

42
2oj.



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

Validación del método microbiológico
cilindro placa para la valoración
del ácido fólico.

TESIS CON
FALSA DE CRECEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ROSA MARIA PEREZ GOMEZ

MEXICO, D. F.,

1992



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.

INDICE

pág.

1. INTRODUCCION	
1.1. OBJETIVO	3
1.2. HIPOTESIS	5
1.3. DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS	6
1.3.1. Métodos Microbiológicos	9
1.3.1.1. Parámetros que afectan la respuesta.....	10
1.3.1.2. Características del microorganismo de ensayo	12
1.3.1.3. Requisitos para la preparación de medios de ensayo	13
1.3.1.3.1. Promoción de crecimiento para medios de cultivo	14
1.3.1.4. Preparación de la muestra	16
1.4. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	
1.4.1. Antecedentes de la validación	18
1.4.2. Definición de Validación	19
1.4.3. Parámetros	22
1.5. MONOGRAFIA DEL ACIDO FOLICO	
1.5.1. Propiedades fisicoquímicas	32
1.5.2. Funciones fisiológicas	35

1.5.3. Aspectos clínicos de la deficiencia de	
ácido fólico	37
2. PARTE EXPERIMENTAL	
2.1. Estandarización del ácido fólico	39
2.2. Método microbiológico.....	42
3. RESULTADOS	50
3.1. Discusión de resultados	56
4. CONCLUSIONES	59
5. PROPOSICIONES	60
6. BIBLIOGRAFIA	61

1. INTRODUCCION

La validación de métodos analíticos es una solución reciente a las necesidades de la Industria Farmacéutica considerada de gran importancia, ya que ayuda a solucionar los requerimientos de las empresas reforzando las tareas del control de calidad en sus aspectos físico, fisicoquímicos y microbiológicos.

Se debe siempre considerar el propósito del método y entonces seleccionar un diseño apropiado. Para evaluar el diseño seleccionado, los datos obtenidos a partir de varios experimentos se procesan por medios apropiados para dar una estimación de la potencia de cada muestra ensayada.

Los datos obtenidos fueron procesados para dar más información, incluyendo la estimación de la precisión de la potencia determinada así como la validez del método.

Se examinaron muestras de composición conocida para comparar la concentración conocida con la concentración encontrada. También se puede comparar un método de rutina con un método alternativo usando la misma muestra.

Estos procedimientos son igualmente aplicables para ensayos microbiológicos en los que la reproducibilidad no sea mucho menor que para algunos métodos químicos.

Los métodos microbiológicos para el ensayo de vitaminas se han desarrollado en cuanto a la medición de la respuesta

(producción de ácido por el microorganismo), en su modalidad acidimétricos. Este tipo de evaluación implica algunas desventajas, fundamentalmente en la duración del tiempo de incubación necesario para la obtención de resultados.

Por lo anterior y debido a la gran cantidad de polivitamínicos que se reciben en el Laboratorio Nacional de Referencia de la Secretaría de Salud para su valoración, se llevo a cabo la validación del método microbiológico difusión en agar para la valoración del ácido fólico (materia prima), ya que este método fue diseñado en el mismo laboratorio. Además de ser un método económico y no requerir de un equipo sofisticado.

1.1. OBJETIVO

Validar el método analítico, microbiológico difusión en agar, para la valoración del ácido fólico como materia prima, tomando como base los parámetros: linealidad, exactitud, precisión y especificidad.

Comprobar si hay efecto en la respuesta debido al ajuste del pH en la muestra.

Estandarización de la materia prima utilizada en esta validación por el método espectrofotométrico.

1.2. HIPOTESIS

Si las respuestas del ensayo presentan reproducibilidad, repetibilidad, exactitud y linealidad se puede considerar que se tiene un método analítico confiable.

1.3. DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS

Debido a la necesidad de un control de calidad tanto en producto terminado como en materia prima han sido diseñados métodos analíticos, para sustancias en particular.

Si el fármaco en cuestión ha sido estudiado extensivamente y existe información en la literatura, se pueden encontrar métodos de prueba satisfactorios. De no ser así, la estructura química del fármaco debe ser estudiada con el propósito de tener un método apropiado.

Para algunos fármacos, puede necesitarse resolver problemas especiales. Como por ejemplo, si la molécula no absorbe la radiación ultravioleta, el investigador se tendrá que dirigir a los problemas de detección; o si el fármaco puede descomponerse fácilmente en el almacenaje se tendrá que detectar productos de degradación. Además, los otros excipientes usados en la fabricación de la forma farmacéutica, a menudo presentan problemas, como la difícil separación de estos excipientes del principio activo por lo que se deben prevenir al mismo tiempo las interferencias para no estropear el sistema analítico. (9)

Después de revisar la literatura sobre métodos similares, probar algunos métodos y tal vez experimentar algunos de ellos, cuando el investigador llega a un método propuesto, este método puede ser probado usando muestras de una composición conocida para

determinar si de hecho es tan exacto, específico y preciso como el problema lo requiere. Si el método es reproducible, esto es que no este sujeto a variaciones día a día o de lugar a lugar, esto también debe ser considerado. El método tendrá que mostrar no solo buen desempeño en las manos del que lo desarrollo sino también debe ser aproximadamente tan efectivo cuando se use por otros analistas en otros laboratorios.

Las palabras usadas para describir un método de tal forma que pueda ser reproducido por otros, no es menos importante que la ciencia que se uso en su desarrollo; si la descripción es inadecuada, no se puede establecer la validez del método.

Además de la posibilidad de que las instrucciones escritas pueden fallar al comunicar el método de manera precisa, existe la posibilidad de que cualquier método analítico recién desarrollado carezca de tolerancia para dar resultados igualmente satisfactorios en las manos de diferentes analistas que trabajen en laboratorios diferentes. Un método con tolerancia es aquel que tiene amortiguadores integrados contra abusos típicos, esto es contra diferencias en el seguimiento de la técnica, el equipo y las condiciones a las que puede estar sujeto. En otras palabras, las desviaciones estandar relativas entre laboratorios solo serán ligeramente mayores que la desviación estandar relativa en un solo laboratorio. (7), (9)

Se incorporan muchos factores en el desarrollo de un método analítico claro. Primero, la documentación de los materiales, equipos y procedimientos deben ser comprensibles y estar completos. Segundo, los reactivos, las muestras y otros materiales requeridos para realizar el método deben estar disponibles en el laboratorio. Tercero, el método debe cumplir con ciertos estándares de exactitud, especificidad, precisión, y ser práctico. Finalmente el método debe tener un alto grado de tolerancia, produciendo resultados igualmente satisfactorios cuando es usado por diferentes investigadores en laboratorios diferentes. Una vez que se han cumplido esos requisitos, el método puede ser validado para uso general. (7), (9), (18)

1-3.1. Métodos Microbiológicos.

En los métodos microbiológicos se aprovecha la fisiología metabólica de determinados microorganismos. Además se basa en la observación de que algunas clases de bacterias, levaduras y hongos solamente pueden crecer y formar productos metabólicos en presencia de ciertas vitaminas. Si se trasladan estos microorganismos, apropiados como indicador de prueba para dichas vitaminas, a medios de cultivo de composición definida, que contienen todos los componentes necesarios para un crecimiento óptimo, menos la vitamina a determinar, no tiene lugar una multiplicación comparable de los microorganismos. En cambio, añadiendo la vitamina o un sustrato que la contiene, se produce un crecimiento que depende de la cantidad de vitamina presente, midiéndose cuantitativamente la respuesta. (13), (15)

Los dos métodos de ensayo microbiológico más comunmente usados son el método de difusión en agar y el método turbidimétrico. El fundamento de ambos métodos es la comparación cuantitativa del efecto de dos sustancias sobre el crecimiento de un microorganismo apropiado en un medio nutriente.

Las dos sustancias son un estándar y una muestra cuya potencia será determinada. El efecto puede ser para inhibir el crecimiento o para promover el crecimiento, como es el caso de vitaminas y aminoácidos. (11)

El ensayo microbiológico, difusión en agar para vitaminas, se basa en la respuesta que presenta un microorganismo a la acción de una vitamina, la cual se hace difundir a través de un gel nutriente inoculado con un microorganismo de prueba. La respuesta que se presenta es la promoción de crecimiento; esta respuesta deberá seguir una función directamente proporcional a la concentración del compuesto a probar y cumplir con las características de precisión, exactitud y linealidad del método, como se observa, el ensayo microbiológico plantea una problemática complicada pero no difícil de solventar, por lo que se deben definir los parámetros que afectan la respuesta. (13), (23)

Donde es importante considerar el planteamiento de Kavanagh * El ensayo de difusión no es un ensayo biológico. Es un método fisicoquímico en que un microorganismo es usado como un indicador. Mas las variaciones observadas son causadas por descuido de los aspectos fisicoquímicos y no por variación biológica *. (13)

1.3.1.1. Parámetros que afectan la respuesta

- a) Selección del organismo de prueba, cuya sensibilidad sea inherente al compuesto.
- b) Densidad del inoculo: la concentración del microorganismo seleccionado debe ser la adecuada y uniforme en el medio para obtener una respuesta reproducible del microorganismo indicador.

- c) **Formulación y condiciones del medio nutriente:** que el medio nutriente sea óptimo para el crecimiento del microorganismo de prueba.
- d) **Espesor de la capa de agar:** este es un punto muy importante pues se sabe que a un mayor grosor de capa, el diámetro de las zonas decrece y la sensibilidad del método disminuye.
- e) **Volumen de la solución de prueba aplicada a la capa:** este deberá ser lo suficientemente grande para actuar como un reservorio de concentración constante o deberá ser un volumen estandar, para no tener diferencias en la difusión de la muestra.
- f) **Tiempo de aplicación de la solución de prueba:** si el estandar y el problema se aplican a distintos tiempos la difusión de ambos será diferente y por lo tanto variara la respuesta.
- g) **Temperatura de incubación:** habrá que seleccionar la temperatura adecuada de crecimiento más uniforme, donde la relación dosis-respuesta sea la mejor.
- h) **Peso molecular de la muestra.**
- i) **Concentración de iones (+) en el agar.**

1.3.1.2. Características del microorganismo de ensayo

Como microorganismos de ensayo solo pueden utilizarse aquellos que se multiplican en dependencia absoluta del factor de crecimiento, la vitamina, y no son capaces de sintetizarlo ni de sustituirlo por otra sustancia diferente. El microorganismo de ensayo ha de poseer un metabolismo activo, para que sea posible realizar la determinación en poco tiempo. (13)

La relación dosis-respuesta en lo posible debe ser lineal, extendiéndose en una zona de concentraciones no demasiado estrecha ni amplia. Además el microorganismo de ensayo no debe ser patógeno. (13)

Para conservar la sensibilidad de las cepas de ensayo se recomienda mantenerlas en medios de cultivo que cubran los requerimientos mínimos, por contener cantidades suficientes de todas las sustancias esenciales para el crecimiento de las respectivas cepas de ensayo, incluyendo las vitaminas que han de determinarse. A intervalos regulares de 2 a 4 semanas se resiembra en medios de cultivos frescos. Para la preparación del inoculo en la determinación de vitaminas ha resultado conveniente en algunos microorganismos la resiembra en un medio que contenga la respectiva vitamina en la cantidad mínima suficiente para garantizar un crecimiento adecuado. De esta forma se evita el enriquecimiento de vitamina en el microorganismo. Las cepas

* racionadas * de este modo suelen proporcionar en el ensayo de la vitamina una curva dosis-respuesta más aguda y por consiguiente, una determinación más exacta. (15)

1.3.1.3. Requisitos para la preparación de medios de ensayo

Los medios de ensayo son medios de cultivo de composición definida que contienen todos los componentes necesarios para el crecimiento del microorganismo, menos la vitamina que ha de determinarse.

El agua empleada para preparar los medios de ensayo debe ser absolutamente pura, es decir, sobretodo exenta de oligoelementos y vitaminas interferentes. Se recomienda por lo tanto prepararla mediante destilación doble en instalaciones de cuarzo. (15)

Los medios de ensayo siempre deben ser de preparación reciente, utilizándose el mismo día de su preparación. El material de vidrio requerido para ello, después de la limpieza corriente ha de dejarse en un baño de ácido durante la noche, enjuagándose luego bien con agua bidestilada. Los utensilios han de someterse a una esterilización con aire caliente a 200 grados C. durante 1 hora como mínimo.

1.3.1.3-1. Promoción de crecimiento para medios de cultivo

El objetivo de la promoción de crecimiento consiste en demostrar que los diferentes tipos de medios de cultivo cumplan con el fin para el cual fueron diseñados. Esto debe aplicarse a todos los lotes de medios de cultivo que se emplean en la industria químico farmacéutica. (10)

Los microorganismos empleados en las pruebas de promoción de crecimiento deben formar parte de la colección de cada laboratorio y estar identificadas con la clave del cepario de procedencia. La selección de ellos depende del tipo del medio de cultivo por estudiar.

Los medios de cultivo selectivos y diferenciales, deben probarse con un microorganismo que fermente la lactosa, uno que no la fermente y otro que sea inhibido.

Si el medio pretende inhibir o promover el crecimiento específicamente de un cierto microorganismo o un grupo de ellos incluirlos en el ensayo, en tales casos debe observarse tanto la intensidad del desarrollo de los microorganismos deseables como las características de sus colonias (tamaño, color, etc.).

Para determinar el grado de inhibición que muestre el lote ensayado, incluir simultáneamente en la prueba un medio no inhibitorio como el agar soya tripticaseína (AST).

Los cultivos empleados deben ser recientes de 18 a 24 horas.

para bacterias; 24 a 48 hrs. para hongos levaduriformes, y de 7 a 28 días para hongos filamentosos. La temperatura de incubación será la óptima para el microorganismo que se trate. (10)

En cuanto a los medios de cultivo sólidos que se utilizan en el aislamiento, selección e identificación de los microorganismos, la técnica de la gota de Miles-Mishra es la apropiada para demostrar la capacidad de promoción de crecimiento y las propiedades selectivas y diferenciales de los medios de cultivo.

Criterios de aceptación.

-Si los medios de cultivo permiten el crecimiento de los microorganismos de prueba y estos además presentan las características morfológicas y fisiológicas esperadas, el o los lotes de medio de cultivo se aprueban para su uso.

-Si los medios de cultivo de prueba no presentan desarrollo y este se manifiesta en las placas testigo, el medio de cultivo no debe utilizarse.

-Si el número de microorganismos encontrados en los medios de prueba no corresponden a lo esperado (50-75 % de recuperación frente al medio de control AST), el medio de cultivo no debe aprobarse para su uso.

1.3-1-4. Preparación de la muestra

Las vitaminas a determinar pueden presentarse en forma libre o bien combinada. Prescindiendo de unas pocas excepciones, los microorganismos no son capaces de liberarlas de los compuestos o conjugados de alto peso molecular. Por consiguiente, el material de examen orgánico ha de tratarse previamente por hidrólisis.

El método más sencillo de disgregación se obtiene calentando la muestra en agua o solución tampón.

En muchos casos sin embargo no es suficiente este método para liberar la vitamina combinada, sino que es necesaria una hidrólisis ácida o alcalina, siempre que lo permita la estabilidad de las vitaminas que han de determinarse. En otros casos solo se libera lo suficiente con la ayuda de enzimas. (15)

Se diluye la solución problema o el extracto de la muestra, a una concentración apropiada y la potencia de muestras desconocidas pueden ser determinadas por medición de la respuesta y leída de una curva dosis-respuesta.

Las características específicas de la relación rectilinea-logaritmo, dosis-respuesta son:

- La línea de respuesta de cualquier otra sustancia cualitativamente idéntica deberá ser paralela a la del estándar de donde la pendiente puede ser medida no solamente del estándar sino también de la muestra.

-Es esencial tener por lo menos dos niveles de dosis para estimar la pendiente de la línea de respuesta, en contraste con la respuesta lineal aritmética, donde una observación y el origen son suficientes. (11)

1.4. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

1.4.1. Antecedentes de la Validación

Desde el punto de vista regulatorio los orígenes de la validación en los Estados Unidos de Norte América en la década de los 70's, buscaba verificar en forma documentada la confiabilidad de las técnicas analíticas.

En la revisión de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) de 1976, la FDA (Administración de Drogas y Alimentos) menciona por primera vez el concepto de validación aplicado a procesos. Dado el interés despertado por el tema, la FDA decide establecer directrices de tipo informativo para orientar acerca de la validación de procesos farmacéuticos en un sentido general. (7)

En 1979 las BPM para productos farmacéuticos incluyen en dos secciones la necesidad de la validación.

A partir de 1985 la FDA considera que todo proceso que no este validado se encuentra fuera de control. Basandose en los antecedentes ya establecidos por los Estados Unidos de Norte América, otros países empiezan a adoptar esta medida de control.(8)

Actualmente en nuestro país las Autoridades Sanitarias, Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud (SSA), junto con un grupo de responsables de los Departamentos de Desarrollo

Farmacéutico, Control de Calidad de la Industria y profesores universitarios unificaron criterios para elaborar una guía oficial, que tiene como objetivo uniformizar los procedimientos para llevar a cabo la validación de la metodología analítica. (3)

La Industria Farmacéutica esta especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados.

1.4.2. Definición de Validación para métodos analíticos.

Es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. (3)

La validación es esencial para asegurar que un procedimiento analítico es adecuado para un problema específico para cuya solución se usara. No solo el procedimiento analítico, sino el sistema analítico completo debe mostrar que proporciona resultados consistentes bajo cualquier circunstancia en que se use. La capacidad se expresa en este caso en términos de parámetros analíticos. El proceso de validación de un método en particular esta basada en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición. (18)

Más que simplemente una medida de un procedimiento, el método

de validación es una medida de la eficiencia de un sistema analítico total. Esta validación del sistema en su realización es parte de la prueba de conveniencia del sistema, en la cual se toman en consideración todos los parámetros con el fin de establecer como actúan en una prueba dada. Por lo tanto se debe asegurar que el método, los instrumentos, los solventes, los reactivos y todo lo demás usado durante el experimento, sean los adecuados para el fármaco que se está analizando.

Así cualquier variación en el procedimiento debe ser documentado y sometido a la validación apropiada.

La aproximación clásica a la validación de la metodología analítica es analizar las muestras de referencia que sean similares en todos los aspectos a la muestra de prueba y comparar los resultados con los valores esperados o certificados. El placebo cargado o métodos estandar de adición se pueden usar como referencias al determinar la exactitud de las pruebas del producto. En el método de recuperación del placebo cargado, se agrega ingrediente activo puro a la mezcla de excipientes del producto, teniendo cuidado de no incluir excipientes que tengan actividad similar al principio activo de interés, la mezcla resultante se examina y compara con el resultado esperado. En la adición estandar, una mezcla a la cual se le agrega una cantidad conocida de un estandar, se examina. La diferencia entre la

muestra así obtenida y la muestra original es una medida del estandar que no se recupero por medio del examen. En ambos métodos la recuperación se define como la proporción de la cantidad del estandar obtenido por medio de la prueba a la cantidad del estandar agregado. Si se conoce la composición de la muestra de referencia, el procedimiento puede probarse en su exactitud y presición. (7)

1.4.3. Parámetros

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad.

Los criterios que se tomaron en cuenta para clasificar la validación se presentan en dos tipos, los cuales no son mutuamente excluyentes y de acuerdo a la estructura del diseño de validación se pueden combinar.

a. Retrospectivo.

-Retrospectivo Normal. Estudio cuya información se obtuvo anteriormente a su planeación con fines ajenos a la validación que se pretende realizar.

-Retrospectivo Parcial. Estudio que cuenta con una parte de la información y el resto esta por obtenerse.

b. Prospectivo.

-Prospectivo Normal. Estudio en el que toda la información se recopilará de acuerdo con los criterios del investigador y para los fines específicos de la investigación después del planeamiento de este.

-Concurrente. Es un tipo de validación prospectiva que se aplica exclusivamente en productos y métodos que se realizan esporádicamente.

-Revalidación. Es la repetición parcial o total de un programa

de validación, cuyo arreglo corresponde al grado de las alteraciones introducidas en el procedimiento ya validado. El procedimiento es el mismo que para una validación prospectiva, pero los controles se realizan en las área donde se hayan efectuado los cambios.

Parámetros para la validación de los métodos analíticos para análisis de rutina en formas farmacéuticas:

1.4.3.1 Linealidad.

La linealidad del sistema de un método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

Cuando se evalúa un método de análisis es necesario verificar que se obtengan resultados correlacionados linealmente, de los análisis de las muestras a contenidos diferentes.

El rango de trabajo (linealidad de la muestra) indica que concentración de la muestra puede determinarse por el método sin cambio en las diluciones especificadas en el mismo y operando bajo las mismas condiciones.

- Se determina construyendo una curva de calibración de una misma

solución patrón, utilizando cuando menos 3 diluciones y haciendo análisis por duplicado para cada dilución.

- El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método. Para propósitos de Control de Calidad como en este caso se utilizaron para materia prima solamente concentraciones del 80, 100 y 120 % .

En una forma farmacéutica (placebo cargado) es recomendable utilizar concentraciones del 50, 100, 120 y 150% del valor esperado.

- Hacer la representación gráfica de la curva.

- Cálculos: media (\bar{X}), desviación estandar (DE), desviación estandar relativa (DER), pendiente (B), coeficiente de correlación (r), error estandar de regresión (r^2), ordenada al origen (A). (apéndice a-3)

Criterios de Evaluación.

DER : < 0.7 %

r : > 0.99

r^2 : > 0.98

B : = 1

A : = 0

El método se llamara lineal si cumple satisfactoriamente con lo anterior o cuando la desviación de la linealidad no afecte los resultados con la región de análisis usual $\pm 1\%$. (1),(18),(3)

1.4.3-2. Precisión del Método

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos, de una muestra homogénea del producto.

Se refiere a la semejanza de análisis sobre una misma muestra. Se expresa comunmente en términos de desviación estandar de una serie de resultados sobre una misma muestra, o del coeficiente de variación.

Las mediciones de la precisión deben de calificarse en términos de posibles fuentes de variabilidad estas son Repetibilidad y Reproducibilidad.

1.4.3-2.1. Repetibilidad

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia o conformidad obtenida entre determinaciones independientes, realizadas por un solo analista, usando las mismas condiciones (aparatos, laboratorio, técnicas, días, etc.).

La inferencia estadística para evaluar repetibilidad involucra el cálculo del estadígrafo de prueba X_1 , donde σ^2 es la varianza poblacional y representa la variabilidad del método.

-Se determina por el análisis de 6 - 10 muestras con placebo adicionados del principio activo (placebos cargados), correspon-

dientes al 100 % establecido en la linealidad del método.

-Cálculos: Porcentaje de recobro, desviación estandar, desviación estandar relativa, coeficiente de variación, intervalo de confianza.(apéndice a-2)

Criterio de Evaluación

El CV expresa en porcentaje la desviación del método y permite comparar diversas muestras entre si a pesar de que tengan medias diferentes.

El valor del CV obtenido a partir de los datos, debe ser menor o igual al CV elegido al inicio del proyecto.

1.4.3.2.2. Reproducibilidad

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia o la conformidad entre determinaciones independientes realizadas con el mismo método o prueba, utilizando diferentes analistas, días, aparatos, laboratorio.

La reproducibilidad podrá evaluarse del mismo modo que para la repetibilidad solo que repitiendo las mismas determinaciones por otro analista, equipo o laboratorio.

Es importante evaluar la influencia de la variabilidad debida al procedimiento de manufactura en el método, cuando se analicen cantidades conocidas adicionadas del principio activo a un placebo con respecto al análisis del producto, pues la adición del

ingrediente incluye un error experimental distinto a la variabilidad inherente en cada muestra del producto de ensayo.

Esta variabilidad puede evaluarse conjuntamente con la reproducibilidad del método por lo que se preparara el producto de acuerdo al procedimiento de manufactura normal con cantidades perfectamente conocidas y analizandolas por diferentes analistas (si se trata de reproducibilidad interanalista) en el mismo equipo en diferentes días.

La evaluación de la reproducibilidad se hace en virtud de una tabla de análisis de varianza (ANADEV). El análisis de varianza se basa en una descomposición o partición aritmética de la suma de cuadrados (SC); suma de cuadrados de las desviaciones de los valores de la muestra y la media de la misma.

En un arreglo experimental doble, o experimento para dos factores (en dos direcciones), nos interesamos por el efecto de 2 factores (diferente analista y diferente día, etc.) y por lo tanto descomponemos la suma de cuadrados en 3 partes, que corresponden a los dos factores que se investigan y a la variación aleatoria. (apéndice a-4)

Criterio de Aceptación.

Los valores para el coeficiente de variación a tomar en cuenta para evaluar la reproducibilidad del método analítico microbiológico es de 5 % .

Se busca que no exista efecto por analista, día o interacción analista/día. Para que el método sea reproducible deben cumplirse las 3 condiciones. (3), (18)

1.4.3.3. Exactitud del Método

Se refiere a la diferencia entre la media de una serie de resultados y el valor real.

Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del principio activo.

Las condiciones en las que el experimento debe efectuarse son, misma muestra, analista, día, laboratorio. Si el método es exacto en condiciones controladas debe serlo en condiciones de rutina.

Su estimación esta asociada con el error total:

Error total= Error ideterminado + Error determinado.

La inferencia estadística para evaluar la exactitud del método, involucra el cálculo del estadígrafo de contraste * t * de studente.

Donde μ es la media poblacional y representa la variabilidad del método (que tanto se acerca al valor central).

-Se determina por el análisis de 6 - 10 muestras con placebos adicionados del principio activo correspondiente al 100% de la

concentración.

-Calcular el porcentaje de recobro, desviación estandar, media porcentual μ (del porcentaje de recobro) desviación estandar relativa, intervalo de confianza. (apéndice a-1)

Criterio de Evaluación

El coeficiente de variación se elegirá en base al método de análisis, y cuanta exactitud se le exija al método.

1.4.3.4. Especificidad

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida a una sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Es la medida del grado de interferencia (o ausencia de), en el análisis de muestras complejas.

Las interferencias pueden deberse a productos de degradación del principio activo, a impurezas en la materia prima (productos de síntesis) o sustancias ajenas resultantes de una contaminación cruzada durante la fabricación del producto.

Se sugiere que la degradación sea tal, que la sustancia en estudio este disminuida del 10 al 25% con respecto a la original. Para sustancias cuyo punto de fusión se encuentra arriba de 200 grados centígrados, se exige un mínimo de 50% . (3) , (18)

Criterio de Evaluación.

Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

Ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

1.4.3.5. Tolerancia.

Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenido por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), cuidados en el método, equipo, condiciones ambientales, etc.-.

Se realiza de la misma forma que la reproducibilidad pero variando las condiciones, dependiendo de los objetivos que se persigan.

Para evaluar los demás puntos considerados en la validación, criterios de evaluación, evaluación estadística y la documentación necesaria, se realiza un procedimiento similar que para reproducibilidad del método.

Para llevar a cabo esta prueba, debe consultarse al coordinador de la validación encargado del proyecto para que se

planteen las condiciones necesarias, así como el tipo de diseños experimentales utilizados. (3), (5), (8)

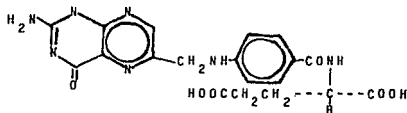
1.5. MONOGRAFIA DEL ACIDO FOLICO.

Los compuestos con actividad relacionada al ácido fólico contienen siempre una o varias moléculas de ácido glutámico que son condición para su actividad biológica. El ácido fólico comercial propiamente dicho solo tiene un resto de ácido glutámico; el ácido fólico se llama también ácido pteroilglutámico. (12)

En la naturaleza el ácido fólico se encuentra principalmente como conjugado; en concentraciones mínimas aparece en casi todas las células vivas. Los conjugados del ácido fólico se encuentra en el hígado, riñón, músculo (vacuno), leche, queso, verduras de hoja oscura (espinaca en forma libre), coliflor, leguminosas, patatas crudas y germen de trigo.

1.5.1. Propiedades Fisicoquímicas.

Fórmula estructural



Fórmula empírica	C ₁₉ H ₁₉ O ₆ N ₇
Peso Molecular	441.4
Descripción	Polvo cristalino amarillo-anaranjado.
Solubilidad	Fácilmente soluble en álcalis y ácidos diluidos, muy poco soluble en agua, insoluble en alcohol y eter, acetona y cloroformo.
Punto de fusión	A 250° C el compuesto comienza a decolorarse y luego a carbonizarse.
Rotación específica	$(\alpha)_D^{20} = \text{aprox. } \pm 20^\circ$ (c = 0.5 NaOH 0.1 N).
Espectro de absorción	El ácido fólico tiene un espectro de absorción característico que depende del pH de la solución. En NaOH 0.1 N los máximos están en 256, 283 y 365 nm.
Estabilidad	La forma cristalina es bastante

estable al aire y al calor, pero la destruyen la luz y los rayos ultravioleta. Las soluciones neutras son relativamente estables; pero los ácidos y álcalis así como los oxidantes y reductores lo destruyen.

Los métodos de determinación del ácido fólico en medios de composición sencilla son:

-Medición de absorción de la luz en una solución alcalina en los máximos de absorción (286, 283, y 365 nm).

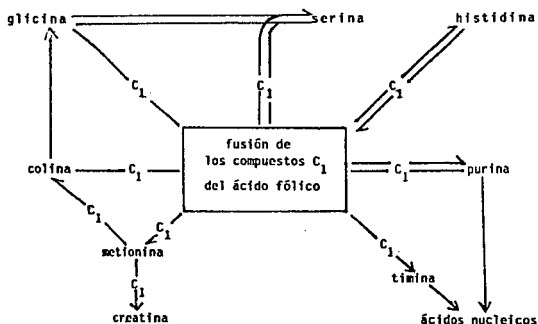
-Reacción Polarográfica.

-Determinación del componente del ácido p-aminobenzoilglutámico o de pteridina después del desdoblamiento oxidativo o reductivo mediante métodos espectrofotométricos o fluorométricos.

Para la determinación del ácido fólico en mezclas complejas todavía no existen métodos estandar de uso general. La liberación del ácido fólico del material de análisis ha de realizarse con sumo cuidado, empleandose generalmente enzimas. El ácido fólico mismo se determina microbiológicamente mediante Lactobacillus casei, Streptococcus faecalis o Tetrahimena geleii.

1-5-2. Funciones Fisiológicas

El Acido fólico, como ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico es indispensable para las transformaciones de los compuestos monocarbonados (C1) que aparecen en el metabolismo.



Los restos de C1 pueden formarse bien en la degradación de purinas e histidina, por el desdoblamiento oxidativo de glicina, activación de formiato libre u oxidación de * formaldehído activado *, en el desdoblamiento del átomo de B-carbono de la serina formando glicina, en la activación del formaldehído libre o por reducción de *ácido fórmico activado*. La función fisiológica importante del ácido tetrahidrofólico consiste, en convertir los restos del C1, por unión a la molécula de vitamina, en * ácido

fórmico activado *, o * formaldehído activado *, para que estos se transformen mutuamente por reducción u oxidación y pueden transportarse a aceptores adecuados. Gracias a estas importantes series de reacciones, puede el organismo disponer de los compuestos C1 para una serie de reacciones de biosíntesis; incorporación a las bases de purina y a la histidina; transporte del * formaldehído activado * a la glicina para formar serina; formación de metionina colina, timina y metilnicotinamida por metilación de sus correspondientes precursores.

Las bases de purinas (adenina, guanina) así como la timina son importantes elementos para la formación de los ácidos nucleicos. Por lo tanto una carencia de ácido fólico produce graves trastornos en la biosíntesis de los ácidos nucleicos indispensables para la formación celular. El ácido formiminoglútamico que se forma en la degradación de la histidina como fase intermedia no puede convertirse ya totalmente en ácido glutámico y ácido formiminotetrahidrofólico cuando hay carencia de ácido fólico y por lo tanto se elimina con la orina.

Por esa razón la eliminación de ácido formiminoglútamico permite hacer el diagnóstico bioquímico de una carencia de ácido fólico, sobre todo porque ese síntoma se manifiesta ya en una etapa inicial de la carencia.

La vitamina B12 esta también estrechamente ligada a los procesos reactivos del metabolismo intermediario que dependen del

ácido fólico. Hay razones para suponer que la vitamina B12 a través de la enzima ácido-hidroxi metiltetrahidrofólico dehidrogenasa, participa en la transformación mutua, por oxidación o reducción, del * formaldehído activado * y * ácido fórmico activado * .

1.5.3. Aspectos Clínicos de la Deficiencia de Ácido Fólico.

La carencia de ácido fólico ocurre en determinadas ocasiones en el hombre y en animales, debido a una administración insuficiente con el alimento, a la destrucción de la flora intestinal (por ejemplo, por sulfonamidas y antibióticos) y a los trastornos por la absorción. La carencia avanzada de ácido fólico se manifiesta siempre por alteraciones del cuadro hemático (anemia megaloblástica en el hombre). Los trastornos son especialmente marcados cuando existe a la vez carencia de ácido fólico y de vitamina B12. Otros síntomas son los trastornos de la mucosa bucal y gastrointestinales que dan lugar a diarrea.

Como la flora intestinal del hombre y de los mamíferos sintetiza ácido fólico, la alimentación que no contiene ácido fólico no produce síntomas carenciales y ello dificulta la determinación de las necesidades. Sobre la base de la administración de cantidades terapéuticas de ácido fólico en la anemia megaloblástica de origen alimentario se calcularon las necesidades

diarias para el hombre adulto en 0.5-1 mg.

Durante el embarazo y la lactancia hay que calcular un aumento de las necesidades de aproximadamente 5 mg. (12)

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Método utilizado para la estandarización del Acido Fólico

Material

Matraces aforados de 100 ml	pyrex
Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml	pyrex
Tubos de centrifuga con tapón de 50 ml	pyrex

Equipo

Centrífuga Equipement Company Mod. V 16
Espectrofotómetro Perkin Elmer 552A

Soluciones Reactivo

Permanganato de Potasio	1:250	p/v
Nitrito de Sodio	1:50	p/v
Acido Clorhídrico	5 N	
Sulfamato de Amonio	1:20	p/v
N-1-Naftiletilemidiamino Dihidrocloruro	1:1000	p/v
Cloruro de Sodio		
Alcohol Isobutílico		
Solución de Fosfato de Potasio Dibásico	1:33	p/v
Hidróxido de Amonio TS		

Método Analítico

Preparación del estandar

Disolver con agitación suave, aproximadamente 50 mg de estandar de referencia del ácido fólico USP, pesado exactamente, en una mezcla de 50 ml de agua y 2 ml de Hidróxido de Amonio TS- en un matraz volumétrico de 100 ml, cuando este disuelto completamente aforar con agua y mezclar. Adicionar unas gotas de tolueno como preservativo, almacenar en refrigeración y protegido de la luz.

El día del ensayo, diluir una alícuota de la solución concentrada del estandar con una solución de fosfato de potasio dibásico 1:33 p/v para obtener una concentración de 10 mcg/ml, calculado sobre base anhidra.

Preparación de la muestra

Disolver aproximadamente 50 mg de ácido fólico, pesado exactamente, como se indica para el estandar y diluir directamente con la solución de fosfato de potasio dibásico 1:33 p/v para dar la concentración de aproximadamente 10 mcg/ml.

Prepare 4 tubos de centrifuga con tapa, de 50 ml marcados respectivamente 1,2,3,y 4. Adicionar los reactivos como se indica a continuación y mezclar.

A cada tubo adicionar 5 ml de la solución de ensayo a los

tubos 2 y 4 adicionar 2 ml de la solución estandar. En los tubos 1 y 2 adicionar 1 ml de Permanganato de Potasio 1:250 p/v y a los tubos 3 y 4 adicionar 1 ml de agua. Dejando reposar de 2 a 3 minutos.

De aquí en adelante tratar todos los tubos de igual forma. Adicionar 1 ml de la solución de Nitrito de Sodio 1:50 p/v y 1 ml de Acido Clorhídrico 5 N, mezclar y dejar reposar por 2 minutos. Entonces adicionar 1 ml de solución de Sulfamato de Amonio 1:20 p/v, y mezclar en forma rotatoria, hasta que practicamente todo el dióxido de Nitrógeno se haya expulsado. Adicionar 1 ml de solución de N-1-Naftiletilenadimina Dihidrocloruro 1:100 p /v, mezclar y dejar reposar por 10 min.. Adicionar 4 g de Cloruro de Sodio y 10 ml de Alcohol isobutílico; agitar vigorosamente por 2 minutos y centrifugar. Determinar la absorbancia de la capa sobrenadante de cada tubo a un máximo de 550 nm, en un espectrofotómetro apropiado, usando Alcohol isobutílico como blanco. Calcular la cantidad en mg de Acido Fólico en cada ml de la preparación de ensayo con la siguiente fórmula:

$$0.4C (A1-A3) / (A2 + A3 - A1 - A4)$$

En donde C es la concentración, en mcg por ml, de Acido Fólico en la preparación estandar, A2, A3 y A4 indican las absorbancias de la solución en los tubos respectivos indicados por los subíndices.

2.2. Método Microbiológico

Material

Cajas petri de 100 x 20 mm con tapa de porcelana porosa pyrex

Cilindros de acero inoxidable, con diámetro exterior de 8mm (+ 0.1 mm), diámetro interior de 6 mm (+ 0.1 mm) y longitud de 10 mm (+ 0.1 mm).

Pipetas pasteur.

Pipetas graduadas de 25 y 1 ml pyrex

Matraces Erlenmeyer de 500 o 1000 ml pyrex

Probeta de 50 ml kimax

Nota: El material anteriormente mencionado debe estar estéril en el momento de su uso.

Vasos de precipitado de 250 o 400 ml pyrex

Matraces volumétricos de 50, 100, y 200 ml pyrex

Embudos de filtración pyrex

Pipetas graduadas de 5 ml kimax

Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml pyrex

Equipo

Incubadora a 37 grados centigrados
Centrífuga Equipement Company Mod. V 16
Potenciómetro Perkin Elmer Lambda 3A UV/VIS
Medidor de Halos Fisher y Lilly
Autoclave Steel L 21

Soluciones Reactivo

Hidróxido de Amonio	2:3 v/v
Acido Acético	0.02 N
Acetato de Sodio	0.02 N

2.2.1. Método Analítico.

Preparación del inculo:

- Microorganismo de prueba: Streptococcus faecalis ATCC 8043.
- Medio de mantenimiento: Agar medio de cultivo No. 1
- Medio de enriquecimiento: Caldo de enriquecimiento.
- Medio para el ensayo: Medio para ensayo del ácido fólico.

Una asada de S. faecalis, el cual se mantiene por picadura en tubos de agar medio No. 1, se pasa a un tubo de caldo de enriquecimiento y se incuba de 35 a 37 grados centigrados de 18 a 24 horas. Se centrifuga a 2500 rpm, durante 10 minutos. y lavar

2 veces el microorganismo con 10 ml de solución salina estéril al 0.85%, resuspender en el 3er lavado con solución salina.

Preparación del medio para ensayo:

Se pesan 7.5 g de caldo para ensayo de Ácido Fólico, por cada 100 ml de caldo que se requiera, adicionar 1.5 g de agar y disolver a fuego lento. Dejar hervir durante 2-3 minutos. Esterilizar por 10 minutos a 15 libras de presión.

Preparación de la solución estandar:

a. Pesar cuidadosamente la cantidad necesaria de estandar de ácido fólico previamente secado según especificaciones de la USP, (22) preparar una solución concentrada conteniendo una potencia de 100 mcg/ml. Transferir a un matraz aforado de 100 ml y disolver con 2 ml de solución de Hidróxido de Amonio 2:3 v/v, aforar con agua destilada; conservar esta solución en refrigeración y usar por un período que no exceda de 20 días.

b. El día del ensayo preparar diluciones de la solución estandar concentrada, dichas diluciones deberán contener concentraciones de 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 mcg/ml.

Las soluciones de 0.5 y 0.25 son usadas como punto de referencia.

Preparación de la muestra:

Pesar la cantidad necesaria de muestra, adicionar 30 ml de agua destilada estéril y 2 ml de la solución de hidróxido de amonio, hidrolizar durante 15 minutos a 15 libras de presión. Enfriar y hacer las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 0.5 y 0.25 mcg/ml.

Ajustar el pH en las diluciones finales a 6.8, tanto en el estandar como en la muestra, con Acido Acético o Acetato de Sodio 0.02 N.

Inoculación del medio de ensayo:

El día del ensayo, inocular en el area aséptica. el medio de ensayo para la determinación del Acido Fólico (previamente preparado y enfriado, aproximadamente a 48 grados centígrados), usando el inóculo en una proporción de 5 ml por cada 100 ml de medio.

Preparación de las placas:

Preparar 8 placas para la curva estandar y 4 placas para cada muestra en ensayo en la siguiente forma:

1. Adicionar una alícuota de 15 ml del medio inoculado al 5%, a cada placa y dejar solidificar.
2. Colocar 4 cilindros sobre cada una de las placas, con pinzas

previamente estériles (no se utiliza el colocador de cilindros ya que este es un diseño 2 + 2, donde solo son necesarios 4 cilindros en forma bien distribuida en la placa).

3. En las placas para la curva estandar llenar cada uno de los cilindros con cada una de las cuatro diferentes concentraciones respectivamente, (1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 mcg/ml) en orden decreciente y siguiendo el sentido de las manecillas del reloj.

4. En las placas para la muestra, llenar dos cilindros opuestos con solución estandar en cada una de las 4 placas, y los 2 cilindros restantes con la muestra en ensayo, a las mismas concentraciones de 0.5 y 0.25 mcg/ml respectivamente.

5. Cubrir las placas, marcar para su identificación y colocar en una incubadora a 37 grados centígrados durante 18 horas.

6. Retirar los cilindros y medir las zonas de crecimiento resultantes con una regla o un lector de zonas de crecimiento. Recopilar los datos en protocolos adecuados y calcular la potencia de cada muestra.

Cálculos:

1. Obtener el diámetro promedio de las zonas de crecimiento para cada concentración de la curva estandar, a partir de estos valores calcular la línea más apropiada y representativa de la curva dosis respuesta, por el método de los mínimos cuadrados. Trazar la línea calculada en la gráfica dosis-respuesta, sobre papel semilog.

Gráficar en el eje de las abcisas las concentraciones del estandar.

2. Calcular el diámetro promedio de las zonas para ambos puntos, el desconocido (muestra) y el de referencia (estandar) para cada grupo de 4 placas de la muestra.

3. Corregir el tamaño promedio de la zona de crecimiento para la muestra desconocida, adicionando o sustrayendo la diferencia resultante entre el tamaño promedio de las zonas de referencia de las placas conteniendo la muestra y el valor teórico para el estandar de 0.5 y 0.25 mcg/ml de la curva de respuesta trazada.

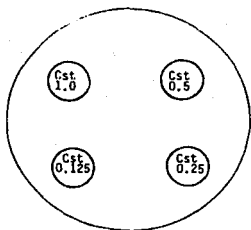


Fig. 1a: En esta figura se muestra como son colocados y llenados los cilindros para obtener la curva estandar.

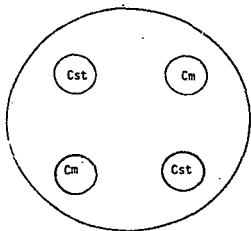
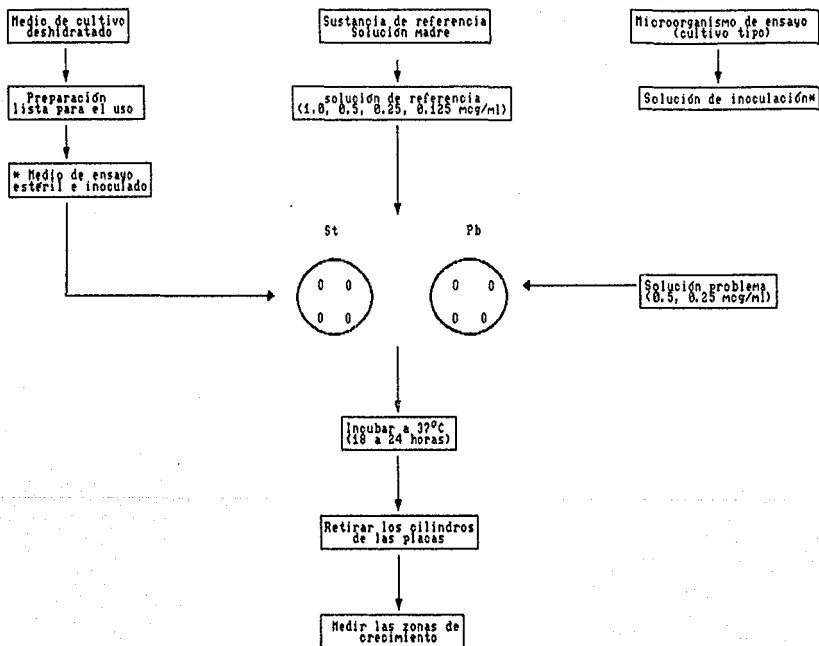


Fig. 1b: En esta forma son llenados los cilindros para obtener los valores de las zonas de crecimiento para la muestra, donde Cst = concentraciones centrales del estandar de referencia (0.5 o 0.25) y Cm = concentración de la muestra problema. Cst y Cm deben ser llevadas a las mismas concentraciones.

ESQUEMA DEL ENSAYO



3. RESULTADOS

Exactitud y Precisión

	mg pesados	mg encontrados	% recobro
1	10.00	10.00	100.00
2	10.00	10.00	100.00
3	10.00	9.91	99.13
4	10.00	9.91	99.10
5	10.00	9.92	99.20
6	10.00	10.00	100.00
7	10.00	10.00	100.00
8	10.00	9.92	99.20
9	10.00	9.91	99.10
10	10.00	10.09	100.90
	$\Sigma y = 996.63$	$\bar{y} = 99.66$	$CV = 0.61$
	$\Sigma y^2 = 99330.46$	$s = 0.608$	

Tabla No. 1: Cuantificación del Acido Fólico para la evaluación estadística de la exactitud del método (apéndice a-1).

Exactitud

area de aceptación para la exactitud del método

$$-2.262 < -1.92 < 2.262$$

Intervalo de confianza

$$100.06 < \mu < 99.195$$

Precisión

De los resultados de la tabla No. 1 (apéndice a-2).

$$\chi_1^2 = 2.7 < \chi_1^2 \text{ calc.} = 3.696 < \chi_1^2 = 19.023$$

9,0.025 9,0.975

hay suficiente evidencia para decir que el método es preciso con un nivel de significancia de 5 %.

Intervalo de confianza:

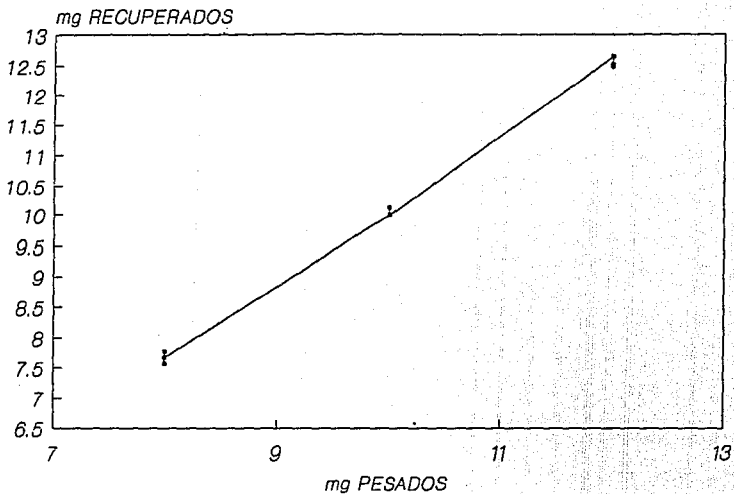
$$0.1063 < \sigma < 1.232$$

Linealidad del Método

mg pesados	mg recuperados
8.0	7.677
8.0	7.569
8.0	7.772
8.0	7.677
10.0	10.000
10.0	10.134
10.0	10.142
10.0	10.000
12.0	12.645
12.0	12.511
12.0	12.483
12.0	12.645
$\Sigma x = 120$	$\Sigma y = 121.255$
$\Sigma x^2 = 1232$	$\Sigma y^2 = 1273.266$
$\Sigma xy = 1251.728$	$n = 12$
$r = 0.999$	$b = -2.138$
$m = 1.224$	

Tabla No. 2: mg pesados contra mg cuantificados para la evaluación estadística de la linealidad del método (apéndice a-3).

LINEALIDAD DE METODO CUANTIFICACION DE AC. FOLICO



Gráfica de mg adicionados vs
mg recuperados

Reproducibilidad

		DIA 1	DIA 2
A		100.00	99.16
N	1	100.00	100.00
A		99.13	100.61
L		$\Sigma y_{11} = 299.13$	$\Sigma y_{21} = 299.77$
I			
S		100.05	101.62
T	2	99.05	101.66
A		100.00	101.62
		$\Sigma y_{12} = 299.1$	$\Sigma y_{22} = 304.9$
		$\Sigma y_{1..} = 598.23$	$\Sigma y_{2..} = 604.67$
			$\Sigma y_{...} = 1202.9$
		$s = 1.0154$	$\bar{y} = 100.158$
			$CV = 1.013$

Tabla No. 3: Porcentos de Acido Fólico encontrado con dos analistas y dos días diferentes, para la evaluación estadística de la reproducibilidad del método analítico (apéndice a-4).

Criterio de Aceptación.

Analista: F calculada = 0.977

F de tablas = 161.4

Fcal. < Ftab.

Día: F calculada = 1.557

F de tablas = 161.4

F cal. < Ftab.

Interacción Analista-Día:

F calculada = -0.090

F de tablas = 5.32

Fcal. < Ftab.

3.1. Discusión de Resultados

En relación a los resultados obtenidos para la estandarización, por el método espectrofotométrico de la materia prima a ser utilizada para la validación del método microbiológico difusión en agar se encontró una potencia de 979 mcg/mg.

En cuanto al efecto del pH, se analizaron muestras así como el estandar a diferente pH, es decir sin ajustar el pH (aproximadamente $\text{pH}=9$) y ajustando a un pH de 6.8 encontrándose una diferencia de varianza significativa con un nivel de significancia de 0.05, ya que se observó que al no ajustar el pH de la muestra y del estandar se obtienen los diámetros de los halos de crecimiento más pequeños que los que se obtienen al ajustar el pH a 6.8; por lo que es importante considerar el efecto del pH sobre todo cuando se tienen fórmulaciones más complejas donde puede influir alguno de los excipientes de esta.

Aunque si se analiza el estandar y la materia prima sin ajustar el pH, considerando que ambos tienen un pH similar el efecto es equivalente.

En base a los resultados evaluados anteriormente se analizaron cada uno de los parámetros para esta validación.

3.1.1. Linealidad del método. Se observa relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, a pesar de haber

obtenido una pendiente diferente de uno y la ordenada al origen diferente de cero, por lo que no puede ser considerada una relación ideal, pero se tiene un coeficiente de correlación de 0.998 que nos indica que el método es lineal satisfactoriamente aunque se tenga una falta de ajuste, al llevar a concentraciones menores de 80 y mayores de 120 % hay tendencia a perder linealidad.

3.1.2. Exactitud del método. Hay suficiente evidencia para decir que el método es exacto con un nivel de significancia del 0.05. Encontrándose un coeficiente de variación (0.61%) mucho menor del que se establece como criterio de aceptación para un método microbiológico (5%) y un intervalo de recobro de 99.195 a 100.06 % que incluye el valor real de la media ($\mu = 100\%$).

3.1.3. Precisión del método. Se establece que el promedio de recobro en el método de análisis para materia prima es de 99-101%, con una desviación estandar menor o igual al 1%.

Analizando los resultados obtenidos se encontro una desviación estandar de 0.608, y una χ^2 calculada menor que χ^2 de tablas, por lo anteriormente expuesto el método analítico se considerará preciso.

3.1.4. Reproducibilidad del método. El criterio que generalmente se establece para que un método pueda considerarse reproducible es que no exista efecto del analista, el día ni la interacción ana-

lista-día. Basandose en la evaluación estadística de un análisis de varianza, donde $F_{cal.} < F_{tab.}$

Analizando los resultados obtenidos, podemos decir que el método analítico bajo estudio es reproducible, ya que no existe efecto del analista, día ni la interacción analista-día.

3.1.5. Especificidad del método. Para comprobar la especificidad del método se ópto por realizarla con un placebo de un polivitaminico con los activos más comunes en estas formulaciones, encontrandose que no se obtenia respuesta del microorganismo en el placebo. El método analítico es capaz de detectar la sustancia de interés en polivitaminicos sin presentar interferencias.

4. CONCLUSIONES

Los objetivos propuestos en este trabajo se cumplieron satisfactoriamente .

En base a los resultados obtenidos del estudio de validación para la cuantificación del ácido fólico (materia prima) se concluye que el método microbiológico cilindro-placa presenta buena reproducibilidad, repetibilidad, exactitud y linealidad a pesar de la falta de ajuste (hacia los extremos de la recta) a concentraciones más bajas y altas a las propuestas en este trabajo por lo que se considerará que el método es confiable.

5. PROPOBICIONES

Se propone continuar el estudio de validación para la cuantificación del ácido fólico en polivitamínicos por este método, en las formas farmacéuticas que con mayor frecuencia sean recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de la Secretaría de Salud.

Además se sugiere realizar las diluciones con una solución amortiguadora para mantener el pH óptimo (pH=6-8), después de disolver el ácido fólico con el hidróxido de amonio 3:2 v/v. para obtener un buen crecimiento del microorganismo.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Kreyszig E., Introducción a la estadística matemática, Ed. Limusa, Mexico D-F., 1983 p-p. 84.
2. Code of Federal Regulations Food and Drugs, 21 April, 1989.
3. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación. Requisitos mínimos para la Validación de Métodos Analíticos; Colegio Nacional de Q-F-B. A-C., p-p. 1, 27-32.
4. Chapman K.G., A Suggested Validation Lexicon; Pharm. Tech, August, 1983.
5. F. Roman y Guzman, G. ; Memorias - Curso de Validación de Métodos Analíticos.
6. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a. ed., 1988, Mexico.
7. Finkelson M.; Validation of Analytical Methods Laboratories, Part II; Pharm. Tech. March; p-p. 74-78,82; 1976.
8. Fontani, F., et. al., Criteri di Convalida dei Metodi D'Analisi; Boil. Chim. Farm., 126 (2), Feb. 66-74; 1987.
9. Guerra J. ; Validation of Analytical Methods Laboratories, Part. I. Pharm. Tech. March. p-p. 74-76; 1986.
10. Guía de Validación de Medios de Cultivo, Comité de elaboración de Guías de Validación SSA. Procedimiento No. 5 , p-p. 27-32.
11. Hewitt, W. ; Microbiological Assay and Introduction to Quantitative Principles and Evaluation; Ed. Academic Press; New

- York, London 1977; Cap. I y II, p-p. 4,6, 27-48.
12. Hoffman, F. ; Vitamin Compendium; Roche y Cia., A.G., Brasilea, Suiza 1972; p-p. 139-143.
 13. Kavanagh, Frederick; Analytical Microbiology; Academic Press, New York, 1963-1972; Vol. II, p-p. 1-86, 125-140.
 14. Loftus, B-L. Nash R-A.; Pharmaceutical Process Validation; Marcel Dekker, New York; 1984; p-p. 251-266.
 15. Manual de Medios de Cultivo Merck, Determinación Microbiológica de Vitaminas, p-p. 5-7.
 16. `Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemist`; Washington, D.C.
 17. Roman G. F.; Validación de Procesos para Productos Farmacéuticos no Estériles; Rev. Mex. Cienc. Farm. 18 (3), 1987; p-p. 2-12.
 18. Taylor J. K. ; Validation of Analytical Methods. Anal. Chem., 55 (6); 1983; p-p. 600-604 A.
 19. Sebrell, W.H. Jr. and Harris, Robert; The Vitamins; Academic Press Inc., 1954.
 20. Smith, David T. y Conant Norman F.; Bacteriología de Zinsser; 2a ed ; Hispano-Americana, 1960.
 21. Strohecker, Rolf and Hennind, Heinz; Vitamin Assay; Verlag Chemie GMBH Weinheim/Bergstr, 1966.
 22. `The United States Pharmacopeia`;The National Formulary;

Twenty-First Revision; Sixteenth edition; January 1985;
United States Pharmacopeial Convention Inc.

23. Warren Letsky, Miller M. Brinton; Industrial Microbiology;
Ed. Mc Graw-Hill, 1976; Cap. 2, p-p- 14, 17,, 20, 31, 32.

APENDICE GENERAL

a-1 Exactitud

Se propone la siguiente hipótesis

$H_0: \mu = 100\%$

$H_1: \mu \neq 100\%$

Estadígrafo de contraste

$$t = \frac{\bar{X} - 100}{s / \sqrt{n}}$$

Área de aceptación

$t_{\alpha/2} < t \text{ calculada} < t_{1-\alpha/2}$

Criterio de aceptación

Si "t" calculada entra en el área de aceptación se acepta H_0

a-2 Precisión

Se propone la siguiente hipótesis

$$H_0: \sigma \leq 1\%$$

$$H_1: \sigma > 1\%$$

Estadístico de contraste

$$\chi^2_1 = \frac{(n-1) s^2}{\sigma^2}$$

Área de aceptación

$$\chi^2_{1-\alpha/2} < \chi^2_1 < \chi^2_{\alpha/2}$$

Criterio de aceptación

Si χ^2_1 calculada es $< \chi^2_{1-\alpha/2}$ de tablas se dice que el método es preciso.

a-3 Linealidad (para la ordenada al origen)

Se propone la siguiente hipótesis

$$H_0: A = 0$$

$$H_1: A \neq 0$$

Estadístico de contraste

$$t_{\text{calculada}} = \frac{A - A_0}{S_{y/x} \frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$\text{cálculo de } A = \frac{(\sum y) (\sum x^2) - (\sum x) (\sum xy)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

cálculo del error típico $\hat{S}_{y/x}$

$$\hat{S}_{y/x} = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum y^2) - A(\sum y) - B(\sum xy)}{n}}$$

Area de aceptación

$$t_{\alpha/2} \leq t \text{ calculada} \leq t_{1-\alpha/2}$$

$$\alpha = 0.05$$

$$g.l. = n - 2$$

Criterio de aceptación

Si "t" calculada cae dentro del área de aceptación, se considera que el método tiene una ordenada ceroana a cero.

Intervalo de confianza

$$A \pm t_{1-\alpha/2} \cdot \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{x^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

a-3.1 linealidad (para la pendiente)

Se propone la siguiente hipótesis

$$H_0: B_0 = 1$$

$$H_1: B_0 \neq 1$$

Estadístico de contraste

$$t_{\text{calculada}} = \frac{(B - B_0) S_x \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

para t de tablas

$$g.l. = n - 2$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\text{cálculo de } B = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

cálculo del error típico $\hat{S}_{y/x}$

$$\hat{S}_{y/x} = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum y^2) - A(\sum y) - B(\sum xy)}{n}}$$

Criterio de aceptación

Si "t" calculada cae dentro del área de aceptación, se considera que el método tiene una pendiente cercana a uno.

Intervalo de confianza

$$B \pm t_{1-\alpha/2} \cdot \frac{S_y/x}{S_x \sqrt{n-1}}$$

Tabla A-6

PERCENTILES DE LA DISTRIBUCION JI-CUADRADO*

$g/$	$\chi^2_{0.0005}$	$\chi^2_{0.005}$	$\chi^2_{0.01}$	$\chi^2_{0.025}$	$\chi^2_{0.05}$	$\chi^2_{0.10}$	$\chi_{0.10}$	$\chi^2_{0.30}$	$\chi^2_{0.40}$
1	0.000000393	0.0000393	0.000157	0.000982	0.00393	0.0158	0.0642	0.148	0.275
2	0.00100	0.0100	0.0201	0.0506	0.101	0.211	0.445	0.713	1.022
3	0.0153	0.0717	0.115	0.216	0.352	0.584	1.005	1.424	1.869
4	0.0639	0.207	0.297	0.484	0.711	1.004	1.649	2.195	2.753
5	0.158	0.412	0.554	0.831	1.145	1.610	2.343	3.000	3.655
6	0.299	0.676	0.872	1.237	1.635	2.204	3.070	3.828	4.570
7	0.485	0.989	1.239	1.690	2.167	2.832	3.822	4.671	5.493
8	0.710	1.344	1.646	2.180	2.733	3.490	4.594	5.527	6.423
9	0.972	1.735	2.088	2.700	3.325	4.168	5.380	6.393	7.357
10	1.265	2.156	2.558	3.247	3.940	4.865	6.179	7.267	8.295
11	1.587	2.603	3.053	3.816	4.575	5.578	6.989	8.148	9.237
12	1.934	3.074	3.571	4.404	5.226	6.304	7.807	9.034	10.182
13	2.305	3.565	4.107	5.009	5.892	7.042	8.634	9.926	11.129
14	2.697	4.075	4.660	5.629	6.571	7.790	9.467	10.821	12.079
15	3.108	4.601	5.229	6.262	7.261	8.547	10.307	11.721	13.030
16	3.536	5.142	5.812	6.908	7.962	9.312	11.152	12.624	13.983
17	3.980	5.697	6.408	7.564	8.672	10.085	12.002	13.531	14.937
18	4.439	6.265	7.015	8.231	9.390	10.865	12.857	14.440	15.893
19	4.912	6.844	7.633	8.907	10.117	11.651	13.716	15.352	16.850
20	5.396	7.434	8.260	9.591	10.851	12.443	14.578	16.266	17.809
21	5.896	8.034	8.897	10.283	11.591	13.240	15.445	17.182	18.768
22	6.405	8.643	9.542	10.982	12.338	14.041	16.314	18.101	19.729
23	6.924	9.260	10.196	11.688	13.091	14.848	17.187	19.021	20.690
24	7.453	9.886	10.856	12.401	13.848	15.659	18.062	19.943	21.652
25	7.991	10.520	11.524	13.120	14.611	16.473	18.940	20.867	22.616
26	8.538	11.160	12.198	13.844	15.379	17.292	19.820	21.792	23.579
27	9.093	11.808	12.879	14.573	16.151	18.114	20.703	22.719	24.544
28	9.656	12.461	13.565	15.308	16.928	18.939	21.588	23.647	25.509
29	10.227	13.121	14.256	16.047	17.708	19.768	22.475	24.577	26.475
30	10.804	13.787	14.953	16.791	18.493	20.599	23.364	25.508	27.442
35	13.788	17.192	18.509	20.569	22.465	24.797	27.836	30.178	32.282
40	16.906	20.707	22.164	24.433	26.509	29.051	32.345	34.872	37.134
45	20.136	24.311	25.901	28.366	30.612	33.350	36.884	39.585	41.995
50	23.461	27.991	29.707	32.357	34.764	37.689	41.449	44.313	46.864
60	30.340	35.535	37.485	40.482	43.188	46.459	50.641	53.809	56.620
70	37.467	43.275	45.442	48.758	51.739	55.329	59.898	63.346	66.396
80	44.791	51.172	53.540	57.153	60.391	64.278	69.207	72.915	76.188
90	52.276	59.196	61.754	65.647	69.126	73.291	78.558	82.511	85.993
100	59.897	67.328	70.065	74.222	77.930	82.358	87.945	92.129	95.808
120	75.468	83.852	86.924	91.573	95.705	100.624	106.806	111.419	115.465
140	91.393	100.655	104.035	109.137	113.659	119.029	125.758	130.766	135.149
160	107.598	117.680	121.346	126.870	131.736	137.546	144.783	150.158	154.856
180	124.013	134.885	138.821	144.741	149.969	156.153	163.868	169.588	174.580
200	140.661	152.241	156.432	162.728	168.279	174.835	183.003	189.049	194.319

Tabla A-6 (continuación)

PERCENTILES DE LA DISTRIBUCION JI-CUADRADO

$\nu/$	$\chi^2_{0.99}$	$\chi^2_{0.95}$	$\chi^2_{0.90}$	$\chi^2_{0.85}$	$\chi^2_{0.80}$	$\chi^2_{0.75}$	$\chi^2_{0.70}$	$\chi^2_{0.65}$	$\chi^2_{0.60}$	$\chi^2_{0.55}$	$\chi^2_{0.50}$
1	0.455	0.708	1.074	1.642	2.706	3.841	5.024	6.635	7.879	12.116	
2	1.386	1.833	2.408	3.219	4.605	5.991	7.378	9.210	10.597	15.202	
3	2.366	2.946	3.665	4.642	6.251	7.815	9.348	11.345	12.838	17.730	
4	3.357	4.045	4.878	5.989	7.779	9.488	11.143	13.277	14.860	19.998	
5	4.351	5.132	6.064	7.289	9.236	11.070	12.832	15.086	16.750	22.105	
6	5.348	6.211	7.231	8.558	10.645	12.592	14.449	16.812	18.548	24.103	
7	6.346	7.283	8.383	9.803	12.017	14.067	16.013	18.475	20.278	26.048	
8	7.344	8.351	9.524	11.030	13.362	15.507	17.535	20.090	21.955	27.868	
9	8.343	9.414	10.656	12.242	14.684	16.919	19.023	21.666	23.589	29.666	
10	9.342	10.473	11.781	13.442	15.987	18.307	20.483	23.209	25.188	31.419	
11	10.341	11.530	12.899	14.631	17.275	19.675	21.920	24.725	26.757	33.136	
12	11.340	12.584	14.011	15.812	18.549	21.026	23.336	26.217	28.300	34.821	
13	12.340	13.636	15.119	16.985	19.812	22.362	24.736	27.688	29.819	36.478	
14	13.339	14.685	16.222	18.151	21.064	23.685	26.119	29.141	31.319	38.109	
15	14.339	15.733	17.322	19.311	22.307	24.996	27.488	30.578	32.601	39.719	
16	15.338	16.780	18.418	20.465	23.542	26.296	28.845	32.000	34.267	41.308	
17	16.338	17.824	19.511	21.615	24.769	27.587	30.191	33.409	35.718	42.874	
18	17.338	18.868	20.601	22.760	25.989	28.869	31.526	34.805	37.156	44.439	
19	18.338	19.910	21.689	23.900	27.204	30.144	32.852	36.191	38.582	45.973	
20	19.337	20.951	22.775	25.038	28.412	31.410	34.170	37.566	39.997	47.498	
21	20.337	21.991	23.858	26.171	29.615	32.671	35.479	38.932	41.401	49.010	
22	21.337	23.031	24.939	27.301	30.813	33.924	36.781	40.289	42.796	50.511	
23	22.337	24.069	26.018	28.429	32.007	35.172	38.076	41.638	44.181	52.000	
24	23.337	25.106	27.096	29.553	33.196	36.415	39.364	42.980	45.558	53.479	
25	24.337	26.143	28.172	30.675	34.382	37.652	40.646	44.314	46.928	54.947	
26	25.336	27.179	29.246	31.795	35.563	38.885	41.923	45.642	48.290	56.407	
27	26.336	28.214	30.319	32.912	36.741	40.113	43.194	46.963	49.645	57.858	
28	27.336	29.249	31.391	34.027	37.916	41.337	44.461	48.278	50.993	59.300	
29	28.336	30.283	32.461	35.139	39.087	42.537	45.722	49.588	52.336	60.734	
30	29.336	31.316	33.530	36.250	40.256	43.773	46.979	50.892	53.672	62.161	
35	34.336	36.475	38.859	41.778	46.059	49.802	53.203	57.342	60.275	69.198	
40	39.335	41.622	44.165	47.269	51.805	55.758	59.342	63.691	66.766	76.095	
45	44.335	46.761	49.452	52.729	57.505	61.656	65.410	69.957	73.166	83.876	
50	49.335	51.892	54.723	58.164	63.167	67.505	71.420	76.154	79.490	89.561	
60	59.335	62.135	65.226	68.972	74.397	79.082	83.298	88.379	91.952	102.695	
70	69.334	72.358	75.689	79.715	85.527	90.531	95.023	100.425	104.215	115.577	
80	79.334	82.566	86.120	90.403	96.578	101.879	106.629	112.329	116.321	128.261	
90	89.334	92.761	96.524	101.054	107.565	113.145	118.136	124.116	128.299	140.783	
100	99.334	102.946	106.906	111.667	118.498	124.342	129.561	135.806	140.169	153.165	
120	119.334	123.289	127.616	132.806	140.233	146.567	152.211	158.950	163.648	177.602	
140	139.334	143.604	148.269	153.854	161.827	168.613	174.648	181.840	186.846	201.682	
160	159.334	163.898	168.876	174.828	183.311	190.516	196.915	204.530	209.824	225.480	
180	179.334	184.173	189.446	195.743	204.704	212.304	219.044	227.056	232.620	249.048	
200	199.334	204.434	209.985	216.609	226.021	233.994	241.058	249.445	255.264	272.422	

* Los datos de esta tabla se han tomado, con permiso, de *Documens Grig Scientific Tables*, 6th Ed., pp. 36-39, Grig Chemical Corporation, Ardley, N. Y. and Hald, A. and Sinkov, S. A., "A Table of Percentage Points of the χ^2 -Distributions," *Skandinavisk Aktuarietidskrift*, 33, 168-175, 1950.

a-4 Reproducibilidad

Tabla de análisis de varianza (ANADEV) para factores aleatorios

Fuente de error (FU)	Grados de libertad (g.l.)	Suma de cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F _{cal}	F _{tab} ($\alpha=0.05$)	Criterio de aceptación
Analista A filas _i	a - 1	$SC_A = \frac{\sum y_i^2}{bc} - \frac{y^2}{abc}$	$MC_A = \frac{SC_A}{a - 1}$	$\frac{MC_A}{MC_{AD}}$	$\frac{g.l._A}{g.l._{AD}}$	$F_A < F_{0.95}$
Día D columnas _j	b - 1	$SC_D = \frac{\sum y_j^2}{ac} - \frac{y^2}{abc}$	$MC_D = \frac{SC_D}{b - 1}$	$\frac{MC_D}{MC_{AD}}$	$\frac{g.l._D}{g.l._{AD}}$	$F_D < F_{0.95}$
Interacción Anal/Día _{ij}	(a-1)(b-1)	$SC_{AD} = \frac{\sum y_{ij}^2}{c} + \frac{\sum y_i^2}{bc} + \frac{\sum y_j^2}{ac} - \frac{y^2}{abc}$	$MC_{AD} = \frac{SC_{AD}}{(a-1)(b-1)}$	$\frac{MC_{AD}}{MC_E}$	$\frac{g.l._{AD}}{g.l._E}$	$F_{AD} < F_{0.95}$
Error Experimental	ab(c-1)	$SC_E = \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum y_{ij}^2}{c}$	$MC_E = \frac{SC_E}{ab(c-1)}$			

Tabla A-5

PERCENTILES DE LA DISTRIBUCION t^*

ν	$t_{0.60}$	$t_{0.70}$	$t_{0.80}$	$t_{0.90}$	$t_{0.95}$	$t_{0.975}$	$t_{0.99}$	$t_{0.995}$	$t_{0.9995}$
1	0.3250	0.7270	1.376	3.078	6.3138	12.706	31.821	63.657	636.619
2	0.2885	0.6172	1.061	1.886	2.9200	4.3027	6.965	9.9248	31.598
3	0.2766	0.5840	0.978	1.638	2.3534	3.1825	4.541	5.8409	12.924
4	0.2707	0.5692	0.941	1.533	2.1318	2.7764	3.747	4.6041	8.610
5	0.2672	0.5598	0.920	1.476	2.0150	2.5706	3.365	4.0321	6.869
6	0.2648	0.5536	0.906	1.440	1.9432	2.4469	3.143	3.7074	5.959
7	0.2632	0.5493	0.896	1.415	1.8946	2.3646	2.998	3.4995	5.408
8	0.2619	0.5461	0.889	1.397	1.8595	2.3060	2.896	3.3554	5.041
9	0.2610	0.5436	0.883	1.383	1.8331	2.2622	2.821	3.2498	4.781
10	0.2602	0.5416	0.879	1.372	1.8125	2.2281	2.764	3.1693	4.587
11	0.2596	0.5400	0.876	1.363	1.7939	2.2010	2.718	3.1058	4.437
12	0.2590	0.5387	0.873	1.356	1.7823	2.1788	2.681	3.0545	4.318
13	0.2586	0.5375	0.870	1.350	1.7709	2.1604	2.650	3.0123	4.221
14	0.2582	0.5366	0.868	1.345	1.7613	2.1448	2.624	2.9768	4.140
15	0.2579	0.5358	0.866	1.341	1.7530	2.1315	2.602	2.9467	4.073
16	0.2576	0.5358	0.865	1.337	1.7459	2.1199	2.583	2.9208	4.015
17	0.2574	0.5344	0.863	1.333	1.7396	2.1098	2.567	2.8982	3.965
18	0.2571	0.5338	0.862	1.330	1.7341	2.1009	2.552	2.8784	3.922
19	0.2569	0.5333	0.861	1.328	1.7291	2.0930	2.539	2.8609	3.883
20	0.2567	0.5329	0.860	1.325	1.7247	2.0860	2.528	2.8453	3.850
21	0.2566	0.5325	0.859	1.323	1.7207	2.0796	2.518	2.8314	3.819
22	0.2564	0.5321	0.858	1.321	1.7171	2.0739	2.508	2.8188	3.792
23	0.2563	0.5318	0.858	1.319	1.7139	2.0687	2.500	2.8073	3.767
24	0.2562	0.5315	0.857	1.318	1.7109	2.0639	2.492	2.7969	3.745
25	0.2561	0.5312	0.856	1.316	1.7081	2.0595	2.485	2.7874	3.725
26	0.2560	0.5309	0.856	1.315	1.7056	2.0555	2.479	2.7787	3.707
27	0.2559	0.5307	0.855	1.314	1.7033	2.0518	2.473	2.7707	3.690
28	0.2558	0.5304	0.855	1.313	1.7011	2.0484	2.467	2.7633	3.674
29	0.2557	0.5302	0.854	1.311	1.6991	2.0452	2.462	2.7564	3.659
30	0.2556	0.5300	0.854	1.310	1.6973	2.0423	2.457	2.7500	3.616
35	0.2553	0.5292	0.8521	1.3062	1.6896	2.0301	2.438	2.7239	3.5919
40	0.2550	0.5286	0.8507	1.3031	1.6839	2.0211	2.423	2.7045	3.5511
45	0.2549	0.5281	0.8497	1.3007	1.6794	2.0141	2.412	2.6896	3.5207
50	0.2547	0.5278	0.8489	1.2987	1.6759	2.0086	2.403	2.6778	3.4965
60	0.2545	0.5272	0.8477	1.2959	1.6707	2.0003	2.390	2.6603	3.4606
70	0.2543	0.5268	0.8468	1.2938	1.6669	1.9945	2.381	2.6480	3.4355
80	0.2542	0.5265	0.8462	1.2922	1.6641	1.9901	2.374	2.6388	3.4169
90	0.2541	0.5263	0.8457	1.2910	1.6620	1.9867	2.368	2.6316	3.4022
100	0.2540	0.5261	0.8452	1.2901	1.6602	1.9840	2.364	2.6260	3.3909
120	0.2539	0.5258	0.8446	1.2887	1.6577	1.9799	2.358	2.6175	3.3736
140	0.2538	0.5256	0.8442	1.2876	1.6558	1.9771	2.353	2.6114	3.3615
160	0.2538	0.5255	0.8439	1.2869	1.6545	1.9749	2.350	2.6070	3.3527
180	0.2537	0.5253	0.8436	1.2863	1.6534	1.9733	2.347	2.6035	3.3456
200	0.2537	0.5252	0.8434	1.2858	1.6525	1.9719	2.345	2.6006	3.3400
∞	0.2533	0.5244	0.8416	1.2816	1.6449	1.9600	2.326	2.5758	3.2905

* Los datos de esta tabla se han tomado, con permiso, de *Documenta Geigy Scientific Tables*, 6th Ed., pp. 32-35, Geigy Pharmaceuticals, Division of Geigy Chemical Corporation, Airdley, N.Y.