



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA



**“Diseño del estudio de estabilidad
para el cloruro de benzalconio
en solución al 50%”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MARÍA DEL CARMEN CARBAJAL MORENO

Director de Tesis:

Dr. David Corona Becerril

Asesor externo:

QFB. Maytrelli Carrillo Muñoz

Toluca, Estado de México 2018

DEDICATORIAS

A mis papás Miguel Ángel e Isabel, por el apoyo incondicional a lo largo de mi vida, esto es para ustedes.

A mi hermano Miguel Ángel por ser el mejor hermano y apoyarme en los momentos más difíciles gracias, por tanto.

A Diana y Many por ser los mejores compañeros de equipo, las experiencias, conocimientos, el apoyo en la Facultad y por compartir a lo largo de este tiempo una gran amistad.

A Itzel y Kenia por el apoyo durante todos estos años y ser amigas tan geniales.

A mis amigos Andrés, Cyntia y Jesús por los momentos compartidos.

A mi familia y todas las personas que son parte de mi vida.

“La mejor vida no es la más larga, sino la más rica en buenas acciones.”

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

A la empresa Organo Síntesis por el apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Bayardo E. Velasco por darme la oportunidad de ser parte de esta gran empresa llamada Organo Síntesis, por la confianza para realizar y ser parte de este proyecto, gracias por creer en mí.

Al Dr. David Corona por el apoyo a este trabajo, los consejos, las enseñanzas, la paciencia y por creer en mí, pero sobre todo gracias por su amistad.

A la QFB. May por darme la oportunidad de realizar este proyecto y el apoyo para continuar; gracias por los consejos y la disposición para explicarme cuando más dudas tenía, aún más importante gracias por tu amistad.

Al Q. Humberto Cortés y al Q. Genaro Romero por su apoyo y consejos para realizar este proyecto.

Al QFB. Marco por los consejos y apoyo para el proyecto, gracias.

A mis compañeros de Calidad Luis, José, Juan y Moy, gracias por los consejos, las enseñanzas y el apoyo para terminar este proyecto.

A todos los profesores que fueron parte de mi formación académica por los conocimientos y consejos brindados.

ÍNDICE

Resumen	14
Abreviaturas	15
Introducción	16
Capítulo 1: MARCO TEÓRICO	
1.1 Cloruro de benzalconio	17
1.2 Estabilidad de fármacos	18
1.3 Degradación forzada	18
1.3.1 Mecanismos de degradación de fármacos	20
1.3.1.1 Hidrólisis	20
1.3.1.2 Oxidación	22
1.3.1.3 Condiciones térmicas	23
1.3.1.4 Fotodegradación	24
1.4 Aplicaciones industriales de los estudios de degradación forzada.....	25
1.5 Estudios de estabilidad	25
1.5.1 Selección de lotes para el estudio de estabilidad	27
1.5.2 Análisis de muestras de estabilidad	27
1.6 Métodos indicativos de estabilidad	27
1.6.1 Validación de métodos analíticos	28
1.7 Verificación de métodos farmacopéicos	29
1.8 Cromatografía.....	30
1.8.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	31
1.9 Volumetría.....	31
1.9.1 Clasificación de las valoraciones.....	32
1.9.2 Detección del final de la valoración	33
Capítulo 2: DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	
2.1 Justificación	35
2.2 Objetivos.....	35
2.2.1 General.....	35
2.2.2 Específicos	35
2.3 Hipótesis	36
Capítulo 3: DISEÑO EXPERIMENTAL	
3.1 Selección del lote.....	37
3.2 Metodología analítica	37
3.3 Muestras para hidrólisis ácida	40
3.3.1 Método Analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50%	40

3.3.2	Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	40
3.3.3	Método analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	41
3.3.4	Método analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	41
3.3.5	Método analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50%	41
3.4	Muestras para hidrólisis básica	41
3.4.1	Método Analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	42
3.4.2	Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50%	42
3.4.3	Método Analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	42
3.4.4	Método Analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	43
3.4.5	Método Analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50%	43
3.5	Muestras para oxidación	43
3.5.1	Método Analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	44
3.5.2	Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50%	44
3.5.3	Método Analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %.....	44
3.5.4	Método Analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	44

3.5.5	Método Analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50%	45
3.6	Muestras para calor seco	45
3.6.1	Método Analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	45
3.6.2	Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50%	45
3.6.3	Método Analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	46
3.6.4	Método Analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	46
3.6.5	Método Analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50%	46
3.7	Fotoestabilidad	46
3.7.1	Muestras para fotoestabilidad de luz fría	48
3.7.1.1	Método Analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50%	48
3.7.1.2	Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	49
3.7.1.3	Método Analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	49
3.7.1.4	Método Analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50%	49
3.7.1.5	Método Analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50%	49
3.7.2	Muestras para fotoestabilidad de luz UV-vis	50
3.8	Preparación de controles negativos	50
3.9	Verificación del método analítico 3 para la determinación del contenido de impurezas por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50%.....	50

3.10	Identificación del ácido benzoico y tolueno como productos de degradación.....	51
Capítulo 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
4.1	Monitoreo de la intensidad de la Lámpara de luz fría para el estudio de degradación forzada	52
4.2	Monitoreo de la temperatura y humedad de la cámara climática para el estudio de degradación forzada	52
4.3	Método analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50 %.....	53
4.4	Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %	56
4.5	Método Analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %.....	60
4.5.1	Hidrólisis ácida.....	60
4.5.2	Hidrólisis básica.....	62
4.5.3	Oxidación	64
4.5.4	Calor seco.....	67
4.5.5	Luz fría	69
4.5.6	Luz UV-vis.....	72
4.6	Método analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50 %.....	74
4.7	Método analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50 %.....	77
4.8.1	Oxidación	79
4.8.2	Calor seco.....	81
4.8.3	Luz fría	83
4.8.4	Luz UV-vis	85
4.8	Verificación del Método Analítico 3 para la Determinación del contenido de impurezas por HPLC del Cloruro de Benzalconio en solución al 50%.....	87
4.9	Selección del material de empaque	88
4.10	Diseño del estudio de estabilidad	89
Capítulo 5: CONCLUSIONES		91
Referencias		93

Índice de figuras

Figura 1: Estructura química del cloruro de benzalconio, donde R representa una cadena alquílica como C12, C14 o C16.....	17
Figura 2: Diagrama de las diferentes condiciones de degradación usadas comúnmente en fármacos y formulaciones farmacéuticas.....	19
Figura 3: Propuesta de degradación por la vía alcalina para la Rebamipida.....	21
Figura 4: Representación gráfica de la ecuación de Arrhenius.....	23
Figura 5: Representación general de un sistema HPLC (Merck,2017)	31
Figura 6: Valoración potenciométrica de KCl con AgNO ₃ . Método de la primera y segunda derivada para determinar el punto de equivalencia.....	34
Figura 7: Lámpara de Inmersión de luz UV-Vis con foto reactor.....	48
Figura 8. Cámara experimental para exposición a la lámpara fluorescente de luz fría.....	48

Índice de Gráficas

Gráfica 1: Monitoreo de intensidad de la lámpara de luz fría.....	52
Gráfica 2: Monitoreo de temperatura y humedad de la cámara climática.....	53
Gráfica 3: % Componente alquílico vs tiempo de análisis en la prueba de hidrólisis ácida.....	58
Gráfica 4: % Componente alquílico vs tiempo de análisis en la prueba de hidrólisis básica.....	58
Gráfica 5: % Componente alquílico vs tiempo de análisis en la prueba de oxidación.....	58
Gráfica 6: % Componente alquílico vs tiempo de análisis en la prueba de calor seco ...	59
Gráfica 7: % Componente alquílico vs tiempo de análisis en la prueba de luz fría.....	59
Gráfica 8: % Componente alquílico vs tiempo de análisis en la prueba de luz UV-vis.....	59
Gráfica 9: % Alcohol bencílico vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida.	60
Gráfica 10: % Benzaldehído vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida.....	60
Gráfica 11: % Cloruro de bencilo vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida.	61
Gráfica 12: % Ácido benzoico vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida..	61
Gráfica 13: % Tolueno vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida.....	61
Gráfica 14: % Imp desc 2 vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida.....	61
Gráfica 15: % Imp desc 3 vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida	61
Gráfica 16: % Alcohol bencílico vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica.	63
Gráfica 17: % Benzaldehído vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica ...	63
Gráfica 18: % Cloruro de bencilo vs tiempo de muestreo en prueba de hidrólisis básica...	63
Gráfica 19: % Ácido benzoico vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica..	63
Gráfica 20: % Tolueno vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica	63
Gráfica 21: % Imp desc 2 vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica.....	63
Gráfica 22: % Imp desco 3 vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica.....	64
Gráfica 23: % Alcohol bencílico vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación.....	65
Gráfica 24: % Benzaldehído vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación.....	65

Gráfica 25: % Cloruro de bencilo vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación.....	65
Gráfica 26: % Ácido benzoico vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación.....	65
Gráfica 27: % Tolueno vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación.....	66
Gráfica 28: % Imp desconocida 2 vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación.....	66
Gráfica 29: % Imp desconocida 3 vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación.....	66
Gráfica 30: % Alcohol bencílico vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco.....	67
Gráfica 31: % Benzaldehído vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco.....	67
Gráfica 32: % Cloruro de bencilo vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco.....	68
Gráfica 33: % Ácido benzoico vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco.....	68
Gráfica 34: % Tolueno vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco	68
Gráfica 35: % Imp desconocida 2 vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco.....	68
Gráfica 36: % Imp desconocida 3 vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco.....	68
Gráfica 37: % Alcohol bencílico vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría.....	70
Gráfica 38: % Benzaldehído vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría	70
Gráfica 39: % Cloruro de bencilo vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría.....	70
Gráfica 40: % Ácido benzoico vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría.....	70
Gráfica 41: % Tolueno vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría.....	71
Gráfica 42: % Imp desconocida 2 vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría.....	71
Gráfica 43: % Imp desconocida 3 vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría.....	71
Gráfica 44: % Alcohol bencílico vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis.....	72
Gráfica 45: % Benzaldehído vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis.....	72
Gráfica 46: % Cloruro de bencilo vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis.....	73
Gráfica 47: % Ácido benzoico vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis.....	73
Gráfica 48: % Tolueno vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis.....	73
Gráfica 49: % Imp desconocida 2 vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis.....	73
Gráfica 50: % Imp desconocida 3 vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis.....	73

Gráfica 51: % Ensayo vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida.....	75
Gráfica 52: % Ensayo vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica.....	75
Gráfica 53: % Ensayo vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco.....	75
Gráfica 54: % Ensayo vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación	75
Gráfica 55: % Ensayo vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría.....	76
Gráfica 56: % Ensayo vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis.....	76
Gráfica 57: pH vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de oxidación.....	80
Gráfica 58: 1ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de oxidación.....	80
Gráfica 59: 2ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de oxidación.....	80
Gráfica 60: pH vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de calor seco.....	82
Gráfica 61: 1ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de calor seco.....	82
Gráfica 62: 2ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de calor seco.....	82
Gráfica 63: pH vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de luz fría.....	84
Gráfica 64: 1ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de luz fría.....	84
Gráfica 65: 2ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de luz fría.....	84
Gráfica 66: pH vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de luz UV-vis.....	86
Gráfica 67: 1ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de luz UV-vis.....	86
Gráfica 68: 2ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de luz UV-vis.....	86

Índice de tablas

Tabla 1: Condiciones del estudio de estabilidad para un nuevo fármaco.....	26
Tabla 2: Condiciones del estudio de estabilidad para un fármaco conocido.....	26
Tabla 3: Información sobre los elementos requeridos para la validación.....	30
Tabla 4: Descripción del aspecto en función del tiempo para la prueba de hidrólisis ácida.....	54
Tabla 5: Descripción del aspecto en función del tiempo para la prueba de hidrólisis básica.....	54
Tabla 6: Descripción del aspecto en función del tiempo para la prueba de oxidación.....	54
Tabla 7: Descripción del aspecto en función del tiempo para la prueba de calor seco.....	55
Tabla 8: Descripción del aspecto en función del tiempo para la prueba de luz fría.....	55
Tabla 9: Descripción del aspecto en función del tiempo para la prueba de luz UV-vis...55	55
Tabla 10: Porcentaje de C12 y C14 en las muestras de cloruro de benzalconio evaluadas por el método analítico 2 “Determinación de la relación de componentes alquílico por HPLC en cloruro de benzalconio en solución al 50 %” para cada tiempo de muestreo....	57
Tabla 11: Porcentaje de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de degradación forzada para la prueba de hidrólisis ácida en cada tiempo de análisis.....	60
Tabla 12: Porcentaje de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de degradación forzada para la prueba de hidrólisis básica en cada tiempo de análisis....	62
Tabla 13: Porcentaje de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de degradación forzada para la prueba de oxidación en cada tiempo de análisis.....	65
Tabla 14: Porcentaje de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de degradación forzada para la prueba de calor seco en cada tiempo de análisis.....	67
Tabla 15: Porcentaje de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de degradación forzada para la prueba de luz fría en cada tiempo de análisis.....	70
Tabla 16: Porcentaje de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de degradación forzada para la prueba de luz UV-vis en cada tiempo de análisis.....	72
Tabla 17: % ensayo de las muestras de degradación forzada en los diferentes tiempos de análisis para cada condición de estrés.....	75
Tabla 18: Volumen de hidróxido de tetrabutilamonio gastado, valor de pH, 1ª y 2ª derivada, para cada tiempo de análisis en la prueba de oxidación.....	79

Tabla 19: Volumen de hidróxido de tetrabutilamonio gastado, valor de pH, 1ª y 2ª derivada, para cada tiempo de análisis en la prueba de calor seco.....81

Tabla 20: Volumen de hidróxido de tetrabutilamonio gastado, valor de pH, 1ª y 2ª derivada, para cada tiempo de análisis en la prueba de luz fría.....83

Tabla 21: Volumen de hidróxido de tetrabutilamonio gastado, valor de pH, 1ª y 2ª derivada, para cada tiempo de análisis en la prueba de luz UV.....85

Resumen

Hoy en día la industria farmacéutica está expuesta a una estricta regulación por la delicadeza de sus actividades y el impacto directo que tiene en la población; es debido a esto que cada una de las etapas es evaluada con detenimiento desde la investigación, desarrollo, aprobación sanitaria, promoción, venta y seguimiento, con el fin de garantizar que los productos cumplan con los estándares de calidad establecidos para cada caso en particular, en apego a las buenas prácticas de manufactura.

Entre los principales requisitos que exigen las distintas autoridades regulatorias, tales como COFEPRIS y FDA, están el contar con la evidencia necesaria para garantizar que un fármaco o medicamento es eficaz y seguro. Parte de esta evidencia es proporcionada por los estudios de estabilidad, cuyo objetivo es evaluar como la calidad de un fármaco o forma farmacéutica cambia con el tiempo bajo la influencia de distintos factores ambientales como la temperatura, humedad y luz.

Por tal motivo, en el presente proyecto se diseñó un estudio de estabilidad para el cloruro de benzalconio en solución al 50% con el objetivo de identificar los principales productos de degradación, así como los métodos que pueden ser utilizados como indicativos de estabilidad durante el periodo en que sea sometido a los estudios de estabilidad acelerada y a largo plazo.

Para lograr estos objetivos el cloruro de benzalconio en solución al 50% fue sometido, en un estudio de degradación forzada, a factores tales como la luz, oxidación, pH y temperatura con el fin de obtener sus productos de degradación y evaluarlos mediante dos métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para la identificación de las principales impurezas en el producto y la relación de los componentes alquílicos y dos más para cuantificar la pureza del producto así otras impurezas no detectables por HPLC, para para lo cual se utilizaron dos técnicas volumétricas. Aunado a esto, se evaluó el aspecto de la solución en función del tiempo.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que el cloruro de benzalconio en solución al 50% es medianamente sensible a cambios en el pH, sensible a la luz UV y altamente sensible a temperaturas mayores a los 105°C; tomando en cuenta estas consideraciones se eligió el envase primario del producto, almacenamiento y condiciones para el estudio de estabilidad acelerado y a largo plazo, así como los métodos indicativos de estabilidad utilizados en cada tiempo de análisis. Aunado a esto, el método usado para la cuantificación de las principales impurezas por HPLC fue verificado exitosamente.

Abreviaturas

OSSA	Organo Síntesis S.A. de C.V.
USP	Farmacopea de los Estados Unidos (<i>United States Pharmacopeia</i>)
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
API	Principio activo farmacéutico
ICH	Conferencia Internacional sobre Armonización (The International Conference on Armonization)
AIBN	Azobisisobutironitrilo
O₂	Oxígeno gaseoso
QbD	Calidad por diseño (<i>Quality by Design</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
mg	Miligramos
mL	Mililitros
h	Horas
v/v	Volumen/Volumen
M	Molar
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno, agua oxigenada
UV-vis	Ultravioleta-Visible
ICH	The International Conference on Harmonization
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

Introducción

Organo Síntesis S.A. de C.V. es una empresa mexicana con más de 50 años de experiencia en la fabricación de diferentes especialidades químicas usadas en una amplia gama de productos utilizados en industrias como la cosmética, farmacéutica y tratamiento de aguas.

La calidad y servicio que brinda Organo Síntesis le han valido para obtener reconocimiento y aceptación comercial no solo a nivel nacional sino también a nivel internacional en mercados como el de USA, América Latina y Asia. (Organo Síntesis, 2016)

El dinamismo actual exige a las empresas mantenerse a la vanguardia en la innovación de productos que satisfagan las necesidades del consumidor, no dejando de lado los estándares de calidad que exigen las principales regulaciones, para garantizar el mejor costo con el mayor beneficio; es debido a esto que Organo Síntesis agrega a su gama de productos el cloruro de benzalconio grado USP.

El cloruro de benzalconio es un cuaternario de amonio ampliamente usado como desinfectante gracias a la acción bactericida que tiene, ya que al disociarse en solución el catión formado interactúa con la membrana celular procarionota alterando su permeabilidad de tal forma que ocasiona la salida de material citoplasmático afectando así la composición de la célula, que dependiendo de la concentración, puede tener un efecto bacteriostático que puede convertirse en bactericida; cabe destacar que tiene una gran afinidad por microorganismos Gram positivos aunque también actúa contra Gram negativos (Fazlara & Ekhtelat, 2012).

Debido a que este producto será fabricado como grado USP debe cumplir con los requisitos que la regulación de FDA exige actualmente, entre ellos contar con estudios de estabilidad que avalen la calidad de este; para ello se debe diseñar un estudio donde se establezcan las condiciones de almacenamiento, frecuencia de análisis y duración del estudio, sistema contenedor-cierre y métodos indicativos de estabilidad, siguiendo los requerimientos establecidos en las guías aplicables

Los métodos indicativos de estabilidad son desarrollados con base en la naturaleza de la molécula química, propiedades fisicoquímicas así como en las pruebas de degradación forzada, que permiten elucidar los mecanismos en que puede degradarse el fármaco, entre los cuales pueden estar la hidrólisis ácida/básica, la oxidación, la fotólisis y la pirolisis; estas pruebas tienen gran importancia ya que las condiciones son más agresivas que en un estudio de estabilidad acelerada y el tiempo en que se obtienen resultados es menor (Bajaj, Singla, & Sakhuja, 2012)

Capítulo 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Cloruro de benzalconio

Perteneciente a la familia de los compuestos cuaternarios de amonio, el cloruro de benzalconio es un tensoactivo con acción detergente y un amplio rango de actividad antimicrobial.

En 1910 se introdujo como germicida y fue hasta 1940 que su aceptación fue mayor llegando a mercados como el de la industria oftálmica como un conservador en las soluciones de lentes de contacto rígidos. Hasta hoy en día, el cloruro de benzalconio sigue siendo utilizado ampliamente en la industria farmacéutica, así como en desinfección hospitalaria.

El cloruro de benzalconio (Figura 1) es una mezcla de cloruros de alquildimetilbencilamonio con un potente carácter biocida, y es uno de los conservantes más usados en distintas formulaciones de soluciones oftálmicas, desde medicamentos anti-glaucoma hasta soluciones de libre venta para lubricar los ojos., para aumentar la solubilidad del fármaco. La concentración regularmente usada en este tipo de formulaciones está en el rango de 0.002-0.02 % pero puede ser mayor a 0.2 % en algunos casos, dependiendo de los atributos de la formulación siendo su principal función aumentar la solubilidad del fármaco. En soluciones acuosas, estos forman agregados conocidos como micelas una vez que las concentraciones de surfactante están por encima de las concentraciones críticas de micelas (CMC).

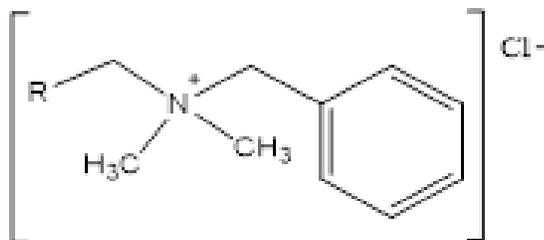


Figura 1: Estructura química del cloruro de benzalconio, donde R representa una cadena alquílica como C12, C14 o C16

1.2 Estabilidad de fármacos

La NOM-073-SSA1-2015 define a la estabilidad como la capacidad de un fármaco, un medicamento o un remedio herbolario contenido en un sistema contenedor-cierre de determinado material, para mantener, durante el tiempo de almacenamiento y uso, las especificaciones de calidad establecidas; para garantizar el cumplimiento de estas, se realizan estudios acelerados, intermedios y a largo plazo. De manera general son tres los tipos de inestabilidad que pueden afectar a un fármaco o medicamento:

- *Física*: Existe una alteración en propiedades como el olor, color, viscosidad, tamaño de partícula, entre otras, afectando la apariencia y con ello la aceptación y confianza por parte del consumidor.
- *Química*: Cualquier cambio estructural en la molécula del API que tenga como resultado una disminución en la eficacia, aparición y aumento de impurezas que pueden resultar tóxicas. La razón principal de la aparición de impurezas en un fármaco o medicamento es debido a la degradación que sufre bajo condiciones como el calor, humedad, pH, luz y solventes usados durante el proceso de manufactura.
- *Microbiológica*: Ocasionada por la contaminación de microorganismos como bacterias, hongos o virus, provocando a su vez inestabilidad en las propiedades fisicoquímicas del producto.

1.3 Degradación forzada

Las pruebas de degradación forzada, de nuevos fármacos o medicamentos, son realizadas para entender el comportamiento químico de las moléculas e identificar las posibles rutas y reacciones químicas que pueden degradar al producto durante su fabricación, acondicionamiento y almacenamiento. Cabe señalar que son complementarias a la estabilidad acelerada y de largo plazo; por lo que está permitido que sean realizadas con un solo lote y con base en la formulación se define cuales recomiendan hacerse (Figura 2: Diagrama de las diferentes condiciones de degradación usadas comúnmente en fármacos y formulaciones farmacéuticas). (ICH Q1A(R2), 2003)

Un estudio de degradación forzada tiene como objetivos:

- Determinar la estabilidad intrínseca de la molécula

- Identificar los principales productos de degradación para diferenciar entre los generados en la síntesis del fármaco y los obtenidos de la formulación en el producto terminado, estableciendo así un perfil de impurezas
- Desarrollar, implementar y validar los métodos indicativos de estabilidad
- Generar formulaciones más estables

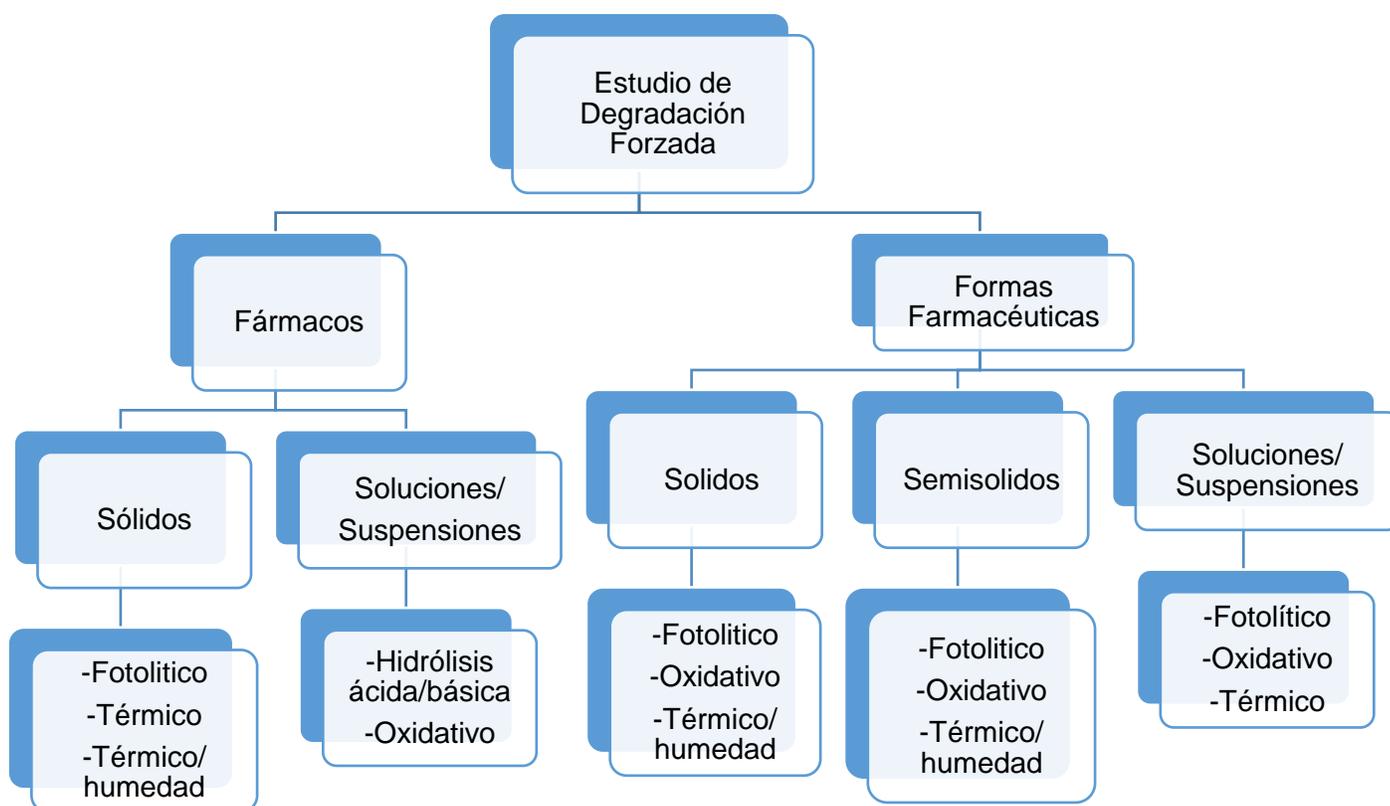


Figura 2: Diagrama de las diferentes condiciones de degradación usadas comúnmente en fármacos y formulaciones farmacéuticas

De acuerdo con las Guías ICH Q1A “Pruebas de Estabilidad para nuevos fármacos y productos farmacéuticos”, ICH Q1B “Pruebas de Fotoestabilidad para nuevos fármacos y productos farmacéuticos” e ICH Q3A “Impurezas en nuevos fármacos” entre los factores ambientales a evaluarse en el estudio deben considerarse:

- Humedad
- Temperatura
- Oxígeno
- Luz

Como resultado de la degradación forzada de un fármaco se obtienen distintos productos de degradación o descomposición, que de acuerdo la FEUM se describen como toda molécula resultante de un cambio químico en la molécula del fármaco, producida con el tiempo y por la acción de, por ejemplo, luz, temperatura, pH, agua, o por reacción con un aditivo y/o el envase primario/sistema contenedor-cierre.

Cabe destacar que la sobreexposición a estos factores puede dar como resultado la formación de productos de degradación secundarios, que probablemente no estarían presentes en los estudios formales de estabilidad, generando confusión en la determinación de las impurezas presentes en la formulación. Debido a esto es importante establecer un límite de descomposición entre el 5-20 %, regularmente se considera como el 10 % ya que en la estabilidad a corto y largo plazo el contenido del API deberá ser como mínimo un 90 % base seca.

Este estudio debe diseñarse de manera correcta ya que es indispensable para el desarrollo de nuevos métodos analíticos, según el paradigma de la calidad por diseño (QbD), pues ayuda a establecer la especificidad de los métodos elegidos como indicativos de estabilidad, ya que se identifican los productos de degradación que pueden generarse en un estudio formal de estabilidad. La incorporación de todas las impurezas potenciales en el método analítico y el establecimiento de la pureza máxima de los picos de interés ayudan a evitar el redesarrollo y la revalidación de métodos analíticos.

Los resultados obtenidos en un estudio de degradación forzada son requeridos por aquellos procesos sistemáticos de fabricación en la industria farmacéutica que cumplan con los objetivos predefinidos para los atributos críticos de calidad (CQA). Aunado a esto, al conocerse los productos de degradación se puede establecerse el perfil de impurezas del fármaco.

A continuación, se presentan los principales mecanismos por los que un fármaco puede sufrir degradación.

1.3.1 Mecanismos de degradación de fármacos

1.3.1.1 Hidrólisis

Es un proceso solvolítico que incluye la descomposición de la molécula por una interacción con el agua, siendo una de las reacciones químicas más comunes de degradación ya que puede llevarse a cabo en un amplio rango de pH; ya sea que el agua este como solvente o como humedad en el ambiente

la mayoría de principios activos son propensos a presentar degradación por este factor, debido a la presencia de grupos carbonilo funcionalizados como amidas, aldehídos, ésteres, imidas, iminas y otros como alcoholes o sales cuaternarias.

Algunos ejemplos de fármacos susceptibles a reacciones de este tipo son:

- Pralatrexato (Prabhakara Sastrya, Venkatesan, Sastry, & Mahesh, 2016)
- Doxofilina (Gupta, Rawat, Gandhi, & Singh Yadav, 2011)
- Rebamipida. Véase Figura 3 (Sonawane & Gide, 2011)

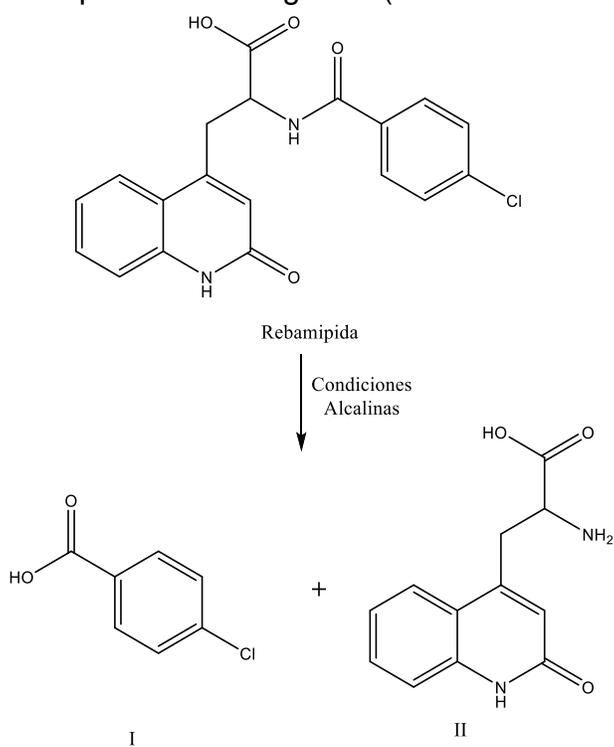


Figura 3: Propuesta de degradación por la vía alcalina para la Rebamipida

Un estudio de hidrólisis bajo condiciones ácidas o básicas involucra la catálisis de grupos funcionales ionizables presentes en la molécula. La selección del ácido o base, así como de las concentraciones dependerá de la naturaleza química del compuesto; sin embargo, el ácido clorhídrico o sulfúrico (0.1-1 M) y el hidróxido de sodio o potasio (0.1-1 M) son de lo más comunes para este tipo ensayos.

Las pruebas de estrés inicialmente son realizadas a temperatura ambiente, en caso de no observarse degradación se deberá aumentar el tiempo, temperatura de reacción (60-70 °C) y en ocasiones la concentración del ácido o base utilizados; por el contrario, si se presenta una degradación total las concentraciones podrán ser disminuidas, lo anterior dependerá de que porcentaje de degradación se considere como punto final del estudio.

Una vez terminado el periodo de reacción, que no debe superar los 7 días, las muestras deberán ser neutralizadas usando un ácido, base o buffer con la finalidad de evitar un mayor grado de descomposición.

1.3.1.2 Oxidación

La degradación oxidativa esta mediada por la formación de radicales libres a partir de un iniciador, este mecanismo involucra la transferencia de un electrón para generar aniones y cationes reactivos que iniciaran un ciclo catalítico entre las moléculas presentes. Muchos de los fármacos existentes pueden ser objeto de autooxidación, aún en las condiciones normales de almacenamiento debido a la presencia de oxígeno en su estado elemental (O₂), es por ello que se considera como una importante vía de degradación.

Las aminas, sulfuros y fenoles son susceptibles al proceso de oxidación por transferencia de electrones para generar N-óxidos, epóxidos, hidroxilaminas, sulfonas y sulfoxidos. Por otro lado, grupos funcionales con hidrógenos lábiles tales como carbonos bencílicos, alílicos, terciarios o en posición alfa (α) respecto al heteroátomo son sensibles a la oxidación para formar hidroperóxidos, hidróxidos o cetonas. (Kumar Hotha, Kumar Reddy, Kishore Raju, & Ravindranath, 2013)

El peróxido de hidrógeno es ampliamente usado como agente oxidante para este tipo de pruebas, pero no es el único, otras opciones son algunos iones metálicos, oxígeno (O₂) y generadores de radicales tales como la azobisisobutironitrilo (AIBN); por ello deberá conocerse la naturaleza química de la sustancia ya que de esto dependerá la sustancia oxidante que se utilice, así como su concentración, temperatura y tiempo de reacción. Se ha reportado que soluciones entre 0.1-3 % v/v de peróxido de hidrógeno a un pH neutral y temperatura ambiente en una exposición no mayor a 7 días pueden dar importantes productos de degradación, en caso de no observar alguna reacción la temperatura puede aumentarse hasta 40 °C.

1.3.1.3 Condiciones térmicas

De manera general, la velocidad se ve favorecida con el aumento de la temperatura; de aquí que los fármacos sean susceptibles de degradación por calentamiento directo o en temperaturas ambientales elevadas. En esta condición pueden presentarse reacciones de pirolisis, hidrólisis, descarboxilación, rearreglos y polimerización. La mayoría de las ocasiones la temperatura es usada en conjunto con otras condiciones de estrés tales como la humedad e hidrólisis con el fin de aumentar el porcentaje de degradación.

El efecto de la temperatura en la degradación térmica de una sustancia es estudiado a través de la ecuación de Arrhenius.

$$k = Ae^{\frac{-Ea}{RT}}$$

Donde:

k = Constante cinética dependiente de la temperatura

A = Factor pre-exponencial o factor de frecuencia

Ea = Energía de activación (J/mol)

R = 8.3145 J/Kmol Constante de los gases

T = Temperatura absoluta en K

Para un análisis más claro de los resultados, la ecuación es usada en su forma linealizada, como se muestra en la figura 4.

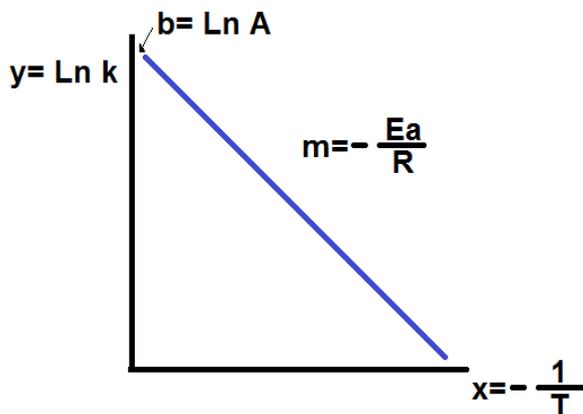


Figura 4: Representación gráfica de la ecuación de Arrhenius

Esta prueba es comúnmente realizada entre 40-80 °C, siendo 70 °C lo más común; temperaturas más elevadas no se recomiendan ya que la cinética de reacción puede no tener un comportamiento lineal. Para el caso fármacos o

medicamentos en estado sólido, estos deberán ser expuesto a calor húmedo y seco, a diferencia de formulaciones líquidas que solo harás uso del calor seco. (Blessy, Patel, Prajapati, & Agrawal, 2013)

1.3.1.4 Fotodegradación

Se define como la disociación o ruptura de enlaces químicos por efecto de la luz, dependiendo directamente de la intensidad de la luz incidente y la cantidad de luz absorbida por la molécula. La degradación fotolítica puede darse por dos mecanismos:

- Oxidativo: Generación de radicales libres en lo que la luz también fungirá como un catalizador para reacciones de oxidación.
- No oxidativo: Isomerización, dimerización, ciclación, rearrreglos, descarboxilación y escisión homolítica de enlaces C-X (X=Heteroátomo), N-alquil (desalquilación y desaminación), entre otros.

Algunos grupos funcionales como los carbonilos, nitro-aromáticos, N-óxidos, alquenos, cloruros de arilo, enlaces débiles C-H y O-H, sulfuros y polienos pueden ser causantes de la fotosensibilidad en la molécula. (Ahuja & Scypinski, 2001)

La guía tripartita armonizada de la ICH referente al estudio de Fotoestabilidad de nuevos principios activos y fármacos menciona que la fotoestabilidad debe formar parte del estudio de degradación forzada y puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de las siguientes fuentes de luz:

- *Opción 1:* Cualquier fuente de luz destinada a producir una emisión similar a la emisión D65/ID65 estándar, tal como una lámpara fluorescente de luz de día artificial que combine radiación visible y ultravioleta (UV), lámpara de xenón o de haluro metálico. D65 es el estándar internacionalmente reconocido para la luz de día exterior, tal como se define en la norma ISO 10977 (1993). ID65 es el estándar de luz de día indirecta interior equivalente.
- *Opción 2:* Se expondrá la misma muestra a la luz fluorescente blanca fría y a la lámpara que emite en el ultravioleta cercano.

1. Una lámpara fluorescente de luz blanca fría diseñada para producir una radiación similar a la especificada en la norma ISO 10977(1993); y
2. Una lámpara que emite en el ultravioleta cercano con una distribución espectral desde 320 nm hasta 400 nm con una emisión máxima de energía entre 350 nm y 370 nm; debe existir un porcentaje significativo de radiación UV en ambas bandas de 320 a 360 nm y de 360 a 400 nm.

1.4 Aplicaciones industriales de los estudios de degradación forzada

Moya-Mirabal y Colaboradores en 2003 realizaron el estudio de estabilidad de tabletas recubiertas de Secnidazol (500 mg) donde concluyeron que la formulación Secnidazol tabletas recubiertas de 500 mg, desarrollada en el departamento de formas farmacéuticas del CIDEM, tiene un tiempo de vida útil de 30 meses cuando se encuentra envasada en frascos de polietileno de baja densidad, y almacenada bajo las condiciones correspondientes a la zona climática IV.

En 2004, Arellano-López presenta un estudio de estabilidad en estantería de dos series de Grisux día y noche cápsulas blandas concluyendo que la serie evaluada con vencimiento en enero de 2004 presenta concentraciones de Pseudoefedrina HCl y Clorfenamina Maleato por debajo del rango permitido además de falta de uniformidad de contenido en las cápsulas nocturnas, por lo tanto, se confirma que el producto no es estable pasada su fecha de vencimiento y por ende, no es posible extender el período de eficacia.

1.5 Estudios de estabilidad

Se les conoce también como estudios formales de estabilidad y son la evidencia científica que demuestran el periodo de vida útil asignado a los fármacos o formulaciones farmacéuticas. Dichos estudios, permiten asignar/confirmar los periodos de caducidad/reanálisis, tiempos de permanencia a granel o productos intermedios almacenados durante el proceso, establecer las condiciones de almacenamiento y transporte, así como seleccionar el mejor sistema contenedor-cierre. (NOM-073-SSA1-2015, 2016)

El objetivo de un estudio de estabilidad es proveer evidencia de como la calidad de un fármaco o forma farmacéutica cambia con el tiempo bajo la influencia de distintos factores ambientales como la temperatura, humedad y luz.

De acuerdo con la duración estos se clasifican en:

- Estabilidad acelerada (Envejecimiento acelerado): Diseñados bajo condiciones extremas para incrementar la velocidad de degradación química, biológica o los cambios físicos de un fármaco, durante su almacenamiento. Sirven para establecer y soportar una vida útil tentativa.
- Estabilidad a largo plazo (Envejecimiento natural): Aquellos que permiten comprobar, mediante un programa de tiempos de muestreo y de evaluación de los requisitos físicos, químicos y biológicos, que un fármaco o medicamento bajo las condiciones de almacenaje y vida de anaquel conserva sus propiedades a lo largo del periodo de vida útil, estableciendo este de manera definitiva.

Los estudios de estabilidad deben considerar la zona climática a la que pertenece el país que los realizara; en el caso de la República Mexicana, está se clasifica dentro de la zona climática II (subtropical, con posible humedad elevada) de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. Las condiciones que establece la NOM-073-SSA1-2015 son (Vease tabla 1 y 2)

Tipo de estudio	Condiciones de almacenamiento	Periodo mínimo	Frecuencia de análisis
Estabilidad acelerada	40°C ± 2°C / 75% ± 5% HR	6 meses	0, 3 y 6 meses
Estabilidad a condición intermedia**	30°C ± 2°C / 65% ± 5% HR	6 meses	0, 3 y 6 meses
Estabilidad a largo plazo*	25°C ± 2°C / 60% ± 5% HR o 30°C ± 2°C / 65% ± 5% HR	12 meses	0, 3, 6, 9 y 12 meses

Tabla 1: Condiciones del estudio de estabilidad para un nuevo fármaco

Tipo de estudio	Condiciones de almacenamiento	Periodo mínimo	Frecuencia de análisis
Estabilidad acelerada	40°C ± 2°C / 75% ± 5% HR	3 meses	0, 1 y 3 meses
Estabilidad a condición intermedia **	30°C ± 2°C / 65% ± 5% HR	6 meses	0, 3 y 6 meses
Estabilidad a largo plazo*	25°C ± 2°C / 60% ± 5% HR o 30°C ± 2°C / 65% ± 5% HR	6 meses (opción 1) 12 meses (opción 2)	0, 3 y 6 meses 0, 3, 6, 9 y 12 meses

Tabla 2: Condiciones del estudio de estabilidad para un fármaco conocido

*Es decisión del fabricante llevar a cabo los estudios de estabilidad a largo plazo a 25°C ± 2°C / 60% ± 5% HR o a 30°C ± 2°C / 65% ± 5% HR.

**Si $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $65\% \pm 5\%$ HR es la condición del estudio de estabilidad a largo plazo, no es necesario hacer el estudio a la condición intermedia

1.5.1 Selección de lotes para el estudio de estabilidad

Se seleccionarán al menos tres lotes para iniciar los estudios de estabilidad, estos pueden ser usados tanto para las condiciones aceleradas como para las de largo plazo. Los lotes deberán producirse con el mínimo de la escala piloto por la misma ruta de síntesis que los lotes de producción, usando un método y procedimiento que simule el proceso final de fabricación. En caso de seleccionar otros, deberá justificarse.

1.5.2 Análisis de las muestras de estabilidad

Los estudios de estabilidad deben incluir la evaluación de los atributos que en el fármaco sean susceptibles a cambios durante el almacenamiento, y que es probable influyan en la calidad, la seguridad y/o la eficacia, es decir, atributos físicos, químicos, biológicos y microbiológicos; todo ello usando como herramienta métodos indicativos de estabilidad validados, en cuyos reportes de validación se describirá realizar el análisis en los tiempos de muestreo establecidos. Los resultados obtenidos se compararán con lo descrito en la especificación para el producto terminado. (ICH Q1A(R2), 2003).

1.6 Métodos Indicativos de Estabilidad

Según menciona la FDA en la guía referente a procedimientos analíticos y validación de métodos, un ensayo indicativo de estabilidad es un procedimiento analítico cuantitativo validado, que puede detectar los cambios con el tiempo en las propiedades pertinentes del fármaco o medicamento.

El método indicativo de estabilidad medirá con exactitud los ingredientes activos, sin interferencia de los productos de degradación, impurezas del proceso, excipientes, u otras impurezas potenciales. Cuando el fabricante presenta un método analítico no indicativo de estabilidad para las pruebas de liberación, este deberá complementarse con uno capaz de identificar cualitativa y cuantitativamente las impurezas, incluidos los productos de degradación. Todos aquellos métodos utilizados para el análisis de muestras de estabilidad deberán ser indicativos y estar validados, en caso de no ser así se deberá justificar científicamente.

1.6.1 Validación de métodos analíticos

El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México define a la validación de métodos como el proceso por el cual se demuestra, mediante estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; justificándose por los siguientes aspectos:

- Moral y Ética,
- Aseguramiento de calidad,
- Económica, y
- Regulatoria.

Los parámetros de desempeño son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad, y entre ellos se incluyen:

- *Exactitud*: Grado de concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.
- *Precisión*: Concordancia entre resultados de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea bajo condiciones establecidas.
- *Especificidad*: Es la capacidad de determinar el analito inequívocamente en la presencia de otros componentes los cuales se espera que estén; comúnmente puede incluir impurezas, degradantes, matriz, etc.
- *Límite de Cuantificación*: Valor de mínimo de concentración que puede obtenerse con una imprecisión aceptable.
- *Límite de detección*: Concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas.
- *Linealidad*: Hace referencia al conjunto de concentraciones del analito en el que la respuesta del sistema de medición es una función lineal de la concentración; la representación gráfica de estos puntos

(concentraciones frente a respuestas) debe exhibir una buena correlación de los puntos experimentales a la recta de regresión para que el método analítico en cuestión sea aceptable. (NMX-CH-152-IMNC-2005)

- *Intervalo*: Valores de concentración del parámetro de interés, para el cual el método se considera aplicable. El intervalo validado es aquel dentro del cual el método puede considerarse válido.
- *Robustez*: Capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales.

Para el ejercicio de validación deberán evaluarse los siguientes parámetros, en función de la aplicación analítica del método:

- *Categoría I*: Procedimientos analíticos para la cuantificación de componentes mayoritarios en sustancias farmacéuticas a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.
- *Categoría II*: Procedimientos para la determinación de impurezas en sustancias farmacéuticas a granel o compuestos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos incluirán ensayos cuantitativos y pruebas límite
- *Categoría III*: Aquellos para la determinación de características de desempeño, por ejemplo: disolución, liberación, entre otros.

Categoría IV: Pruebas de Identificación.

1.7 Verificación de métodos farmacopéicos

Los métodos farmacopéicos, compendiales y/o normalizados no requieren ser validados por parte de los laboratorios usuarios; sin embargo, si es necesario demostrar mediante evidencia documental la idoneidad del método analítico bajo las condiciones actuales de uso, para tales fines se realiza una verificación. (USP, United States Pharmacopeia, 2016)

La verificación consiste en evaluar características de desempeño analítico, que serán seleccionadas por el usuario con base en las necesidades y clasificación del método, tales como las consideradas para la validación de un método analítico (Tabla 3) generando así la evidencia necesaria para demostrar la idoneidad del método.

La verificación del método debe considerar si es la metodología adecuada para el fármaco o matriz del producto a analizar, idoneidad de los equipos e instrumentos utilizados, así como la variación entre los analistas usuarios.

Características de Desempeño analítico	Categoría I	Categoría II de valoración		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativos	Pruebas límite		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

Tabla 3: Información sobre los elementos requeridos para la validación

*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza de la prueba

1.8 Cromatografía

El término cromatografía deriva de las palabras griegas “chroma” (color) y “graphein” (escribir), aludiendo a que los pigmentos vegetales separados originalmente por Mikhail Semenovitch Tswett se ponen de manifiesto como bandas coloreadas.

Es un método físico de separación en el cual los componentes se distribuyen entre dos fases, una que es estacionaria (fase estacionaria) y otra que se mueve en una dirección determinada (fase móvil).

La separación de los componentes en la matriz analítica puede basarse en adsorción, distribución de masa (coeficiente de partición) o intercambio iónico, aunque también se consideran las diferencias en las propiedades fisicoquímicas de las moléculas tales como tamaño, masa y volumen. (USP, United States Pharmacopeia, 2016).

1.8.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Es una de las técnicas más usadas para la identificación y cuantificación de productos de degradación, se compone de una fase estacionaria sólida (empaquete de la columna) y una fase móvil líquida que puede ser la mezcla de uno o de varios solventes (Figura 5). (Merck, 2017)

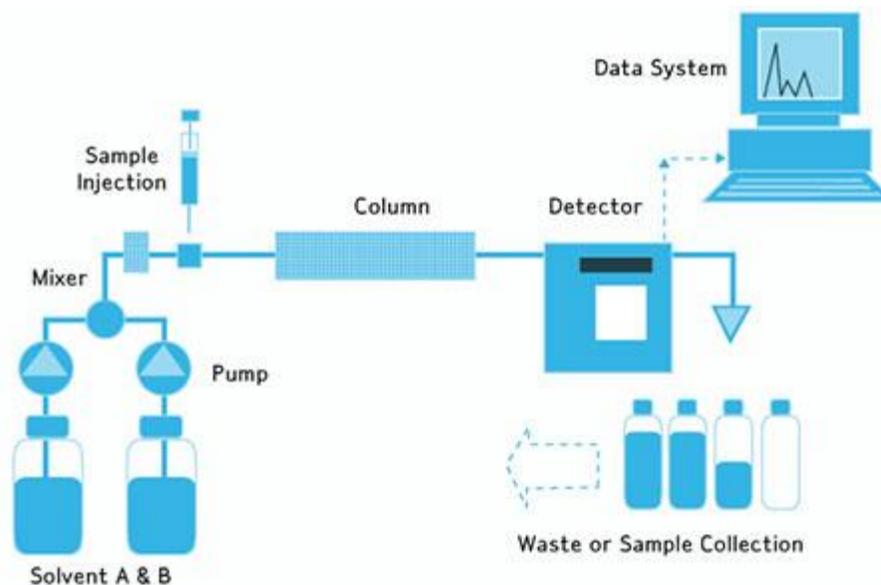


Figura 5: Representación general de un sistema HPLC (Merck,2017)

El cromatograma es un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, de la concentración del analito en el efluente o de otra magnitud utilizada por el sistema, y será característico de cada corrida analítica. Si la separación es incompleta, uno o más componentes pueden ser eluidos como un pico no resuelto

1.9 Volumetría

Los análisis volumétricos hacen referencia al conjunto de métodos donde se determina el volumen de una solución de concentración conocida, llamada solución estándar, requerido para reaccionar cuantitativamente con el analito. A este proceso se le conoce como valoración.

La valoración es entonces el proceso químico en donde el analito contenido en la muestra reaccionara completamente con la solución valorante; para ello la reacción

debe ser rápida, completa y observable, esto con el objetivo de establecer el punto final de la valoración indicado por un cambio de coloración o en el potencial.

1.9.1 Clasificación de las valoraciones

Se dividen en:

- Directa

Existe una correlación directa entre la cantidad de analito presente y la cantidad de valorante consumido, es decir, el valorante reacciona directamente con el analito. Un ejemplo de valoración directa es la determinación del contenido de ácido en vinagre.

- Indirecta

El analito se hace reaccionar de manera espontánea con otra sustancia y el producto obtenido es titulado con la solución valorante. Comúnmente se utiliza para la cuantificación de iones sodio o potasio.

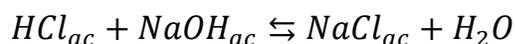
- Retroceso

Se adiciona al analito un reactivo de concentración conocida en exceso, pasado el tiempo de reacción, se valora el volumen excedente. La determinación de azúcares reductores es un ejemplo de esta titulación.

Aunque también se clasifican por la naturaleza química de la reacción entre el analito y la solución estándar, en:

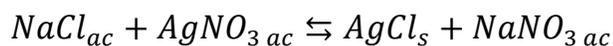
- Ácido/Base

Valoraciones donde ocurre una reacción de neutralización entre el analito y la sustancia valorante. Ejemplo de esto, es la reacción entre el ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio.



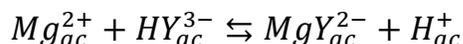
- Reacciones de Precipitación

Aquellas en donde el analito al reaccionar con el valorante forma un compuesto insoluble, es decir, un precipitado; el ejemplo más común de esta es la Argentometría.



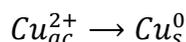
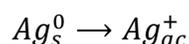
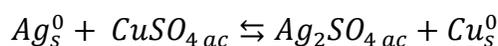
- Reacciones Complejométricas

El analito reacciona con un agente quelante (valorante) para formar un complejo. Uno de los más usados es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).



- Reacciones de Óxido/Reducción

La solución de referencia es comúnmente de un agente oxidante o reductor que reaccionara con el analito para reducir u oxidar al valorante, según sea el caso.



1.9.2 Detección del final de la valoración.

En la práctica habitual, existen dos maneras de establecer el final de la valoración:

1) Punto final

Se aprecia el fin de la reacción mediante un cambio de color del indicador. El cambio de color de un indicador se suele corresponder con un determinado rango de pH, por lo que este modo se usa habitualmente para las valoraciones de ácido/base.

2) Punto de equivalencia

Es el punto en el que el analito y el valorante están presentes en exactamente la misma concentración. Para identificar este punto, la valoración es monitoreada mediante la medición de pH, posteriormente se calcula la 1ra y 2da derivada con los datos, en función del volumen adicionado a la titulación. A continuación, se muestra un ejemplo del tipo de gráficos que se obtienen (Figura 6). (Martínez Pérez, 2017)

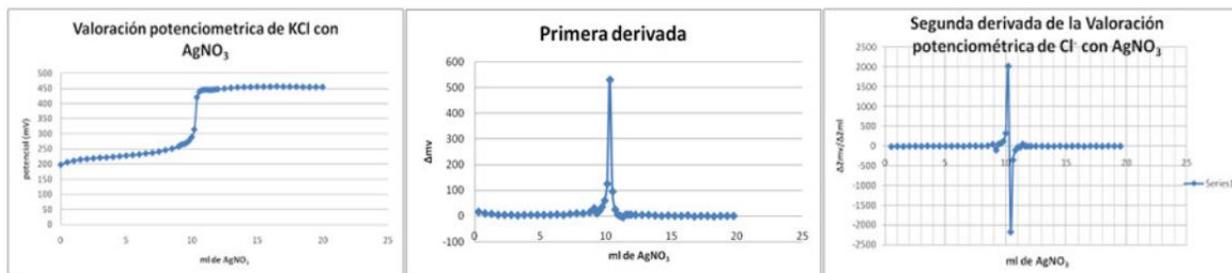


Figura 6: Valoración potenciométrica de KCl con AgNO₃. Método de la primera y segunda derivada para determinar el punto de equivalencia.

Capítulo 2

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

2.1 Justificación

Realizar estudios de estabilidad permite brindar la evidencia necesaria para entender como la calidad de un principio activo (API) o producto farmacéutico puede verse afectada con el transcurso del tiempo por influencia de factores ambientales como la temperatura, la humedad y la luz; esta información será determinante para establecer el período de reanálisis del producto, así como las condiciones de almacenamiento y empaquetamiento. (Shete, 2014)

Debido a esto, la estabilidad de un fármaco se vuelve un parámetro crítico que puede afectar la pureza, potencia y seguridad de este, por lo que debe contarse con métodos indicativos de estabilidad que permitan analizar las muestras en los periodos de tiempo establecidos y así evaluar la calidad del producto.

Con base en la información anterior, es de vital importancia para Organo Síntesis S.A. de C.V. diseñar el estudio de estabilidad para el cloruro de benzalconio en solución al 50 %, en el que se considere el corto y largo plazo, ya que con los datos obtenidos de ambos estudios se tendrá un sustento sólido para establecer la fecha de reanálisis del producto, cumpliendo así con la reglamentación vigente para productos GMP.

Al realizar este proyecto, se proporciona información sobre las posibles rutas de degradación del producto, la sensibilidad a distintos factores ambientales y la metodología analítica que podría usarse para analizar las muestras de estabilidad; con base en estas aportaciones es que se diseñara el estudio de estabilidad acelerado y a largo plazo.

Pregunta de Investigación: ¿En qué condiciones de estrés será más propenso a sufrir degradación el cloruro de benzalconio en solución al 50 %?

2.2 Objetivos

2.2.1 General

Realizar el diseño del estudio de estabilidad para el cloruro de benzalconio en solución al 50 % para determinar el periodo de reanálisis de la solución.

2.2.2 Específicos

- Someter muestras cloruro de benzalconio en solución al 50 % a pruebas de degradación forzada para definir los agentes físicos y químicos que pueden causar la degradación del producto.
- Identificar los principales productos de degradación del cloruro de benzalconio en solución al 50 %.
- Establecer los métodos analíticos indicativos de estabilidad que se usaran para analizar las muestras en los periodos de tiempo determinados en cada estudio (acelerada y/o Largo plazo).
- Verificar el método compendial de la USP para la determinación de impurezas, propuesto como indicativo de estabilidad en el producto terminado.

2.3 Hipótesis

El método compendial de la USP establecido para determinar las principales impurezas podrá ser usado como un método indicativo de estabilidad para el cloruro de benzalconio en solución al 50 %.

Capítulo 3

DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 Selección del lote

Para fines del estudio de degradación forzada, las muestra analíticas utilizadas fueron tomadas de un lote piloto del cloruro de benzalconio en solución al 50 % proporcionado por el Departamento de Investigación y Desarrollo de Organo Síntesis S.A. de C.V.

3.2 Metodología analítica

Cuatro de los métodos analíticos usados en este estudio fueron recopilados de la monografía del cloruro de benzalconio de la USP 39 NF 34 y, tras algunas modificaciones y adecuaciones según las necesidades de Organo Síntesis S.A. de C.V., estos métodos lograron implementarse con éxito, sin embargo, era necesario demostrar que además de ser idoneos para el análisis del PT también podían ser empleados como métodos indicativos de estabilidad.

A continuación se describen las principales características de los métodos analíticos utilizados en este estudio:

- **Método analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50 %**

Describir el aspecto de la solución de cloruro de benzalconio al 50 % en función del tiempo para cada condición de estrés evaluada, considerar las características del producto antes de iniciar el estudio.

-Cloruro de benzalconio en solución al 50 %: líquido incoloro cristalino ligeramente viscoso de olor característico libre de materia extraña.

La evaluación del aspecto unicamente se realizó de manera cualitativa, describiendo los cambios fisicoquímicos observados en cada tiempo de análisis.

- **Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %**

Condiciones cromatográficas

Instrumento: Cromatografo de líquidos 1260 Inffinity II
Agilent

Fase móvil: Acetonitrilo:Buffer de acetatos pH 5.0 (55:45)

Columna:	Zorbax Eclipse XDB-CN empaque L10 4.6x250 mm; 5 µm
Temperatura de la columna:	30 °C
Flujo:	3 mL/min
Volumen de inyección:	3 µL
Concentración de la muestra analítica:	4 mg/mL
Longitud de onda:	254 nm
Tiempo:	12 min

- **Método analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC en cloruro de benzalconio en solución al 50 %**

Condiciones cromatográficas

Instrumento: Cromatografo de líquidos 1260 Infinity II
Agilent

Fase Móvil:	Tiempo	Solución A (%)	Solución B (%)
		0	80
	10	80	20
	14	50	50
	35	50	50
	36	20	80
	55	20	80
	56	80	20
	65	80	20

Columna:	ZORBAX Eclipse XDB-C18 empaque L1 4.6x150 mm; 5 µm
Temperatura de la columna:	30 °C
Flujo:	1 mL/min
Volumen de inyección:	20 µL
Concentración de la muestra analítica:	50 mg/mL
Longitud de onda A:	210 nm
Longitud de onda B:	257 nm
Tiempo:	65 min

- **Método analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50%**

Metodología

Pesar aprox. 1 g de cloruro de benzalconio en solución al 50 % y disolver en 30 mL de agua destilada, adicionar esta solución a un embudo de separación de 250 mL que contenga 25 mL de diclorometano. Posteriormente, agregar 10 mL de hidróxido de sodio 0.1 N y 10 mL de solución de yoduro de potasio (1:20) recientemente preparada, y tapar el embudo de separación, agitar bien y dejar separar las capas. Desechar la fase orgánica y lavar la capa acuosa con tres porciones de diclorometano de 10 mL cada una. Desechar los lavados y pasar la capa acuosa a un matraz de 250 mL con tapón esmerilado, enjuagar el embudo de separación con tres porciones de agua, de 5 mL cada una, agregando estos lavados al contenido del matraz.

Adicionar lentamente 40 mL de ácido clorhídrico frío; mezclar y valorar con SV de yodato de potasio 0.05 M hasta que la solución tome una coloración café claro. Agregar 5 mL de diclorometano, tapar el matraz y agitar fuertemente. Continuar la valoración, gota a gota, agitando después de cada adición hasta que la fase orgánica se vuelva incolora y la fase acuosa tome una coloración amarillo claro. Efectuar una prueba en blanco, empleando 30 mL de agua como muestra. La diferencia entre las dos titulaciones representa la cantidad de yodato de potasio que equivale al peso de cloruro de benzalconio en la muestra

- **Método Analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50 %**

Metodología

Preparar una mezcla de metanol y ácido clorhídrico 1 N en relación (97:3) utilizando 97 mL de metanol y 3 mL de ácido clorhídrico 1 N, homogeneizar la solución y resguardar en un reservorio con tapa. Pesar aprox. 10 g de muestra en un vaso de precipitado de 250 mL y diluir con 20 mL de la mezcla metanol: ácido clorhídrico 1 N (97:3) homogeneizar y calentar en un baño de vapor durante 5 minutos, verificando que la solución no alcance su punto de ebullición. Retirar del baño de vapor y agregar 100 mL de Isopropanol. Durante 5 minutos pasar una corriente de nitrógeno lentamente a través de la solución, antes de llevar a cabo la titulación.

Agregar gradualmente 12 mL de la SV de hidróxido de tetrabutilamonio 0.1 N registrando los datos de la titulación potenciométrica por cada volumen adicionado. Registrar los valores y trazar la curva de titulación correspondiente: volumen de hidróxido de tetrabutilamonio 0.1 N vs pH.

3.3 Muestras para hidrólisis ácida

Las condiciones de esta prueba fuerón:

Agente estresante:	Ácido clorhídrico
Temperatura:	50 °C
Humedad relativa:	75 %
Tiempos de muestreo:	0,12,24,48 y 72 h
Duración total de la prueba:	72 h
Métodos de análisis:	-Método analítico 1, 2, 3, 4 y 5

Los mililitros necesarios de la solución de ácido clorhídrico con normalidad teórica de 0.5, para cada una de las muestras, se calcularon de acuerdo a:

Fórmula 1

$$mL_{HCl} = \frac{\left(\frac{P_{mta}}{2}\right)(1 \text{ mol})(1000 \text{ mmol})(1 \text{ mL})}{(PM_{mta})(1 \text{ mol})(mM \text{ HCl})}$$

Donde=

P_{mta} = *Peso real de la muestra en gramos*

PM_{mta} = *Peso molecular de la muestra*

$mM \text{ HCl}$ = *miliMolaridad real de la solución de ácido clorhídrico*

3.3.1 Método analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50 %

Para la evaluación del aspecto, en cada tiempo de análisis se hicieron anotaciones describiendo la apariencia de cada una de las muestras adicionadas con ácido clorhídrico 0.5 N.

3.3.2 Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En viales de vidrio de 20 mL, se pesaron aprox. 1.6 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo adicionando los mL de ácido clorhídrico 0.5 N necesarios de acuerdo a la fórmula 1; posteriormente se sellaron y colocaron dentro de una cámara climática puesta en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de viales correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 2.

3.3.3 Método analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En matraces volumétricos de 50 mL, se pesaron aprox. 5 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo adicionando los mL de ácido clorhídrico 0.5 N necesarios de acuerdo a la fórmula 1; posteriormente se taparon y colocaron dentro de una cámara climática puesta en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de matraces correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 3.

3.3.4 Método analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En viales de vidrio de 20 mL, se pesó aprox. 1 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo adicionando los mL de ácido clorhídrico 0.5 N necesarios de acuerdo a la fórmula 1; posteriormente se sellaron y colocaron dentro de una cámara climática puesta en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de viales correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 4.

3.3.5 Método analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En matraces volumétricos de 100 mL, se pesaron aprox. 10 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo adicionando los mL de ácido clorhídrico 0.5 N necesarios de acuerdo a la fórmula 1; posteriormente se taparon y colocaron dentro de una cámara climática puesta en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de matraces correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 5.

3.4 Muestras para hidrólisis básica

Las condiciones de esta prueba serán:

Agente estresante:	<u>Hidróxido de sodio</u>
Temperatura:	<u>50 °C</u>
Humedad relativa:	<u>75 %</u>

Tiempos de muestreo:	0,12,24,48 y 72 h
Duración total de la prueba:	72 h
Métodos de análisis:	-Método analítico 1, 2, 3, 4 y 5

Los mililitros necesarios de la solución de hidróxido de sodio con normalidad teórica de 0.5, para cada una de las muestras, se calcularon de acuerdo a:

Fórmula 2

$$mL_{NaOH} = \frac{\left(\frac{P_{mta}}{2}\right)(1 \text{ mol})(1000 \text{ mmol})(1 \text{ mL})}{(PM_{mta})(1 \text{ mol})(mM \text{ NaOH})}$$

Donde=

P_{mta} = *Peso real de la muestra en gramos*

PM_{mta} = *Peso molecular de la muestra*

$mM \text{ NaOH}$ = *miliMolaridad real de la solución de hidróxido de sodio*

3.4.1 Método analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50 %

Para la evaluación del aspecto, en cada tiempo de análisis se hicieron anotaciones describiendo la apariencia de cada una de las muestras adicionadas con hidróxido de sodio 0.5 N.

3.4.2 Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En viales de vidrio de 20 mL, se pesaron aprox. 1.6 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo adicionando los mL de hidróxido de sodio 0.5 N necesarios de acuerdo a la fórmula 2; posteriormente se sellaron y colocaron dentro de una cámara climática puesta en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de viales correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 2.

3.4.3 Método analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En matraces volumétricos de 50 mL, se pesaron aprox. 5 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo adicionando los mL de hidróxido de sodio 0.5 N necesarios de acuerdo a la fórmula 2; posteriormente se taparon y colocaron dentro de una cámara climática

puesta en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de matraces correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 3.

3.4.4 Método analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En viales de vidrio de 20 mL, se pesó aprox. 1 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo adicionando los mL de hidróxido de sodio 0.5 N necesarios de acuerdo a la fórmula 2; posteriormente se sellaron y colocaron dentro de una cámara climática puesta en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de viales correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 4.

3.4.5 Método Analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En matraces volumétricos de 100 mL, se pesaron aprox. 10 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo adicionando los mL de hidróxido de sodio 0.5 N necesarios de acuerdo a la fórmula 2; posteriormente se taparon y colocaron dentro de una cámara climática puesta en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de matraces correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 5.

3.5 Muestras para oxidación

Las condiciones de esta prueba fueron:

Agente estresante:	Peróxido de hidrógeno
Temperatura:	25 °C
Humedad relativa:	60 %
Tiempos de muestreo:	0,12,24,48 y 72 h
Duración total de la prueba:	72 h
Métodos de análisis:	-Método analítico 1, 2, 3, 4 y 5

Los gramos de peróxido de hidrógeno con una pureza teórica de 50 %, para cada una de las muestras, se calcularon de acuerdo a:

Fórmula 3

$$g_{H_2O_2} = \frac{\left(\frac{P_{mta}}{2}\right) (1 \text{ mol})(34 \text{ g})(P)}{(PM_{mta})(1 \text{ mol})(100)}$$

Donde=

P_{mta} = *Peso real de la muestra en gramos*

PM_{mta} = *Peso molecular de la muestra*

P = *Pureza de la solución de peróxido de hidrógeno*

3.5.1 Método analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50 %

Para la evaluación del aspecto, en cada tiempo de análisis se hicieron anotaciones describiendo la apariencia de cada una de las muestras adicionadas con peróxido de hidrógeno al 50 %.

3.5.2 Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En viales de vidrio de 20 mL, se pesaron aprox. 1.6 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo adicionando los mL de peróxido de hidrógeno al 50 % necesarios de acuerdo a la fórmula 3; posteriormente se sellaron y colocaron dentro de una cámara climática puesta en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de viales correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 2.

3.5.3 Método analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En matraces volumétricos de 50 mL, se pesaron aprox. 5 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo adicionando los mL de peróxido de hidrógeno al 50 % necesarios de acuerdo a la fórmula 3; posteriormente se taparon y colocaron dentro de una cámara climática puesta en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de matraces correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 3.

3.5.4 Método analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En viales de vidrio de 20 mL, se pesó aprox. 1 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo adicionando los mL de peróxido de hidrógeno al 50 % necesarios de acuerdo a la fórmula 3; posteriormente se sellaron y colocaron dentro de una cámara climática puesta en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de viales correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 4.

3.5.5 Método Analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En matraces volumétricos de 100 mL, se pesaron aprox. 10 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo adicionando los mL de peróxido de hidrógeno al 50 % necesarios de acuerdo a la fórmula 3; posteriormente se taparon y colocaron dentro de una cámara climática puesta en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de matraces correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 5.

3.6 Muestras para calor seco

Las condiciones de esta prueba fueron:

Agente estresante:	<u>Calor seco</u>
Temperatura:	<u>80 °C</u>
Humedad relativa:	<u>25 %</u>
Tiempos de muestreo:	<u>0,12,24,48 y 72 h</u>
Duración total de la prueba:	<u>72 h</u>
Métodos de análisis:	<u>-Método analítico 1, 2, 3, 4 y 5</u>

3.6.1 Método analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50 %

Para la evaluación del aspecto, en cada tiempo de análisis se hicieron anotaciones describiendo la apariencia de cada una de las muestras expuestas al calor seco.

3.6.2 Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En viales de vidrio de 20 mL, se pesaron aprox. 1.6 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo; posteriormente se colocaron dentro del horno de secado puesto en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de viales correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 2.

3.6.3 Método analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En matraces volumétricos de 50 mL, se pesaron aprox. 5 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo se colocaron dentro del horno de secado puesto en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de matraces correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 3.

3.6.4 Método analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En viales de vidrio de 20 mL, se peso aprox. 1 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo; posteriormente se colocaron dentro del horno de secado puesto en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de viales correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 4.

3.6.5 Método Analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En matraces volumétricos de 100 mL, se pesaron aprox. 10 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo se colocaron dentro del horno de secado puesto en las condiciones mencionadas para esta prueba, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de matraces correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 5.

3.7 Fotoestabilidad

Para evaluar la fotoestabilidad del cloruro de benzalconio se utilizó como fuente de luz la opción 2 establecida en la norma ICH Q1B la cual a su vez indica que las muestras deben de exponerse a 2 fuentes diferentes (luz UV-vis y luz fluorescente de luz fría) las cuales deben cumplir con los requisitos mencionados

en el guía, aunado a ello se colocó un luxómetro que monitoreo los lux a los que estuvieron expuestas las muestras en la prueba de luz fría donde de acuerdo a la ISO 18909-2006 el rango de aceptado es de 20,000-50,000 lux, en lámparas fluorescentes.

Para fines de esta prueba, en el uso de la lámpara de luz UV-Vis (Figura 7) se tomarón las precauciones necesarias para su manejo en un fotoreactor incluyendo la vestimenta adecuada asi como la precaución de no exponer de manera directa ninguna parte del cuerpo.

Por otra parte, en la cámara experimental para exposición a la lámpara fluorescente de luz fría (Figura 8), el luxómetro se colocó en la distancia a la cual fueron puestas las muestras analíticas asegurando asi que antes y durante el estudio los luxes medidos estuvieron en un rango de entre 20,000-50,000 lux.

Las condiciones de esta prueba fueron:

Luz fría

Agente estresante:	<u>Lámpara fluorescente de luz fría</u>
Temperatura:	<u>25 °C</u>
Humedad relativa:	<u>60 %</u>
Tiempos de muestreo:	<u>0,12,24,48 y 72 h</u>
Duración total de la prueba:	<u>72 h</u>
Métodos de análisis:	<u>-Método analítico 1, 2, 3, 4 y 5</u>

Luz UV-vis

Agente estresante:	<u>Lámpara de inmersión de luz UV-vis</u>
Temperatura:	<u>30 °C</u>
Humedad relativa:	<u>60 %</u>
Tiempos de muestreo:	<u>0,12,24,48 y 72 h</u>
Duración total de la prueba:	<u>72 h</u>
Métodos de análisis:	<u>-Método analítico 1, 2, 3, 4 y 5</u>



Figura 7: Lámpara de inmersión de luz UV-Vis con foto reactor



Figura 8: Cámara experimental para exposición a la lámpara fluorescente de luz fría

3.7.1 Muestras para fotoestabilidad luz fría:

3.7.1.1 Método analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50 %

Para la evaluación del aspecto, en cada tiempo de análisis se hicieron anotaciones describiendo la apariencia de cada una de las muestras expuestas a la lámpara de luz fría.

3.7.1.2 Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En viales de vidrio de 20 mL, se pesaron aprox. 1.6 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo; posteriormente se colocaron dentro de la cámara de exposición a la lámpara de luz fría, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de viales correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 2.

3.7.1.3 Método analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En viales de vidrio de 20 mL, se pesaron aprox. 5 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo; posteriormente se colocaron dentro de la cámara de exposición a la lámpara de luz fría, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de viales correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 3.

3.7.1.4 Método analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En viales de vidrio de 20 mL, se peso aprox. 1 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo; posteriormente se colocaron dentro de la cámara de exposición a la lámpara de luz fría, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de viales correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 4.

3.7.1.5 Método Analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

En viales de vidrio de 20 mL, se pesaron aprox. 10 g de la muestra analítica, un duplicado para cada tiempo de muestreo; posteriormente se colocaron dentro de la cámara de exposición a la lámpara de luz fría, en cada tiempo de análisis se tomo el duplicado de viales correspondiente para analizar las muestras de acuerdo a la metodología establecida en el método analítico 5.

3.7.2 Muestras para fotoestabilidad luz UV-vis:

Colocar en el fotoreactor 250 mL de cloruro de benzalconio y empezar la prueba en las condiciones mencionadas, las muestras serán tomadas en cada tiempo de análisis a través de la llave de muestreo y analizadas de acuerdo a los métodos 1,2,3,4 y 5, según corresponda.

3.8 Preparación de controles negativos

La preparación de los controles negativos se realizó de la misma forma que para las muestras (sin incluir la muestra analítica) y se analizaron bajo las mismas condiciones, es decir, se incluyeron en las determinaciones iniciales del ensayo, límites de amina y sales de amina, relación de componentes alquílicos por HPLC e impurezas por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %.

3.9 Verificación del método analítico 3 para la determinación del contenido de impurezas por HPLC en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

Para el método analítico 3, que como se menciona anteriormente, es un método compendial solo se realizará un ejercicio de verificación tal como se menciona en el marco teórico de este trabajo.

La información referente al protocolo de verificación del método analítico 3 se encuentra descrita en el PVALOSSA-017-00, documento interno de la empresa Organo Síntesis S.A. de C.V.

Este método analítico considera a las tres impurezas principales presentes en el cloruro de benzalconio en solución al 50% que son:

- Alcohol bencílico
- Benzaldehído
- Cloruro de bencilo

Debido a esto, el ejercicio de verificación se basó en las impurezas antes mencionadas exceptuando de algunas pruebas al cloruro de bencilo.

Ya que el método analítico 3 pertenece a la categoría II de la clasificación de métodos analíticos según la USP, se evaluaron los siguientes parámetros:

- Linealidad
- Exactitud
- Robustez
- Precisión
- Especificidad
- Repetibilidad
- Límite de detección y cuantificación

3.10 Identificación del ácido benzoico y tolueno como productos de degradación

Dentro de las impurezas desconocidas presentes en el cloruro de benzalconio en solución al 50% se pudieron identificar por tiempos de retención al ácido benzoico y tolueno.

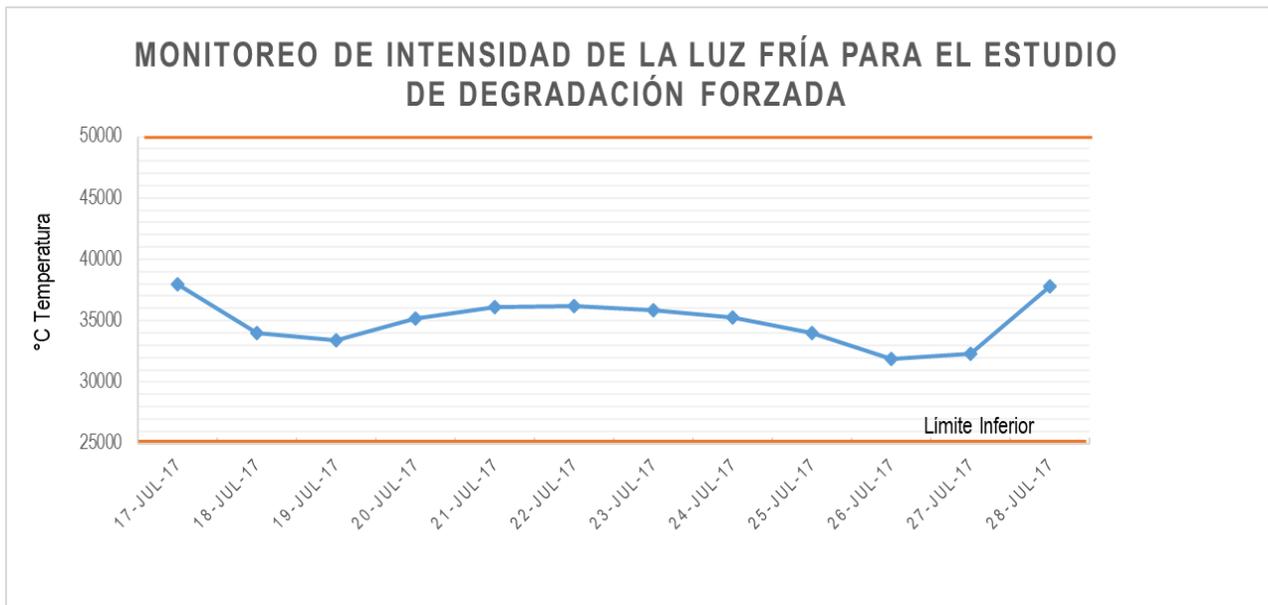
Para ello se realizaron inyecciones previas al inicio del estudio de degradación forzada de soluciones de concentración conocida del ácido benzoico y tolueno, que, al ser comparadas con cromatogramas representativos de muestras analíticas sometidas a pruebas preliminares de degradación, mostraban coincidencia en los tiempos de retención de estas sustancias por lo que se identificaron como ácido benzoico y tolueno, respectivamente.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Monitoreo de intensidad de la lámpara de luz fría para el estudio de degradación forzada

La lámpara fluorescente de luz fría fue monitoreada durante el estudio, ya que una de las condiciones era mantener la emisión en un rango de 20,000-50,000 lux, de lo contrario tendría que detenerse la prueba; sin embargo, como podemos observar en la gráfica 1, la intensidad se mantuvo en 35000 ± 5000 lux, por lo que la prueba se concluyó con éxito.

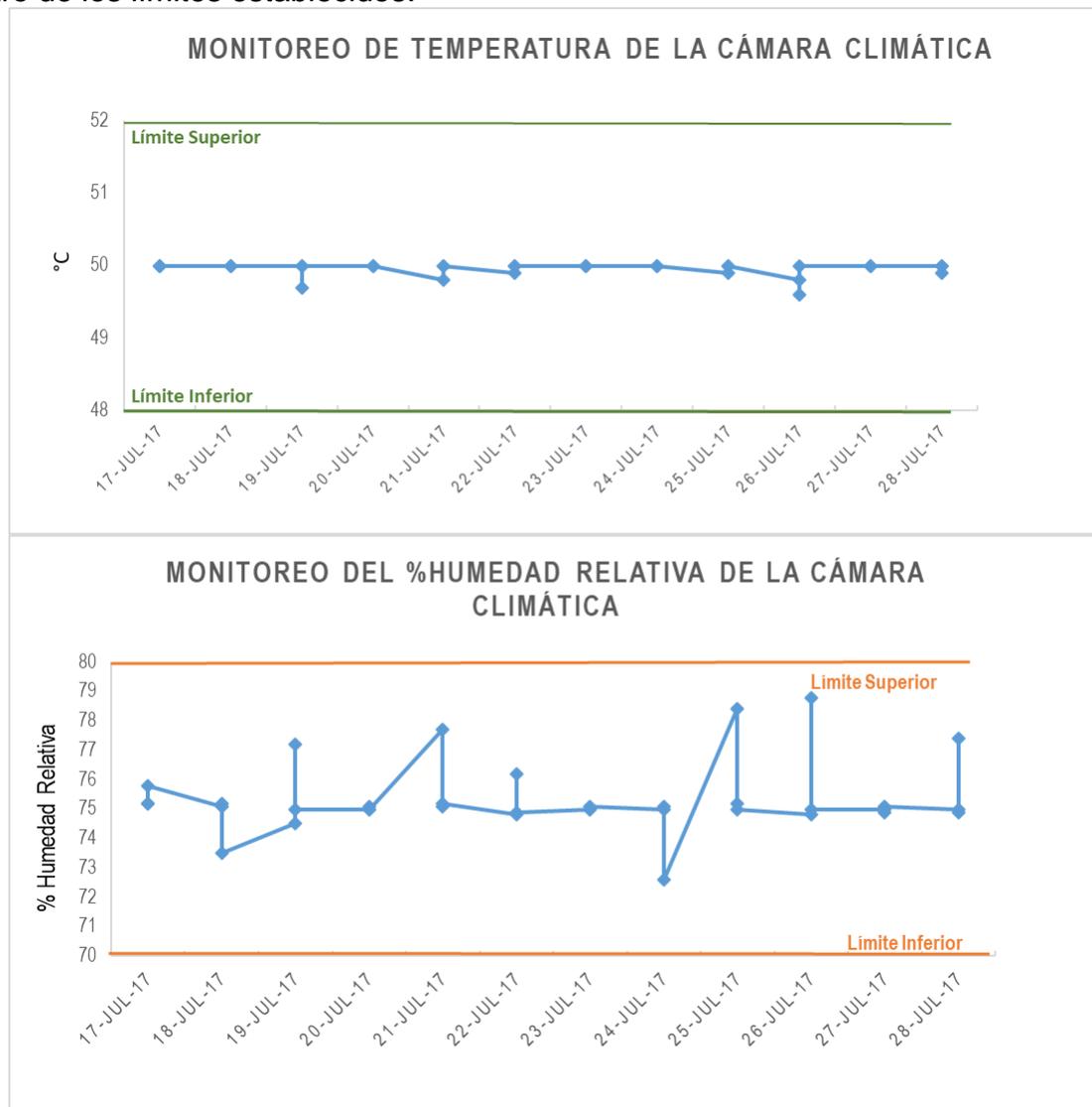


Gráfica 1: Monitoreo de intensidad de la lámpara de luz fría

4.2 Monitoreo de la temperatura y humedad de la cámara climática para el estudio de degradación forzada

Como parte del estudio de degradación forzada se realizó un monitoreo de la temperatura y porcentaje de humedad relativa de la cámara climática donde fueron colocadas las muestras que se utilizarían en cada tiempo de análisis; esto con el objetivo de garantizar que las condiciones fueran constantes durante los días de estudio (12), para ello se tomó lectura de los valores de temperatura (°C) y humedad relativa (% HR) tres veces al día, datos con los que se construyó la gráfica 2 donde se puede observar que la temperatura se mantuvo muy cercana a los 50°C mientras

que para la humedad relativa la fluctuación fue mayor, entre el 72-79%, pero siempre dentro de los límites establecidos.



Gráfica 2: Monitoreo de temperatura y humedad de la cámara climática

4.3 Método analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50 %.

Se realizó una descripción de los principales cambios en las muestras tales como la apariencia, color, olor y viscosidad, en función del tiempo para cada condición de estrés propuesta. A continuación, las observaciones:

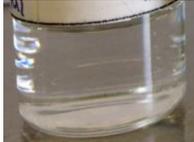
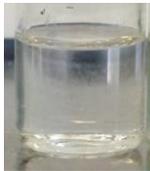
Condición	Aspecto respecto al tiempo				
	0h	12h	24h	48h	72h
Hidrólisis Ácida	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico.
					

Tabla 4: Descripción del aspecto en función del tiempo para la prueba de hidrólisis ácida.

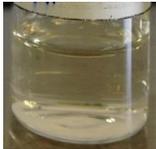
Condición	Aspecto respecto al tiempo				
	0h	12h	24h	48h	72h
Hidrólisis básica	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico	Solución ligeramente viscosa, cristalina color paja, libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa, cristalina color paja, libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa, cristalina color paja, libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa, cristalina color paja, libre de partículas extrañas con olor característico.
					

Tabla 5: Descripción del aspecto en función del tiempo para la prueba de hidrólisis básica.

Condición	Aspecto respecto al tiempo				
	0h	12h	24h	48h	72h
Oxidación	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico.
					

Tabla 6: Descripción del aspecto en función del tiempo para la prueba de oxidación

Condición	Aspecto respecto al tiempo				
	0h	12h	24h	48h	72h
Calor Seco	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico	Solución ligeramente viscosa que se vuelve un semisólido a temperatura ambiente, cristalino e incoloro, libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa que se vuelve un semisólido a temperatura ambiente, cristalino, color paja, libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa que se vuelve un semisólido a temperatura ambiente, cristalino, color amarillo canario, libre de partículas extrañas con un ligero cambio en el olor característico de la solución	Solución ligeramente viscosa que se vuelve un semisólido a temperatura ambiente, cristalino, color mostaza, libre de partículas extrañas con un cambio total en el olor característico de la solución.
					

Tabla 7: Descripción del aspecto en función del tiempo para la prueba de calor seco.

Condición	Aspecto respecto al tiempo				
	0h	12h	24h	48h	72h
Luz Fría	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico	Solución ligeramente viscosa que se vuelve un semisólido a temperatura ambiente, cristalino e incoloro libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa que se vuelve un semisólido a temperatura ambiente, cristalino e incoloro libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa que se vuelve un semisólido a temperatura ambiente, cristalino e incoloro libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa que se vuelve un semisólido a temperatura ambiente, cristalino e incoloro libre de partículas extrañas con olor característico.
					

Tabla 8: Descripción del aspecto en función del tiempo para la prueba de luz fría

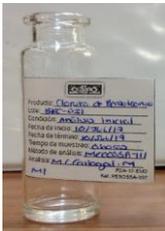
Condición	Aspecto respecto al tiempo				
	0h	12h	24h	48h	72h
Luz UV	Solución ligeramente viscosa, cristalina e incolora, libre de partículas extrañas con olor característico	Solución ligeramente viscosa, cristalina de color paja, libre de partículas extrañas con olor característico.	Solución ligeramente viscosa, cristalina de color paja, libre de partículas extrañas con un ligero cambio en el olor característico de la solución	Solución ligeramente viscosa, cristalina color canela, libre de partículas extrañas con un cambio total en el olor característico de la solución	Solución ligeramente viscosa, cristalina color canela, libre de partículas extrañas con olor distinto al característico de la solución.
					

Tabla 9: Descripción del aspecto en función del tiempo para la prueba de luz UV-vis

En el caso de la hidrólisis ácida (tabla 4), así como de la oxidación (tabla 6) no se observaron cambios significativos en la coloración o viscosidad de la solución. Por el contrario, aunque en la prueba de exposición a la lámpara de luz fría (tabla 8) no se presentaron cambios de coloración si hubo un aumento de viscosidad con el paso del tiempo, siendo que a partir de la hora 12, esta se volvía un semisólido.

Para la hidrólisis básica (tabla 5) el cambio más notable fue el color de la solución al pasar del incoloro en la hora 0, por ligeramente color paja en la hora 12 y hasta llegar a la hora 72 con un color paja intenso.

En la exposición a la lámpara de luz UV-vis (tabla 9) la viscosidad tampoco se vio afectada, sin embargo, el color cambio de incoloro al inicio de la prueba, por paja después de 24 h y canela a las 72 h; otro cambio significativo, fue el del olor tornándose completamente diferente al característico de la solución de cloruro de benzalconio al 50 %.

La exposición al calor seco (véase tabla 7) provoco un cambio en la viscosidad ya que la solución se volvió un semi-sólido desde las 12 h; el color también sufrió un cambio importante de incoloro en el inicio de la prueba a color mostaza después de las 72 h.

De acuerdo con los cambios observados durante el estudio de degradación forzada, los agentes estresantes que causaron importantes cambios fisicoquímicos en la solución al 50 % del cloruro de benzalconio fueron: calor seco, NaOH 0.5 M y la lámpara de luz UV-vis.

4.4 Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %.

Conocer la relación de componentes alquílicos (C12 y C14) en las muestras de cloruro de benzalconio es importante ya que la efectividad del producto depende directamente de la proporción en la que cada componente se encuentra presente en la solución.

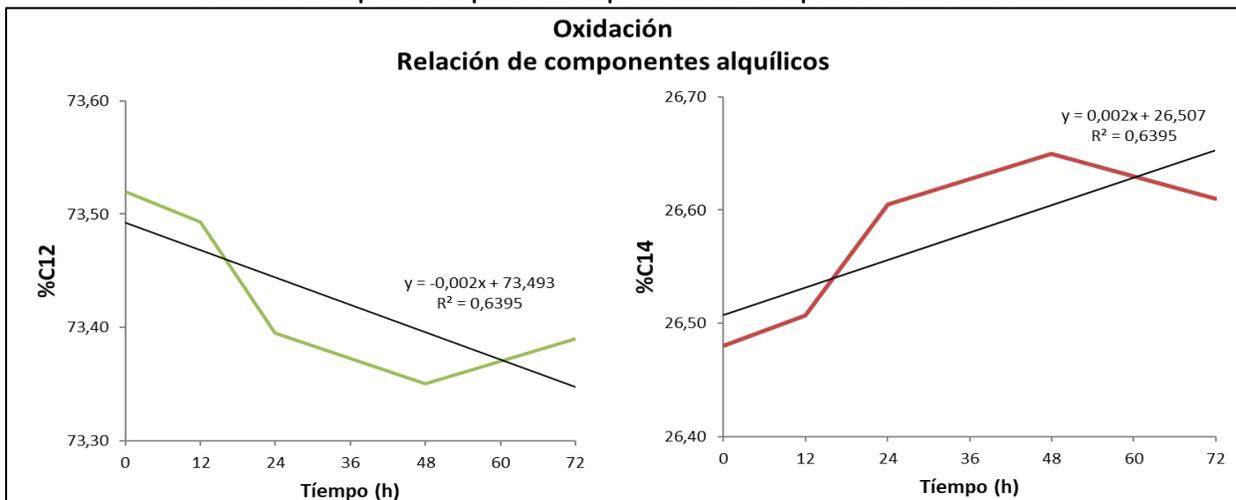
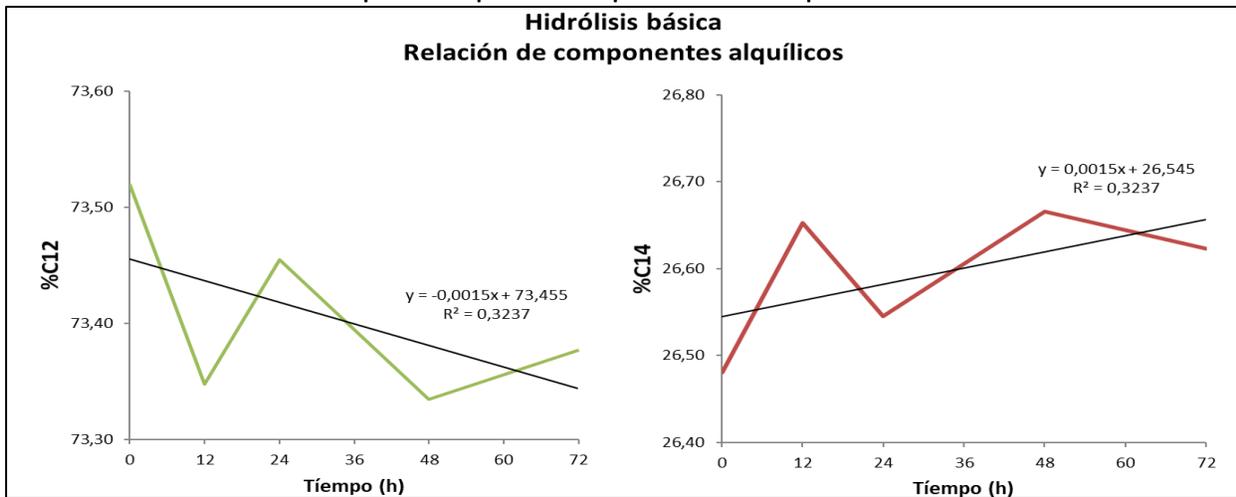
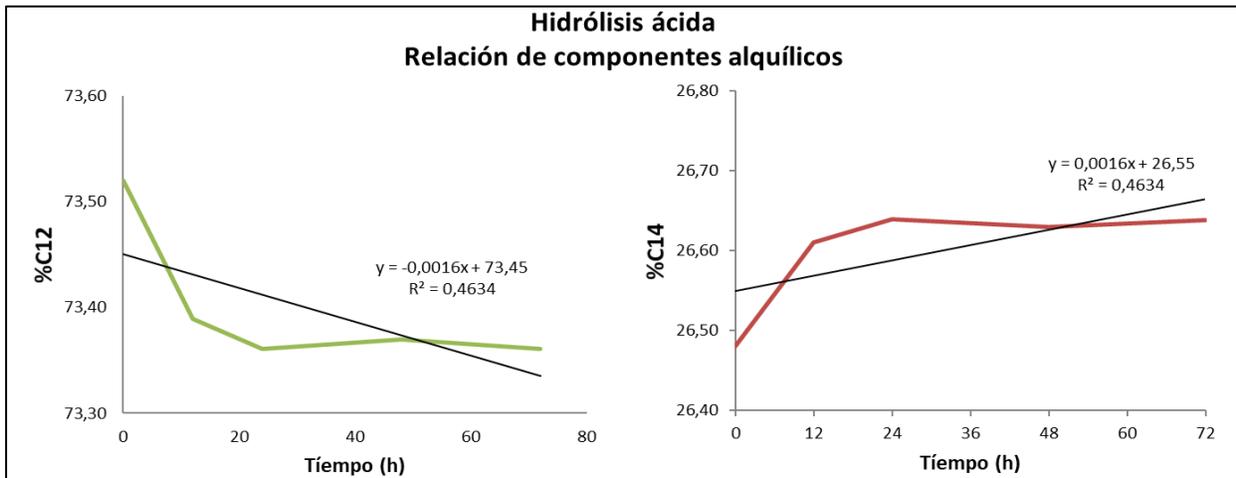
La tabla 10 muestra la relación de los componentes alquílicos en función del tiempo, la diferencia respecto del análisis inicial no fue mayor al 1 %. Cabe destacar que la relación de ambos homólogos se mantuvo en un 3:1 (C12:C14).

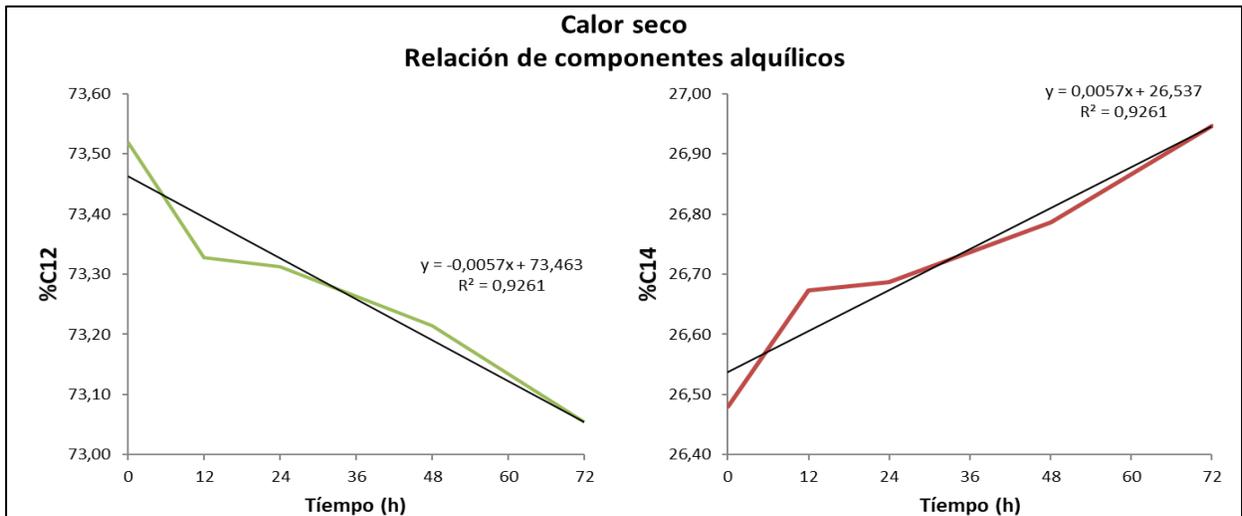
Condición	TIEMPO (h)					TIEMPO (h)				
	0	12	24	48	72	0	12	24	48	72
	RCA	RCA	RCA	RCA	RCA	$ D_i $	$ D_i $	$ D_i $	$ D_i $	$ D_i $
Hidrólisis Ácida	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12
	73,52	73,39	73,36	73,37	73,36	N/A	0,18	0,22	0,20	0,22
	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14
	26,48	26,61	26,64	26,63	26,64	N/A	0,49	0,60	0,57	0,60
Hidrólisis Básica	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12
	73,52	73,35	73,45	73,33	73,38	N/A	0,23	0,09	0,25	0,19
	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14
	26,48	26,65	26,55	26,67	26,62	N/A	0,65	0,25	0,70	0,54
Oxidación	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12
	73,52	73,49	73,40	73,35	73,39	N/A	0,04	0,17	0,23	0,18
	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14
	26,48	26,51	26,60	26,65	26,61	N/A	0,10	0,47	0,64	0,49
Calor Seco	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12
	73,52	73,33	73,31	73,21	73,05	N/A	0,26	0,28	0,42	0,63
	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14
	26,48	26,67	26,69	26,79	26,95	N/A	0,73	0,78	1,16	1,76
Luz Fría	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12
	73,52	73,39	73,37	73,39	73,40	N/A	0,17	0,21	0,17	0,16
	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14
	26,48	26,61	26,63	26,61	26,60	N/A	0,47	0,58	0,48	0,44
Luz UV	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12	C12
	73,52	73,42	73,48	73,48	73,54	N/A	0,13	0,05	0,06	0,03
	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14	C14
	26,48	26,58	26,52	26,52	26,46	N/A	0,36	0,14	0,15	0,09

Tabla 10: Porcentaje de C12 y C14 en las muestras de cloruro de benzalconio evaluadas por el método analítico 2 “Determinación de la relación de componentes alquílico por HPLC en cloruro de benzalconio en solución al 50 %” para cada tiempo de muestreo.

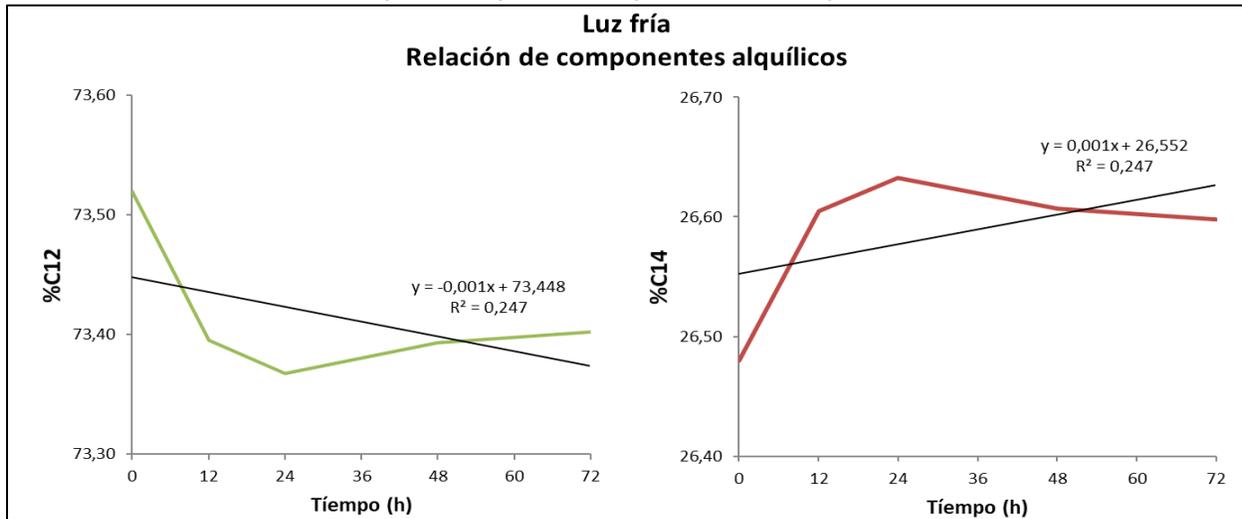
Es importante mencionar, que al ser una relación entre el área de cada homólogo y la suma total de las áreas obtenidas en la muestra, la relación siempre deberá sumar el 100%; sin embargo, en los cromatogramas obtenidos si se observó una disminución en las áreas de las muestras, siendo más representativo para la hidrólisis básica que obtuvo una disminución del 7 % aproximadamente después de 72 h y para el calor seco, que pasadas 48 h ya tenía una diferencia de casi 8 % siendo para las 72 h de estudio un 11 % respecto al análisis inicial.

Para las pruebas de hidrólisis ácida, oxidación, exposición a luz fría y luz UV-vis, el decremento fue menor al 5 % en comparación al análisis inicial.

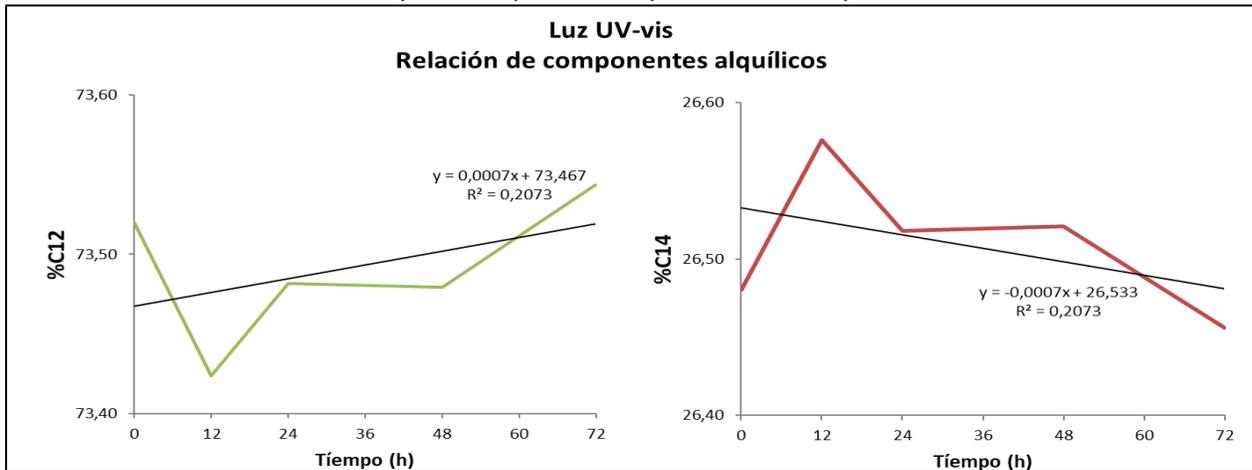




Gráfica 6: %Componente alquílico vs tiempo de análisis en la prueba de calor seco



Gráfica 7: %Componente alquílico vs tiempo de análisis en la prueba de luz fría



Gráfica 8: %Componente alquílico vs tiempo de análisis en la prueba de luz UV-vis

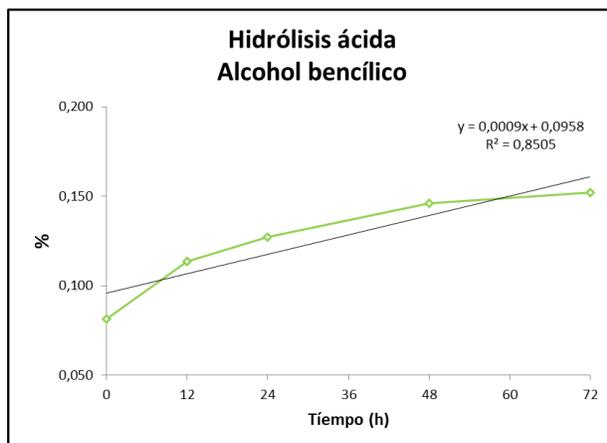
4.5 Método analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %”

4.5.1 Hidrólisis ácida

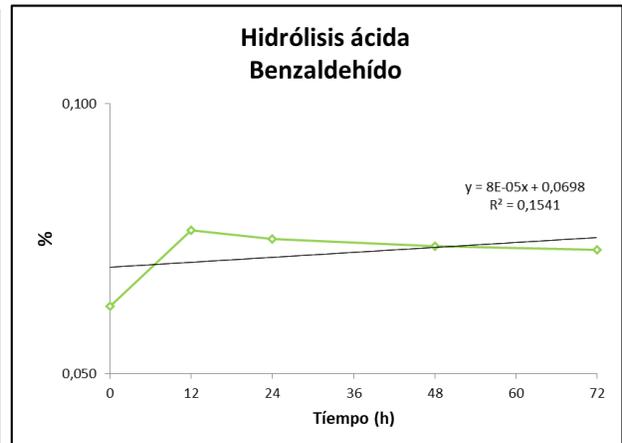
La tabla 11 incluye los valores puntuales (%) de las principales impurezas cuantificadas en la prueba de hidrólisis ácida, en muestras de cloruro de benzalconio en solución al 50 %, en cada tiempo de análisis.

Condición	TIEMPO (h)					$ D_i $				
	Hidrólisis ácida					Hidrólisis ácida				
	0	12	24	48	72	0	12	24	48	72
%Alcohol bencílico	0,081	0,113	0,127	0,146	0,152	N/A	39,50	56,49	79,22	86,66
%Benzaldehído	0,063	0,077	0,075	0,074	0,073	N/A	22,49	19,89	17,68	16,67
%Cloruro de bencilo	0,035	0,025	0,021	0,012	0,000	N/A	27,62	41,74	65,61	100,00
%Ácido benzoico	0,099	0,100	0,101	0,101	0,100	N/A	1,28	1,99	2,19	0,89
%Tolueno	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	N/A	0,00	0,00	0,00	0,00
%Impureza desconocida 2	0,023	0,030	0,030	0,030	0,029	N/A	28,01	29,30	27,20	24,32
%Impureza desconocida 3	0,023	0,025	0,026	0,026	0,024	N/A	12,97	14,67	13,52	7,56

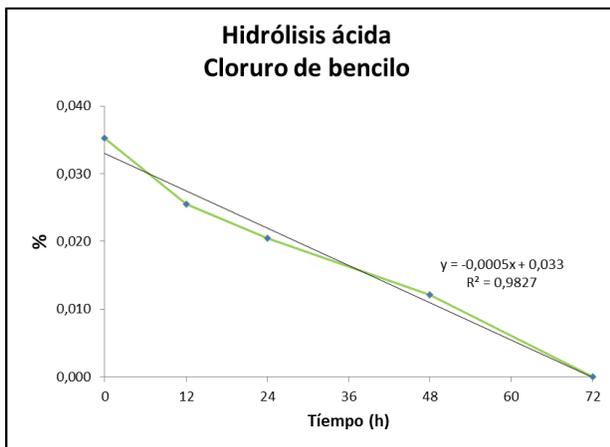
Tabla 11: Porcentaje de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de degradación forzada para la prueba de hidrólisis ácida en cada tiempo de análisis.



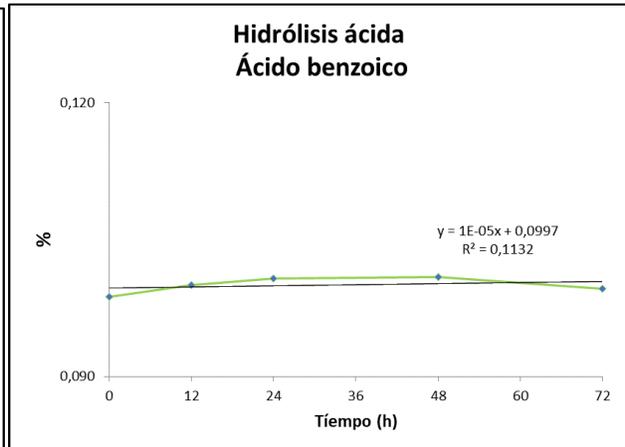
Gráfica 9: % Alcohol bencílico vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida



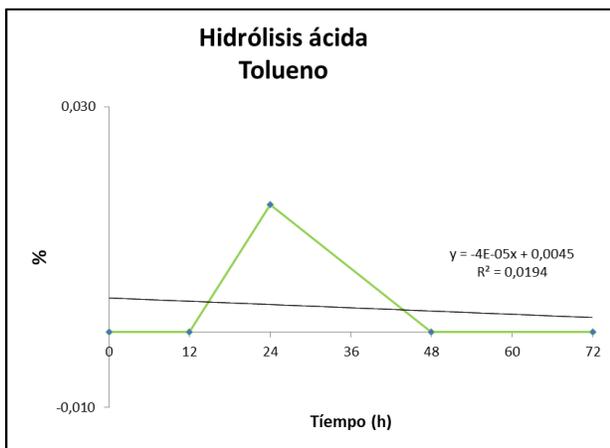
Gráfica 10: % Benzaldehído vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida



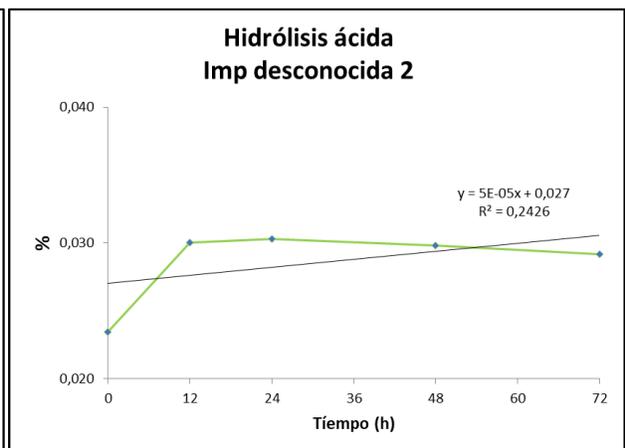
Gráfica 11: % Cloruro de bencilo vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida



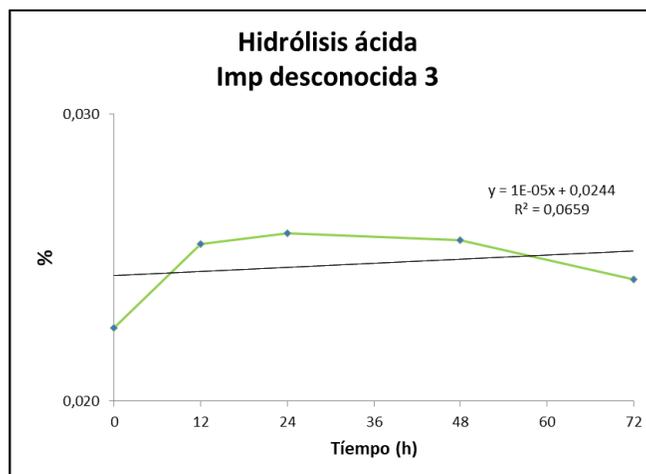
Gráfica 12: % Ácido benzoico vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida



Gráfica 13: % Tolueno vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida



Gráfica 14: % Imp desconocida 2 vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida



Gráfica 15: % Imp desconocida 3 vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida

El alcohol bencílico (gráfica 9) incremento aproximadamente un 87 % respecto al análisis inicial pasadas las 72 h, es decir, duplico su contenido llegando a 0.152 %.

Pasadas 12 h de estudio, el contenido de benzaldehído (gráfica 10) tuvo su mayor incremento con casi 23 % del valor inicial, sin embargo, al paso de las horas el contenido fue disminuyendo gradualmente hasta un 0.073 % que, aun así, fue mayor al valor inicial de 0.063 %.

En la gráfica 11 podemos observar que el cloruro de bencilo paso de 0.035 % en la cuantificación inicial a un 0 % pasadas las 72 h, degradándose por completo en presencia de ácido clorhídrico 0.5 M con un comportamiento lineal cuya $r^2=0.98$.

Las gráficas 12,13,14 y 15 (ácido benzoico, tolueno, impureza desconocida 1 y 2, respectivamente) no muestran grandes cambios en los valores obtenidos para cada impureza respecto del valor inicial.

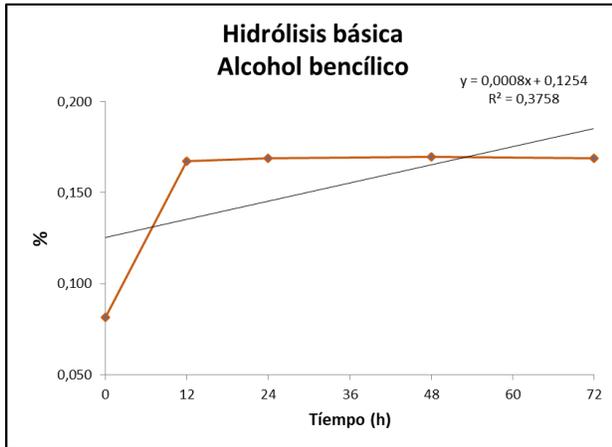
4.5.2 Hidrólisis básica

Los valores puntuales (%) de las principales impurezas cuantificadas en la prueba de hidrólisis básica para cada tiempo de análisis, en muestras de cloruro de benzalconio en solución al 50 %, se encuentran resumidos en la siguiente tabla:

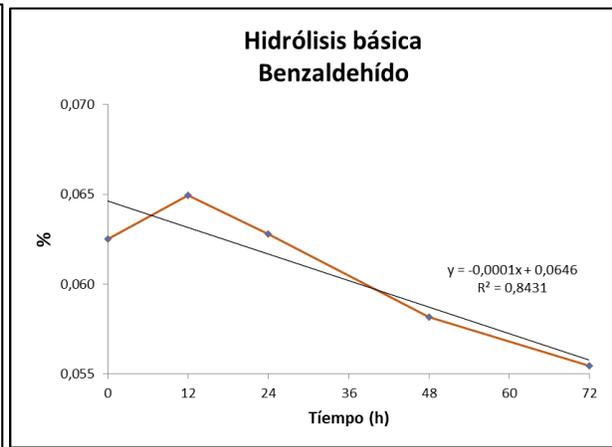
Condición	TIEMPO (h)					$ D_i $				
	Hidrólisis básica					Hidrólisis básica				
	0	12	24	48	72	0	12	24	48	72
%Alcohol bencílico	0,081	0,167	0,169	0,170	0,169	N/A	105,80	107,56	108,52	107,48
%Benzaldehído	0,063	0,065	0,063	0,058	0,055	N/A	3,89	0,47	6,95	11,32
%Cloruro de bencilo	0,035	0,000	0,000	0,000	0,000	N/A	100,00	100,00	100,00	100,00
%Ácido benzoico	0,099	0,100	0,100	0,100	0,033	N/A	1,02	1,52	1,55	66,48
%Tolueno	0,000	0,000	0,016	0,000	0,000	N/A	0,00	0,00	0,00	0,00
%Impureza desconocida 2	0,023	0,030	0,030	0,023	0,030	N/A	27,90	28,61	2,50	26,90
%Impureza desconocida 3	0,023	0,026	0,027	0,026	0,026	N/A	16,17	18,82	15,06	14,62

Tabla 12: Porcentaje de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de degradación forzada para la prueba de hidrólisis básica en cada tiempo de análisis.

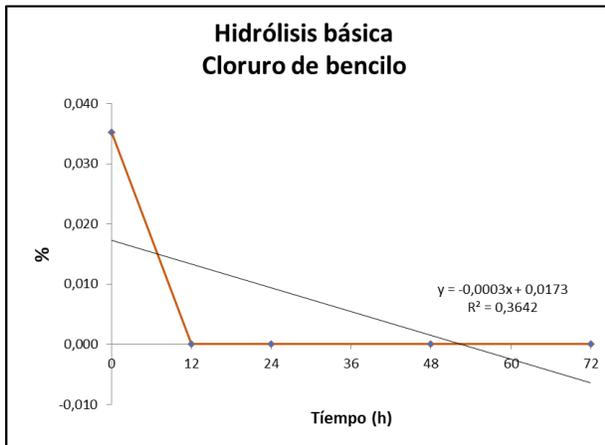
A continuación, se incluyen las gráficas representativas para cada impureza cuantificada en la prueba de hidrólisis básica:



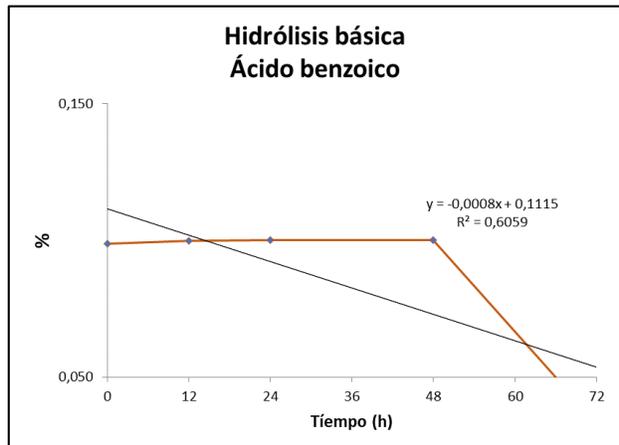
Gráfica 16: % Alcohol bencílico vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica



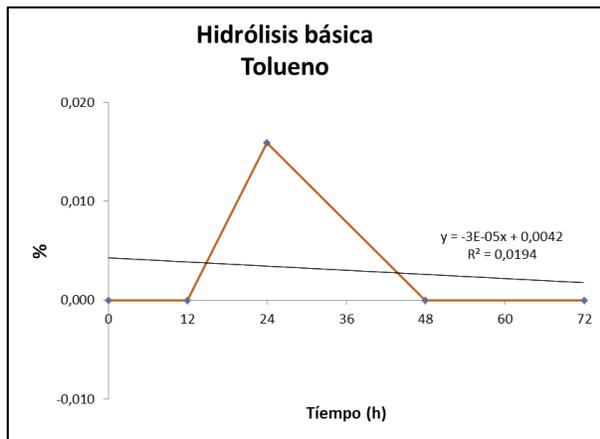
Gráfica 17: % Benzaldehído vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica



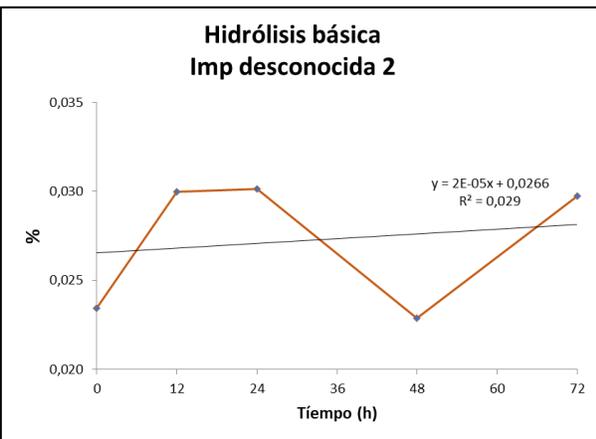
Gráfica 18: % Cloruro de bencilo vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica



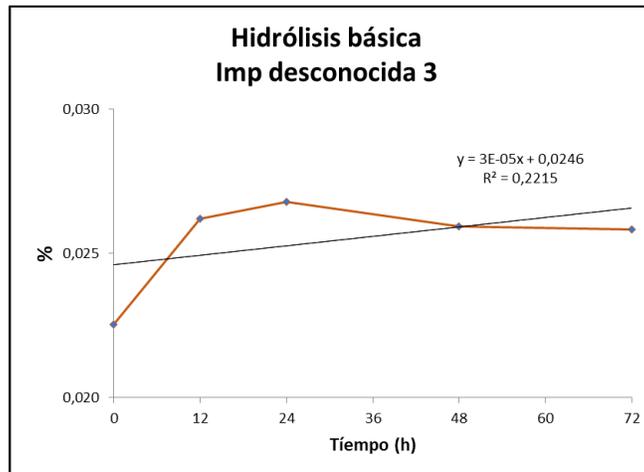
Gráfica 19: % Ácido benzoico vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica



Gráfica 20: % Tolueno vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica



Gráfica 21: % Imp desconocida 2 vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica



Gráfica 22: % Imp desconocida 3 vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica

La gráfica 16 muestra que pasadas las 12 h en contenido de alcohol bencílico ya había duplicado el valor inicial, es decir, 0.167 % alcanzando el máximo aumento en las 48 h con 0.17 %.

El contenido de benzaldehído por el contrario disminuyó gradualmente a lo largo del estudio pasando de 0.063 % en la hora 0 hasta un 0.055 % pasadas las 72 h, gráfica 17.

El cloruro de bencilo, al igual que en la hidrólisis ácida, se degradó por completo, sin embargo, en este caso pasadas 12 h el porcentaje de bencilo ya era de 0 %, gráfica 18.

La gráfica 19 muestra el comportamiento del ácido benzoico, donde se puede observar que durante 48 h el contenido estuvo en 0.1 % pero en la hora 72 este disminuyó hasta 0.033 %.

En la hora 24 se cuantificó 0.016% de Tolueno, pero en el análisis de las 48h el porcentaje fue de 0, véase gráfica 20.

La impureza desconocida 2 y 3 tuvieron un comportamiento similar, teniendo valores entre 0.023-0.030 %, como se muestra en las gráficas 21 y 22.

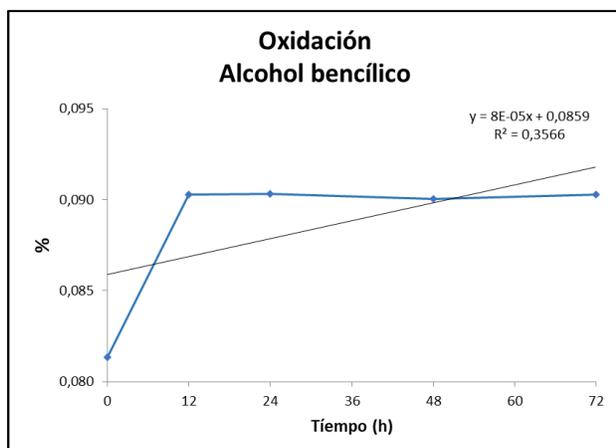
4.5.3 Oxidación

La siguiente tabla, se incluyen los valores puntuales (%) de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de cloruro de benzalconio en solución al 50 %, obtenidos en la prueba de oxidación para cada tiempo de análisis.

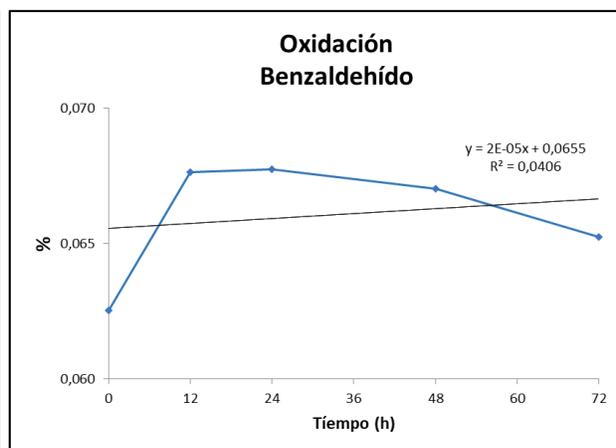
Condición	TIEMPO (h)					$ D_i $				
	Oxidación					Oxidación				
	0	12	24	48	72	0	12	24	48	72
%Alcohol bencílico	0,081	0,090	0,090	0,090	0,090	N/A	10,97	10,98	10,64	10,97
%Benzaldehído	0,063	0,068	0,068	0,067	0,065	N/A	8,17	8,33	7,19	4,36
%Cloruro de bencilo	0,035	0,034	0,033	0,032	0,000	N/A	3,47	4,94	8,76	100,00
%Ácido benzoico	0,099	0,101	0,100	0,099	0,099	N/A	2,06	1,28	0,76	0,56
%Tolueno	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	N/A	0,00	0,00	0,00	0,00
%Impureza desconocida 2	0,023	0,029	0,028	0,028	0,028	N/A	22,90	19,40	19,55	17,46
%Impureza desconocida 3	0,023	0,025	0,025	0,025	0,000	N/A	11,28	9,39	9,40	100,00

Tabla 13: Porcentaje de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de degradación forzada para la prueba de oxidación en cada tiempo de análisis.

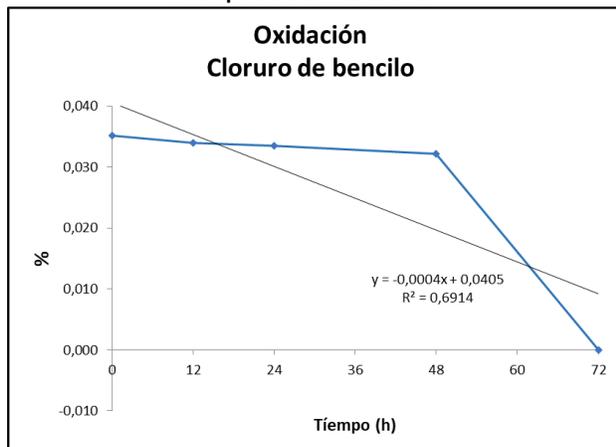
A continuación, se incluyen las gráficas representativas para cada impureza cuantificada en la prueba de oxidación:



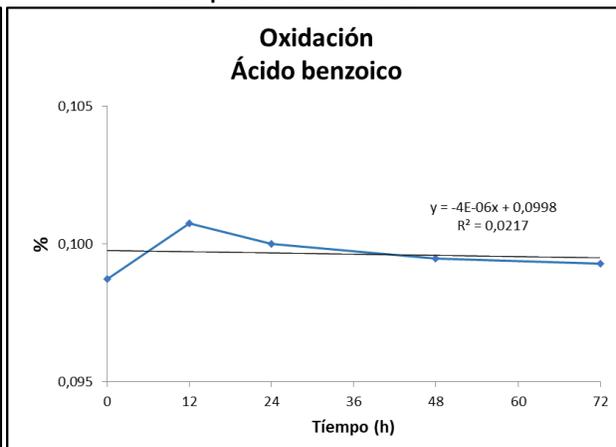
Gráfica 23: % Alcohol bencílico vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación



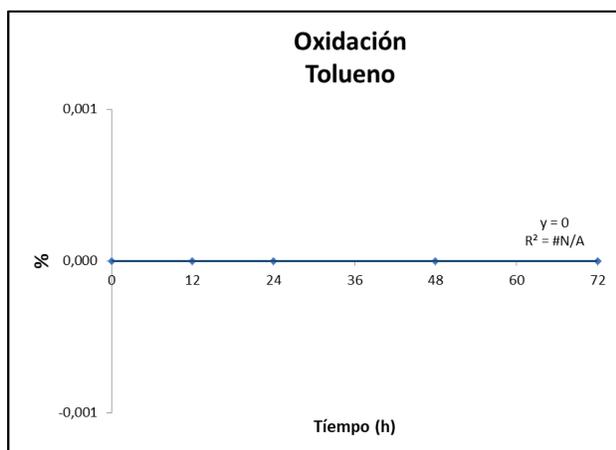
Gráfica 24: % Benzaldehído vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación



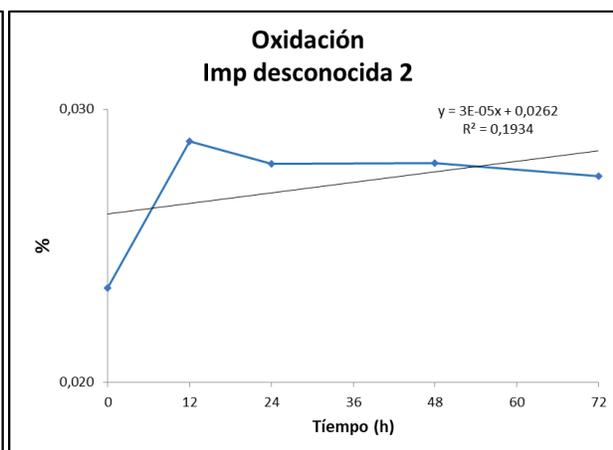
Gráfica 25: % Cloruro de bencilo vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación



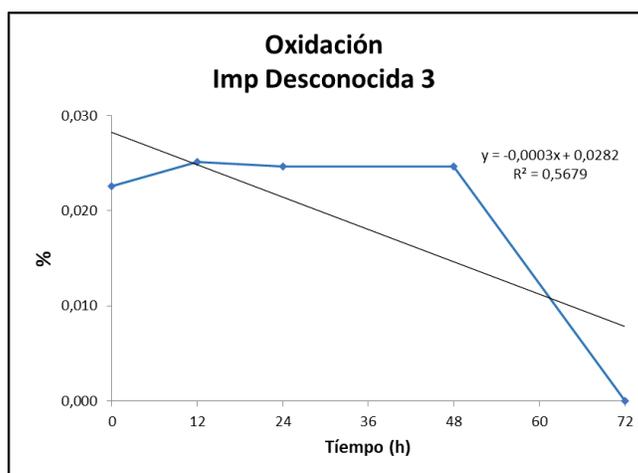
Gráfica 26: % Ácido benzoico vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación



Gráfica 27: % Tolueno vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación



Gráfica 28: % Imp desconocida 2 vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación



Gráfica 29: % Imp desconocida 3 vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación

El alcohol bencílico aumento 0.009 % pasadas 12 h, manteniendo un valor de 0.090 % hasta el final del estudio (gráfica 23); el benzaldehído, por otra parte, tuvo un incremento de 0.005 % en la hora 12 pero pasadas 48 h disminuyo ligeramente dando un valor final de 0.065% tras 72 h de estudio (gráfica 24).

El cloruro de bencilo, así como la impureza desconocida 3 (gráficas 25 y 29 respectivamente) tuvieron un comportamiento similar ya que durante las primeras 48 h no tuvieron cambios significativos en sus valores, pero pasadas las 72 h ambas impurezas disminuyeron hasta 0 %.

El ácido benzoico, tolueno y la impureza desconocida 2 mantuvieron porcentajes con pocos cambios tal cual podemos ver en las gráficas 26, 27 y 28.

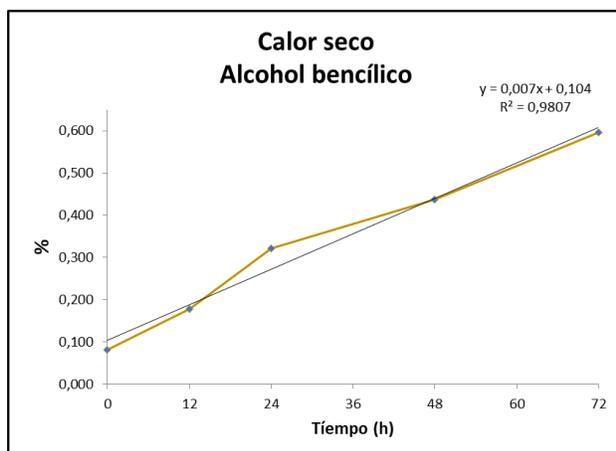
4.5.4 Calor seco

La tabla 14 incluye los valores puntuales (%) de las principales impurezas, cuantificadas en las muestras de cloruro de benzalconio en solución al 50 %, obtenidos en la prueba de calor seco para cada tiempo de análisis.

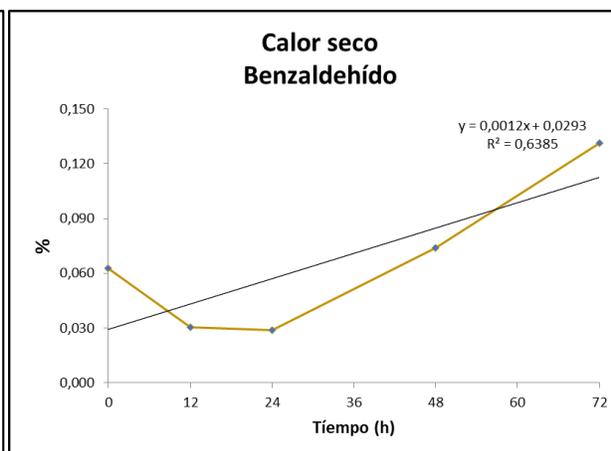
Condición	TIEMPO (h)					$ D_i $				
	Calor seco					Calor seco				
	0	12	24	48	72	0	12	24	48	72
%Alcohol bencílico	0,081	0,177	0,321	0,436	0,595	N/A	117,82	294,74	436,11	631,76
%Benzaldehído	0,063	0,030	0,029	0,074	0,131	N/A	51,53	53,68	18,34	110,28
%Cloruro de bencilo	0,035	0,078	0,134	0,153	0,154	N/A	121,22	280,71	333,17	337,15
%Ácido benzoico	0,099	0,111	0,154	0,284	0,483	N/A	12,35	55,88	187,59	389,28
%Tolueno	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	N/A	0,00	0,00	0,00	0,00
%Impureza desconocida 2	0,023	0,032	0,033	0,035	0,054	N/A	34,50	39,36	50,34	131,34
%Impureza desconocida 3	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	N/A	100,00	100,00	100,00	100,00

Tabla 14: Porcentaje de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de degradación forzada para la prueba de calor seco en cada tiempo de análisis.

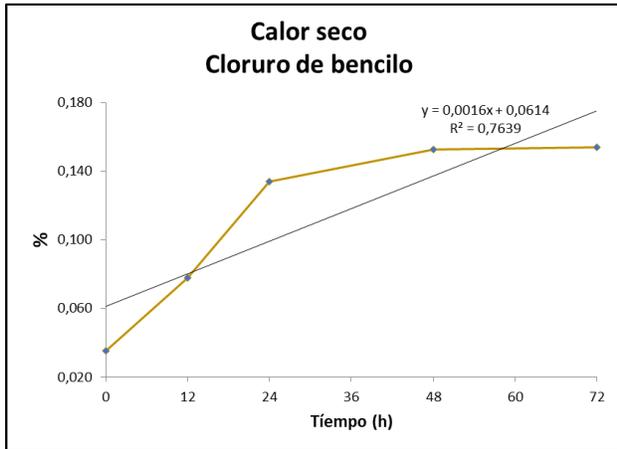
A continuación, se incluyen las gráficas representativas para cada impureza cuantificada en la prueba de calor seco:



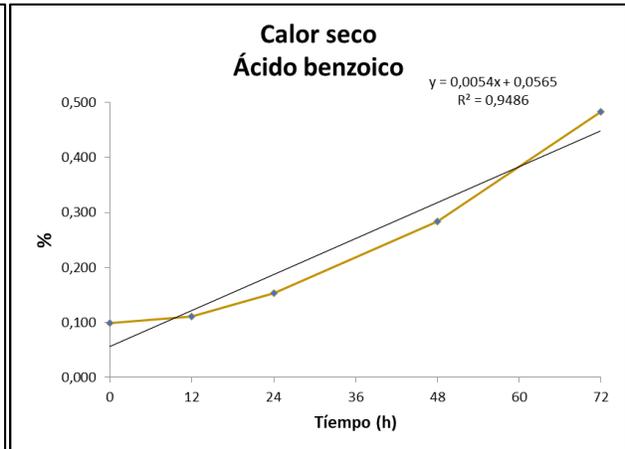
Gráfica 30: % Alcohol bencílico vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco



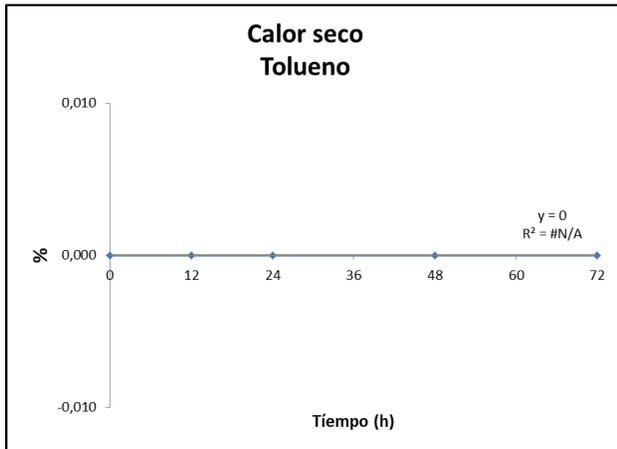
Gráfica 31: % Benzaldehído vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco



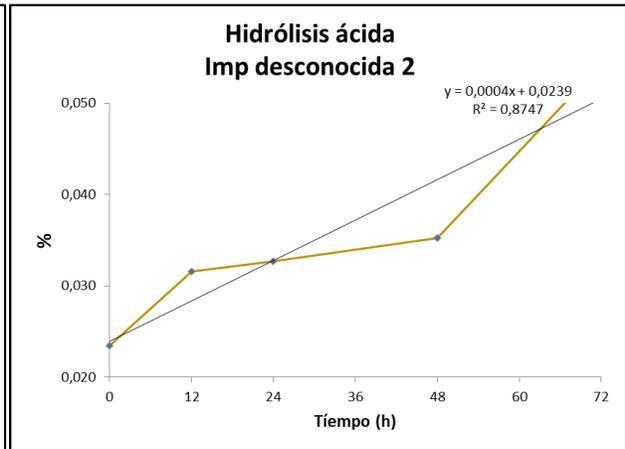
Gráfica 32: % Cloruro de bencilo vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco



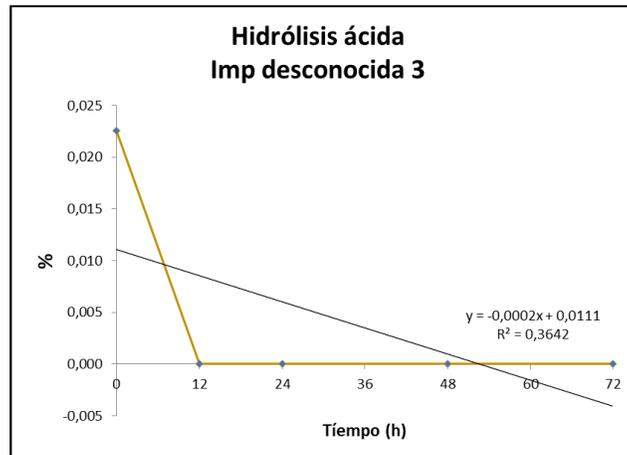
Gráfica 33: % Ácido benzoico vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco



Gráfica 34: % Tolueno vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco



Gráfica 35: % Imp desconocida 2 vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco



Gráfica 36: % Imp desconocida 3 vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco

El calor seco aumento 632 % el valor inicial del alcohol bencílico, con 0.595% pasadas las 72 h, superando incluso el valor permitido para esta impureza que debe ser ≤ 0.5 %, como se puede ver en la gráfica 30 el comportamiento durante la prueba se ajusta al modelo lineal con una $r^2= 0.98$.

El benzaldehído también duplico su valor, sin embargo, su comportamiento fue diferente según se observa en la gráfica 31 donde primero tuvo una disminución en las horas 12 y 24, pero aumento en las horas posteriores del estudio con un valor final de 0.131 % después de 72 h, apenas por debajo de la especificación para esta impureza que debe ser ≤ 0.15 %.

Más de 300 % fue el aumento del cloruro de bencilo en la prueba de calor seco, que paso de 0.035 % en el análisis inicial a 0.154 % después de 72 h; en la gráfica 32 se observa que durante las primeras 24 h el incremento fue lineal llegado a 0.134 %, sin embargo, para la hora 48 y 72 el incremento fue de apenas 0.02 %, el valor final de esta impureza supera considerablemente la especificación que debe ser ≤ 0.05 %.

El calor seco fue la única condición de estrés donde el ácido benzoico paso de 0.099 % a 0.483 % con un comportamiento lineal cuya $r^2=0.95$ tras 72 h de estudio (gráfica 33); el incremento tiene bastante lógica considerando que es *per se* una impureza del alcohol bencílico y benzaldehído, los cuales también aumentaron considerablemente respecto al valor inicial.

El tolueno se mantuvo igual que en la cuantificación inicial con 0%, gráfica 34.

La impureza desconocida 2 duplico su valor de 0.023 % a 0.054 % después de 72 h, la gráfica 35 muestra que su comportamiento con una $r^2 = 0.87$; caso contrario sucedió con la impureza desconocida 3 que desde la hora 12 disminuyo su valor a 0 % como se observa en la gráfica 36.

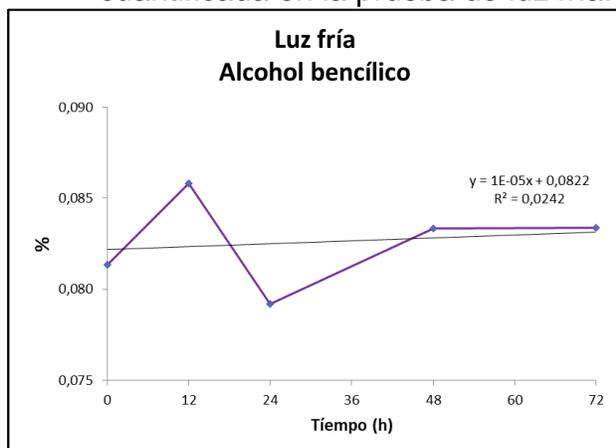
4.5.5 Luz fría

En la tabla 15 se incluyen los valores puntuales (%) de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de cloruro de benzalconio en solución al 50 %, obtenidas en la prueba de luz fría para cada tiempo de análisis.

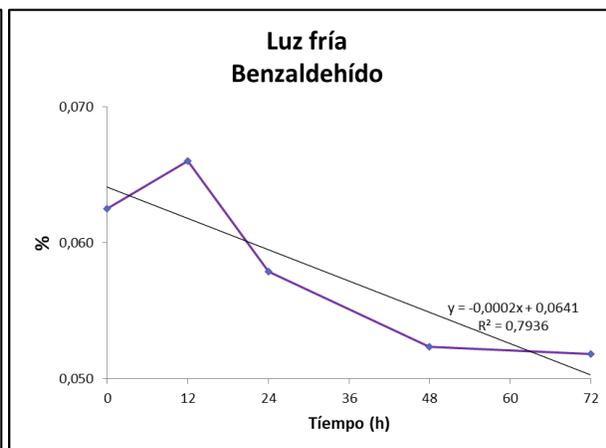
Condición	TIEMPO (h)					D _i				
	Luz fría					Luz fría				
	0	12	24	48	72	0	12	24	48	72
%Alcohol bencílico	0,081	0,086	0,079	0,083	0,083	N/A	5,49	2,67	2,41	2,47
%Benzaldehído	0,063	0,066	0,058	0,052	0,052	N/A	5,66	7,40	16,26	17,10
%Cloruro de bencilo	0,035	0,025	0,000	0,000	0,000	N/A	28,17	100,00	100,00	100,00
%Ácido benzoico	0,099	0,099	0,089	0,095	0,094	N/A	0,48	10,04	3,78	4,94
%Tolueno	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	N/A	0,00	0,00	0,00	0,00
%Impureza desconocida 2	0,023	0,029	0,025	0,026	0,025	N/A	23,32	5,76	10,04	5,74
%Impureza desconocida 3	0,023	0,022	0,017	0,015	0,000	N/A	4,29	22,51	31,52	100,00

Tabla 15: Porcentaje de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de degradación forzada para la prueba de luz fría en cada tiempo de análisis

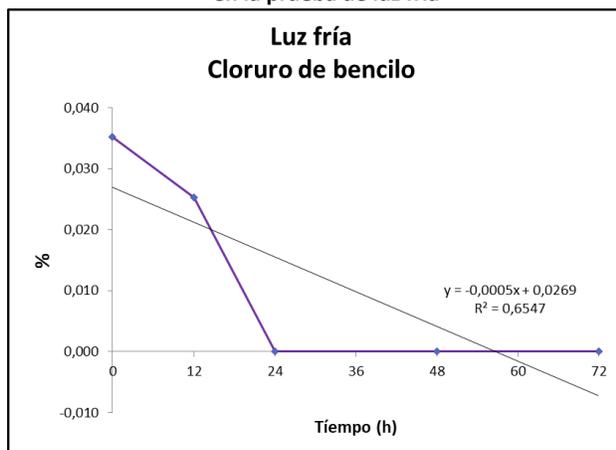
A continuación, se incluyen las gráficas representativas para cada impureza cuantificada en la prueba de luz fría:



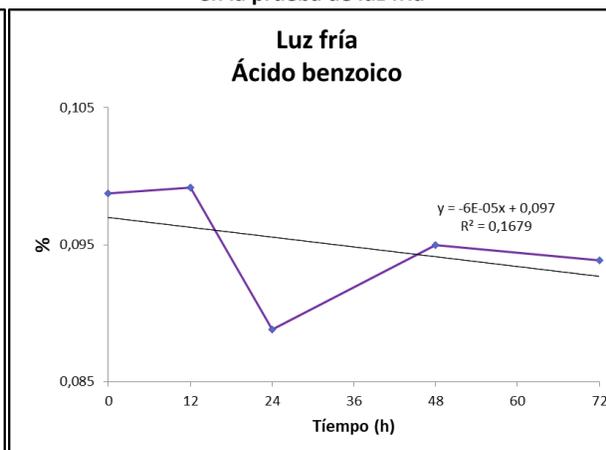
Gráfica 37: % Alcohol bencílico vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría



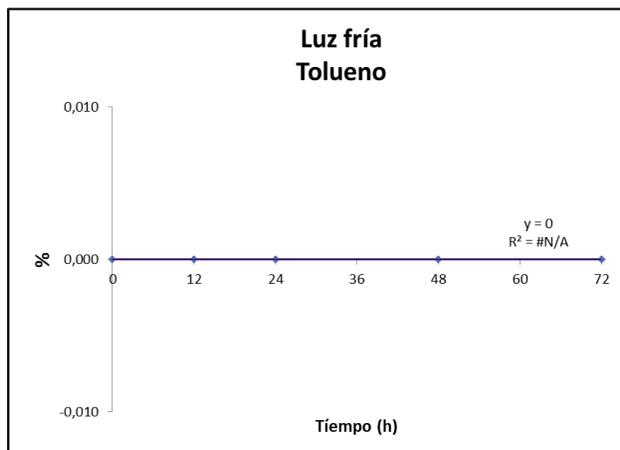
Gráfica 38: % Benzaldehído vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría



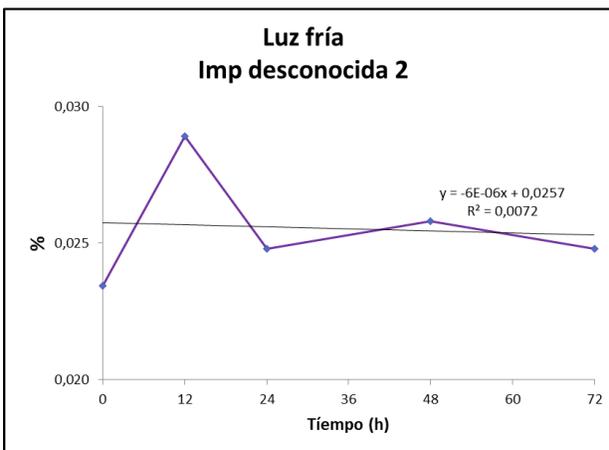
Gráfica 39: % Cloruro de bencilo vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría



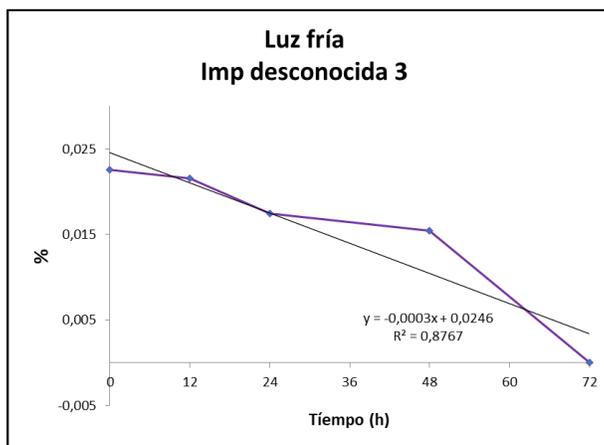
Gráfica 40: % Ácido benzoico vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría



Gráfica 41: % Tolueno vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría



Gráfica 42: % Imp. desconocida 2 vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría



Gráfica 43: % Imp. desconocida 3 vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría

El alcohol bencílico aumento 0.005 % pasadas 12 h, después disminuyo a 0.079% y se mantuvo constante después de la hora 48 en 0.083 %, gráfica 37.

El benzaldehído, por otra parte, tuvo un incremento de 0.003 % en la hora 12 pero a partir de la hora 48 disminuyó gradualmente para dar un valor final de 0.052 % tras 72 h de estudio, gráfica 38.

El cloruro de bencilo, después de 24 h, bajo hasta 0 %, gráfica 39.

El ácido benzoico, tolueno y la impureza desconocida 2, como lo muestran las gráficas 40, 41 y 42 respectivamente, no presentaron cambios significativos durante las 72 h de estudio. Caso contrario a la impureza desconocida 2 que disminuyo gradualmente de un valor inicial de 0.023% hasta 0.0% después de 72 h, gráfica 43.

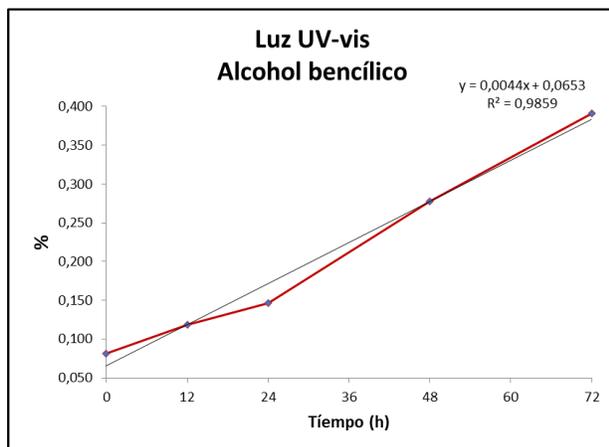
4.5.6 Luz UV-vis

En la tabla 16 se incluyen los valores puntuales (%) de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de cloruro de benzalconio en solución al 50 %, obtenidas en la prueba de luz UV-vis para cada tiempo de análisis.

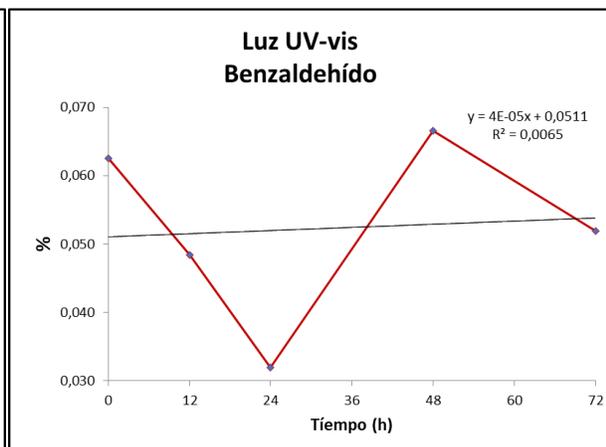
Condición	TIEMPO (h)					$ D_i $				
	Luz UV-vis					Luz UV-vis				
	0	12	24	48	72	0	12	24	48	72
%Alcohol bencílico	0,081	0,119	0,147	0,277	0,391	N/A	45,93	80,16	240,84	381,03
%Benzaldehído	0,063	0,048	0,032	0,067	0,052	N/A	22,67	49,01	6,55	17,02
%Cloruro de bencilo	0,035	0,050	0,057	0,111	0,120	N/A	40,94	62,69	216,64	242,07
%Ácido benzoico	0,099	0,099	0,097	0,091	0,086	N/A	0,06	1,54	7,97	12,77
%Tolueno	0,000	0,095	0,126	0,304	0,324	N/A	N/A	32,22	219,97	240,24
%Impureza desconocida 2	0,023	0,028	0,028	0,027	0,028	N/A	19,19	17,99	16,36	18,59
%Impureza desconocida 3	0,023	0,025	0,025	0,026	0,028	N/A	12,35	12,49	14,90	25,45

Tabla 16: Porcentaje de las principales impurezas cuantificadas en las muestras de degradación forzada para la prueba de luz UV-vis en cada tiempo de análisis

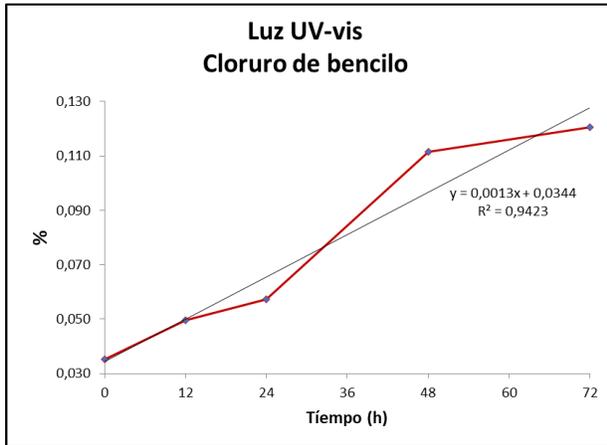
A continuación, se incluyen las gráficas representativas para cada impureza cuantificada en la prueba de luz UV-vis:



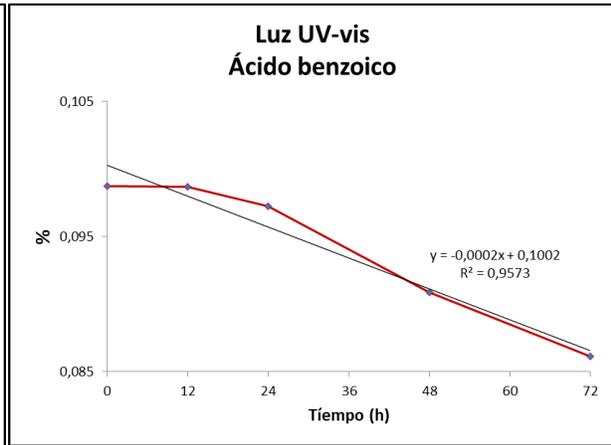
Gráfica 44: % Alcohol bencílico vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis



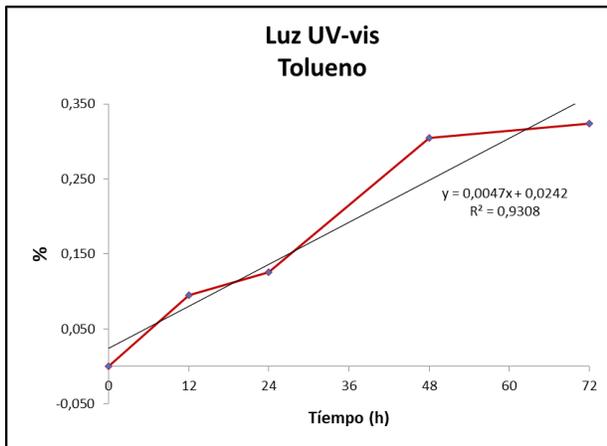
Gráfica 45: % Benzaldehído vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis



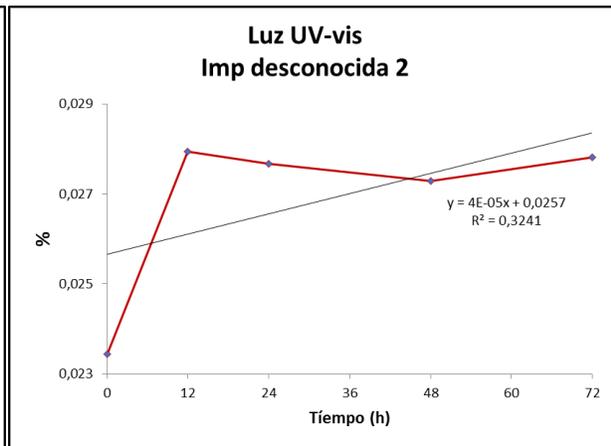
Gráfica 46: % Cloruro de bencilo vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis



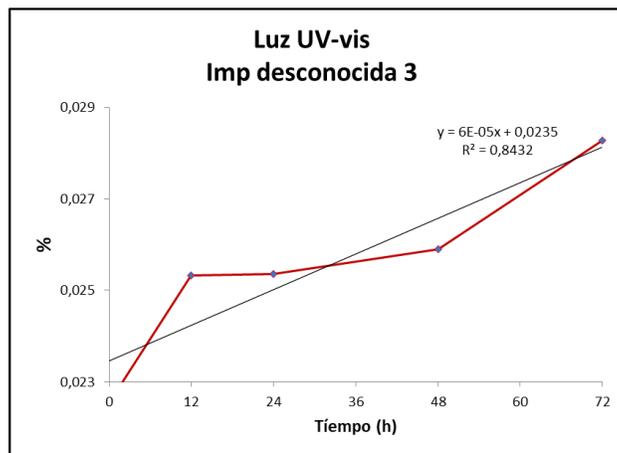
Gráfica 47: % Ácido benzoico vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis



Gráfica 48: % Tolueno vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis



Gráfica 49: % Imp. desconocida 2 vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis



Gráfica 50: % Imp. Desconocida 3 vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis

En la prueba de exposición a la lámpara de luz UV-vis, el incremento de alcohol bencílico casi fue de 400 % aumentando de 0.081 % a 0.391 %, aunque el incremento fue bastante, el valor está dentro de la especificación de ≤ 0.5 %.; la gráfica 44 muestra que su comportamiento fue lineal con una $r^2=0.99$.

El benzaldehído tuvo un comportamiento cambiante como podemos ver en la gráfica 45, pues en las horas 12 y 24 su tendencia era a disminuir del 0.063 % inicial pero pasadas 48 h incremento a 0.067 % y en la hora 72 h bajo a 0.052 %, 0.011 % menos que el valor inicial.

El cloruro de bencilo también incremento con la luz UV-vis de 0.035 % a 0.12 %, superando el valor permitido para esta impureza que debe ser ≤ 0.05 %, la gráfica 46 nos muestra su comportamiento con una $r^2= 0.94$.

El ácido benzoico comenzó a disminuir gradualmente a partir de las 12 h de 0.099 % a 0.086 % al final de la prueba, la gráfica 47 nos muestra que el comportamiento tiene una $r^2=0.97$.

La luz UV-vis fue la única condición de estrés donde el tolueno tuvo un incremento de 0 % en el análisis inicial hasta 0.324 % y su comportamiento, de acuerdo con la gráfica 48, fue lineal con una $r^2=0.93$.

Las impurezas desconocidas 2 y 3 tuvieron un comportamiento similar al incrementar de 0.023 % a 0.028 %, sin embargo, la impureza desconocida 2 incremento desde la hora 12 a 0.028 % según muestra la gráfica 49 mientras que la impureza desconocida 3 fue de manera gradual, como se observa en la gráfica 50.

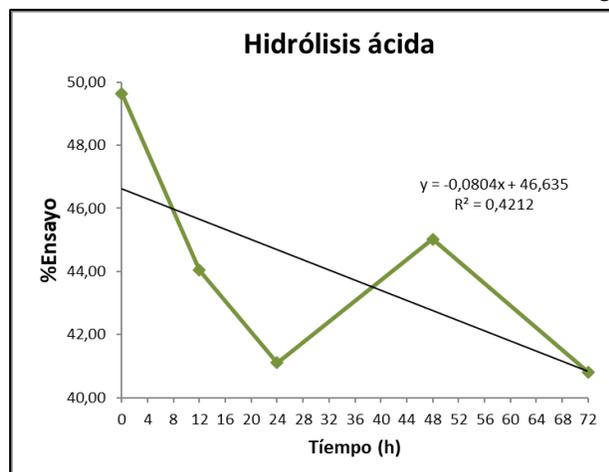
4.6 Método analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50%

La tabla 17 resume los porcentajes de ensayo obtenidos con el método analítico 4 en cada tiempo de análisis de las muestras de cloruro de benzalconio en solución al 50 %, de acuerdo con cada condición de estrés.

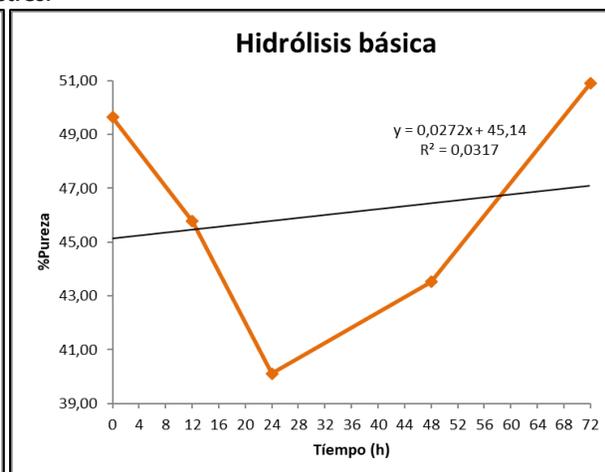
Estos valores representan el contenido de Cloruro de Benzalconio en la solución, que teóricamente tiene un 50 % de activo; sin embargo, como podemos observar en las gráficas, para cada condición de estrés el comportamiento en la degradación del API es diferente.

Condición	TIEMPO (h)					TIEMPO (h)				
	0	12	24	48	72	0	12	24	48	72
	% Ensayo	% Ensayo	% Ensayo	% Ensayo	% Ensayo	$ D_i $	$ D_i $	$ D_i $	$ D_i $	$ D_i $
Hidrólisis ácida	49,64	44,04	41,11	45,03	40,81	N/A	11,29	17,18	9,29	17,79
Hidrólisis básica	49,64	45,78	40,12	43,52	50,89	N/A	7,78	19,18	12,33	2,52
Calor seco	49,64	45,67	45,84	41,16	41,48	N/A	7,99	7,66	17,08	16,44
Oxidación	49,64	68,01	68,51	66,19	76,54	N/A	37,00	38,01	33,34	54,19
Luz fría	49,64	72,57	84,98	93,32	93,94	N/A	46,19	71,19	87,99	89,24
Luz UV-vis	49,64	36,83	36,44	49,18	41,95	N/A	25,81	26,59	0,93	15,49

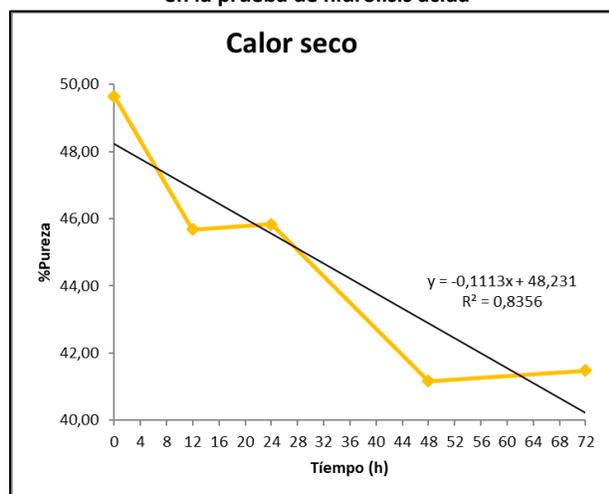
Tabla 17: % ensayo de las muestras de degradación forzada en los diferentes tiempos de análisis para cada condición de estrés.



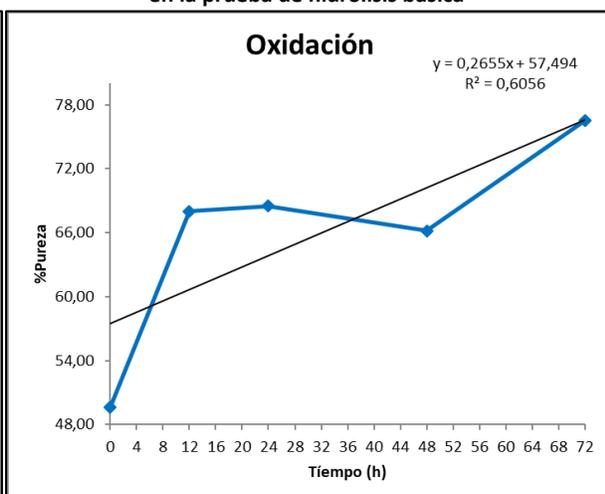
Gráfica 51: % Ensayo vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis ácida



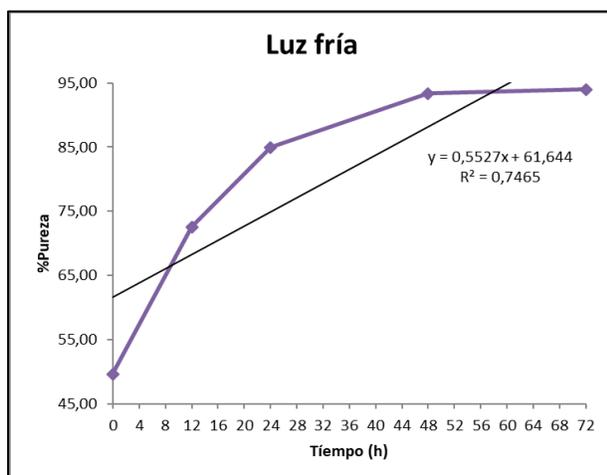
Gráfica 52: % Ensayo vs tiempo de muestreo en la prueba de hidrólisis básica



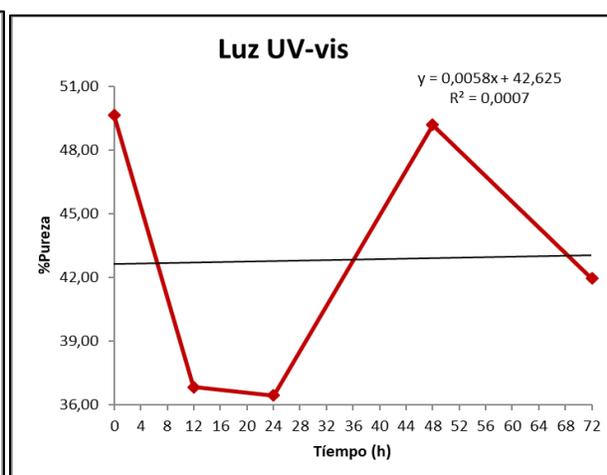
Gráfica 53: % Ensayo vs tiempo de muestreo en la prueba de calor seco



Gráfica 54: % Ensayo vs tiempo de muestreo en la prueba de oxidación



Gráfica 55: % Ensayo vs tiempo de muestreo en la prueba de luz fría



Gráfica 56: % Ensayo vs tiempo de muestreo en la prueba de luz UV-vis

En el caso de la hidrólisis ácida la tendencia fue una baja en el contenido de cloruro de benzalconio pasadas 24 h con un 41.11 % pero en la hora 48 aumento el porcentaje a 45.03% para disminuir nuevamente en la hora 72 a 40.81 %, según podemos ver en la gráfica 51, dejándolo por debajo de los valores permitidos en la especificación de 49-52.5 % de ensayo.

El comportamiento de la hidrólisis básica fue similar como muestra la gráfica 52, pues pasadas 24 h de estudio el porcentaje había disminuido hasta 40.12 %, sin embargo, en la hora 48 aumento a 43.52 % hasta un 50.89 % después de 72 h, superando incluso el valor inicial.

El calor seco también tuvo tendencia a disminuir gradualmente el porcentaje de ensayo de un 49.64 % como valor inicial hasta 41.16 % después de 72 h, siendo el comportamiento que más se ajusta al modelo lineal con una $r^2=0.84$, según la gráfica 53; este agente estresante generó, al igual que la luz fría, cambios en la solución de cloruro de benzalconio volviéndola un semisólido con el paso del tiempo pero contrario a lo que sucedió con la luz fría, el calor seco si bajo la concentración de API saliendo de la especificación que es de 49-52.5 %.

Al ser una determinación volumétrica con una matriz analítica compleja, la cantidad de muestra es un factor importante así como el agente estresante utilizado pues puede presentarse una interferencia analítica; ejemplo de esta situación fue la prueba de oxidación donde, el peróxido de hidrógeno al ser un agente oxidante, también reacciona con el yodato de potasio utilizado durante la prueba, incrementando la respuesta con lo que el contenido total de cloruro de benzalconio se ve aumentado como se muestra en la gráfica 54 hasta un 76 %; cabe destacar que se realizó la determinación del control negativo para esta condición, sin embargo, los resultados fueron muy variables por lo que para el caso específico de la prueba de oxidación esta determinación no se considera concluyente.

Las muestras de exposición a la luz fría presentaron importantes cambios fisicoquímicos, anteriormente descritos, estos impactaron en la cuantificación del contenido total de cloruro de benzalconio que se vio aumentado respecto al tiempo, este comportamiento se puede apreciar de mejor manera en la gráfica 55, debido a que la muestra perdió humedad, es decir, se concentró al convertirse en un semisólido llegando a un 93.94 %, saliendo de la especificación al igual que en la prueba de hidrólisis ácida y exposición al calor seco.

La gráfica 56 muestra el comportamiento de las muestras expuestas a la luz UV-vis donde podemos ver que pasadas las primeras 24 h el valor era de 36.44% una notable disminución respecto al valor inicial, pero en la hora 48 este valor aumento hasta 49.18 % para bajar a 41.95 % después de 72 h, dejándolo también fuera de la especificación de 49-52%.

4.7 Método analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

La prueba de límite de aminas y sales de amina, como su nombre lo dice, es una prueba límite en la que no se cuantifico puntualmente el contenido de estas impurezas; sin embargo, se estableció como criterio de aceptación que la diferencia de volumen entre los puntos de inflexión 2 y 1, no debe ser mayor a 5 mL, para ello se construyeron las curvas de pH vs volumen de la solución valorante, 1ª derivada vs volumen y 2ª derivada vs volumen, obteniendo así la diferencia de volumen entre los puntos de inflexión.

Las muestras provenientes de la hidrólisis ácida y básica, esta prueba no se llevó a cabo, ya que los valores iniciales de pH fueron de 1.0 y 13.5 respectivamente por lo que, al ser el agente titulante (hidróxido de tetrabutilamonio 0.1 M) una base, la titulación no se llevaría a cabo en un medio fuertemente alcalino y la molaridad usada no permitiría neutralizar completamente, en el volumen indicado en la metodología, el medio fuertemente ácido de la hidrólisis ácida.

La condición de oxidación tuvo un comportamiento muy parecido al de la curva de titulación obtenida en el análisis inicial, como se ve en la gráfica 59, siendo la diferencia de volumen entre los puntos de inflexión menor 5 mL tal como se establece en la especificación de la prueba por lo que el contenido de aminas y sales de amina es < 0.1 mmol/g.

En la exposición al calor seco a partir de la hora 48 la diferencia de volumen entre los puntos de inflexión fue ligeramente mayor a la especificación (5.35 mL) mientras que pasadas 72 h la curva de titulación solo presento un punto de inflexión tal como se muestra en la gráfica 62, superando así el contenido de aminas y sales de amina de 0.1 mmol/g.

La prueba de exposición a la luz fría no tuvo grandes cambios respecto al comportamiento del análisis inicial; según la gráfica 65 se puede observar que los puntos de inflexión en los diferentes tiempos de análisis coincidieron en su mayoría a excepción de la hora 24 que se desplazó hacia el lado izquierdo de la gráfica, por lo que el contenido también es < 0.1 mmol/g.

La lámpara de luz UV-vis también generó aumento en el contenido de amina y sales de amina pues pasadas 24 h la diferencia de volumen entre ambos puntos de inflexión estaba apenas por debajo del límite (4.5 mL) y a partir de las horas 48 h, la titulación presentó solo un punto de inflexión según vemos en la gráfica 68, con lo que se supera el 0.1 mmol/g.

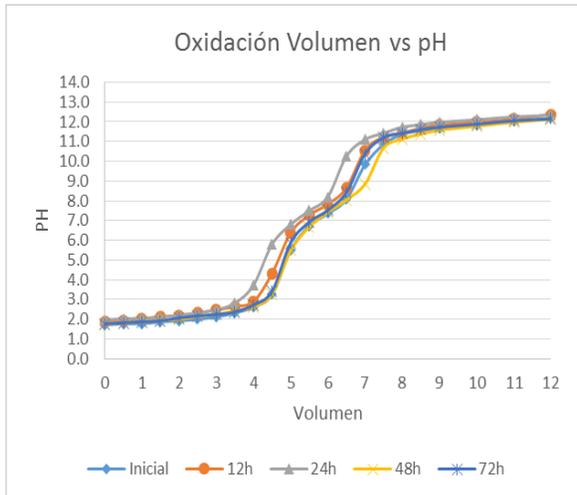
4.7.1 Oxidación

Como se mencionó anteriormente, para la prueba de aminas y sales de amina, fue necesario concentrar en esta tabla los volúmenes gastados de solución titulante y valores de pH en cada tiempo de análisis, para obtener la 1ª y 2ª derivada.

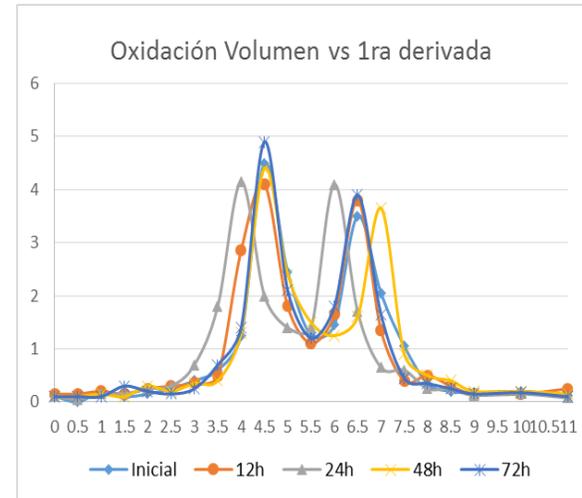
PROMEDIO																			
Inicial				12h				24h				48h				72h			
tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da
0	1.7	0.1	-0.2	0	1.9	0.2	0.0	0	2.0	0.1	-0.1	0	1.8	0.1	0.0	0	1.8	0.1	0.0
0.5	1.8	0.0	0.4	0.5	2.0	0.2	0.1	0.5	2.0	0.0	0.2	0.5	1.8	0.1	0.1	0.5	1.8	0.1	0.0
1	1.8	0.2	-0.2	1	2.0	0.2	-0.1	1	2.1	0.2	0.0	1	1.9	0.2	-0.1	1	1.9	0.1	0.4
1.5	1.9	0.1	0.1	1.5	2.1	0.2	0.2	1.5	2.1	0.2	0.2	1.5	2.0	0.1	0.4	1.5	1.9	0.3	-0.2
2	1.9	0.2	0.2	2	2.2	0.3	0.1	2	2.2	0.3	0.1	2	2.0	0.3	-0.2	2	2.1	0.2	-0.1
2.5	2.0	0.3	0.3	2.5	2.3	0.3	0.1	2.5	2.3	0.3	0.8	2.5	2.2	0.2	0.3	2.5	2.2	0.2	0.2
3	2.1	0.4	0.4	3	2.5	0.4	0.3	3	2.5	0.7	2.2	3	2.3	0.4	0.1	3	2.3	0.3	0.9
3.5	2.3	0.6	1.3	3.5	2.7	0.5	4.7	3.5	2.8	1.8	4.7	3.5	2.4	0.4	1.8	3.5	2.4	0.7	1.4
4	2.6	1.3	6.5	4	2.9	2.9	2.5	4	3.7	4.2	-4.3	4	2.6	1.3	6.2	4	2.7	1.4	7.0
4.5	3.3	4.5	-4.1	4.5	4.3	4.1	-4.6	4.5	5.8	2.0	-1.2	4.5	3.3	4.4	-4.0	4.5	3.4	4.9	-5.6
5	5.5	2.5	-2.4	5	6.4	1.8	-1.4	5	6.8	1.4	0.0	5	5.5	2.4	-1.8	5	5.9	2.1	-1.8
5.5	6.7	1.3	0.4	5.5	7.3	1.1	1.1	5.5	7.5	1.4	5.4	5.5	6.7	1.5	-0.5	5.5	6.9	1.2	1.2
6	7.4	1.5	4.1	6	7.8	1.7	4.3	6	8.2	4.1	-4.8	6	7.4	1.3	0.7	6	7.5	1.8	4.2
6.5	8.1	3.5	-2.9	6.5	8.7	3.8	-4.9	6.5	10.3	1.7	-2.1	6.5	8.1	1.6	4.1	6.5	8.4	3.9	-4.5
7	9.8	2.1	-2.0	7	10.6	1.4	-1.9	7	11.1	0.6	-0.1	7	8.9	3.7	-5.5	7	10.4	1.7	-2.4
7.5	10.9	1.1	-1.4	7.5	11.2	0.4	0.2	7.5	11.4	0.6	-0.7	7.5	10.7	0.9	-0.8	7.5	11.2	0.5	-0.2
8	11.4	0.4	-0.3	8	11.4	0.5	-0.4	8	11.7	0.3	0.0	8	11.1	0.5	-0.2	8	11.4	0.3	-0.2
8.5	11.6	0.2	-0.1	8.5	11.7	0.3	-0.3	8.5	11.9	0.3	-0.3	8.5	11.4	0.4	-0.4	8.5	11.6	0.3	-0.2
9	11.7	0.2	0.0	9	11.8	0.2	0.0	9	12.0	0.1	0.0	9	11.6	0.2	0.0	9	11.7	0.2	0.0
10	11.8	0.2	-0.1	10	12.0	0.2	0.1	10	12.1	0.2	-0.1	10	11.8	0.2	0.0	10	11.9	0.2	-0.1
11	12.0	0.1	N/A	11	12.1	0.3	N/A	11	12.3	0.1	N/A	11	12.0	0.2	N/A	11	12.1	0.1	N/A
12	12.2	N/A	N/A	12	12.4	N/A	N/A	12	12.3	N/A	N/A	12	12.1	N/A	N/A	12	12.2	N/A	N/A

Tabla 18: Volumen de hidróxido de tetrabutilamonio gastado, valor de pH, 1ª y 2ª derivada, para cada tiempo de análisis en la prueba de oxidación.

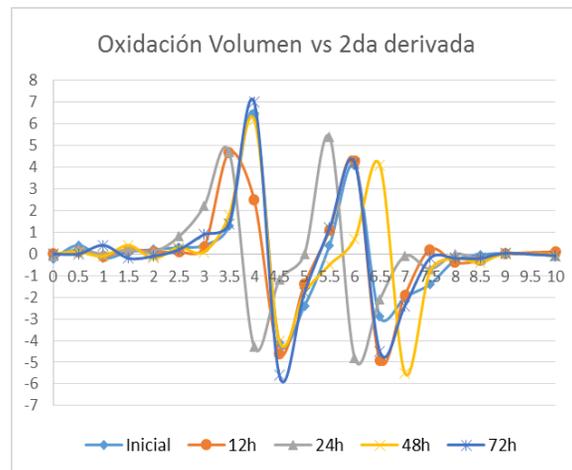
Posteriormente se construyeron las gráficas, mostradas a continuación, con el fin de obtener la diferencia de volumen entre los puntos de inflexión 2 y 1, y así establecer si las muestras excedían el límite de contenido de aminas y sales de amina, o seguían dentro del valor normal.



Gráfica 57: pH vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de oxidación.



Gráfica 58: 1ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de oxidación.



Gráfica 59: 2ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de oxidación.

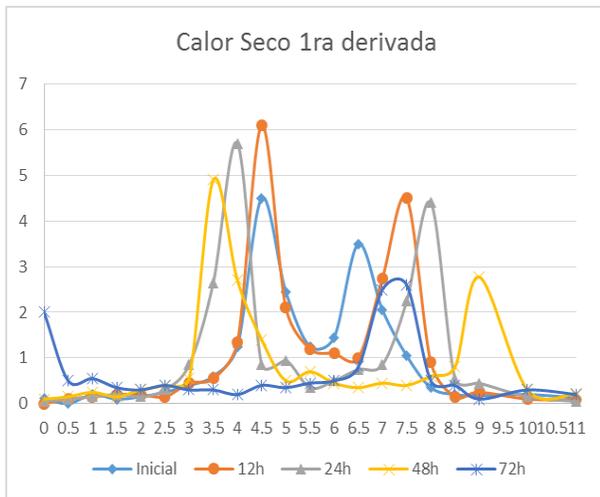
4.7.2 Calor seco

Al igual que en la oxidación fue necesario concentrar en esta tabla, para la prueba de calor seco, los volúmenes gastados de solución titulante y valores de pH en cada tiempo de análisis, para obtener la 1ª y 2ª derivada.

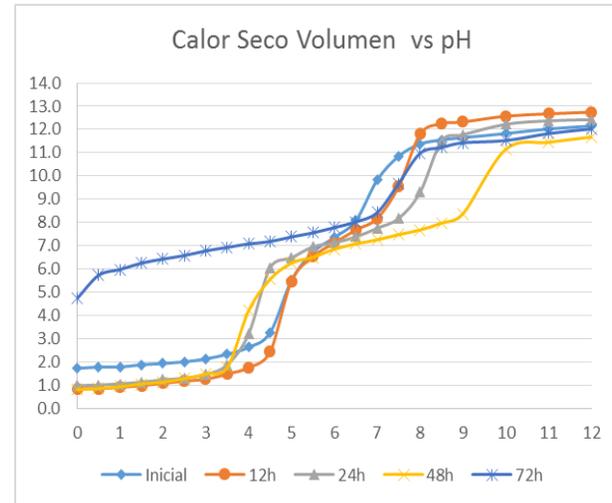
PROMEDIO																			
Inicial				12h				24h				48h				72h			
tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da
0	1.7	0.1	-0.2	0	0.9	0.0	0.2	0	1.0	0.1	0.1	0	0.8	0.1	0.1	0	4.7	2.0	-3.0
0.5	1.8	0.0	0.4	0.5	0.9	0.1	0.1	0.5	1.0	0.1	0.1	0.5	0.9	0.2	0.2	0.5	5.7	0.5	0.1
1	1.8	0.2	-0.2	1	0.9	0.2	0.1	1	1.1	0.2	0.1	1	0.9	0.3	-0.2	1	6.0	0.6	-0.4
1.5	1.9	0.1	0.1	1.5	1.0	0.2	0.0	1.5	1.1	0.2	-0.1	1.5	1.1	0.2	0.3	1.5	6.3	0.4	-0.1
2	1.9	0.2	0.2	2	1.1	0.2	-0.1	2	1.2	0.2	0.3	2	1.1	0.3	0.2	2	6.4	0.3	0.2
2.5	2.0	0.3	0.3	2.5	1.2	0.2	0.6	2.5	1.3	0.3	1.1	2.5	1.3	0.4	0.3	2.5	6.6	0.4	-0.2
3	2.1	0.4	0.4	3	1.3	0.5	0.2	3	1.5	0.9	3.6	3	1.5	0.6	8.7	3	6.8	0.3	0.0
3.5	2.3	0.6	1.3	3.5	1.5	0.6	1.6	3.5	1.9	2.7	6.1	3.5	1.8	4.9	-4.4	3.5	6.9	0.3	-0.2
4	2.6	1.3	6.5	4	1.8	1.4	9.5	4	3.2	5.7	-9.7	4	4.2	2.7	-2.6	4	7.1	0.2	0.4
4.5	3.3	4.5	-4.1	4.5	2.4	6.1	-8.0	4.5	6.1	0.9	0.2	4.5	5.6	1.4	-1.8	4.5	7.2	0.4	-0.1
5	5.5	2.5	-2.4	5	5.5	2.1	-1.8	5	6.5	1.0	-1.2	5	6.3	0.5	0.4	5	7.4	0.4	0.2
5.5	6.7	1.3	0.4	5.5	6.5	1.2	-0.2	5.5	7.0	0.4	0.3	5.5	6.5	0.7	-0.5	5.5	7.6	0.5	0.1
6	7.4	1.5	4.1	6	7.1	1.1	-0.2	6	7.1	0.5	0.5	6	6.9	0.4	-0.2	6	7.8	0.5	0.6
6.5	8.1	3.5	-2.9	6.5	7.7	1.0	3.5	6.5	7.4	0.8	0.2	6.5	7.1	0.4	0.2	6.5	8.0	0.8	3.4
7	9.8	2.1	-2.0	7	8.2	2.8	3.5	7	7.8	0.9	2.8	7	7.3	0.4	-0.1	7	8.4	2.5	0.2
7.5	10.9	1.1	-1.4	7.5	9.6	4.5	-7.2	7.5	8.2	2.3	4.3	7.5	7.5	0.4	0.4	7.5	9.7	2.6	-4.2
8	11.4	0.4	-0.3	8	11.8	0.9	-1.5	8	9.3	4.4	-7.7	8	7.7	0.6	0.4	8	11.0	0.5	-0.2
8.5	11.6	0.2	-0.1	8.5	12.3	0.1	0.2	8.5	11.5	0.6	-0.2	8.5	8.0	0.8	4.0	8.5	11.2	0.4	-0.6
9	11.7	0.2	0.0	9	12.3	0.3	-0.1	9	11.8	0.4	-0.3	9	8.4	2.8	-2.5	9	11.4	0.1	0.2
10	11.8	0.2	-0.1	10	12.6	0.1	0.0	10	12.2	0.2	-0.1	10	11.2	0.3	-0.1	10	11.5	0.3	-0.1
11	12.0	0.1	N/A	11	12.7	0.1	N/A	11	12.4	0.1	N/A	11	11.5	0.2	N/A	11	11.8	0.2	N/A
12	12.2	N/A	N/A	12	12.8	N/A	N/A	12	12.4	N/A	N/A	12	11.7	N/A	N/A	12	12.0	N/A	N/A

Tabla 19: Volumen de hidróxido de tetrabutilamonio gastado, valor de pH, 1ª y 2ª derivada, para cada tiempo de análisis en la prueba de calor seco.

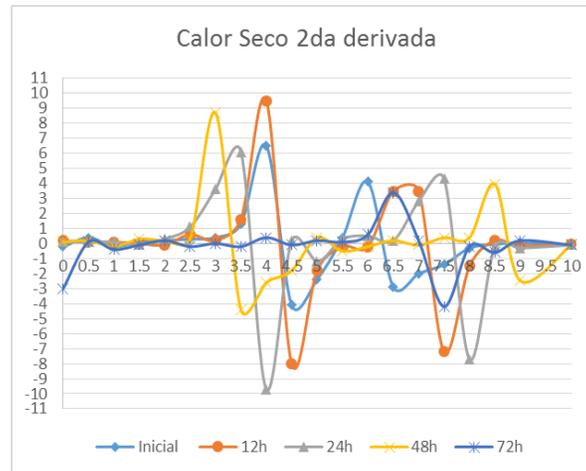
Posteriormente se construyeron las gráficas, mostradas a continuación, con el fin de obtener la diferencia de volumen entre los puntos de inflexión 2 y 1, y así establecer si las muestras excedían el límite de contenido de aminas y sales de amina, o seguían dentro del valor normal.



Gráfica 60: pH vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de calor seco.



Gráfica 61: 1ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de calor seco.



Gráfica 62: 2ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de calor seco.

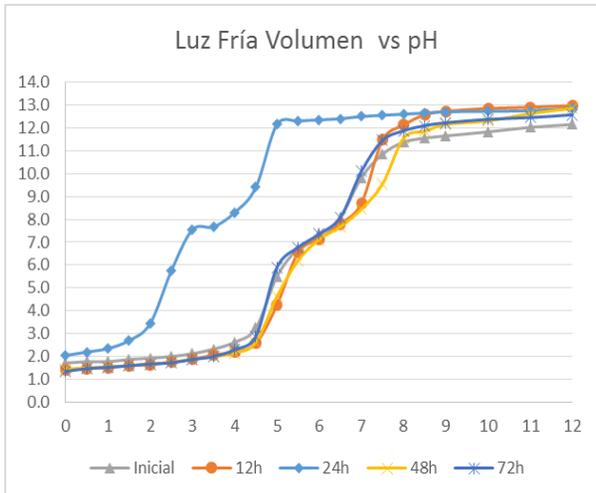
4.7.3 Luz fría

Para la prueba de aminas y sales de amina, fue necesario concentrar en esta tabla los volúmenes gastados de solución titulante y valores de pH en cada tiempo de análisis, para obtener la 1ª y 2ª derivada.

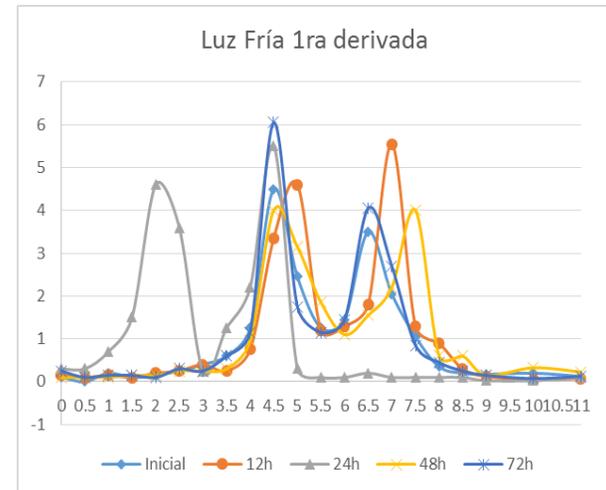
PROMEDIO																			
Inicial				12h				24h				48h				72h			
tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da
0	1.7	0.1	-0.2	0	1.4	0.2	-0.1	0	2.1	0.3	0.0	0	1.5	0.1	0.0	0	1.4	0.3	-0.3
0.5	1.8	0.0	0.4	0.5	1.5	0.1	0.1	0.5	2.2	0.3	0.8	0.5	1.5	0.1	0.0	0.5	1.5	0.1	0.1
1	1.8	0.2	-0.2	1	1.5	0.2	-0.1	1	2.4	0.7	1.6	1	1.6	0.1	0.1	1	1.5	0.2	0.0
1.5	1.9	0.1	0.1	1.5	1.6	0.1	0.2	1.5	2.7	1.5	6.2	1.5	1.6	0.2	0.0	1.5	1.6	0.1	-0.1
2	1.9	0.2	0.2	2	1.7	0.2	0.1	2	3.5	4.6	-2.0	2	1.7	0.2	0.2	2	1.7	0.1	0.4
2.5	2.0	0.3	0.3	2.5	1.8	0.3	0.3	2.5	5.8	3.6	-6.7	2.5	1.8	0.3	0.0	2.5	1.7	0.3	-0.1
3	2.1	0.4	0.4	3	1.9	0.4	-0.3	3	7.6	0.2	2.0	3	1.9	0.3	0.1	3	1.9	0.3	0.7
3.5	2.3	0.6	1.3	3.5	2.1	0.3	1.0	3.5	7.7	1.3	1.9	3.5	2.0	0.3	1.3	3.5	2.0	0.6	1.1
4	2.6	1.3	6.5	4	2.2	0.8	5.2	4	8.3	2.2	6.6	4	2.2	0.9	6.1	4	2.3	1.2	9.8
4.5	3.3	4.5	-4.1	4.5	2.6	3.4	2.5	4.5	9.4	5.5	-10.4	4.5	2.6	4.0	-1.7	4.5	2.9	6.1	-8.6
5	5.5	2.5	-2.4	5	4.3	4.6	-6.8	5	12.2	0.3	-0.4	5	4.6	3.2	-2.6	5	5.9	1.8	-1.2
5.5	6.7	1.3	0.4	5.5	6.6	1.2	0.2	5.5	12.3	0.1	0.0	5.5	6.2	1.9	-1.5	5.5	6.8	1.2	0.6
6	7.4	1.5	4.1	6	7.2	1.3	1.0	6	12.4	0.1	0.2	6	7.1	1.1	0.9	6	7.4	1.5	5.2
6.5	8.1	3.5	-2.9	6.5	7.8	1.8	7.5	6.5	12.4	0.2	-0.2	6.5	7.7	1.6	1.3	6.5	8.1	4.1	-2.7
7	9.8	2.1	-2.0	7	8.7	5.6	-8.5	7	12.5	0.1	0.0	7	8.5	2.2	3.6	7	10.1	2.7	-3.7
7.5	10.9	1.1	-1.4	7.5	11.5	1.3	-0.8	7.5	12.6	0.1	0.0	7.5	9.6	4.0	-6.8	7.5	11.5	0.9	-0.8
8	11.4	0.4	-0.3	8	12.1	0.9	-1.2	8	12.6	0.1	0.0	8	11.6	0.6	0.0	8	11.9	0.5	-0.4
8.5	11.6	0.2	-0.1	8.5	12.6	0.3	-0.4	8.5	12.7	0.1	-0.1	8.5	11.9	0.6	-0.9	8.5	12.1	0.2	-0.2
9	11.7	0.2	0.0	9	12.7	0.1	-0.1	9	12.7	0.0	0.0	9	12.2	0.2	0.2	9	12.2	0.2	-0.1
10	11.8	0.2	-0.1	10	12.9	0.1	0.0	10	12.7	0.0	0.1	10	12.3	0.3	-0.1	10	12.4	0.1	0.1
11	12.0	0.1	N/A	11	12.9	0.1	N/A	11	12.8	0.1	N/A	11	12.6	0.2	N/A	11	12.5	0.1	N/A
12	12.2	N/A	N/A	12	13.0	N/A	N/A	12	12.9	N/A	N/A	12	12.9	N/A	N/A	12	12.6	N/A	N/A

Tabla 20: Volumen de hidróxido de tetrabutilamonio gastado, valor de pH, 1ª y 2ª derivada, para cada tiempo de análisis en la prueba de luz fría.

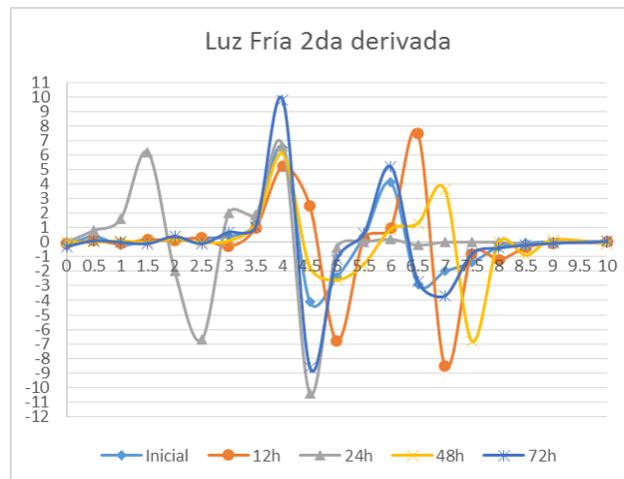
Posteriormente se construyeron las gráficas, mostradas a continuación, con el fin de obtener la diferencia de volumen entre los puntos de inflexión 2 y 1, y así establecer si las muestras excedían el límite de contenido de aminas y sales de amina, o seguían dentro del valor normal.



Gráfica 63: pH vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de luz fría.



Gráfica 64: 1ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de luz fría.



Gráfica 65: 2ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de luz fría.

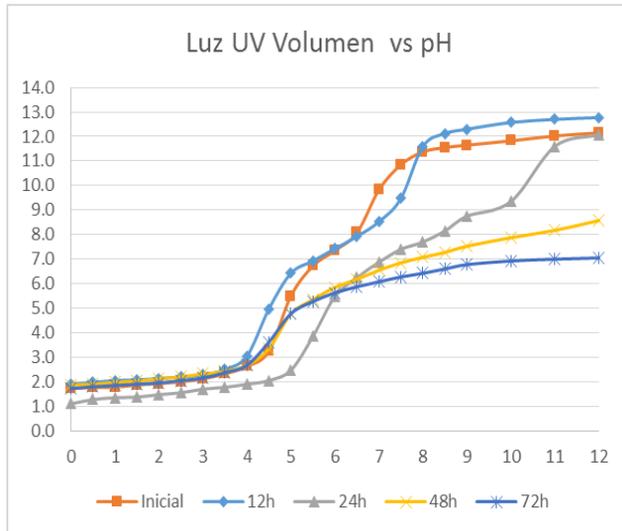
4.7.4 Luz UV-vis

Para la prueba de aminas y sales de amina, fue necesario concentrar en esta tabla los volúmenes gastados de solución titulante y valores de pH en cada tiempo de análisis, para obtener la 1ª y 2ª derivada.

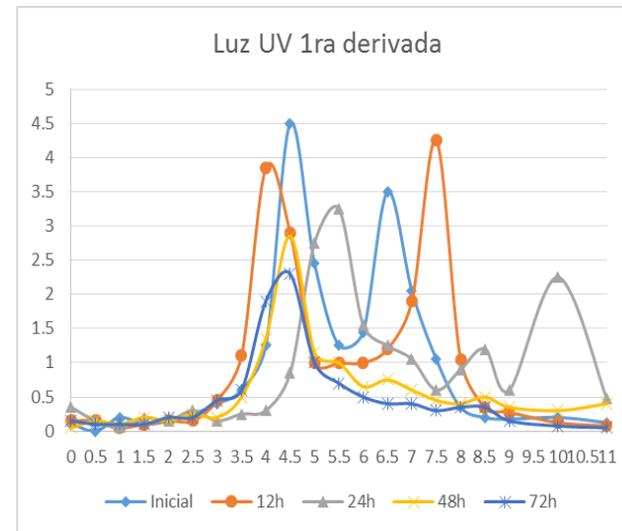
PROMEDIO																			
Inicial				12h				24h				48h				72h			
tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da	tBuAOH Volumen	pH	1ra	2da
0	1.7	0.1	-0.2	0	1.9	0.2	0.0	0	1.1	0.4	-0.4	0	1.9	0.0	0.2	0	1.7	0.2	-0.1
0.5	1.8	0.0	0.4	0.5	2.0	0.1	-0.2	0.5	1.3	0.2	-0.2	0.5	1.9	0.2	-0.1	0.5	1.8	0.1	0.0
1	1.8	0.2	-0.2	1	2.1	0.1	0.1	1	1.4	0.0	0.3	1	2.0	0.1	0.2	1	1.9	0.1	0.0
1.5	1.9	0.1	0.1	1.5	2.1	0.1	0.1	1.5	1.4	0.2	-0.1	1.5	2.0	0.2	-0.1	1.5	1.9	0.1	0.2
2	1.9	0.2	0.2	2	2.1	0.2	0.0	2	1.5	0.2	0.3	2	2.1	0.2	0.2	2	2.0	0.2	0.0
2.5	2.0	0.3	0.3	2.5	2.2	0.1	0.6	2.5	1.6	0.3	-0.3	2.5	2.2	0.3	-0.1	2.5	2.1	0.2	0.5
3	2.1	0.4	0.4	3	2.3	0.5	1.3	3	1.7	0.2	0.2	3	2.3	0.2	0.6	3	2.2	0.5	0.3
3.5	2.3	0.6	1.3	3.5	2.5	1.1	5.5	3.5	1.8	0.3	0.1	3.5	2.4	0.5	1.7	3.5	2.4	0.6	2.6
4	2.6	1.3	6.5	4	3.1	3.9	-1.9	4	1.9	0.3	1.1	4	2.7	1.4	3.0	4	2.7	1.9	0.8
4.5	3.3	4.5	-4.1	4.5	5.0	2.9	-3.8	4.5	2.1	0.9	3.8	4.5	3.4	2.9	-3.4	4.5	3.6	2.3	-2.6
5	5.5	2.5	-2.4	5	6.4	1.0	0.0	5	2.5	2.8	1.0	5	4.8	1.2	-0.3	5	4.8	1.0	-0.6
5.5	6.7	1.3	0.4	5.5	6.9	1.0	0.0	5.5	3.9	3.3	-3.4	5.5	5.4	1.0	-0.7	5.5	5.3	0.7	-0.4
6	7.4	1.5	4.1	6	7.4	1.0	0.4	6	5.5	1.6	-0.6	6	5.9	0.7	0.2	6	5.6	0.5	-0.2
6.5	8.1	3.5	-2.9	6.5	7.9	1.2	1.4	6.5	6.3	1.3	-0.4	6.5	6.2	0.7	-0.3	6.5	5.9	0.4	0.0
7	9.8	2.1	-2.0	7	8.5	1.9	4.7	7	6.9	1.1	-0.9	7	6.6	0.6	-0.3	7	6.1	0.4	-0.2
7.5	10.9	1.1	-1.4	7.5	9.5	4.3	-6.4	7.5	7.4	0.6	0.6	7.5	6.9	0.4	-0.1	7.5	6.3	0.3	0.1
8	11.4	0.4	-0.3	8	11.6	1.1	-1.4	8	7.7	0.9	0.6	8	7.1	0.4	0.2	8	6.4	0.3	0.0
8.5	11.6	0.2	-0.1	8.5	12.1	0.4	-0.2	8.5	8.2	1.2	-1.2	8.5	7.3	0.5	-0.3	8.5	6.6	0.4	-0.4
9	11.7	0.2	0.0	9	12.3	0.3	-0.1	9	8.8	0.6	1.7	9	7.5	0.4	0.0	9	6.8	0.2	-0.1
10	11.8	0.2	-0.1	10	12.6	0.1	-0.1	10	9.4	2.3	-1.8	10	7.9	0.3	0.1	10	6.9	0.1	0.0
11	12.0	0.1	N/A	11	12.7	0.1	N/A	11	11.6	0.5	N/A	11	8.2	0.4	N/A	11	7.0	0.0	N/A
12	12.2	N/A	N/A	12	12.8	N/A	N/A	12	12.1	N/A	N/A	12	8.6	N/A	N/A	12	7.1	N/A	N/A

Tabla 21: Volumen de hidróxido de tetrabutilamonio gastado, valor de pH, 1ª y 2ª derivada, para cada tiempo de análisis en la prueba de luz UV.

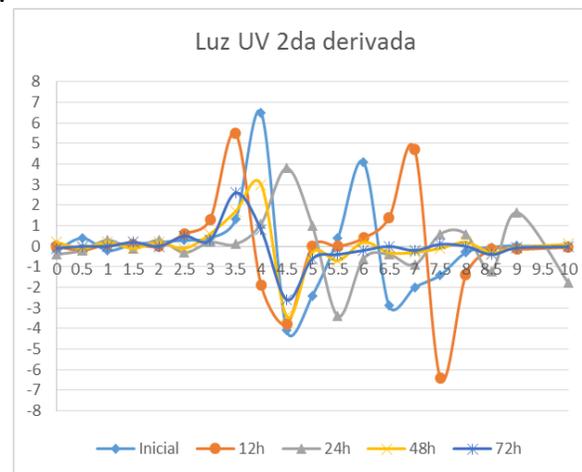
Posteriormente se construyeron las gráficas, mostradas a continuación, con el fin de obtener la diferencia de volumen entre los puntos de inflexión 2 y 1, y así establecer si las muestras excedían el límite de contenido de aminas y sales de amina, o seguían dentro del valor normal.



Gráfica 66: pH vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de luz UV.

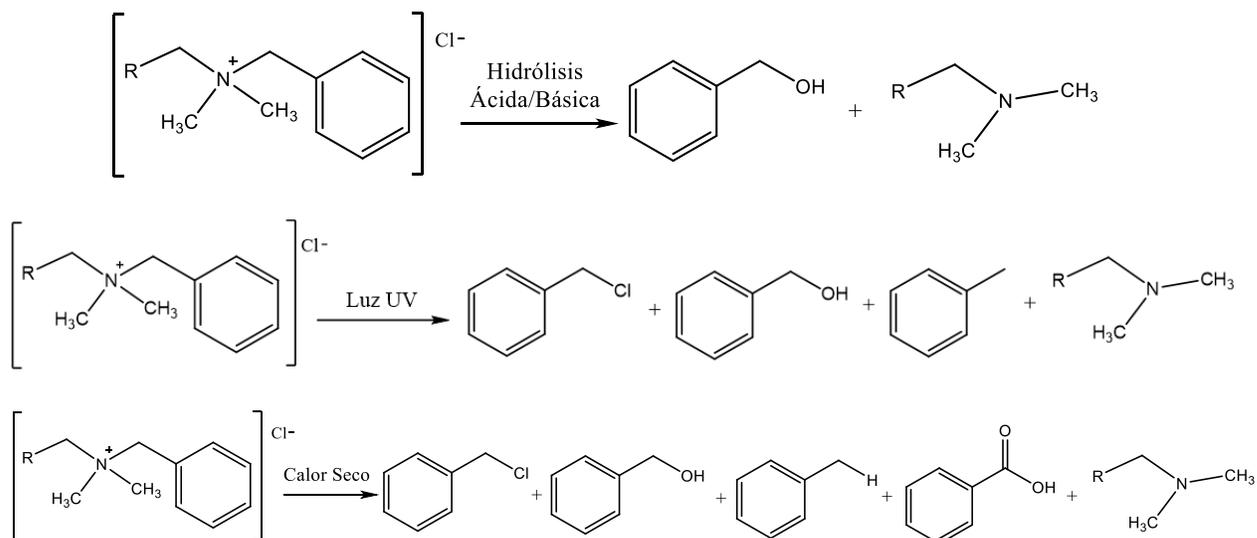


Gráfica 67: 1ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de luz UV.



Gráfica 68: 2ª derivada vs volumen del titulante (mL) en cada tiempo de muestreo, prueba de luz UV.

Después de realizar el estudio de degradación forzada del cloruro de benzalconio en solución al 50 %, se proponen las siguientes rutas de degradación de acuerdo con los resultados obtenidos en cada una de las pruebas:



Es importante destacar que el factor común entre las rutas es la ruptura de la molécula en el nitrógeno cuaternario, siendo este el punto más propenso a sufrir ataques nucleofílicos por parte de otros grupos funcionales o radicales libres formados en las diferentes condiciones de estrés probadas para este estudio, convirtiéndose la parte aromática en el principal precursor de las impurezas identificadas.

4.8 Verificación del método analítico 3 para la determinación del contenido de impurezas por HPLC en cloruro de benzalconio en solución al 50 %

El ejercicio de verificación resultó satisfactorio ya que los resultados cumplen con los criterios establecidos de manera interna por Organo Síntesis S.A. de C.V.

En el caso de la linealidad el coeficiente de correlación (r^2) resultó ser mayor a 0.99 para cada impureza y el promedio del porcentaje de recobro para ambas impurezas oscilo entre 99.06 – 102.99 % con una desviación estándar relativa menor al 2 %.

De acuerdo con los resultados, el método es robusto ante pequeños pero deliberados cambios en el pH de la solución A, así como en la temperatura del horno de la columna.

La prueba de especificidad demostró que el método analítico 3 es capaz de identificar, sin traslape de picos en la matriz analítica, el alcohol bencílico,

benzaldehído y cloruro de bencilo, ya que sus tiempos de retención son 12.64, 15.80 y 30.88 respectivamente.

Los límites de cuantificación y detección por su parte nos demuestran que el método es capaz de detectar a las impurezas en una pequeña concentración, además de cuantificar en el orden de ppm. De acuerdo con las pruebas de verificación realizadas para este método analítico, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Prueba	Resultado	
	Alcohol bencílico	Benzaldehído
Linealidad	$r^2 = 0.9993$	$r^2 = 0.9997$
Exactitud	100.72 – 102.99 %	99.06 – 100.69 %
Robustez	$ D_{abs} < 2 \%$	$ D_{abs} < 2 \%$
Precisión	$ D_{abs} < 2 \%$	$ D_{abs} < 2 \%$
Especificidad	Cumple	Cumple
Repetibilidad	RSD < 5 %	RSD < 5 %
Límite de detección	0.0021 mg/mL	0.0001 mg/mL
Límite de cuantificación	0.0065 mg/mL	0.0004 mg/mL

4.9 Selección del material de empaque

Con base en los resultados obtenidos, para cada una de las condiciones de degradación evaluada, como envase primario del cloruro de benzalconio en solución al 50 % fueron elegidos los siguientes envases los siguientes:

- Contenedor de polietileno de alta densidad, alto peso molecular con capacidad nominal de 1000 L y certificación UN.
- Tambor de polietileno de alta densidad, alto peso molecular con capacidad nominal de 220 L y certificación UN.
- Porrón de polietileno de alta densidad, alto peso molecular con capacidad nominal de 30 L y certificación UN



4.10 Diseño del estudio de estabilidad

En el mes de diciembre comenzaron simultáneamente dos estudios de estabilidad uno acelerado y otro a largo plazo, diseñados según los resultados obtenidos en las pruebas de degradación forzada.

Condición	Temperatura	Humedad Relativa	Tiempo de estudio	Ubicación
Largo Plazo	25 ± 2 °C	60 ± 5 %	36 meses	Cámara climática Binder
Acelerada	40 ± 2 °C	75 ± 5 %	6 meses	Cámara climática Binder

- **Lotes por evaluar**

Los lotes que se seleccionaron para el estudio de estabilidad acelerado y a largo plazo fueron aquellos que manufacturaron durante el ejercicio de validación del proceso de fabricación del cloruro de benzalconio en solución al 50 %, envasados en contenedores con características similares a los usados para envasar el producto terminado.

Lote	Tamaño de lote (kg)	Fecha de producción	Fecha tentativa de expiración
BKC-1117-0002V	6125.8	23/NOV/17	23/NOV/19
BKC-1117-0003V	6121.2	25/NOV/17	25/NOV/19
BKC-1117-0004V	6149.0	28/NOV/17	28/NOV/19

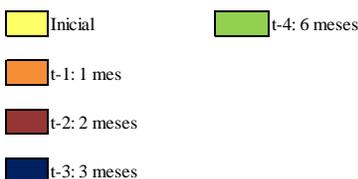
- **Programa de análisis**

Se realizó un análisis inicial para cada lote (04/Dic/18), posteriormente las muestras fueron colocadas en las cámaras de estabilidad en las condiciones de aceleración y largo plazo, comenzando así el estudio formal de estabilidad.

Los tiempos de análisis serán de acuerdo con el siguiente cronograma, según corresponda a la estabilidad acelerada o de largo plazo.

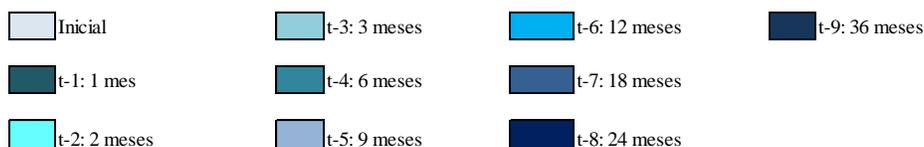
- Estabilidad acelerada

LOTE	2017	2018					
	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN
BKC-1117-0002V							
BKC-1117-0003V							
BKC-1117-0004V							



- Estabilidad a largo plazo

LOTE	2017	2018												2019	2020		
	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	JUN	DIC	DIC	
BKC-1117-0002V																	
BKC-1117-0003V																	
BKC-1117-0004V																	



- **Parámetros por evaluar en cada tiempo de análisis**

Se incluirá la determinación de color APHA debido a que, como se mencionó anteriormente, la solución de cloruro de benzalconio al 50 % puede sufrir importantes cambios de apariencia entre ellos el color.

PARÁMETRO	MÉTODO
Aspecto	Método analítico 1
Distribución de la relación de componentes alquílicos	Método analítico 2
Impurezas	Método analítico 3
% Ensayo	Método analítico 4
Aminas + Sales de aminas	Método analítico 5
Color APHA	Método analítico 6

Capítulo 5

CONCLUSIONES

Actualmente el estudio de estabilidad acelerada, así como el de largo plazo se encuentran en marcha y analizándose según el programa de análisis, logrando cumplir el objetivo general de este trabajo, al diseñar un estudio de estabilidad para el cloruro de benzalconio en solución al 50 % y así determinar el periodo de reanálisis.

De acuerdo con las pruebas de degradación forzada realizadas a la solución de cloruro de benzalconio al 50 % se encontró que es:

- Estable ante condiciones de oxidación.
- Medianamente sensible a condiciones de hidrólisis ácida y básica
- Fotosensible, ya que la lámpara de luz fría provoca cambios fisicoquímicos en la solución al igual que en la exposición a la luz UV-vis además que esta última genera tolueno y un incremento de las impurezas.
- Termosensible ya que el calor seco induce cambios en el aspecto, disminución en la concentración del API, así como un incremento en las principales impurezas.

Se identificaron al ácido benzoico, alcohol bencílico, benzaldehído, cloruro de bencilo y tolueno como los principales productos de degradación del cloruro de benzalconio en solución al 50 %.

Se establecen como métodos indicativos de estabilidad los siguientes:

- Método analítico 1: Determinación del aspecto del cloruro de benzalconio en solución al 50 %.
- Método analítico 2: Determinación de la relación de componentes alquílicos por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %.
- Método analítico 3: Determinación del contenido de impurezas por HPLC del cloruro de benzalconio en solución al 50 %.
- Método Analítico 4: Valoración total de cloruros de alquildimetilbencilamonio en cloruro de benzalconio en solución al 50 %.
- Método analítico 5: Determinación del límite de aminas y sales de amina en cloruro de benzalconio en solución al 50 %.
- Método analítico 6: Determinación de color APHA del cloruro de benzalconio en solución al 50 %.

El método analítico 3 para la determinación del contenido de impurezas demostró ser lineal, preciso, exacto, repetible, robusto y específico para las principales impurezas por lo que se considera VERIFICADO.

La hipótesis planteada fue cumplida ya que el método analítico 3 será usado como método indicativo de estabilidad para cuantificar las principales impurezas del cloruro de benzalconio en solución al 50 % durante el estudio de estabilidad.

REFERENCIAS

- NOM-073-SSA1-2015. (07 de 06 de 2016). Recuperado el 29 de Abril de 2017, de Diario Oficial de la Federación: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5440183&fecha=07/06/2016
- Ahuja, S., & Scypinski, S. (2001). *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*. Estados Unidos de América: Academic Press.
- Alani, H., & AlNukkary, Y. (2016). Determination of Benzalkonium Chloride in Ophthalmic Solutions by Stability-Indicating HPLC Method: Application to a Stability Study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 080-089.
- Arellano Yañez, P. A. (2004). *Estudio de Estabilidad en estantería de dos series de Grisux día y noche cápsulas blandas*. Santiago de Chile.
- Bajaj, S., Singla, D., & Sakhuja, N. (2012). Stability Testing of Pharmaceutical Products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 129-138.
- Bakshi, M., & Saranjit, S. (2002). Development of validated stability-indicating assay method- critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1011-1040.
- Blessy, M., Patel, R. D., Prajapati, P. N., & Agrawal, Y. (2013). Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs- A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 159-165.
- Fazlara, A., & Ekhtelat, M. (2012). The Disinfectant Effects of Benzalkonium Chloride. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*, 23-29.
- FDA. (Julio de 2015). *Guidance for Industry ,Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation, Draft Fuidance, Food and Drug Administration*. Obtenido de Food and Drug Administration: <https://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/001424gl.pdf>
- Gupta, A., Rawat, S., Gandhi, M., & Singh Yadav, J. (2011). Method Development and Acid Degradation Study of Doxofylline by RPHPLC. *Asian J. Pharm. Ana.*, 10-13.
- ICH (Q1B), E. W. (s.f.). *Photostability Testing of New Drug Substances and Products*.
- ICH Q1A(R2), E. W. (6 de Febrero de 2003). *Q1A(R2)*. Recuperado el 12 de Abril de 2017, de INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf
- Jovović, M., Kostić, N., Jančić-Stojanović, B., & A., M. (2012). Investigation of tropicamide and benzalkonium chloride stability using liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 231–239.

- Kumar Hotha, K., Kumar Reddy, S. P., Kishore Raju, V., & Ravindranath, L. K. (2013). Forced degradation studies: Practical approach-overview of regulatory guidance and literature for the drug products and drug substances. *International Research Journal of Pharmacy*, 78-85.
- Martínez Pérez, P. (2017). *Análisis volumétrico de interés farmacéutico: Valoradores Automáticos*. Sevilla.
- Merck. (14 de Junio de 2017). *Merck*. Obtenido de Merck:
<https://www.merckmillipore.com/MX/es/water-purification/learning-centers/applications/hplc/KFCb.qB.PXYAAAFaq1cQWTs.,nav>
- Mettler Toledo. (18 de Abril de 2018). *www.mt.com*. Obtenido de
https://www.mt.com/dam/Analytical/EasyPlus/pdf/Guide_ABC_of%20Easy_Titration_ES_low-res.pdf
- Moya Mirabal, A., E.A. Rodríguez-Leyes, T., Márquez Conde, B., & Polanco, L. P. (2003). Estudio de Estabilidad de Tabletas Recubiertas de Secnidazol (500mg). *Latin American Journal of Pharmacy*, 223-229.
- NOM-059-SSA1-2015. (5 de Febrero de 2016). Obtenido de
<http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Documents/Normas/050216nom059.pdf>
- Organo Síntesis. (2016). *Organo Síntesis*. Recuperado el 06 de Febrero de 2017, de
<http://organosintesis.com/>
- Prabhakara Sastrya, R., Venkatesan, C., Sastry, B., & Mahesh, K. (2016). Identification and characterization of forced degradation products of pralatrexate injection by LC-PDA and LC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 400-409.
- Secretaria de Salud. (2017). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. México: Artes Gráficas Panorama S.A. de C.V.
- Shete, S. (2014). Force degradation study to stability indicating method. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 863-873.
- Sonawane, S., & Gide, P. (2011). Optimization of Forced Degradation Using Experimental Design and Development of a Stability-Indicating Liquid Chromatographic Assay Method for Rebamipide in Bulk and Tablet Dosage Form. *Scientia Pharmaceutica*, 85-96.
- USP, United States Pharmacopeia. (2016). *United States Pharmacopeia*. Baltimore: United Book Press.