	0,7945	0,7922	0,7910
37	0,7944	0,7913	0,7899

**8.2.- Resultados calificación de equipos.**

❖ **Linealidad.**

Tabla: Volumen de tiosulfato de sodio gastado en cada nivel.

Nivel	N1	N2	N3	N4	N5	N6
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (mL)	10,2205	11,5369	15,0858	18,2235	19,9319	22,7735
	10,2490	11,5220	15,0917	18,4588	19,8972	22,8212
	10,1953	11,5309	15,0985	18,3769	19,8832	22,8466

❖ **Precisión.**

Tabla: Valores del gasto y del título de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  por nivel.

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (mL)			Título (M)		
N1	N2	N3	N1	N2	N3
11,5369	15,0858	19,9319	0,0201	0,0201	0,0201
11,5220	15,0917	19,8972	0,0201	0,0201	0,0201
11,5309	15,0985	19,8832	0,0201	0,0201	0,0201

❖ **Exactitud.**

Tabla: Resultados del valor real de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  y del porcentaje de error.

Nivel	Gasto $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (mL)	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (mg/mL)		% Error
		Valor teórico	Valor medido	
N1	11,5369	0,5678	0,5674	0,1245
	11,5220	0,5678	0,5667	0,1352
	11,5309	0,5678	0,5671	0,0941
N2	15,0858	0,7435	0,7427	0,0641
	15,0917	0,7435	0,7430	0,0251
	15,0985	0,7435	0,7433	0,0245
N3	19,9319	0,9808	0,9821	0,0109
	19,8972	0,9808	0,9804	0,0809
	19,8832	0,9808	0,9797	0,1161

**8.3.- Resultados validación de la metodología analítica.**

❖ **Especificidad.**

Tabla: Valores obtenidos del gasto del  $\text{CuSO}_4$  en el blanco y los excipientes.

Excipiente	Blanco (mL)	Gasto $\text{CuSO}_4$ (mL)
Glicina	9,7775	9,8875
Cloruro de potasio	9,7775	9,8479
Fosfato de sodio dibásico	9,7775	9,8743
Fosfato de sodio dihidrato	9,7775	9,8961
Bórax	9,8471	9,8743
Timerosal	9,8471	9,8819
Formaldehído	9,8471	9,9416
Tween 20	9,8471	9,9653
Cloruro de sodio	9,8841	9,8266
Fosfato de potasio monobásico	9,8841	9,8034

❖ **Linealidad.**

Tabla: Valores del volumen gastado de CuSO<sub>4</sub> por nivel.

Niveles	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
Gasto CuSO <sub>4</sub> (mL)	8,8939	8,7058	8,3569	7,9816	7,5707	7,1954	7,1750
	8,9032	8,6940	8,3122	7,9780	7,6153	7,2493	7,0762
	8,8844	8,7313	2,0889*	7,9670	7,6174	7,2140	2,2062*

\*Estos valores se consideran datos aberrantes, para eliminarlos se utilizó el criterio de Dixon.

Tabla: Resultados del consumo de aluminio, promedio y factores de respuesta de la linealidad.

Nivel	Al (mg)	Consumo Al (mL)	Promedio cons. Al (mL)	FR
N1	0,5027	0,908	0,9081	1,8061
		0,8987		1,7876
		0,9175		1,825
N2	0,6028	1,0961	1,0915	1,8183
		1,1079		1,8379
		1,0706		1,776
N3	0,802	1,445	1,4674	1,8018
		1,4897		1,8575
N4	1,0014	1,8203	1,8264	1,8178
		1,8239		1,8214
		1,8349		1,8324
N5	1,2046	2,2312	2,2008	1,8522
		2,1866		1,8151
		2,1845		1,8134
N6	1,4038	2,6065	2,5823	1,8567
		2,5526		1,8183
		2,5879		1,8435
N7	1,4817	2,6269	2,6763	1,7729
		2,7257		1,8395

Tabla: Datos para calcular la desviación estándar residual y el intervalo de confianza del intercepto.

Nivel	mg Al (xi)	mL Cons. Al (yi)	$\hat{y}$
N1	0,5027	0,9081	0,9140
N2	0,6028	1,0915	1,0969
N3	0,8020	1,4674	1,4610
N4	1,0014	1,8264	1,8255
N5	1,2046	2,2008	2,1971
N6	1,4038	2,5823	2,5612
N7	1,4817	2,6763	2,7036

❖ **Precisión.**

Tabla: Valores del volumen de gasto de  $\text{CuSO}_4$  y de consumo de aluminio.

Nivel	Volumen $\text{CuSO}_4$ (mL)		Volumen consumo de Al	
	Precisión int.	Repetibilidad	Precisión int.	Repetibilidad
N1	8,8513	8,8441	1,0124	1,0196
	8,8949	8,7984	0,9688	1,0653
	8,8461	8,8867	1,0176	0,9770
N2	7,9343	7,9451	1,9294	1,9186
	7,9397	7,9651	1,9240	1,8986
	7,9619	7,8967	1,9018	1,9670
N3	7,0576	7,0780	2,8061	2,7857
	7,0809	7,0482	2,7828	2,8155
	7,0677	7,0060	2,7960	2,8577

Tabla: FR de la precisión intermedia y repetibilidad.

Nivel	Factor de Respuesta	
	Precisión int.	Repetibilidad
N1	2,0032	2,0067
	1,9169	2,0966
	2,0135	1,9228
N2	1,9285	1,9178
	1,9231	1,8978
	1,9009	1,9662
N3	1,8912	1,8767
	1,8755	1,8967
	1,8844	1,9252

❖ **Exactitud.**

Tabla: Valores obtenidos en la exactitud.

Nivel	Vol. Gastado CuSO <sub>4</sub> (mL)	Vol. Teórico CuSO <sub>4</sub> (mL)	% Recuperación
St	7,9785	7,8572	101,5432
	7,9641	7,8572	101,3599
	7,9561	7,8572	101,2581
N1	8,5927	8,9001	96,5462
	8,6014	8,9001	96,6440
	8,6282	8,9001	96,9451
N2	7,9402	8,1490	97,4377
	7,9013	8,1490	96,9603
	7,9164	8,1490	97,1456
N3	7,2328	7,3979	97,7681
	7,2354	7,3979	97,8032
	7,2053	7,3979	97,3964

❖ **Límite de detección y cuantificación.**

Tabla: Consumo de aluminio por nivel (volumen de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O).

Nivel	Cantidad Al (mg)	Consumo Al (mL)
N1	0,3007	0,6724
		0,7026
		0,6677
N2	0,4010	0,8497
		0,8655
		0,9010
N3	0,4991	1,0398
		1,0316
		1,0649

Tabla: Resultados verificación de los límites.

Resultados	CuSO <sub>4</sub> (mL)	Al (mg)	Prom. Al (mg)
LD	9,5850	0,1274	0,1168
	9,6032	0,1176	
	9,6256	0,1055	
LC	9,4336	0,2091	0,2181
	9,4045	0,2248	
	9,9425	0,2205	

#### 8.4.- Resultados comparación de métodos.

Tabla: Volumen de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (mL) gastado por ambos métodos.

Solución	Gasto $\text{CuSO}_4$ (mL)	
	Equipo	Manual
Blanco	9,8649	9,9
	9,8937	9,8
	9,8635	9,9
Estándar	8,3941	8,5
	8,3848	8,4
	8,3814	8,5
	8,4253	8,4
Muestra	8,7377	8,6
	8,5209	8,3
	8,4889	8,4
	8,4542	8,4