

20  
24



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

VALIDACION DE UN METODO ANALITICO  
POR ESPECTROFOTOMETRIA PARA LA  
CUANTIFICACION DE CLORHIDRATO DE  
LIDOCAINA Y ACRIFLAVINA (SOLUCION) PARA  
EL CONTROL DE CALIDAD.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**  
P R E S E N T A :  
VICTOR HERNANDEZ SERVIN



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

Introducción.....	1
I. Generalidades.....	3
A. Farmacología.....	3
B. Monografía de Clorhidrato de Lidocaína.....	4
C. Monografía de Acriflavina.....	7
D. Espectrofotometría.....	9
II. Validación de Métodos Analíticos.....	12
A. Parámetros a evaluar.....	15
1. Especificidad.....	16
2. Exactitud.....	16
3. Linealidad.....	16
4. Precisión.....	17
5. Estabilidad de la muestra.....	17
III. Planteamiento del problema.....	18
IV. Objetivos.....	19
V. Hipótesis.....	20
VI. Material y equipo.....	21
VII. Métodos Analíticos.....	22
VIII. Evaluación de parámetros.....	23
A. Clorhidrato de Lidocaína.....	23
1. Especificidad frente a excipientes.....	23
2. Linealidad del sistema.....	23
3. Precisión del sistema.....	24
4. Linealidad del Método Analítico.....	24
5. Exactitud del Método Analítico.....	24
6. Precisión del Método Analítico.....	25
7. Estabilidad de la Muestra.....	25
B. Acriflavina.....	26
1. Especificidad frente a excipientes.....	26
2. Linealidad del Sistema.....	28
3. Precisión del Sistema.....	28
4. Linealidad del Método Analítico.....	27

5. Exactitud del Método Analítico .....	27
6. Precisión del Método Analítico .....	27
7. Estabilidad de la Muestra .....	29
IX. Resultados .....	29
X. Discusión de Resultados .....	62
XI. Conclusiones .....	66
XII. Sugerencias .....	57
XIII. Bibliografía .....	68
XIV. APENDICE .....	71

## INDICE DE TABLAS

	pag.
A. Clorhidrato de Lidocaina	
Especificidad de Clorhidrato de Lidocaina	29
Linealidad del Sistema Para la Cuantificación de Clorhidrato de lidocaina	31
Precisión del Sistema	32
Linealidad del Método Analítico	33
Exactitud del Método Analítico	38
Reproducibilidad del Método Analítico	41
Estabilidad de la Muestra	43
b. Acriflavina	
Especificidad de Acriflavina	46
Linealidad del Sistema	47
Precisión del Sistema	48
Linealidad del Método Analítico	49
Exactitud del Método Analítico	55
Reproducibilidad del Método Analítico	58
Estabilidad de la Muestra	61

## INTRODUCCION

Hoy en día, la industria farmacéutica produce una gran diversidad de formas farmacéuticas, gran parte destinadas para el consumo humano y otras de uso veterinario.

Durante la producción de toda forma farmacéutica, es necesario tener un estricto control de calidad sobre el producto terminado, ya que todo medicamento está destinado para el bienestar del hombre, previniendo una posible enfermedad o para tratarla cuando está presente.

Debido a que el método de análisis de un medicamento juega un papel muy importante para decir si el medicamento cumple o no con las especificaciones de calidad establecidas, la industria farmacéutica se ha avocado a la mejoría de las técnicas de análisis, para poder obtener así resultados más confiables y que reflejen el valor de la concentración del o los compuestos a ser cuantificados.

Por esto, las técnicas utilizadas en el análisis químico, deben de cumplir con ciertas características o parámetros para poder ser utilizadas. Tal evaluación de parámetros se conoce como **Validación de Métodos Analíticos**.

Los anestésicos locales tienen una gran aplicación en el campo médico: son fármacos que bloquean la conducción nerviosa cuando son utilizados en concentración adecuada.

Al igual que los anestésicos locales, los antisépticos son ampliamente utilizados en el campo médico.

Actualmente, además del método espectrofotométrico para la cuantificación de clorhidrato de lidocaína, se cuenta con otros como el de cromatografía de líquidos, volumétrico, cromatografía de gases. Mientras que para acriflavina además del método espectrofotométrico se cuenta con el de cromatografía de líquidos

En el presente trabajo, se validó el método espectrofotométrico y se encontró como un método adecuado para la cuantificación de clorhidrato de lidocaína a una longitud de onda de 550 nm y para acriflavina a una longitud de onda de 450 nm, basándose en que es una técnica sencilla, que lleva un tiempo de acuerdo a las necesidades del laboratorio.

## I. GENERALIDADES <sup>1.2.3.4.5.17.18.19</sup>

### A. Farmacología

1. Clorhidrato de lidocaina. La lidocaina es un fármaco que bloquea la conducción nerviosa cuando se aplica en el tejido nervioso en concentración adecuada. Actúa en cualquier parte del sistema nervioso y en todos los tipos de fibras nerviosas; por ejemplo, cuando se aplica en la corteza motora, desaparece la transmisión del impulso que proviene de esa área; cuando se inyecta en la piel impide la iniciación y la transmisión de estímulos sensitivos.

La lidocaina en contacto con un tronco nervioso causa parálisis sensitiva y motora en el área que tal tronco inerva. La gran ventaja que tiene es que su acción es reversible; su uso es seguido de recuperación completa de la función nerviosa sin que queden huellas de lesión estructural de las fibras o las neuronas.

La duración del efecto anestésico depende del tiempo que persistan concentraciones efectivas del fármaco en el sitio de acción, por lo cual todo factor que modifique la velocidad de difusión del anestésico hacia los vasos sanguíneos (absorción) modificará la duración del efecto.

2. Aciclovir. La aciclovir es un agente que se utiliza para destruir microorganismos o para inhibir su reproducción o



metabolismo; se aplica principalmente sobre superficies cutáneas o mucosas.

Es un bacteriostático que ataca principalmente a las bacterias Gram-positivas. Es menos efectivo contra las Gram-negativas. Inefectivo contra las esporas, y su actividad se incrementa en soluciones alcalinas. Ha sido utilizada para el tratamiento de infecciones locales de oídos, boca y garganta.

#### B. Monografía de Clorhidrato de lidocaina (2, 3)

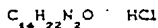
1. Nombre químico:

2-(Diethylamino)-N-(2,6-dimetilfenil)acetamida clorhidrato de; 2-diethylamino-2',6'-acetoxylidida, clorhidrato de; w-diethylamino-2,6-dimetilacetanilida, clorhidrato de.

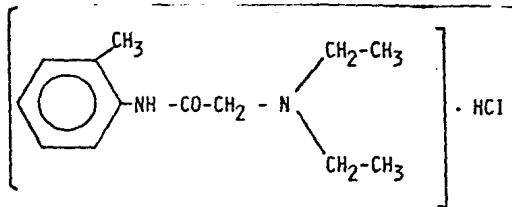
2. Nombre genérico:

Lignocaina, Xilocaina, Anestacon, Ultracaina.

3. Fórmula empírica:



4. Fórmula estructural:



5. Peso molecular:

288.82 g/mol.

6. Descripción:

Polvo cristalino blanco inodoro; punto de fusión del producto monohidratado es de 77-78°C

7. Solubilidad:

Muy soluble en agua; fácilmente soluble en alcohol; soluble en cloroformo; casi insoluble en éter.

8. Métodos de identificación:

A. Disolver 300 mg en 5-10 ml de agua y llevar a un embudo de separación, agregar 4 ml de solución 6N de hidróxido de amonio, extraer con 4 porciones de 15 ml de cloroformo. Combinar los extractos, evaporar con ayuda de corriente de aire caliente, secar el residuo 24 horas al vacío sobre gel de sílice. El precipitado cristalino así obtenido funde entre 66-69°C

B. El espectro de absorción en la región infrarroja de una dispersión del residuo obtenido en la prueba anterior en bromuro de potasio, exhibe máximas a las mismas longitudes de onda que una preparación similar estándar de referencia de lidocaína.

C. El espectro de absorción en la región ultravioleta, de una solución del residuo obtenido en la prueba "A" en alcohol presenta máximas a 263 nm su  $E_{1cm}^{1\%}$  es 13.5 y a 278 su  $E_{1cm}^{1\%}$  es 2.2 y una inflexión a 270 nm aproximadamente.

D. A 5 ml de la solución al 5% m/v de la muestra, agregar 5

ml de agua, alcalinizar con solución 2 M de hidróxido de sodio, filtrar, lavar el precipitado con agua, disolver 100 mg del mismo en 1 ml de alcohol y agregar 0.5 ml de solución al 10% m/v de nitrato de cobalto; se forma un precipitado azul-verde.

E. Disolver 200 mg de la muestra en 10 ml de solución al 1% m/v de 2-4-6-trinitrofenol; filtrar, lavar el precipitado con agua y secar. El picrato obtenido funde a 230°C aproximadamente.

F. Una solución al 5% m/v de la muestra, da reacción positiva las pruebas de identidad de cloruros.

### C. Monografía de Acriflavina (2,3).

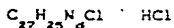
1. Nombre químico:

3,6-Diamino-10-metilacridinio mezclado con 3,6-acridinodiamina, mezcla de 3,6-diamino-10-metilacridinio hidrocloreto y 3,6-diaminoacridina dihidrocloreto.

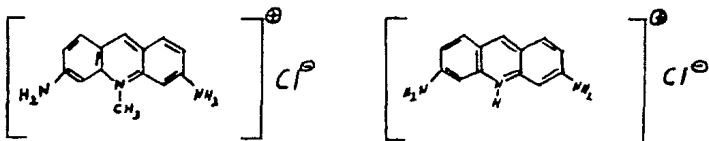
2. Nombre genérico:

Euflavina, Tripaflavina, Acriflavina, Gonacrina.

3. Fórmula empírica:



4. Fórmula estructural:



5. Peso molecular:

505.44 g/mol

6. Descripción:

Polvo cristalino de color naranja o rojo pardo; inodoro, de sabor amargo; se compone aproximadamente de 75% de cloruro de diaminometilacridinio y aproximadamente de 25% de monoclóhidrato de diaminoacridina.

7. Solubilidad:

Fácilmente soluble en agua, poco soluble en etanol, soluble en glicerina e insoluble en éter y cloroformo. La solución acuosa (1 : 49) es transparente.

8. Métodos de identificación:

A. La solución acuosa saturada de color rojo pardo, al ser diluida presenta una fluorescencia verde, la cual desaparece al agregar un poco de ácido clorhídrico y reaparece si se sigue diluyendo.

B. Con la adición de ácido sulfúrico concentrado ó de ácido clorhídrico se separan de la solución acuosa cristales rojos.

C. Con la adición de solución saturada de cloruro de sodio, se separa de la solución acuosa de Acriflavina un aceite pardo rojo, que se solidifica pronto en forma cristalina.

D. Con solución saturada de bicarbonato de sodio no se acentúa más la coloración de la solución acuosa.

E. La solución acuosa no da coloración roja con el naranja de metilo (Heliantina).

#### D. Espectrofotometría. (4.6.7.8.17)

La espectrofotometría de absorción consiste en la medida de la absorción, por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática.

La banda espectral empleada en las mediciones, se extiende desde las cortas longitudes de onda de la zona ultravioleta hasta la zona visible del espectro.

Este intervalo puede considerarse como si estuviera constituido por dos zonas, la ultravioleta (190- 380 nm) y la visible 380- 780nm.

La ley fundamental que rige la fotometría de absorción se llama ley de Beer:  $A = Ebc$

Cuando un haz de radiación monocromática que se transmite en planos paralelos, penetra a un medio absorbente a ángulos rectos con las superficies planas y paralelas del medio, la disminución de su poder de radiación con respecto al trayecto luminoso (espesor de la celda)b, o con la concentración del material absorbente c (en gramos por litro) sigue una progresión exponencial.

Solo se observa un estricto cumplimiento de la ley de Beer por un sistema cuando la radiación empleada es monocromática.

La radiación electromagnética puede considerarse como constituida por ondas de energía. En cada una de estas ondas, la distancia entre dos crestas (o valles) consecutivas es la

longitud de onda.

La radiación sólo se absorbe o emite en unidades definidas llamadas fotones. La energía de los fotones es proporcional a la frecuencia de la radiación.

La intensidad de un haz de radiación está caracterizada por su poder de radiación, que es proporcional al número de fotones por segundo que se propagan en el haz. Un haz que transporte radiación de una sola longitud de onda es monocromático; un haz policromático contiene radiación de diversas longitudes de onda.

El uso de la espectrofotometría de absorción en las zonas visible y ultravioleta como procedimiento de valoración se basa en el hecho de que la absorptividad de una sustancia suele ser una constante independiente de la intensidad de la radiación incidente, la longitud interior de la celda y la concentración, por lo cual la concentración se puede determinar fotométricamente.

Básicamente todos los tipos de espectrofotómetros están diseñados de modo que permitan el paso de una radiación esencialmente monocromática. El espectrofotómetro consta de una fuente de energía, de un sistema dispersivo con rendijas para seleccionar la banda de longitudes de onda, una celda ó recipiente para la sustancia problema, un detector de la energía radiante y dispositivos acoplados de amplificación, medición y registro.

1. Fuente de energía radiante. Esta, debe proporcionar radiación continua, es decir, su espectro debe contener todas las

longitudes de onda de la región en que se van a usar. Las más comunes son, para radiación ultravioleta, las lámparas de descarga de deuterio y de hidrógeno, mientras que para la región visible es de tungsteno

2. Monocromador. Sirve para seleccionar la longitud de onda a la cual se desea trabajar.

3. Celdas. Recipiente transparente para contener la muestra; las más usadas son las cuadradas de 10 mm. de cuarzo.

4. Detector. Transforma la radiación en señal eléctrica; las más usadas son las fotoceidas de silicón, fototubos y fotomultiplicadores.

5. Indicadores de señal. Dispositivos acoplados de amplificación, medición y registro.



## II. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS<sup>(9,10,11,12,13,14,15,16)</sup>

Más que la simple medida de un procedimiento, la validación de métodos es una medida del desempeño de un sistema total analítico. En otras palabras, se tiene que asegurar que el método, instrumentos, solventes, reactivos, y todo lo que se usa durante el ensayo es lo adecuado para el compuesto en cuestión.

La validación del comportamiento del sistema es parte de la aptitud del sistema probado, en la cual todos los parámetros se toman en consideración para establecer como se comporta en el ensayo.

La forma más común para validar una metodología analítica es analizando muestras de referencia que son similares en todos los aspectos a la muestra problema, comparando los resultados con los esperados. El placebo cargado ó la adición de estándar son los métodos que se pueden usar como referencia para determinar la exactitud de un método ensayado.

En el método de recobro de el placebo cargado, el principio activo puro, es adicionado a una mezcla de excipientes, y la mezcla es analizada y comparada con los resultados esperados.

En el método de la adición de estándar, a una mezcla de concentración conocida de activo se le adiciona una cantidad de estándar conocida y se analiza. La diferencia entre la muestra así obtenida y la muestra original es la medida de el aumento del estándar recuperado en el ensayo.

La exactitud de un método puede variar a través de un rango de concentraciones. La medida de la exactitud se determina que puede ir de 80% a 120% de principio activo con respecto al valor central normal de fármaco.

Mediante el tratamiento estadístico, los datos obtenidos en la exactitud, se usan para determinar la linealidad del método, definida como la variación en el aumento de fármaco recuperado por el ensayo como una función del aumento del fármaco real en la muestra.

Para un método que es utilizado de rutina en el laboratorio, se deben designar en la evaluación estadística con un nivel de significancia del 95%.

Otros requerimientos, incluyen la reproducibilidad y sensibilidad; éstos pueden ser más flexibles que lo requerido para exactitud porque son una función de la precisión del ensayo, especificaciones (rango), y el número de muestras ensayadas.

Para métodos muy críticos o métodos utilizados generalmente, la desviación estándar relativa entre todos los resultados no debe ser mayor del 2%.

Otro criterio de la validación de métodos es la especificidad. Lo ideal, es que el compuesto a ser medido esté libre de interferencia que permitan medir la potencia real de un activo. Analizando los compuestos o excipientes que contiene la formulación sin el ingrediente activo en cuestión, se obtendrá una buena medida de la especificidad.

Así, la validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. El objetivo de la validación es producir los mejores resultados analíticos posibles, para obtener tales resultados deben ser consideradas todas las variables del método reactivos, aparatos, instrumentos, analistas

## A. Parámetros a Evaluar

Los parámetros a evaluar tanto para el método para Acriflavina como para Clorhidrato de Lidocaína son:

### 1) Sistema

- a. Linealidad
- b. Precisión

### 2) Método Analítico

- a. Especificidad
- b. Exactitud
- c. Linealidad
- d. Reproducibilidad
- e. Estabilidad de la muestra

### 1. ESPECIFICIDAD

Es la demostración de que la respuesta del método corresponde solo a la sustancia de interés; esto es, aquí se verifican si la respuesta medida corresponde solo a la sustancia de interés y si los excipientes y productos de degradación interfieren o no en la señal medida.

### 2. EXACTITUD

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y un valor de referencia.

Se expresa como el % de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia

### 3. LINEALIDAD

Es una medida del grado al cual la curva de calibración analítica se aproxima a una línea recta del tipo  $y = a + bx$ , donde  $y$  es la variable dependiente o cantidad obtenida,  $x$  es la variable independiente o cantidad adicionada,  $a$  es la ordenada al origen e indica el valor medido al cual la cantidad adicionada es igual a cero,  $b$  es la pendiente y representa las variaciones que hay de  $y$  con respecto a  $x$ .

Para determinar este parámetro, los datos experimentales se analizan de modo que la cantidad recuperada u obtenida está en

funcion de la cantidad adicionada al placebo y asi analizar el grado en que los resultados tengan un comportamiento lineal. Para esto, se utiliza el analisis de regresion lineal simple

El grado de variación de la variable dependiente se estima en porciento utilizando el analisis de correlacion.

#### 4. PRECISION

Es la variacion de los datos con respecto a un valor central

La precision es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del metodo analitico bajo las condiciones normales de operacion.

a. Repetibilidad. Es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones de trabajo (mismo analista, mismos aparatos, mismo dia, mismos reactivos).

b. Reproducibilidad. Es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones de trabajo (diferentes analistas, dias, equipo).

#### 5. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Es el tiempo durante el cual, la respuesta medida no cambia en forma significativa, esto es, el tiempo en el cual una respuesta permanece estable y sin cambios considerables.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la elaboración de éste medicamento, se llevan a cabo análisis químicos en los diferentes pasos de su elaboración.

Estos análisis se realizan en las siguientes etapas:

1. Proceso
2. Producto terminado

Debido a esto, el método que se utiliza en el análisis, ya sea para uno u otro de los principios activos, deben poseer ciertas características que indiquen que el método utilizado es confiable.

El presente trabajo verificará que tan confiables son los métodos espectrofotométricos utilizados como métodos rutinarios de control para la cuantificación de Clorhidrato de Lidocaina y Acriflavina a una longitud de onda de 550 nm y 450 nm respectivamente en su forma farmacéutica de solución.

El tratamiento estadístico de los resultados nos permitirá conocer la variabilidad de los datos, indicándonos su validez.

El procedimiento se hace de acuerdo a las necesidades del laboratorio de control de calidad, así como a las normas requeridas por la industria farmacéutica ó el control de medicamentos.

## IV OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo la validación de los métodos analíticos espectrofotométricos para la cuantificación de Clorhidrato de Lidocaína y Acriflavina como principios activos en la forma farmacéutica de solución.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Determinar la linealidad y precisión del sistema.
2. Determinar la especificidad, exactitud, linealidad, precisión, estabilidad de la muestra, del método analítico como parámetros de validación.



## V. HIPOTESIS

Si las propiedades fisicoquímicas de los excipientes empleados en la fórmula farmacéutica, no interfieren en la cuantificación por el método espectrofotométrico de Clorhidrato de Lidocaina y Acriflavina, y si en un rango de concentración, el coeficiente de correlación es mayor o igual a 0.99, la ordenada al origen es igual a 0, la pendiente es igual a 1 y el coeficiente de variación es igual o menor a 2, entonces los métodos espectrofotométricos serán específicos, lineales, precisos y exactos, por lo que pueden emplearse como métodos de rutina en el laboratorio de control de calidad.

## VI. MATERIAL Y EQUIPO

1. MATERIALES	MARCA	DESCRIPCION
Matraces volumétricos	PYREX	100 ml.
Pipetas volumétricas	"	5, 10, 15, 50 ml
Vasos de precipitado	"	100 ml.
Embudos de separación	"	250 ml.
Embudos de filtración	"	tallo corto
Soporte universal		
Anillos de fierro		
2. EQUIPO	MARCA	MODELO
Balanza analítica	Mettler	AE 200
Espectrofotómetro	Shimadzu	204-58000 UV-240
Parrilla de calentamiento	Corning	PC- 320
3. REACTIVOS		DESCRIPCION
Hidróxido de amonio concentrado		Merck
Cloroformo		Merck
Sulfato de sodio anhidro		Merck
Acido clorhídrico		Merck
Carbonato de Sodio		Merck
Sulfato de sodio pentahidratado		Merck
Acridiavina estándar de referencia.		
Clorhidrato de lidocaína estándar de referencia.		

## VII. METODOS ANALITICOS

### 1. Clorhidrato de Lidocaina

Transferir una alícuota equivalente a 34 mg de Clorhidrato de Lidocaina a un embudo de separación de 250 ml. y agregar 10 ml de hidróxido de amonio concentrado, extraer con tres porciones de cloroformo de 50 ml cada una, filtrar el cloroformo a través de sulfato de sodio anhidro.

Evaporar el cloroformo casi a sequedad en baño maría.

Preparar una solución estándar que contenga 340 mg de Clorhidrato de Lidocaina y 35 mg de Acriflavina en 100 ml.

De esta solución tomar 10 ml y tratar como la muestra.

Adicionar 5 ml de ácido Clorhídrico 0.1 N a los recipientes del estándar y problema, así como a un tercero que servirá como blanco; evaporar el remanente de cloroformo y adicionar 15 ml de Carbonato de sodio al 15% y 5 ml de sulfato cúprico al 1.3%; mezclar y filtrar a través de papel wathman # 42; leer contra el blanco de reactivos a 550 nm.

### 2. Acriflavina

Pesar 1 gr de solución problema en un matraz volumétrico de 100 ml. Aforar con agua y se mide esta solución en un espectrofotómetro en celdas de 1 cm a 450 nm contra agua como blanco.  $E_{1cm} = 1620$

## VIII. EVALUACION DE PARAMETROS

### A. CLORHIDRATO DE LIDOCAINA (METODO ANALITICO 1).

#### 1. Especificidad frente a excipientes.

Para llevar a cabo esta prueba, se procedió a la elaboración de un placebo y un placebo cargado, utilizando las mismas concentraciones de los excipientes que en la forma farmacéutica; posteriormente se trataron de igual manera para la cuantificación de Clorhidrato de lidocaína y después, se compararon frente a un estándar de Clorhidrato de lidocaína, donde se observó la respuesta del placebo, placebo cargado y estándar de clorhidrato de lidocaína.

#### 2. Linealidad del sistema.

Se trabajo con 5 niveles de concentración para el Clorhidrato de Lidocaína siendo al 60, 80, 100, 110, 125% respecto a la concentración normal de Clorhidrato de Lidocaína en la forma farmacéutica.

Se hicieron muestras por triplicado; se trabajo el mismo día en las mismas condiciones de operación, equipo y laboratorio. Los datos obtenidos se ajustaron por el método de mínimos cuadrados, y de esta manera se determinó la pendiente, ordenada al origen y el coeficiente de correlación.

### 3. Precisión del sistema.

Se trabajó con seis muestras con el equivalente al 100% de la concentración de Principio activo respecto a la concentración de la forma farmacéutica.

Los resultados obtenidos se evaluaron por medio del coeficiente de variación.

### 4. Linealidad del método analítico

Se trabajó con placebos cargados cuyas concentraciones fueron de 60, 80, 100, 110 y 125% respecto a la concentración normal del Clorhidrato de Lidocaina en la forma farmacéutica; se hicieron muestras por triplicado trabajando en las mismas condiciones de operación, el mismo día.

Los resultados se compararon contra estándar de referencia. Los datos se trataron igual que para linealidad del sistema.

### 5. Exactitud del método analítico.

En esta prueba se procedió a realizar placebos cargados con el equivalente al 100% de la concentración normal; se llevaron a cabo 8 replicaciones realizando la cuantificación como lo indica el método analítico; los datos se trataron por medio del Coeficiente de Variación y de una prueba  $t$  student.

## 6. Precisión del método analítico.

Esta prueba se realizó evaluando la repetibilidad y reproducibilidad.

### I. Repetibilidad.

Para la evaluación de esta prueba, se utilizaron los datos de exactitud; por medio de una prueba de Ji cuadrada se evaluó la significancia de la variabilidad.

### II. Reproducibilidad.

Para evaluar esta prueba, se procedió a elaborar placebos cargados con el equivalente al 100% se realizaron muestras por triplicado, con dos analistas y dos diferentes días.

Los resultados se trataron por medio de un análisis de varianza para dos criterios de clasificación.

## 7. Estabilidad de la muestra

Se llevaron a cabo muestras por triplicado, colocándolas a diferentes condiciones;

I. Luz blanca y temperatura ambiental

II. Temperatura ambiental y oscuridad

III. Condiciones de refrigeración.

Se observó la lectura inicial, y posteriormente se observó a las 1, 3, 5 y 24 horas, observando si hubo o no un cambio considerable en las lecturas.

## B. ACRIFLAVINA (METODO ANALITICO 2).

### 1. Especificidad frente a excipientes.

Para esta prueba, se elaboró un placebo y un placebo cargado, utilizando las mismas concentraciones de los excipientes que en la forma farmacéutica; posteriormente se trataron de igual manera que para la cuantificación de Acriflavina, comparándose con un patrón de referencia.

### 2. Linealidad del sistema.

Se trabajó con 5 niveles de concentración, siendo al 60, 80, 100, 110 y 125% respecto a la concentración normal de Acriflavina en la forma farmacéutica.

Se hicieron muestras por triplicado; se trabajó el mismo día en las mismas condiciones de operación, equipo y laboratorio. Los datos obtenidos se ajustaron por el método de mínimos cuadrados, y de esta manera se determinó la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación.

### 3. Precisión del sistema.

Se trabajó con 6 muestras con el equivalente al 100% de la concentración de principio activo respecto a la concentración de la forma farmacéutica.

Los resultados obtenidos se evaluaron por medio del coeficiente de variación.

#### 4. Linealidad del método analítico

Se trabajó con placebos cargados cuyas concentraciones fueron 60, 80, 100, 110 y 125% respecto a la concentración normal de Acriflavina en la forma farmacéutica; se hicieron muestras por triplicado trabajando en las mismas condiciones de operación el mismo día.

Los resultados se compararon contra un estándar de referencia. Los datos se trataron igual que para Linealidad del sistema.

#### 5. Exactitud del método analítico

Se procedió a realizar placebos cargados con el equivalente al 100% de la concentración normal; se llevaron a cabo 8 repeticiones realizando la cuantificación como lo marca el método analítico. Los datos se trataron por medio del coeficiente de variación y una prueba de t student.

#### 6. Precisión del método Analítico

Esta prueba se realizó evaluando la repetibilidad y reproducibilidad.

##### I. Repetibilidad.

Para la evaluación de esta prueba, se utilizaron los datos de exactitud; por medio de una prueba de Ji cuadrada se evaluó la significancia de la variabilidad.



## II. Reproducibilidad.

Para evaluar esta prueba, se procedió a elaborar placebos cargados con el equivalente al 100%, se realizaron muestras por triplicado, con dos analistas y dos días.

Los resultados se trataron por medio de un análisis de varianza para dos criterios de clasificación.

## 7. Estabilidad de la muestra.

Se llevaron a cabo muestras por triplicado, colocándolas en diferentes condiciones:

- I. Luz blanca y temperatura ambiente.
- II. Oscuridad y temperatura ambiente.
- III. Condiciones de refrigeración (5°C).

Se obtuvo la lectura inicial, y posteriormente se observó a las 1, 3, 5 y 24 horas, observando si hubo o no un cambio considerable en las lecturas.

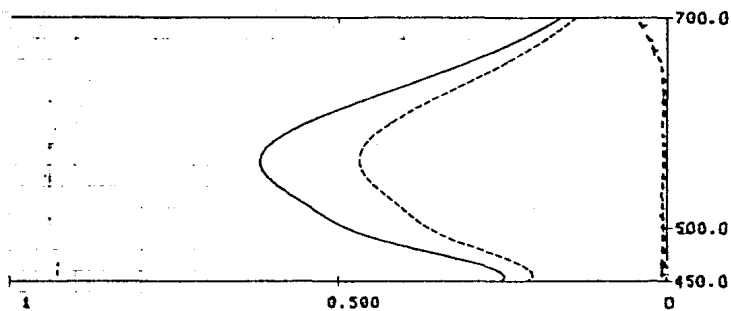
## IX. RESULTADOS

### ESPECIFICIDAD

Tabla 1. Resultados de la especificidad para Clorhidrato de Lidocaína.

MUESTRA	ABSORBANCIA
Patrón de referencia	0.482
	0.481
Placebo cargado	0.478
	0.475
Placebo	0.007
	0.006

De los resultados de la tabla anterior se obtiene una interferencia de los excipientes equivalentes al 1.5%.



Gráfica de especificidad de Clorhidrato de lidocaína.

## LINEALIDAD DEL SISTEMA

Tabla II. Resultados obtenidos en la linealidad del sistema para la cuantificación de Clorhidrato de Lidocaína

Concentración mg/ml	2.04	2.72	3.40	3.74	4.25
Absorbancias	0.276	0.362	0.469	0.514	0.568
	0.274	0.380	0.467	0.514	0.571

De la tabla II se obtuvieron los siguientes resultados, después de realizar el tratamiento estadístico con las fórmulas que aparecen en el apéndice (A).

Ordenada al origen	(b) = 0.0108
Pendiente	(m) = 0.1345
Coeficiente de correlación	(r) = 0.9937

## PRECISION DEL SISTEMA

Tabla III. Resultados obtenidos en la precisión del sistema para la cuantificación de clorhidrato de Lidocaina.

Concentración mg/ml	3.40
Absorbancias	0.486
	0.489
	0.487
	0.485
	0.485
	0.488

Realizando el tratamiento estadístico por medio de las fórmulas que aparece en el apéndice, se obtiene de la tabla III los siguientes resultados.

Media	( $\bar{X}$ ) = 0.4866
Desviación estándar	( $\hat{\sigma}$ ) = 0.00149
Coeficiente de variación	(C.V.) = 0.3062%

## LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO

Tabla IV. Resultados obtenidos en la linealidad del método analítico para la cuantificación de Clorhidrato de Lidocaina.

Concentración mg/ 10 ml	20.4	27.2	34.0	37.4	42.5
Absorbancias	0.270	0.384	0.486	0.518	0.567
	0.276	0.379	0.458	0.514	0.571
	0.279	0.371	0.466	0.521	0.574

Tabla V. Resultados de la linealidad del método analítico para la cuantificación de Clorhidrato de Lidocaína.

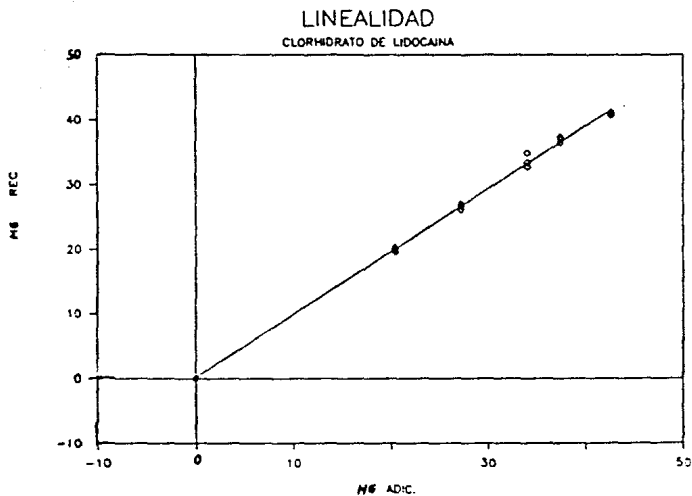
mg adicionados mg/10 ml	mg recuperados mg/10 ml	% recuperado
20.4	19.60	96.08
20.4	20.03	98.22
20.4	20.25	99.28
27.2	26.98	99.22
27.2	26.63	97.93
27.2	26.07	95.86
34.0	34.88	102.56
34.0	32.70	96.20
34.0	33.46	98.31
37.4	37.01	98.96
37.4	36.48	97.55
37.4	37.37	99.92
42.5	40.67	95.98
42.5	40.95	96.37
42.5	41.17	96.87

De la tabla IV y V se obtuvieron los siguientes resultados después de realizar el tratamiento estadístico por medio de las fórmulas del apéndice (A).

Pendiente  $(m) = 0.96552$

Ordenada al origen  $(b) = 0.4292$

Coefficiente de correlación  $(r) = 0.9966$



Gráfica 1. Linealidad de el método Analítico para la Cuantificación de Clorhidrato de Lidocaína.



Linealidad de clorhidrato de lidocaína.

evaluación de la pendiente.

$$H_0: B = 1$$

$$H_A: B \neq 1$$

Estadígrafo de contraste:

$$t_{\text{calc}} = -1.43$$

$$t_{\text{tablas}} = 2.1604$$

Intervalo de aceptación:

$$-2.1604 < -1.43 < 2.164$$

Tabla VI. Resultados de el analisis de varianza de la linealidad del metodo analitico para la cuantificación de clorhidrato de Lidocaína.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	Ftab
Regresión	1	839.47	839.47	1608.83	4.67
Error de regresión	13	6.7842	0.5218		
Falta de ajuste	3	3.2097	1.0699	2.9931	3.71
Error puro	10	3.5745	0.35745		

NOTA: Las fórmulas empleadas para los cálculos se encuentran en el apéndice (B).

Tabla VII. Resultados de la exactitud de el método analítico para la cuantificación de Clorhidrato de Lidocaína.

mg Adicionados	mg Recuperados	% de Recobro
34	34.66	101.3729
34	33.37	98.1693
34	33.61	98.8558
34	34.23	100.6864
34	33.45	98.3981
34	33.76	99.3135
34	34.15	100.4576
34	33.84	99.5423

De la tabla anterior se obtiene:

Desviación estándar  $(\sigma) = 1.145$   
 Media  $(\bar{X}_n) = 99.5994$   
 Coeficiente de  
 variación  $(C.V) = 1.1503\%$

## Tratamiento estadístico

$$H_0: \mu = 100\%$$

$$H_1: \mu \neq 100\%$$

### Estadígrafo de contraste

$$T_{\text{calc.}} = -0.9895$$

$$T_{0.975} = 2.3646$$

### Area de aceptación

$$-2.3646 < -0.9895 < 2.3646$$

### Intervalo de confianza

$$98.64 < 99.59 < 100.5566$$

## PRECISION

10. REPETIBILIDAD. De la tabla VII. se obtuvieron los siguientes resultados:

Tratamiento Estadístico

$H_0: \delta \leq 2\%$

$H_1: \delta > 2\%$

Estadígrafo de contraste

$$x^2_{cal} = 8$$

$$x^2_{tab} = 16.013$$

$$8 < 16.013$$

Coefficiente de Variación

1.15%

2). REPRODUCIBILIDAD.

Tabla VIII. Resultados de la interacción analista-día para la reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de Clorhidrato de Lidocaina.

	DIA I % RECOBRO	DIA II % RECOBRO
ANALISTA	104.6934	105.6923
I	104.4897	101.4216
	98.3673	105.4655
ANALISTA	103.6734	100.5607
II	104.4897	100.1869
	103.6734	100.5667

Tabla IX. Análisis de varianza para reproducibilidad de el método analítico para la determinación de Clorhidrato de Lidocaina.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>
Analista	1	0.7984	0.7984	0.0457	18.51
Día	2	34.1866	17.0943	3.1135	4.48
Error	8	43.9264	5.4908		

Las fórmulas de cálculo aparecen en el apéndice (D).

Tabla X. Resultados de la estabilidad de la muestra para el método analítico en la determinación de Clorhidrato de Lidocaina.

CONDICION	TIEMPO (HORAS)				
	00	1	3	5	24
Luz	100	100.50	102.25	100.50	97.45
blanca	100	100.50	100.50	100.25	100.25
	100	100.30	101.30	100.10	99.85
Obscuri- dad.	100	100.76	101.02	101.53	97.17
	100	100.00	100.50	101.52	100.76
	100	100.52	100.50	101.32	99.55
Refrige- ración	100	99.74	99.22	96.64	96.90
	100	98.40	98.20	97.42	96.15
	100	99.80	99.50	98.20	96.90

V. R. = CONCENTRACION



Tabla XI. Resultados del Tratamiento con  $t_{DUNNETT}$  para la Estabilidad de la Muestra para el método analítico en la determinación de Clorhidrato de Lidocaina.

TIEMPO (HRS)	REFRIGERACION	OSCURIDAD	LUZ BLANCA
1	-0.5469	0.3500	0.3555
3	-0.8423	0.5524	1.1076
5	-2.1168	1.1377	0.2324
24	-2.7466	-0.6892	-0.6700

$$t_{DUNNETT} = -3 \rightarrow +3$$

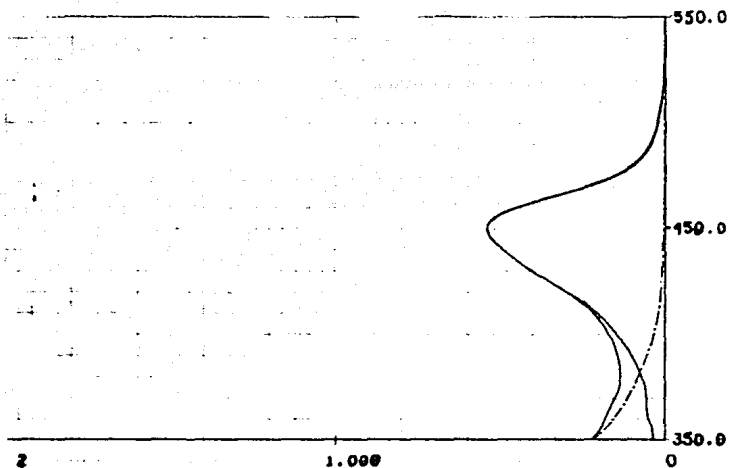
\* Las fórmulas de calculo aparecen en el apéndice (E).

## ESPECIFICIDAD

Tabla IA. Resultados de la especificidad para Acriflavina.

MUESTRA	ABSCRBANCI A
Patrón de referencia	0.584 0.584
Placebo cargado	0.566 0.566
Placebo	0.009 0.009

De los resultados de la tabla anterior se obtiene una interferencia de los excipientes equivalente al 1.5%.



Gráfica de especificidad de acriflavina.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Tabla IIA. Resultados obtenidos en la linealidad del sistema para la cuantificación de Acriflavina.

Concentración					
g/ml	2.1	2.8	3.5	3.85	4.37
Absorbancia					
M1	0.342	0.443	0.569	0.620	0.689
M2	0.340	0.445	0.572	0.619	0.694
M3	0.340	0.446	0.573	0.617	0.689

De la tabla anterior se obtuvieron los siguientes resultados después de realizar el tratamiento estadístico con las fórmulas del apéndice.

Ordenada al origen (b) = 0.0113

Pendiente (m) = 0.157

Coefficiente de correlación (r) = 0.9985

PRECISION DEL SISTEMA

Tabla IIIA. Resultados obtenidos en la precisión del sistema para la cuantificación de Acriflavina.

CONCENTRACION	
g/ml.	3.5
Absorbancias	0.576
	0.571
	0.577
	0.573
	0.570
	0.570
	0.574
	0.569

Realizando el tratamiento estadístico por medio de las fórmulas que aparecen en el apéndice, se obtienen los siguientes resultados:

Media	$(\bar{X}) = 0.57275$
Desviación estándar	$(\sigma) = 0.00337$
Coefficiente de variación	$(C.V.) = 0.5883\%$

LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO

Tabla IVA. Resultados obtenidos en la linealidad del método analítico para la cuantificación de Acriflavina.

Concentración					
mg/100ml	21.00	28.00	35.00	38.53	43.70
Absorbancias.	0.341	0.453	0.569	0.624	0.709
	0.340	0.453	0.567	0.625	0.709
	0.341	0.452	0.566	0.624	0.708

Tabla VA. Resultados de la linealidad del método analítico para la cuantificación de Acriflavina.

mg Adicionados mg/100 ml	mg Recuperados mg/100 ml	% Recuperado
21.00	21.04	100.19
21.00	20.98	99.90
21.00	21.04	100.19
28.00	27.96	99.85
28.00	27.96	99.85
28.00	27.90	99.64
35.00	35.12	100.34
35.00	35.00	100.00
35.00	34.93	99.80
38.53	38.51	99.94
38.53	38.58	100.12
38.53	38.51	99.94
43.70	43.76	100.13
43.70	43.76	100.13
43.70	43.70	100.00

De la tabla VA se obtuvieron los siguientes resultados después de realizar el tratamiento estadístico por medio de las fórmulas que aparecen en el apéndice (A).

Pendiente  $(m) = 1.0016$

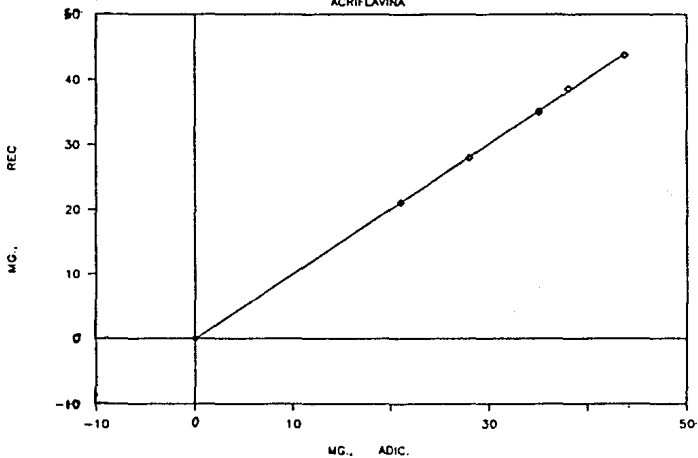
Ordenada al origen  $(b) = -0.0519$

Coefficiente de  
correlación  $(r) = 0.9999$



## LINEALIDAD

ACRIFLAVINA



Gráfica 2. Linealidad del método analítico para la Cuantificación de Acriflavina.

Tabla VIA. Resultados de el análisis de varianza de la linealidad del método analítico para la cuantificación de Acriflavina.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	Ftab
Regresión	1	927.0008	927.0008	831104.1	4.67
Error de regresión	13	0.0438	0.0011		
Falta de ajuste	3	0.0146	0.0048	1.8561	3.71
Error puro	10	0.029	0.0029		

NOTA: Las fórmulas empleadas para los cálculos se encuentran en el apéndice (B).

Linealidad de clorhidrato de lidocaína.

evaluación de la pendiente.

$$H_0: B = 1$$

$$H_A: B \neq 1$$

Estadígrafo de contraste:

$$t_{\text{calc}} = 0.1467$$

$$t_{\text{tablas}} = 2.1604$$

Intervalo de aceptación:

$$- 2.1604 < 0.1467 < 2.1604$$

## EXACTITUD

Tabla VIIA. Resultados de la exactitud de el método analítico para la cuantificación de Acriflavina.

mg adicionados	mg recuperados	% de Recobro
3.5	3.493	99.8236
3.5	3.469	99.1181
3.5	3.518	100.5291
3.5	3.462	98.9417
3.5	3.481	99.4708
3.5	3.506	100.1763
3.5	3.537	101.0582
3.5	3.475	99.2945

De la tabla anterior se obtiene:

Desviación estándar	( $\sigma$ ) = 0.7399
Media	( $\bar{x}$ ) = 99.8015
Coefficiente de variación	(C.V.) = 0.7404%

### Tratamiento estadístico

$$H_0: \mu = 100\%$$

$$H_1: \mu \neq 100\%$$

### Estadígrafo de contraste

$$T_{\text{calc}} = -0.7599$$

$$T_{0.975} = 2.3646$$

### Area de aceptación

$$-2.3646 < -0.7599 < 2.3646$$

### Intervalo de confianza

$$99.1837 < 99.8015 < 100.4192$$

## PRECISION

1). REPETIBILIDAD. De la tabla VIIA, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tratamiento estadístico

$$H_0: \delta \leq 2\%$$

$$H_1: \delta > 2\%$$

Estadígrafo de contraste

$$X^2_{\text{cal}} = 8 \qquad X^2_{\text{tab}} = 16.013$$

Area de aceptación

$$8 < 16.031$$

Coefficiente de Variación

$$0.7404$$

2). REPRODUCIBILIDAD.

Tabla VIIIA. Resultados de la interacción analista-día para la reproducibilidad del método analítico para cuantificación de Acriflavina.

	DIA I % RECOBRO	DIA II % RECOBRO
ANALISTA	102.4691	101.9400
I	102.4691	101.9400
	102.6425	101.4109
ANALISTA	102.8218	101.0582
II	101.2345	101.0582
	101.9400	101.0582

Tabla IXA. Análisis de varianza para reproducibilidad de el método analítico para la determinación de Acriflavina.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	Ftab
Analista	1	0.1517	0.1517	0.2942	18.51
Día	2	1.031	0.5155	0.8560	4.46
Error	8	4.8179	0.6022		

$\alpha = 0.05$

\* Las fórmulas de cálculo se encuentran en el apéndice (AD).



Tabla XA. Resultados de la estabilidad de la muestra para el método analítico en la determinación de Acriflavina.

CONDICION	TIEMPO (HORAS)				
	0	1	3	5	24
Luz	100	99.65	99.65	98.46	97.25
Blanca	100	99.82	99.65	98.60	97.85
	100	100.00	99.49	98.30	97.55
Obscuridad	100	100.34	100.00	99.65	99.09
	100	100.67	100.33	99.83	99.14
	100	100.84	100.00	99.83	98.57
Refrige- ración	100	100.17	99.65	99.31	98.97
	100	100.00	99.82	99.65	99.02
	100	99.66	98.98	99.32	98.98

V. R. = CONCENTRACION

Tabla XIA. Resultados del tratamiento con  $t_{DUNNET}$  para la Estabilidad de la muestra para el método Analítico en la determinación de Acriflavina.

TIEMPO (HRSD)	REFRIGERACION	OBSCURIDAD	LUZ BLANCA
1	-0.2857	3.109	-0.0809
3	-2.6054	0.5547	-2.0339
5	-2.8912	-1.1598	-7.4634
24	-5.093	-5.3790	-12.3550

$$t_{DUNNET} = -3 \rightarrow +3$$

\* Las fórmulas empleadas para cálculos se encuentran en el apéndice (E).

## X. DISCUSION DE RESULTADOS

### A) CLORHIDRATO DE LIDOCAINA.

Para poder llevar a cabo la validación de este método analítico, se realizó primero la especificidad frente a excipientes. Se hicieron placebos y placebos cargados y se trataron como lo indica el método analítico junto con un patrón de referencia. Los resultados indican una interferencia de los excipientes equivalente al 1.5%, debido a que el método se utiliza como método de "rutina", esto es, como control de calidad, se considera no significativa la interferencia existente, por lo que el método se considera específico frente a excipientes (20). Una vez conocido esto, se procedió a realizar una curva estándar con concentraciones de 20.4 a 42.5 mg/10ml. Como muestran los resultados obtenidos en la tabla II, el coeficiente de correlación, la ordenada al origen y la pendiente, nos indican que en el rango mencionado, existe una relación directamente proporcional entre los mg. adicionados y la absorbancia obtenida.

Se puede observar en las tablas IV y V por medio de la pendiente, ordenada al origen y de el coeficiente de correlación; además de que se llevó a cabo un análisis de varianza que demostró no ser significativo para el efecto de falta de ajuste (tabla VI), que el método analítico es lineal en el intervalo de concentraciones de 20.4- 42.5 mg/10ml.

Para la prueba de exactitud del método analítico se llevó a cabo la preparación de placebos cargados con el equivalente al 100% de principio activo. La tabla VII, nos muestra una media de recuperación de el 99.5294%; por medio de el tratamiento estadístico con una prueba de "t" student se demostro que la media de recuperación es equivalente al 100%; empleando un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  ya que no presenta un efecto significativo.

Para la repetibilidad, usando los mismos datos que para exactitud, y haciendo una prueba de  $X^2$ , se observa que la desviación estándar es menor al 2%, por lo que el metodo analítico posee una variación en sus recobros menor al 2%.

En cuanto a la reproducibilidad, se evaluó probando a través de un diseño completamente al azar para los factores analista ( $A_i$ ) y día ( $D_j$ ). Cada uno de los tratamientos fue evaluado mediante el análisis de lotes independientes con tres replicaciones por tratamiento y trabajando a la concentración estipulada en el marbete al 100%. El análisis de varianza correspondiente mostro no presentar efecto significativo para el analista ni para el día. (Tabla IX)

Para la estabilidad de la muestra, se prepararon placebos cargados y se realizó la cuantificación de principio activo como lo marca la técnica analítica. Posteriormente se sometio a las muestras a 3 diferentes condiciones y se leyeron a diferentes tiempos. Los resultados, despues de someterse a un tratamiento por medio de la  $t_{DUNNET}$ , mostraron no tener efecto significativo

aun hasta 24 horas en las condiciones mencionadas, empleando un nivel de significación del 5%.

#### b) ACRIFLAVINA.

Se realizó primero la especificidad frente a excipientes haciendo placebos y placebos cargados, y se trataron junto a un patrón de referencia como lo indica la técnica analítica. Los resultados indican una interferencia de los excipientes de el 1.5%, por lo que el valor no se considera significativo por ser un método para control de calidad.

Para la linealidad del sistema se hizo una curva estándar con un rango de concentración de 2.1- 4.37  $\mu\text{g/ml}$ . Se demostró ser directamente proporcional la relación de gramos adicionados y absorbancia obtenida. Posteriormente para la linealidad del método se hicieron placebos cargados y como lo muestra la tabla VA, con valores de la pendiente, ordenada al origen y el coeficiente de correlación, además de el análisis de varianza que demostró no ser significativo para el efecto de regresión, así como no presentar valores significativos para el efecto de la falta de ajuste (tabla VIA), que el método analítico es lineal en el intervalo de concentraciones arriba mencionado.

Para la exactitud del método analítico, se llevó a cabo la preparación de placebos cargados con el equivalente al 100% de principio activo. La tabla VIIA nos muestra una media de recuperación de el 99.8015%, y el tratamiento estadístico con una prueba de " $t_{\text{Student}}$ " se demostró que el método analítico posee una media de recuperación equivalente al 100%, ya que no

presenta un efecto significativo empleando un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

Para la repetibilidad, usando los datos de exactitud, por medio de una prueba de " $\chi^2$ ", se observa que la desviación estandar es menor al 2%, por lo que el metodo analítico posee una variación en sus recobros menor al 2%.

Para la reproducibilidad, se evaluó por medio de un diseño completamente al azar para los factores analista ( $A_i$ ) y día ( $D_j$ ). Cada uno de los tratamientos fué evaluado mediante al analisis de lotes independientes con tres replicaciones por tratamiento y trabajando a la concentración estipulada en el morbete al 100%. El analisis de varianza correspondiente mostró no presentar efecto significativo para el analista ni para el día (Tabla IXA).

Para la estabilidad de la muestra, se elaboraron placebos cargados y se realizó la cuantificación de principio activo como lo marca la técnica analítica. Posteriormente se sometió a las muestras a tres diferentes condiciones y se leyeron a diferentes tiempos. Los resultados, después de ser tratados por medio de la  $t_{DUNNET}$  con un nivel de significación del 5%, muestran que:

1) a condiciones de refrigeración, la muestra no presenta efecto significativo hasta las 5 horas, pero a las 24 horas sí.

2) a condiciones de obscuridad, presenta efecto significativo a las 24 horas.

3) a condiciones de luz blanca, presenta efecto significativo a las 5 y 24 horas.

## XI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que los objetivos planteados se alcanzaron en su totalidad, ya que los métodos analíticos para la cuantificación de clorhidrato de Lidocaina y Acriflavina resultaron ser: LINEALES, EXACTOS, PRECISOS y ESPECIFICOS.

Este último parámetro se realizó frente a excipientes, por lo que se puede decir que los métodos pueden emplearse como método rutinario en el laboratorio de Control de Calidad.

Adicionalmente se puede decir que el tiempo empleado para la cuantificación de Clorhidrato de Lidocaina y Acriflavina es adecuado para las necesidades del laboratorio donde se realizó la validación.

## XII. SUGERENCIAS.

Tomando en base los parámetros evaluados y los resultados obtenidos, se sugiere que ambos métodos no se utilicen para pruebas de estabilidad. Para esto, llevar a cabo el desarrollo de técnicas analíticas, evaluar los parámetros aquí mencionados, además de someter a degradación de los principios activos en condiciones de temperatura, acidez y alcalinidad, en la evaluación de especificidad.



### XIII BIBLIOGRAFIA

1. Bowman W.C. And Rand M. J. " Textbook of Farmacology ", segunda Ed., Blackwell Scientific Publications, Amsterdam 1978.
2. Goodman y Gilman. Bases Farmacológicas de la Terapeutica, 5a. Ed., Interamericana 1978.
3. The Merck Index Eleventh Edition. Merck and Co. Inc Rahway. N. J. USA, 1989.
4. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 5a. Edición, Secretaria de Salud, México 1988.
5. Martindale The Extra Pharmacopeia. 28 ed. James y Reynolds. Londres Inglaterra, 1986.
6. Introduction to Ultraviolet and Visible Spectrophotometry. Edited by J. E. Steward . B. S. 2a. Ed. 1977.
7. Galen W. Ewing. Metodos Instrumentales de Analisis Quimicos, 1a. Ed. McGraw-Hill, México 1978.
8. Skoog D. A. y West A. M. Fundamentos de Quimica Analitica, Reverte España 1978.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

9. Guerra J. Finfeison M. "Validation of Analytical Methods Laboratories" by FDA, Pharmaceutical Technology 3, (7) 74-78 1986.
10. Taylor John K. "Validation of Analytical Methods"; Anal. Chem. 55, (6) 600-608, 1983.
11. Massart D. L. Evaluation and Optimizacion Laboratory Methods and Analytical Procedures. Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam, 1978.
12. Mc. Gonogle, E. J. Analytical Methods Validation, Chemycal Instituto of Canada, April 29 1980.
13. Adrianus J. Van Der Wilen et. al. Guidelines for Assay Validations, Pharmaceutical Technology March 1982.
14. Judy P. Boehlert. Assay Developent in Stability Methods Drug Developent and Industrial Pharmacy 10, 1343, 1984.
15. Federal Register. Volumen 43 no. 190 September 29, 1978. Section 211.165 (e) y 211.194 (a) (2).
16. Curso Técnico-Práctico de Validacion de Tecnicas Analíticas. por AFM; Mexico, Memorias de Congreso 1981.

17. The United States Pharmacopeia XXI-National Formulary XVI, USP Convention, Rockville, M. D. 1985.
18. Korolkovas, A. Compendio Esencial de Química Farmacéutica; Reverté España, 1979.
19. Moffat, A. Claerke's Insolation and Identification of Drugs  
2a. Ed. The Pharmaceutical Press, Londres Inglaterra, 1986.
20. Tesis Profesional. "Validación de un Método Analítico para Cuantificar Peroxido de Benzilo en un gel por Yodometria. Pastora Bernadita Camarillo Cruz. México 1989. U.N.A.M.
21. Daniel, W. Bioestadística; Base para el Analisis de las ciencias de la Salud. Limusa, México 1982.
22. Márquez M. Probabilidad y Estadística Para Ciencias Químico Biológicas. U.N.A.M., México 1986.
23. Bowker A. H. Engineering Statics, Englewood Clifs, New Jersey, Prentice-Hall Inc. 1959.
24. Ostle, Bernard. Estadística Aplicada. 8a. Ed. Limusa; México 1983.

XIV. APENDICE<sup>(21,22,23,24)</sup>

A. FORMULAS PARA EVALUAR LA LINEALIDAD DE UN METODO

ANALITICO

1. Pendiente de la Recta de Regresión (M)

$$M = \frac{N (\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{N \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

2. Intercepto (B)

$$B = \frac{(\Sigma Y)(\Sigma X^2) - (\Sigma X)(\Sigma XY)}{n \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

3. Coeficiente de Correlación (r)

$$r = \frac{N (\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{N (\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2 \quad N (\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2}$$

4. Error Típico de Estimación  $S_{y/x}$

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{n_1 - 1}{n_2 - 1} S_y^2 - (b^2 S_x^2)}$$

5. INFERENCIAS RESPECTO A LA ORDENADA AL ORIGEN.

Hipótesis a contrastar :

$$H_0 : a = A$$

$$H_A : a \neq A$$

donde  $A = 0$

Estadígrafo de contraste :

$$t \text{ cal.} = \frac{a - A}{S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}}$$

Decisión estadística:

$$\text{si } t_{\text{cal}} < t(0.975, n-2 \text{ gl})$$

$$\text{y } t_{\text{cal}} > t(0.025, n-2 \text{ gl})$$

Puede considerarse que estadísticamente  $a = 0$

Intervalo de confianza al 95% :

$$a \pm t_{1-\alpha/2} S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

## 6. INFERENCIAS RESPECTO A LA PENDIENTE

Hipótesis a contrastar :

$$H_0 : b = B$$

$$H_a : b \neq B$$

Donde  $B = 1$

Estadígrafo de contraste:

$$t_{cal} = \frac{(b - B) (S_{v \cdot x}) \sqrt{n-1}}{S_{y \cdot x}}$$

Decisión estadística :

Si  $t_{cal} < t (0.975, n-2 \text{ gl})$

y  $t_{cal} > t (0.025, n-2 \text{ gl})$

Puede considerarse que estadísticamente  $b = 1$

Intervalo de confianza al 95% :

$$b \pm t_{1-\alpha/2} \frac{S_{y/x}}{S_{y/x} \sqrt{n-1}}$$

Si ambas hipótesis, tanto para  $a$  como para  $b$  son aceptadas, el método se considera lineal.

## B. FALTA DE AJUSTE.

Modelo lineal Estadístico.

$$Y_{ij} = B_0 + D_i X_i + E_j(t)$$

$$i = 1 \dots \dots \dots t$$

$$j = 1 \dots \dots \dots n$$

Donde :

$B_0$  = Ordenada al origen

$B_i$  = Pendiente

$Y_{ij}$  = Observacion (mg recobrados) del  $i$ -ésimo tratamiento,  
(mg adicionados) de la  $j$ -ésima repetición.

$X_i$  =  $i$ -ésimo tratamiento (mg adicionados)

$E_j(t)$  = Error experimental de la  $j$ -ésima repetición dentro  
 $i$ -ésimo tratamiento.

Para la interpretación estadística se realizó un análisis de  
varianza para el modelo mencionado.



TABLA DE ANADEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
REGRESION	1	SCr	SCr	SCr/MCcr	
ERROR DE REGRESION	n-2	SCcr	SCcr/GLcr		
FALTA DE AJUSTE	(N-2) - tx(r-1)	SCfa	SCfa/GLfa	MCfa/MCep	
ERROR PURO	tx (R-1)	SCep	SCep/GLep		

Donde :

$$SCr = m \sum XY + b \sum Y - \frac{(\sum Y)^2}{n}$$

$$SCcr = \sum Y^2 - m \sum XY - b \sum Y$$

$$SCep = \sum Y^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{r}$$

$$SCfa = SCcr - SCep$$

Se determina los valores para  $F_{tablas}$  de la forma siguiente:

$$F ( GLr , GLcr ; 0.95)$$

$$F ( GLfa , GLep ; 0.95)$$

Area de aceptación :

$F_{cal} \geq F_{tab} \quad (GLr, GLer ; 0.95)$

$F_{cal} \leq F_{tab} \quad (GLfa, GLep ; 0.95)$

## C. FORMULAS PARA EVALUAR LA EXACTITUD DE UN METODO

### ANALITICO

Hipotesis a contrastar :  $H_0 : \mu = 100\%$

$H_a : \mu \neq 100\%$

Estadígrafo de contraste :

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{X} - \mu_0}{S / (n)^{1/2}}$$

Decisión estadística :

Si  $t_{\text{calc}} < t(0.975, n-1 \text{ gl})$

y  $t_{\text{calc}} > t(0.025, n-1 \text{ gl})$

El método se considera exacto.

Intervalo de confianza al 95%

$$\bar{X} \pm t_{1-\alpha/2} \frac{S}{(n)^{1/2}}$$

D. FORMULAS PARA EVALUAR LA PRECISION DE UN METODO

ANALITICO

1. Repetibilidad :

Hipótesis a contrastar :  $H_0 : \sigma \leq 1.5\%$

$H_a : \sigma > 1.5\%$

Estadigrafo de contraste :

$$X_{\text{cal}}^2 = \frac{(n-1) S^2}{\sigma^2}$$

Decision estadística :

$$\text{si } X_{\text{cal}}^2 \leq X_{\text{t}}^2 \text{ (0.975 , n-1 gl)}$$

El método se considera preciso en cuanto a repetibilidad.

Intervalo de confianza al 95%

$$\boxed{\frac{(n-1) S^2}{X^2 (1-\alpha/2)}} < \sigma < \boxed{\frac{(n-1) S^2}{X^2 (\alpha/2)}}$$

## 2. Reproducibilidad.

Modelo lineal estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + EK(ij)$$

donde:

$Y_{ijk}$  = Observación del  $i$ -ésimo analista del  $j$ -ésimo día de la  $k$ -ésima repetición.

$\mu$  = media general.

$A_i$  = Analista  $i$ -ésimo.

$D_j$  = día  $j$ -ésimo.

$EK(ij)$  = error experimental.

TABLA DE ANADEVIA

FUENTE DE VARIACION	G. L.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
$A_i$	$a-1$	$\frac{\sum Y^2_i}{br} - \frac{Y^2}{abr}$	$\frac{SCA_i}{a-1}$	$\frac{MCA}{MCE}$	
$D_j(i)$	$(b-1)a$	$\frac{\sum Y^2_{ij}}{r} - \frac{\sum Y^2_i}{br}$	$\frac{SCD_{ji}}{(b-1)a}$	$\frac{MCD_j}{MCE}$	
$EK(ij)$	$(r-1)ab$	$\frac{\sum \sum Y^2_{ijk}}{r} - \frac{\sum Y^2_{ij}}{br}$	$\frac{SCE}{(r-1)ab}$		

Area de aceptación :  $F_{cal} \leq F_{io.05}$

## E. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

t DUNNET

$$t = \frac{(Y_i/r) - 100}{\left[ (M - C_e) \frac{2}{r} \right]^{1/2}}$$

$$M C_e = \frac{S C_e}{(r-1)t}$$

$$S C_e = \sum Y^2 - \frac{\sum Y t^2}{r}$$

tiablas, con 12 y 24 g l ,  $\alpha = 0.05$

tiablas  $\pm 3$