

302827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

Con Estudios Incorporados a la U.N.A.M.

28
251

VALIDACION DEL METODO ANALITICO
PARA LA DETERMINACION DE
METILDOPA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

JESUS VAZQUEZ LARIOS

MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

**EMPIEZA POR HACER LO NECESARIO,
LUEGO LO QUE ES POSIBLE, Y DE
PRONTO TE ENCONTRARAS HACIENDO
LO IMPOSIBLE..**

SAN FRANCISCO DE ASIS

CON TODO MI CARINO PARA MAMA MARGARITA;
PAPA JOSE, TIA TONA, TIO JORGE; SRA.
ELIZABETH, ITZEL E IRVING; Y MUY
ESPECIALMENTE PARA LAS ESTRELLAS GUIAS
DE MI VIDA: MI HERMANA ROSARIO, MI ESPOSA
ELIZABETH Y MI HIJO.....

A TODOS MIS MAESTROS DE LA CARRERA Y GENTE
QUE HA SIDO CLAVE EN MI VIDA PROFESIONAL:
EUNICE TORRES, DIEGO HERNANDEZ, MARIO MOLINA,
MARGARITA ESPINOZA, FRANCISCO PALLACH.....

CON AFECTO A MIS TIOS, A MIS PRIMOS
Y A TODAS LAS PERSONAS QUE DE ALGUNA
MANERA ME HAN DADO SU APOYO, EN
ESPECIAL A MIS AMIGOS DE SIEMPRE:
JORGE Y MANUEL....

A MIS COMPANEROS POR TODOS
LOS MOMENTOS QUE COMPARTIMOS
JUNTOS.....

INDICE

CAPITULO I. INTRODUCCION

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2. OBJETIVOS.....	2
1.3. HIPOTESIS.....	2

CAPITULO II. ANTECEDENTES

2.1. VALIDACION	
2.1.1. DEFINICION.....	3
2.1.2. TIPOS DE VALIDACION.....	4
2.1.3. VALIDACION RETROSPECTIVA.....	4
2.1.4. VALIDACION PROSPECTIVA.....	5
2.1.5. VENTAJAS DE LA VALIDACION.....	6
2.2. PARAMETROS ESTADISTICOS Y CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.....	7
2.2.1. LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	8
2.2.1.1. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	9
2.2.2. PRECISION DEL SISTEMA.....	9
2.2.2.1. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA PRECISION DEL SISTEMA.....	9

2.2.3. LINEARIDAD DEL METODO.....	10
2.2.3.1. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA LINEARIDAD DEL METODO.....	10
2.2.4. EXACTITUD AL 100%.....	11
2.2.4.1. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA EXACTITUD AL 100 %	11
2.3. METILDOPA (MONOGRAFIA)	
2.3.1. METODOS DE OBTENCION.....	11
2.3.2. MECANISMO DE ACCION.....	12
2.3.3. FARMACOLOGIA.....	13
2.3.4. FARMACOCINETICA.....	13
2.3.5. TOXICIDAD Y PRECAUCIONES.....	14
2.3.6. USOS TEREPEUTICOS.....	15

CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. DIAGRAMAS DE FLUJO EXPERIMENTAL	
3.1.1. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL PARA LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO.....	17
3.1.2. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL DEL METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICA- CION DE METILDOPA.....	18
3.1.3. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACION DE LOS PARAMETROS ESTADISTICOS PARA LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO.....	19

3.2. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO	
3.2.1. MATERIAL DE LABORATORIO.....	20
3.2.2. REACTIVOS.....	20
3.2.3. PREPARACION DE SOLUCIONES REACTIVO.....	21
3.2.4. EQUIPO.....	21
3.3. METODOLOGIA	
3.3.1. METODO PARA LA CUANTIFICACION DE METILDOPA.....	21
3.3.2. METODO PARA LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO.	
3.3.2.1. METODO PARA DETERMINAR LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	22
3.3.2.2. METODO PARA DETERMINAR LA PRECISION DEL SISTEMA.....	22
3.3.2.3. METODO PARA DETERMINAR LA LINEARIDAD DEL METODO.....	23
3.3.2.4. METODO PARA DETERMINARA LA EXACTITUD AL 100 % DEL METODO ANALITICO.....	23

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. RESULTADOS	
4.1.1. LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	24
4.1.2. CURVA DE CALIBRACION.....	24

4.1.3.	CALCULOS PRELIMINARES PARA DETERMINAR EL COEFICIENTE DE CORRELACION Y EL COEFICIENTE DE DETERMINACION DE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	27
4.1.4.	CALCULOS FINALES PARA DETERMINAR EL COEFICIENTE DE CORRELACION Y EL COEFICIENTE DETERMINACION DE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	28
4.1.5.	CALCULOS PRELIMINARES PARA DETERMINAR EL COEFICIENTE DE VARIACION DE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	28
4.1.6.	CALCULOS FINALES PARA DETERMINAR EL COEFICIENTE DE VARIACION DE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	29
4.2.	PRECISION DEL SISTEMA.	
4.2.1.	RESULTADOS OBTENIDOS PARA DETERMINAR LA PRECISION DEL SISTEMA.....	29
4.2.2.	CALCULOS PRELIMINARES PARA DETERMINAR LA PRECISION DEL SISTEMA.....	31
4.2.3.	CALCULOS FINALES PARA DETERMINAR LA PRECISION DEL SISTEMA.....	31
4.3.	LINEARIDAD DEL METODO	
4.3.1.	RESULTADOS OBTENIDOS PARA DETERMINAR LA LINEARIDAD DEL METODO.....	32
4.3.2.	CALCULOS PARA LA DETERMINACION DE RECOBROS EXPERIMENTALES.....	35

4.3.3. CALCULOS PRELIMINARES PARA DETERMINAR LA LINEARIDAD DEL METODO.....	35
4.3.4. CALCULOS FINALES PARA DETERMINAR LA LINEARIDAD DEL METODO.....	37
4.3.5. CALCULOS DEL POR CIENTO RECUPERADO PARA CADA CANTIDAD RECUPERADA.....	37
4.3.6. CALCULOS PRELIMINARES PARA DETERMINAR EL COEFICIENTE DE VARIACION.....	40
4.3.7. CALCULOS FINALES PARA DETERMINAR EL COEFICIENTE DE VARIACION.....	40
4.4. RESULTADOS DE LA EXACTITUD AL 100 % .	
4.4.1. RESULTADOS OBTENIDOS PARA DETERMINAR LA EXACTITUD AL 100%.....	41
4.4.2. CALCULOS PARA DETERMINAR EL RECOBRO EXPERIMENTAL.....	42
4.4.3. CALCULOS PRELIMINARES PARA DETERMINAR LA EXACTITUD AL 100 %	43
4.4.4. CALCULOS FINALES PARA DETERMINAR LA EXACTITUD AL 100 %	43
4.5 DISCUSION.....	44

CAPITULO V. CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES.....	45
-------------------	----

CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA..... 46

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al incremento de nuevos principios activos en diferentes formas farmacéuticas en el mercado que requieren de métodos de análisis apropiados.

(25,28)

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, donde el químico se da cuenta si el método, el cual está evaluando sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado. (24, 25)

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, la cual se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. (24, 26) La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos como son: evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, lo que nos proporciona una medida del comportamiento del método analítico. (7, 26, 28)

1.2. OBJETIVOS.

Determinar, mediante el instrumento de la validación, si el método analítico propuesto, para la cuantificación de metildopa por espectrofotometría visible es exacto, confiable y reproducible así como cuantificar su variabilidad.

1.3. HIPOTESIS.

Validar el método analítico para la cuantificación de metildopa por espectrofotometría visible.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1. VALIDACION.

2.1.1. DEFINICION

La validación se define como el método científico basado en la evidencia documentada, que se utiliza para demostrar la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de cualquier método, operación o proceso y así mismo, establecer su variabilidad. (1, 4, 25)

La validación es un proceso del control total de la calidad, ya que comprende desde el análisis de proveedores y materias primas, pasando por los procesos de manufactura, hasta los sistemas relacionados con el análisis del producto terminado y su distribución, conjuntando así, todos estos aspectos para determinar los límites máximos y mínimos de operación del proceso o del método analítico usado, asegurando por consiguiente, la obtención de un producto de calidad constante o confirmando que el método analítico usado es efectivo. (3, 5, 10, 22)

Un método validado es un proceso consistente y, por lo tanto, es virtualmente reproducible cuando es repetido. (4, 22)

2.1.2. TIPOS DE VALIDACION.

La validación comienza cuando se decide lo que es exactamente un proceso dado: ¿para qué es?, ¿cuál es su finalidad? y de hecho, ¿qué es lo que realmente hace?. Una vez que estas preguntas se han formulado y respondido de una manera razonable se puede preparar un plan a seguir para proceder a validar el método analítico. (20, 21, 27)

Ningún tipo de validación de métodos analíticos es apropiado para todas las situaciones existentes, sin embargo se cuenta con dos formas básicas de validación de métodos: la validación prospectiva y la validación retrospectiva, que teniendo diferentes aplicaciones, han sido ampliamente estudiadas y descritas en los últimos años. (2, 22)

2.1.3. VALIDACION RETROSPECTIVA

La validación retrospectiva es la evidencia documentada, basada en los datos acumulados de producción, control y análisis de un producto ya elaborado y en distribución. (5, 10) Este tipo de validación nos sirve para corroborar que el producto está siendo fabricado y analizado con calidad, de una manera consistente. (25, 27)

Básicamente dos son los criterios mínimos para la validación retrospectiva de un método:

1) Que exista un proceso y método estable: Esto significa que el método de análisis se haya mantenido sin cambios en el transcurso de un determinado tiempo.

2) Cambios en el método de análisis: Una historia de cualquier cambio en la técnica analítica como introducción de equipo, reactivos o material nuevo, etc... (2, 8)

Los resultados analíticos obtenidos de este tipo de validación, pueden ser estadísticamente evaluados para establecer la variabilidad y validez del método analítico. La validación retrospectiva debe estar amparada por un protocolo que defina los datos que deben ser recolectados y evaluados, el tratamiento estadística a ser usado, los criterios de aceptación y los resultados esperados. (2, 11)

2.1.4. VALIDACION PROSPECTIVA

La validación prospectiva es la evidencia documentada que se realiza antes de que el analito, principio activo o producto terminado salga al mercado, ya que el método analítico debe ser estudiado perfectamente para que el análisis del producto como tal sea reproducible, exacto y específico. (2, 8)

Este tipo de validación es aplicable a nuevos productos, a reformulaciones y a cambios en el equipo utilizado en el método

analítico, que pudiesen afectar las características fisicoquímicas del analito. (8, 11)

2.1.5. VENTAJAS DE LA VALIDACION.

Aún cuando existes costos iniciales, asociados a la validación de un método analítico, también existen ahorros potenciales a largo plazo.

Un proceso validado ahorra tiempo, lo cual implica una disminución indirecta de costos de operación. Con un método validado no hay necesidad de inventar nada nuevo cada vez que surjan cambios en el personal o en el equipo usado, reactivos, etc.. Esto es, porque el proceso esta bien documentado y se basa en principios científicos firmes, que han sido muy bien calculados a través de la validación. (24, 29)

La validación también asegura que el equipo utilizado es manejado dentro de los límites operacionales previamente establecidos. Debemos de tomar en cuenta que estos límites están basados en función al tipo de equipo y a algunos datos suministrados por el fabricante del mismo, los cuales deben ser verificados al tiempo de operación. Una vez cubiertos estos puntos, nosotros podemos asegurar que nuestro equipo está funcionando de una manera eficiente para las formas que fue creado, evitando con esto errores de calibración, medición tiempos muertos en mantenimientos correctivos, etc... (22,29)

A su vez, el personal de laboratorio analítico tiene a su disposición procedimientos escritos que debe seguir, por lo tanto no necesita perder tiempo tratando de encontrar la forma de realizar ciertas operaciones o de desarrollar acciones que no estén incluidas en el manual, lo que puede causar daños y/o atrasos en el análisis, y provocar reprocesos o rechazo. (17) Los controles de métodos, procesos y equipos pueden ser realizados en base a los resultados de su validación e historial. (4, 13)

Durante la validación, algunos parámetros son generalmente identificados como indicativos de la ejecución del proceso, lo cual permite hacer evaluaciones de las interacciones de estos parámetros en lugar de tener que vigilar cada una de las fases de un proceso total, para determinar si éste está o no bajo control. (18, 19)

Resumiendo, podemos decir que el método de validación asegura la calidad de todas y cada una de las unidades analizadas o producidas. Es calidad que se analiza y se elabora en cada segmento del ciclo análisis o de producción, hasta el final del mismo; no es calidad que se inspecciona o se agrega. (23)

2.2. PARAMETROS ESTADISTICOS Y CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

Los parámetros que se consideran necesarios para la validación de métodos analíticos de formas farmacéuticas son:
(1, 6, 9, 12, 25)

- 1.- Linearidad del Sistema.
- 2.- Precisión del Sistema.
- 3.- Linearidad del Método.
- 4.- Exactitud y Repetibilidad al 100 %.
- 5.- Precisión (Reproducibilidad).

2.2.1. LINEARIDAD DEL SISTEMA.

Es la relación que se establece mediante una recta que puede ser obtenida directamente o relacionando una propiedad física, química o biológica con cierta cantidad del fármaco y, auxiliándose de una transformación matemática bien definida, asegura que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

Se determina construyendo una curva de calibración (cantidad adicionada contra cantidad recuperada) de una misma solución patrón, utilizando cuando menos 5 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 y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluido el 100 % de la dosis.

2.2.1.1. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA
LINEARIDAD DEL SISTEMA.

- A) La ordenada al origen $(b)=0$.
- B) El coeficiente de determinación $(r) \geq 0.99$.
- C) El coeficiente de correlación $(r^2) \geq 0.98$.

2.2.2. PRECISION DEL SISTEMA.

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

La precisión es la medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico, bajo condiciones normales de operación. Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

2.2.2.1. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA PRECISION
DEL SISTEMA.

El coeficiente de variación $(CV) \leq 1.5 \%$.

2.2.3. LINEARIDAD DEL METODO.

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados), incluyendo el 100 %, cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado de cada concentración.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método y preferentemente deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

2.2.3.1. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA LINEARIDAD DEL METODO.

La gráfica de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada:

- A) La pendiente (m) ≈ 1 .
- B) La ordenada al origen (b) = 0.
- C) El coeficiente de correlación (r) ≥ 0.98 .
- D) Por ciento recuperado: en el intervalo de confianza al 95% para la media, debe localizarse el 100 %.

El coeficiente de variación dependerá del tipo de método y la muestra ya que se debe de tomar en cuenta la forma farmacéutica y concentración.

En métodos químicos y espectrofotométricos, el coeficiente de variación (CV) ≤ 3 %.

2.2.4. EXACTITUD AL 100 %.

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Se debe cuando menos analizar 6 placebos cargados con el - 100 % del principio activo, de manera independiente, por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

2.2.4.1. CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA EXACTITUD AL 100 % .

- A) El promedio del por ciento de recobro para métodos químicos y espectrofotométricos debe ser del 97-103 %.
- B) El coeficiente de variación para métodos químicos y espectrofotométricos (CV) ≤ 3 % .

2.3. METILDOPA.

2.3.1. METODOS DE OBTENCION.

Es el producto de la reacción del 3,4, dimetoxi-fenil-acetonitrilo con etóxido de sodio el cual es hidrolizado con ácido para dar 3,4 dimetoxi-fenil-acetona. Este a su vez se hace reaccionar con carbonato de amonio y cianuro de potasio para formar un

sustituto intermedio, hidantoína que, bajo hidrólisis alcalina, rompe la metildopa racémica. el acetilado formado de este racémico es determinado usando (-) alfa metil-bencilamina. El acetilado aislado, sal de metildopa(-) es desacetilado con base y tratado con ácido mineral para liberar la (-) metildopa. (14, 30)

2.3.2. MECANISMO DE ACCION.

Inicialmente, se pensó que el mecanismo de acción antihipertensiva de este fármaco estaba relacionado con la inhibición de la síntesis de catecolaminas, con la resultante inhibición de la función simpático periférica. Esta teoría es desecho posteriormente y fue reemplazada por la teoría del "falso neurotransmisor".

De acuerdo a esta teoría, la metildopa es metabolizada en el Sistema Nervioso Central por las neuronas adrenérgicas a metildopamina y alfa-metilnorepinefrina, esta última actúa como un falso neurotransmisor, ya que aunque no esta normalmente presente en las neuronas, se acumula y se almacena en los mismos sitios que el neurotransmisor fisiológicos.

El alfa-metilnorepinefrina al ser liberada por el mismo estímulo que el verdadero transmisor, estimula los receptores alfa-2-adrenérgicos en el cerebro, tal estimulación da por resultado un decremento en el flujo simpático del sistema nervioso central lo que origina el efecto antihipertensivo del medicamento. (15)

2.3.3. FARMACOLOGIA.

La metildopa produce reducciones progresivas de la presión sanguínea y de la frecuencia cardiaca que alcanza su máximo en 4 a 5 horas y dura aproximadamente 24 horas después de una sola dosis.

El descenso de la presión sanguínea es mayor en los pacientes hipertensos que en los normotensos, tal efecto se debe a la disminución del gasto cardíaco, de la resistencia periférica o a ambos factores. El gasto cardíaco se reduce menor durante la administración crónica del fármaco que después de una sola dosis.

La hipotensión por la metildopa no implica ninguna alteración importante en la distribución del riego sanguíneo. En los paciente normotensos y en los hipertensos el gasto sanguíneo renal y la filtración glomerular se mantienen en los límites normales. (15, 16)

2.3.4. FARMACOCINETICA.

La principal vía de eliminación de la metildopa es la filtración glomerular, en caso de enfermedad renal grave el producto puede acumularse. Su acción antihipertensora se refuerza con diuréticos por vía bucal, como ocurre para todos los medicamentos antihipertensivos.

Cuando la metildopa se administra por vía bucal, 50 % o menos de la dosis es absorbida. Aparece rápidamente en la orina

como sustancia inalterada, así como en forma de conjugados y en pequeñas cantidades de derivados descarboxilados. La cantidad total absorbida y la distribución de los metabolitos varían en forma considerable de un individuo a otro y en el mismo paciente de un día a otro. (15)

2.3.5. TOXICIDAD Y PRECAUCIONES.

La metildopa por vía parenteral o bucal produce sedación. Con una sola dosis este efecto es de duración más corta que el efecto hipotensor y tiende a desaparecer cuando el fármaco se administra en forma continúa. aunque de ordinario reaparece si se aumenta la dosis, y en algunos pacientes obliga a suspender el tratamiento.

Otros efectos que se verifican en el sistema nervioso central son: vértigo, liberación de prolactina y la consiguiente lactación, signos extrapiramidales y depresión psíquica. Se manifiestan trastornos gastrointestinales rara vez graves.

La hipotensión por el ejercicio es poco frecuente. La retención de sal y agua con aumento de peso y edema puede ocurrir con la metildopa, como con otros agentes antihipertensivos.

La metildopa causa reacciones de base alérgica. En el tratamiento crónico, se han observado a pacientes que han dado reacción positiva en la prueba de Coomb directa. También se han registrado en número considerable casos de anemia hemolítica. Por

lo regular, esta anemia desaparece pronto cuando se suspende el tratamiento, pero la prueba de Coomb puede seguir positiva durante varios meses. Se han citado casos de prueba positiva de lupus y de prueba positiva de factor reumatoide de resultados del tratamiento con metildopa.

La metildopa debe emplearse con cuidado con otros fármacos, particularmente con: l-dopa, metotrimепrazina, norepinefrina y propanolol. Las anfetaminas, antidepressivos triciclicos, inhibidores de la MAO, fenotiazinas, vasodilatadores, diuréticos de benzotiadiazina, fármacos antiarrítmicos, efedrina y forazolidona, son también sospechosas de interactuar con la metildopa, pero la documentación es escasa. (14, 15)

2.3.6. USOS TERAPEUTICOS.

La metildopa se administra por vía oral en dosis que varían entre 500 mg y 2 g diarios. Como regla general el tratamiento se inicia administrando una dosis de 250 mg repetida tres veces al día por 48 horas. Después se procede al reajuste de la posología diaria, añadiendo o quitando una o dos tabletas (preferiblemente con una separación de dos días de intervalo como mínimo), hasta lograr los efectos deseados. En la mayoría de los pacientes, la determinación de la posología efectiva se manifiesta al cabo de 12 a 24 horas, por la obtención de un control suave y uniforme sobre las cifras de presión sanguínea. (15)

Las tiazidas complementan la efectividad de la metildopa, debido a lo cual el médico puede, si así lo cree oportuno, co-administrarlas a partir de las dosis iniciales o después de haber establecido la posología individual.

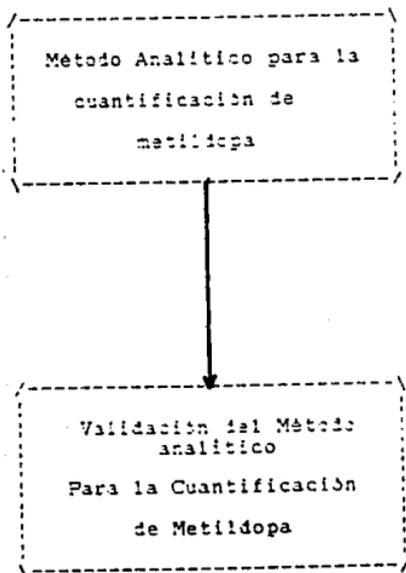
En el paciente con disfunción renal es posible que las dosis efectivas sean más pequeñas que las correspondientes el hipertenso cuyo aparato renal funciona normalmente. (14, 15)

CAPITULO III

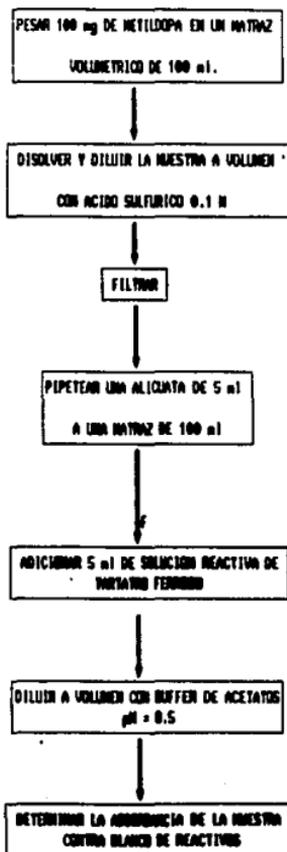
PARTE EXPERIMENTAL

3.1. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL.

3.1.1. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL PARA LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO



3.1.2. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL DEL METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE METILDOPA



3.1.3. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACION DE LOS PARAMETROS ESTADISTICOS PARA LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO.



3.2. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS.

3.2.1. MATERIAL DE LABORATORIO.

Matraces volumétricos	100 y 1000 ml
Vasos de precipitados	1500 ml
Pipetas	3 y 5 ml
Probeta	100 ml
Espátula	

3.2.2. REACTIVOS.

	MARCA	GRADO ANALITICO
Acido sulfúrico	Merck	Reactivo
Acetato de amonio	Mallinckrodt	Reactivo
Sulfato ferroso heptahidratado	J.T. Baker	Reactivo
Potasio y Sodio Tartrato	Merck	Reactivo
Metildopa		Estandar de Referencia.

3.2.3. PREPARACION DE SOLUCIONES REACTIVOS.

1) Acido sulfúrico 0.1 N : Diluir 3 ml de ácido sulfúrico concentrado a 1000 ml con agua destilada.

2) Buffer de acetatos pH 8.5 : Pesar 50.0 g de acetato de amonio en un vaso de precipitados, añadir 800 ml de agua y 200 ml de etanol al 95 %. Ajustar el pH a 8.5 con hidróxido de amonio concentrado.

3) Reactivo de Tartrato Ferroso: Pesar 1.0 g de sulfato ferroso, 2.0 g de tartrato de sodio potásico y 0.10 g de bisulfito de sodio en un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver y diluir a volumen con agua destilada. Preparar al momento de usarse. No usar si la solución está turbia.

3.2.4. EQUIPO.

- 1) Espectrofotómetro Beckman, D.U. Spectrophotometer
- 2) Balanza analítica AND Electronic Balance ER-180-A.

3.3. METODOLOGIA.

3.3.1. METODO PARA LA CUANTIFICACION DE METILDOPA.

1.- Disolver 100 g de metildopa en un matraz volumétrico de 100 ml, diluir a volumen con ácido sulfúrico 0.1 N. Mezclar bien y filtrar.

2.- Pipetear una alícuota de 5.0 ml de la solución en un matraz volumétrico de 100 ml.

3.- Pipetear 5.0 ml de agua destilada en un tercer matraz volumétrico de 100 ml que servirá como blanco.

4.- Pipetear 5.0 ml del reactivo de tartrato ferroso en cada matraz y diluir a volumen con buffer de acetatos pH 8.5 .

5.- Determinar la absorbancia de las muestras a 520 nm usando el blanco en la celda de referencia.

3.3.2. METODO PARA LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

3.3.2.1. METODO PARA DETERMINAR LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.

Determinar construyendo una curva de calibración (cantidad adicionada contra cantidad recuperada) de una misma solución patrón, utilizando cuando menos 5 diluciones y haciendo el análisis por duplicado para cada dilución.

3.3.2.2. METODO PARA DETERMINAR LA PRECISION*DEL SISTEMA.

Determinar por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

**3.3.2.3. METODO PARA DETERMINAR LA LINEARIDAD
DEL METODO ANALITICO.**

Determinar a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes concentraciones de la sustancia de interés (placebos cargados), incluyendo el 100 %, cada uno de manera independiente, hacer el análisis por triplicado de cada concentración.

**3.3.2.4. METODO PARA DETERMINAR LA EXACTITUD AL
100 % DEL METODO ANALITICO.**

Determinar a partir de analizar cuando menos 6 placebos cargados con el 100 % del principio activo, de manera independiente, por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS

4.1.1. LINEARIDAD DEL SISTEMA.

La tabla No.1 nos muestra los resultados de las lecturas obtenidas al leer, a una longitud de onda de 520 nm, cinco diluciones a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis por duplicado para cada dilución, tomando en consideración los siguientes datos:

- A) Número de lote del estándar secundario: MQF-00080
- B) Solución Patrón 114 mg/100 ml HCl 0.1 N
- C) Pureza del estándar secundario: 87.63 %.
- D) Concentración de la solución patrón: 100.07 mg/ml.

4.1.2. CURVA DE CALIBRACION.

La grafica No. 1 nos muestra la curva de calibración obtenida a partir de los datos de la Tabla No. 1. La relación que se establece mediante la recta obtenida nos asegura que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración de metildopa dentro de un rango de 30.021 mcg/ml a 70.044 mcg/ml.

GRAFICA No.1

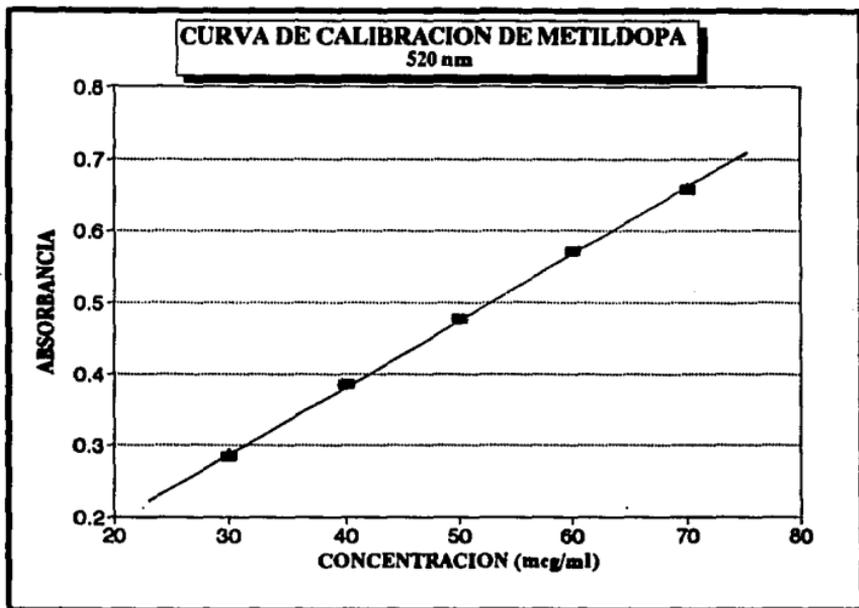


TABLA No. 1

**TABLA DE RESULTADOS DE LA LINEARIDAD
DEL SISTEMA**

DILUCION	CONCENTRACION (mcg/ml)	ABSORBANCIA (1)	ABSORBANCIA (2)
3 ml/100 ml	30.021	0.284	0.289
4 ml/100 ml	40.028	0.386	0.385
5 ml/100 ml	50.035	0.478	0.477
6 ml/100 ml	60.042	0.572	0.572
7 ml/100 ml	70.044	0.657	0.660

4.1.3. CALCULOS PRELIMINARES PARA DETERMINAR EL
 COEFICIENTE DE CORRELACION Y EL COEFICIENTE DE
 DETERMINACION DE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.

$$\Sigma x = 2(30.021+40.028+50.035+60.042+70.049)$$

$$\Sigma x = 500.35$$

$$\Sigma y = 0.284+0.289+0.386+0.385+0.478+0.477+0.572+0.572+ \\ 0.657+0.660$$

$$\Sigma y = 4.760$$

$$\Sigma x^2 = 2[(30.021)^2+(40.028)^2+(50.035)^2+(60.042)^2+ \\ (70.049)^2]$$

$$\Sigma x^2 = 27,037.81324$$

$$\Sigma y^2 = (0.284)^2+(0.289)^2+(0.386)^2+(0.385)^2+(0.478)^2+ \\ (0.477)^2+(0.572)^2+(0.657)^2+(0.660)^2$$

$$\Sigma y^2 = 2.439022$$

$$\Sigma xy = [30.021 (0.284+0.289)]+[40.028 (0.386+0.385)]+ \\ [50.035 (0.478+0.477)]+[60.042 (0.572+0.572)]+ \\ [70.049 (0.657+0.660)]$$

$$\Sigma xy = 256.789$$

4.1.4. CALCULOS FINALES PARA EL COEFICIENTE DE
CORRELACION Y EL COEFICIENTE DE DETERMINACION
DE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.

$$r = \frac{[(2)(5)(256.789) - (500.35)(4.760)]^2 / [(2)(5)(27,037.808) - (500.35)^2][(2)(5)(2.439022) - (4.76)^2]}{1/2}$$

$$r = [34,681.713 / 34,700.84]^{1/2}$$

$$r = 0.99972436$$

$$r^2 = 0.99944879$$

4.1.5. CALCULOS PRELIMINARES PARA EL COEFICIENTE DE
VARIACION DE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.

$$F11 = 0.284 / 30.021 = 0.00946004464$$

$$F12 = 0.289 / 30.021 = 0.00962659472$$

$$F13 = 0.386 / 40.028 = 0.00964324973$$

$$F14 = 0.385 / 40.028 = 0.00961826721$$

$$F15 = 0.478 / 50.035 = 0.00955331268$$

$$F16 = 0.477 / 50.035 = 0.00953332667$$

$$F17 = 0.572 / 60.042 = 0.00952666467$$

$$F18 = 0.572 / 60.042 = 0.00952666467$$

$$F19 = 0.657 / 70.049 = 0.00937914888$$

$$F19 = 0.660 / 70.049 = 0.00942197605$$

$$\Sigma F = 0.0952892$$

$$\Sigma F^2 = 0.00090807$$

$$F = 0.095289249 / 10 = 0.00952892$$

4.1.6. CALCULOS FINALES PARA EL COEFICIENTE DE VARIACION DE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.

$$DE = 10 (0.0009080739449) - (0.095289249)^2 / 10(10-1)$$

$$DE = 0.00008809$$

$$CV = (0.00008809 / 0.0952892) (100)$$

$$CV = 0.924 \%$$

Ya que $r > 0.99$, $r^2 > 0.98$ y $CV \leq 1.5 \%$, se cumple con todos los criterios necesarios para cumplir con la linealidad del sistema.

4.2. PRECISION DEL SISTEMA.

4.2.1. RESULTADOS OBTENIDOS PARA DETERMINAR LA PRECISION DEL SISTEMA.

La tabla No. 2 nos muestra los resultados obtenidos por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar que corres-

ponde al 100 % establecido en la linealidad del sistema. Los datos adicionales que se tienen que considerar son:

- A) Número de lote estándar secundario: MQF-00080
- B) Peso del estándar de metildopa: 114.1 mg
- C) Pureza del estándar: 87.63 %
- D) Concentración de la solución estándar: 0.9998583 mg/ml
- E) Longitud de onda: 520 nm

TABLA No. 2

**TABLA DE RESULTADOS DE LA PRECISION
DEL SISTEMA**

DILUCION: 5 ml/100 ml
CONCENTRACION: 0.04999 mg/ml

ABSORBANCIAS

- 1) 0.480
- 2) 0.472
- 3) 0.470
- 4) 0.471
- 5) 0.470
- 6) 0.469

4.2.2. CALCULOS PRELIMINARES PARA DETERMINAR LA
PRECISION DEL SISTEMA.

$$\Sigma y = 0.480 + 0.472 + 0.470 + 0.471 + 0.470 + 0.469$$

$$\Sigma y = 2.832$$

$$\Sigma y^2 = (0.480)^2 + (0.472)^2 + (0.470)^2 + (0.471)^2 + (0.470)^2 + (0.469)^2$$

$$\Sigma y^2 = 1.336786$$

$$y = 2.832 / 6$$

$$y = 0.472$$

$$DE = [6(1.33678) - (2.832)^2 / 6(6-1)]^{1/2}$$

$$DE = 0.004049691$$

4.2.3. CALCULOS FINALES PARA DETERMINAR LA PRECISION
DEL SISTEMA.

$$CV = [0.004049691 / 0.472] (100)$$

$$CV = 0.857 \%$$

Ya que el CV \leq 1.5 se cumple con el criterio establecido para la precisión del sistema.

4.3.1. LINEARIDAD DEL METODO

4.3.1. RESULTADOS OBTENIDOS PARA DETERMINAR LA LINEARIDAD DEL METODO.

La tabla No. 3 nos muestra las absorbancias obtenidas de tres placebos con diferentes cantidades adicionadas de metildopa, haciendo el analisis de las mismas por triplicado, tomando en cuenta que:

- A) Número de lote de estándar secundario: MQF-0080
- B) Pureza del estándar de Metildopa: 87.63 % .

La tabla No. 4 nos muestra los datos tabulados de la cantidad adicionada de metildopa contra la cantidad recuperada en los análisis realizados para determinar la linealidad del método.

TABLA No. 3

**TABLA DE RESULTADOS PARA LA
LINEARIDAD DEL METODO**

PESO PLACEBO mg	CONCENTRACION FINAL mcg/ml	ABSORBANCIA (Abs)
91.3	39.959	0.383 0.385 0.380
114.1	49.992	0.459 0.472 0.463
136.9	59.982	0.557 0.551 0.562

TABLA No. 4.

**TABLA DE DATOS TABULADOS DE CANTIDAD
ADICIONADA VS CANTIDAD RECUPERADA**

CANTIDAD ADICIONADA (X) mg	CANTIDAD RECUPERADA (Y)		
X1 79.9	Y11 = 80.2156	Y12 = 80.6345	Y13 = 79.5873
X2 99.9	Y21 = 98.6957	Y22 = 101.4910	Y23 = 99.5558
X3 119.9	Y31 = 120.1812	Y32 = 118.8866	Y33 = 121.2601

4.3.2. CALCULOS PARA LA DETERMINACION DE RECOBROS EXPERIMENTALES.

Cantidad adicionada: 79.9 mg

$$0.383 / 0.382 (91.3)(0.8763) = 80.2156 \text{ mg}$$

$$0.385 / 0.382 (91.3)(0.8763) = 80.6345 \text{ mg}$$

$$0.380 / 0.382 (91.3)(0.8763) = 79.5873 \text{ mg}$$

Cantidad adicionada: 99.9 mg

$$0.459 / 0.465 (114.1)(0.8763) = 98.6957 \text{ mg}$$

$$0.472 / 0.465 (114.1)(0.8763) = 101.4910 \text{ mg}$$

$$0.463 / 0.465 (114.1)(0.8763) = 99.5558 \text{ mg}$$

Cantidad adicionada: 119.9 mg

$$0.557 / 0.556 (136.9)(0.8763) = 120.1812 \text{ mg}$$

$$0.551 / 0.556 (136.9)(0.8763) = 118.8866 \text{ mg}$$

$$0.562 / 0.556 (136.9)(0.8763) = 121.2601 \text{ mg}$$

4.3.3. CALCULOS PRELIMINARES PARA DETERMINAR LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.

La tabla No. 5 nos muestra los datos tabulados de la cantidad de metildopa recobrada experimentalmente para determinar la linealidad del sistema

TABLA No. 5

**TABLA DE DATOS TABULADOS PARA LA OBTENCION
DE RECOBROS EXPERIMENTALES**

#ST	PESO ESTANDAR (mg)	ABSORBANCIA	mg DE METILDOPA
1	91.3	0.382	79.9
2	114.1	0.465	99.0
3	136.9	0.556	119.9

$$\Sigma x = 3(79.9+99.9+119.9)$$

$$\Sigma x = 899.10$$

$$\Sigma x^2 = 3[(79.9)^2+(99.9)^2+(119.9)^2]$$

$$\Sigma x^2 = 92220.09$$

$$\Sigma y = 80.2156+80.6345+79.5873+98.6957+101.4910+99.5558+120.1812+121.2601$$

$$\Sigma y = 900.5078$$

$$\Sigma y^2 = (80.2156)^2+(80.6345)^2+(79.5873)^2+(98.6957)^2+(101.4910)^2+(99.5558)^2+(120.1812)^2+(121.2601)^2$$

$$\Sigma y^2 = 92,504.7813$$

$$\Sigma xy = 79.9(80.2156+80.6345+79.5873)+99.9(98.6957+101.491$$

$$0+99.555)+119.9(120.1812+118.8866+121.2601)$$

$$\Sigma xy = 92,358.5393$$

4.3.3. CALCULOS FINALES PARA DETERMINAR LA
LINEARIDAD DEL SISTEMA.

$$m = (3)(3)(92358.5939)-(899.10)(900.5078) / (3)(3)$$

$$(92220.09)-(899.10)^2$$

$$m = 21,575.4370 / 21,600.00$$

$$m = 0.9989$$

$$b = 900.5078 - 0.9989(899.10) / (3)(3)$$

$$b = 0.2663$$

$$r^2 = [(3)(3)(92,358.5393)-(899.10)(900.5078)]^2 /$$

$$[(3)(3)(92,220.09)-(899.10)^2][(3)(3)(92,504.7813)-$$

$$(900.5078)^2]$$

$$r^2 = 465'708,916.5 / 467'180,650.1$$

$$r^2 = 0.9968$$

4.3.4. CALCULOS DEL POR CIENTO RECUPERADO PARA CADA CANTIDAD
RECUPERADA.

La tabla No. 6 se muestra los cálculos realizados para determinar el por ciento recuperado para cada cantidad recuperada.

TABLA No. 6

**TABLA DE CALCULOS DEL POR CIENTO RECUPERADO
PARA CADA CANTIDAD RECUPERADA**

$R1 = (80.2156 / 79.9) (100) = 100.3950$
$R2 = (80.6345 / 79.9) (100) = 100.9193$
$R3 = (79.5873 / 79.9) (100) = 99.6086$
$R4 = (98.6957 / 99.0) (100) = 98.7945$
$R5 = (101.4910 / 99.0) (100) = 101.5926$
$R6 = (99.5558 / 99.0) (100) = 99.6555$
$R7 = (120.1812 / 119.9) (100) = 100.2345$
$R8 = (118.8866 / 119.9) (100) = 99.1548$
$R9 = (121.2601 / 119.9) (100) = 101.1344$

**4.3.6. CALCULOS PRELIMINARES PARA DETERMINAR EL
COEFICIENTE DE VARIACION.**

La tabla No. 7 nos muestra las cantidades tabuladas de la cantidad recuperada para proceder a determinar el coeficiente de variación.

TABLA No. 7

**TABLA DE DATOS TABULADOS DE LA
CANTIDAD RECUPERADA PARA LA
OBTENCION DEL COEFICIENTE
DE VARIACION**

R1 =	100.3950
R2 =	100.9193
R3 =	99.6086
R4 =	98.7945
R5 =	101.5926
R6 =	99.6555
R7 =	100.2345
R8 =	99.1548
R9 =	101.1344

$$\Sigma R = 100.3950 + 100.9193 + 99.6086 + 98.7945 + 101.5926 + 99.6555 + \\ 100.2345 + 99.1548 + 101.1344$$

$$\Sigma R = 91.4891$$

$$\Sigma R^2 = (100.3950)^2 + (100.9193)^2 + (99.6086)^2 + \\ (98.7945)^2 + (101.5926)^2 + (99.6555)^2 + \\ (100.2345)^2 + (99.1548)^2 + (101.1344)^2$$

$$\Sigma R^2 = 90,305.1425$$

$$R = 901.4891 / 9$$

$$R = 100.1655$$

$$DE = [9(90,305.1452) - (901.4891)^2 / 9(9-1)]^{1/2}$$

$$DE = [63.7094 / 72]^{1/2}$$

$$DE = 0.9407$$

4.3.6. CALCULOS FINALES PARA DETERMINAR EL COEFICIENTE DE VARIACION.

$$CV = (0.9407 / 100.1655)100 = 0.9391 \%$$

Ya que $b = 0$, $m = 1$, $r^2 > 0.98$ Y $CV < 3$; se cumplen con los criterios para la linealidad del método.

4.4. EXACTITUD AL 100 %.

4.4.1. RESULTADOS OBTENIDOS PARA DETERMINAR LA EXACTITUD AL 100 % .

La tabla No. 8 nos muestra los resultados tabulados de seis placebos cargados con el 100 % del principio activo de manera independiente.

Número de lote del estándar secundario: MQF-00080

Pureza del estándar de metildopa 87.63 %

TABLA No. 8.

# DE PLACEBO	PESO (mg)	ABSORBANCIA
1	114.1	0.476
2	114.1	0.472
3	114.1	0.457
4	114.1	0.465
5	114.1	0.454
6	114.1	0.465
ESTANDAR	114.1	0.465

4.4.2. CALCULOS PARA DETERMINAR EL RECUBRO
EXPERIMENTAL.

$$0.476 / 0.465 (114.1)(0.8763) = 102.3511$$

$$0.472 / 0.465 (114.1)(0.8763) = 101.4910$$

$$0.457 / 0.465 (114.1)(0.8763) = 98.2656$$

$$0.457 / 0.465 (114.1)(0.8763) = 98.2656$$

$$0.465 / 0.465 (114.1)(0.8763) = 99.9858$$

$$0.454 / 0.465 (114.1)(0.8763) = 97.6206$$

La tabla No. 9 nos muestra los recubros experimentales tabulados del por ciento recuperado para el 100 % de metildopa:

TABLA No. 9

**TABLA DE DATOS TABULADOS
DEL POR CIENTO RECUPERADO**

$$R1 = 102.3511$$

$$R2 = 101.4910$$

$$R3 = 98.2656$$

$$R4 = 98.2656$$

$$R5 = 99.9858$$

$$R6 = 97.6206$$

4.4.3. CALCULOS PRELIMINARES PARA DETERMINAR LA EXACTITUD AL 100 %

$$\sum R = 102.3511 + 101.4910 + 98.2656 + 98.2656 + 99.9858 + 97.6206$$

$$\sum R = 597.9798$$

$$\sum R^2 = (102.3511)^2 + (101.4910)^2 + (98.2656)^2 + (98.2656)^2 + (99.9858)^2 + (97.6206)^2$$

$$\sum R^2 = 59,615.3826$$

$$R = 597.9798 / 9$$

$$R = 99.6633$$

$$DE = [6(59615) - (597.9798)^2 / 6(6-1)]^{1/2}$$

$$DE = 1.9361$$

4.4.4. CALCULOS FINALES PARA LA EXACTITUD AL 100 %.

$$CV = (1.9361 / 99.6633)100 = 1.9426 \%$$

Ya que el promedio de recobro fue del 99.6633 (dentro del rango establecido 97.3 a 103 %) y el coeficiente de variación es menor al 3% se cumple con los criterios para la exactitud al 100%

4.5 DISCUSION

El proceso de validación pone a prueba el método analítico para determinar sus parámetros óptimos de operación y su metodología de control, para así reproducirlo eficazmente y tener la certeza que refleja el fin para el cual fue ideado.

El método analítico para la cuantificación de metildopa, como todo proceso de medición, esta sujeto a errores sistematicos instrumentales, operativos o personales, los cuales se evaluan determinando la relación que es establece mediante un modelo lineal entre la propiedad física medida, con la cantidad del analito.

La precisión del método se estimó con la concordancia relativa entre las mediciones repetidas independientes bajo las mismas condiciones (es decir, su repetibilidad), y bajo diferentes condiciones (su reproducibilidad).

La linealidad del método de medición se estableció mediante una recta que refleja la propiedad medible (cantidad recuperada) y el valor real de la propiedad (cantidad adicionada).

La exactitud del método se determinó expresando el por ciento de recobro obtenido del analisis de muestras a las que se les adicionó cantidades conocidas de metildopa y determinando su coeficiente de variación cumple con el propósito para el cual es empleado.

Reuniendo estos datos documentados acorde a las disposiciones oficiales de la Secretaría de Salud el método puede ser considerado confiable, preciso y exacto.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

El proceso de validación de un método analítico de un principio activo es un factor de vital importancia para satisfacer tanto los requerimientos regulatorios, los cuales la industria farmacéutica debe cumplir para garantizar con suficiente evidencia documentada ante los organismos gubernamentales, así como para evitar gastos innecesarios en la comprobación, verificación de la efectividad y reproducibilidad del método.

Los puntos tomados en consideración para validar el método analítico propuesto fueron:

- A) El procedimiento de validación del método para cuantificar metildopa como materia prima.
- B) Los criterios de aceptación de cada uno de los parámetros necesarios para validar el método.
- C) La evidencia documentada de la validación del método conforme a las guías de validación aprobadas por la Secretaría de Salud.

Tomando en cuenta que el método cumplió satisfactoriamente todos los puntos anteriormente expuestos, se puede afirmar que el método analítico para cuantificar metildopa por espectrofotometría visible esta VALIDADO y por tanto es reproducible, exacto y confiable.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

- 1.- A. Alcantara, J. Mora, J.F. Sánchez. Sebiofar. MATERIAL DE APOYO DEL CURSO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS. México (1989)
- 2.- A. Ramírez, V. Berberena. Institute for Professional Development. VALIDATION: A STATISTICAL APPROACH. Insty-Tech. (1990)
- 3.- Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. Centro Mexicano de Desarrollo e Investigación Farmacéutica, A.C. VALIDACION DE PROCESOS FARMACEUTICOS. México (1982)
- 4.- Asociación Farmacéutica Mexicana, CONCLUSIONES DE LA MESA REDONDA SOBRE REQUISITOS MINIMOS PARA LAS PRUEBAS DE ESTABILIDAD. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 18 (3); 20-24. México (1987)
- 5.- Berry, I.R. Actualización Gerencial, Infotec. PRINCIPIOS EN EL PROCESO DE VALIDACION APLICADOS A PRODUCTOS FARMACEUTICOS. Drug Dev. & Ind. Pharm, Vol 14, núm. 2-3.

- 6.- Cafet, S.A. CURSO DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.
México. (1990)
- 7.- Cavenaghi, L. Gallo, G., and Leali, G.M. STATISTICAL
EVALUATION OF THE RESULTS OBTAINED WITH THE ANALYTICAL
METHODS USED FOR THE QUALITY CONTROL OF MEDICINES.
Drug Development and Industrial Pharmacy. 13 (14),
2571-2615. (1987)
- 8.- Center for Drugs and Biologics and Center for Devices
and Radiological Health Food and Drug Administration.
GUIDELINE ON GENERAL PRINCIPLES OF PROCESS VALIDATION.
(1987)
- 9.- Colegio Nacional de Q.F.B. REQUISITOS MINIMOS PARA LA
VALIDACION DE METODO ANALITICOS. México. (1989)
- 10.- Department of Health and Human Services, Public Health
Services, Food and Drug Administration. DRAFT GUIDE-
LINE FOR SUBMISSION OF SUPPORTIVE ANALYTICAL DATA FOR
METHODS VALIDATION IN NEW DRUG APPLICATION. USA (1984)
- 11.- Duarte J. E. and Vest D. K. VALIDATING ALTERNATE
LABORATORY ASSAY METHODS PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY.
May. 60-66 (1979)

- 12.- Fontani. F., et al. Criteri di Convalida dei Metodi d'analisi. Boll. Chim. Pharm. Vol. 126, N°m 2, 66-74. (1987)
- 13.- Garret E.R. SELECTION, EVALUATION AND CONTROL OF THE ASSAY OF THE PHARMACEUTICAL PRODUCTS I. Journal Pharmaceutical Sciences 51 (7), 672-675 (1982)
- 14.- Gennaro, Alfonso R. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES 17th EDITION. Mack Publishing Company (1985)
- 15.- Goodman L., Gilman A. BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPIA. Editorial Interamericana. México (1990)
- 16.- Goth A. FARMACOLOGIA MEDICA. 8a Edición. Editorial Interamericana. México (1977)
- 17.- Guerra, J. VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS BY FDA LABORATORIES. Pharm. Tech. 74-78 (1986)
- 18.- Horwithz W. THE VARIABILITY OF AOAC METHODS OF ANALYSIS USED IN ANALYTICAL PHARMACEUTICAL CHEMISTRY. Journal of the AOAC 60 (6), 1355-1363. (1977)

- 19.- Lark P.D. APPLICATION OF STATISTICAL ANALYSIS TO ANALYTICAL DATA ANALYTICAL CHEMISTRY. 26 (11), 1714-1715, (1954)
- 20.- Linning F. J.; Mandel J. & Peterson J. M. A PLAN FOR STUDYING THE ACCURACY AND PRECISION OF AN ANALYTICAL PROCEDURES. Analytical Chemistry. 26 (7), 1102-1110, (1954)
- 21.- Loftus, B.T. & Nash R.A. PHARMACEUTICAL PROCESSES VALIDATION. Marcel Dekker, New York (1984)
- 22.- Massart D. L. Dijkstra A and Kaufman L. EVALUATION AND OPTIMIZATION OF LABORATORY METHODS AND ANALYTICAL PROCEDURES. Elsevier Scientific Publishing Company. The Netherlands (1978).
- 23.- Mitchel, J.A. CONTROL OF THE ACCURACY AND PRECISION OF INDUSTRIAL TEST AND ANALYSES. Journal Chemical Society. 19 (12), 961-967, (1947)
- 24.- Rampazzo, Paolo. STANDARDISATION AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY. Il Farmaco. 45 (Supplement to No. 6) 807-815. (1990)

- 25.- Secretaría de Salud. Comité de elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud. VALIDACION DE METODO ANALITICOS. México. (1989)
- 26.- Shah, V.P. Clinical. Res. Practices & Drug Regulations Affairs. ANALYTICAL METHODS USED IN BIOAVAILABILITY STUDIES: A REGULATORY VIEWPOINT. 5(1), 51-60 (1987)
- 27.- U.S.P. PHARMACEUTICAL MANUFACTURERS ASSOCIATION QUALITY CONTROL SECTION COMPENDIAL ASSAY VALIDATION COMMITTEE CURREENT CONCEPTS FOR THE VALIDATION OF COMPENDIAL ASSAY. The USP Convention, 1241-1245. USA (May-April 1986)
- 28.- Villafuerte R. L. Departamento de Farmacia de la Sección de Graduados de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. SEMINARIO DE EDUCACION CONTINUA EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA: VALIDACION. México. (1990)
- 29.- Wernimont, G.T. USE OF STATISTICS TO DEVELOP AND EVALUATE ANALYTICAL METHODS. Association of Official Analytical Chemist. Arlington, V.A. (1985)

30.- Wind Holz M. THE MERCK INDEX. 8a Edición. Merck and
Company Inc. USA (1983)