

35



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

" DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO  
ANALITICO PARA DETERMINAR CAFEINA EN UN  
JARABE QUE TAMBIEN CONTIENE ACETAMINOFEN,  
MALEATO DE CLORFENIRAMINA Y CLORHIDRATO  
DE FENILPROPANOLAMINA ."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JOSE ALEJANDRO FRIAS HURTADO



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**JURADO ASIGNADO:**

**Presidente:** *Profra. María Luisa García Padilla*

**Vocal :** *Profra. Isaura Luisa Carrera García*

**Secretario:** *Profra. Rosa Lorenia Mora Tovar y Chávez*

**1er. Suplente:** *Profra. María Teresa Buentello Rodriguez*

**2do. Suplente:** *Profra. María Cristina Enriquez Mendoza*

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Departamento de Control Analítico  
Facultad de Química, U. N. A. M.  
Coordinación de la Cooperación  
Facultad-Empresa.  
Ciudad Universitaria. México, D.F.  
Tel 6223717

**Asesor del Tema:**

*Profra. Luisa García P.*  
Q.F.B. *María Luisa García Padilla*

**Supervisor del Tema:**

*R. A.*  
Q.F.B. *Rosa Lorenia Mora Tovar y Chávez*

**Sustentante:**

*José Alejandro Frias Hurtado*  
José Alejandro Frias Hurtado

*Hace mucho tiempo caminaba por el camino de la vida. Un día ví un letrero que decía: "LA TIENDA DEL CIELO ". Me fuí acercando y la puerta se fue abriendo... Cuando me di cuenta, ya estaba dentro de ella. Vi muchos angeles... Uno me dio una canasta y me dijo: " Hijo mío, compra con cuidado ". Todo lo que un cristiano necesita estaba en aquella tienda. Y agregó el ángel: " Lo que no te puedas llevar ahora, lo podrás llevar después " .*

*Primero compré paciencia, amor, estaba en la misma fila; más abajo había comprensión. Eso se necesita donde quiera que uno va. Compré dos cajas de sabiduría y dos bolsas repletas de fe, y no me olvidé del Espíritu Santo. Como olvidarme, si estaba donde quiera... Compré también fuerza y coraje para ayudarme con esta carrera que es la vida. Ya se llenaba la canasta cuando recordé que necesitaba gracia, y no podía olvidar la salvación, pues era gratis. Siendo así, traté de tomar bastante para salvarme a mí y para salvarte a tí.*

*Caminé hacia la salida para pagar lo que debía, pues creía que tenía todo lo que necesitaba para hacer la voluntad de mi Padre, pero cuando caminaba hacia el cajero, vi la oración y tuve que ponerla también en mi canasta, porque sabía aque cuando saliera de la tienda el pecado me iba a estar esperando.*

*Había mucha paz y felicidad. Estas estaban en el último estante. Canción y alabanza colgaban del techo y arranqué una de cada una para mí*

*Llegué por fin al cajero ángel y le pregunté: " ¿Cuánto le debo? " El sonrió y me respondió: Lleva tu canasta donde quiera que vayas". Otra vez sonrió y me respondió: " Hijo mío, Jesús pagó tu deuda hace mucho tiempo " .*

*Gracias Dios por permitirme llegar aquí*

## **A MIS PADRES.**

Gracias por su apoyo, confianza y sobre todo por su gran paciencia, situaciones sin las cuales no hubiese sido posible llegar hasta aquí. ¡Siempre lo tendré presente!

## **A MIS HERMANOS**

Alicia, Ricardo, Laura y muy en especial a Ismael, que espero que esto lo motive aún más en lo que desea emprender.

## **A MIS PRIMOS**

Quiero agradecer a la familia Ordaz Trinidad de Querétaro, en especial a Margatita y a Ramón por tantos momentos compartidos y sobre todo por sus palabras de aliento que me impulsaron a seguir adelante. A Fabricio Hurtado gracias porque siempre has estado conmigo.

## **AL DEPARTAMENTO DE CONTROL ANALITICO.**

A las Maestras:

Cristy.

Chelo.

Gina.

Isaura.

Lore.

María Luisa.

Tere.

Gracias por esos buenos momentos que me hicieron mas agradable la estancia en el laboratorio, por sus enseñanzas y consejos que me ayudaron a consolidar mis conocimientos y mi carácter, pero sobre todo por su invaluable amistad.

*Maestra Isaura y Maestra María Luisa : Gracias por sus consejos, tiempo y dedicación a la revisión de este trabajo*

*Maestra Lore: Gracias por darme su apoyo, tiempo, dedicación y sobre todo su confianza, para la realización de este trabajo.*

### *A MIS AMIGOS*

*Toño, gracias por tu amistad de tantos años, consejos y sobre todo esas palabras de aliento en los momentos difíciles, que hicieron posible la realización de esta difícil empresa.*

*Zenón, Samuel, José Luis, Agustín, gracias por su amistad, y por todos esos buenos momentos que hicieron más agradable la estancia en la facultad.*

*Tere, Julia, Marbella, Sally, Adriana, Nancy S., Yvonne, gracias por su amistad y por compartir grandes momentos juntos.*

*Gracias a la Generación 90, por su amistad.*

*Alejandro Arias Garrido.*

# INDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
<b>CAPITULO I "INTRODUCCIÓN"</b>	
1.0.- Introducción	1
1.1.- Objetivos	3
<b>CAPITULO II "GENERALIDADES"</b>	
2.1.- Estimulantes del Sistema Nervioso Central	4
a) Las Xantinas	5
a.1) Fuente e Historia	6
a.2) Química	6
a.3) Mecanismo de Acción	8
b) Cafeína	11
b.1) Espectroscopía de Absorción Ultravioleta	13
b.2) Métodos de Valoración	13
b.3) Parámetros Farmacocinéticos	14
b.4) Farmacocinética	14
b.5) Farmacodinamia	15
b.6) Vía de Administración	16
b.7) Dosis	16
b.8) Formas Farmacéuticas Dosificadas	16
b.9) Contraindicaciones	17
b.10) Usos	17
b.11) Efectos Colaterales	18
2.2) Validación de Métodos Analíticos	19
Especificidad	21
Linealidad	21
Precisión	23
Repetibilidad	24
Reproducibilidad	24
Exactitud	25
Estabilidad de la Muestra Analítica	26

## **CONTENIDO**

**Página**

### **CAPITULO III " PARTE EXPERIMENTAL "**

3.1.- Desarrollo del Método Analítico	28
3.2.- Validación del Método Analítico	31
a) Especificidad	31
b) Linealidad del Sistema	31
c) Repetibilidad del Sistema	31
d) Linealidad del Método	31
e) Exactitud del Método	32
f) Repetibilidad del Método	32
g) Reproducibilidad del Método	32
h) Estabilidad de la Muestra Analítica	32

### **CAPITULO IV " RESULTADOS "**

4.1.- Especificidad	33
4.2.- Linealidad del Sistema	34
4.3.- Repetibilidad del Sistema	36
4.4.- Linealidad del Método	37
4.5.- Repetibilidad y Exactitud al 100 %	39
4.6.- Reproducibilidad del Método	40
4.7.- Estabilidad de la Muestra Analítica	41

### **CAPITULO V " CONCLUSIONES "**

5.1.- Conclusiones	43
--------------------	----

<b>ANEXO I</b>	<b>45</b>
----------------	-----------

### **CAPITULO VI " BIBLIOGRAFIA "**

6.1.- Referencias Bibliograficas	57
----------------------------------	----



## **CAPITULO I**

### **1.- INTRODUCCIÓN**

**E**xisten varios medicamentos con acción descongestiva del tracto respiratorio, en cuyas formulaciones se incluyen como principios activos a la cafeína y al maleato de clorfeniramina. La cafeína se utiliza en este tipo de preparaciones por ser un estimulante del sistema nervioso central, por lo que atenúa las propiedades sedantes que causa la presencia del antihistamínico, (maleato de clorfeniramina).

Los estimulantes del sistema nervioso central son fármacos que incrementan la actividad de alguna porción del cerebro o médula espinal. Estos fármacos actúan sobre la corteza cerebral y estructura subcortical, incluyendo el tálamo, incrementando la actividad motora y mejorando la actividad mental.

La estimulación del sistema nervioso central puede ser producida en hombres y animales por un gran número de sustancias naturales y sintéticas. Sin embargo, ninguna ocupa un lugar prominente en la dieta del hombre, como lo hacen los derivados de las xantinas.

Los derivados de las xantinas incluyen cafeína, teobromina, teofilina y un gran número de derivados sintéticos relacionados; todos ellos tienen propiedades farmacológicas similares que difieren marcadamente en la intensidad de sus acciones. Por ejemplo, los efectos estimulantes de la cafeína sobre el sistema nervioso central y sobre el músculo esquelético son más acentuados que en las otras xantinas.

En el tipo de medicamentos mencionados (con cafeína y maleato de clorfeniramina), las formas farmacéuticas más usuales son grageas, solución y jarabe, las cuales se encuentran incluidas en el Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud. Debido a que no existe un método de cuantificación oficial de cafeína para la presentación de jarabe, se consideró importante desarrollar los métodos analíticos que permitan la cuantificación de los principios activos con las características que requiere un método de rutina.

En este trabajo se presenta el desarrollo y validación de un método analítico para determinar cafeína en un jarabe que también contiene acetaminofén, maleato de clorfeniramina y clorhidrato de fenilpropanolamina. El fundamento de la metodología seguida, fue el siguiente: En base a las propiedades de los principios activos y de sus coeficientes de distribución, se efectuó por procesos de extracción líquido-líquido la separación de la cafeína, el maleato de clorfeniramina y el clorhidrato de fenilpropanolamina del acetaminofén. Posteriormente, se separó la cafeína del maleato de clorfeniramina y del clorhidrato de fenilpropanolamina, por medio de cromatografía en capa delgada.

Una vez separados dichos principios activos, la banda correspondiente a la cafeína se raspó y el principio activo se extrajo y se diluyó convenientemente utilizando como disolvente solución de ácido clorhídrico 0.1N. Finalmente se determinó la absorbancia de la solución a 272 nm, en un espectrofotómetro adecuado.

Para validar el método analítico se evaluaron los siguientes parámetros:

Linealidad y Repetibilidad del sistema, Linealidad, Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad), Exactitud, Especificidad del método y Estabilidad de la muestra analítica.

Los datos obtenidos en cada una de las determinaciones se trataron estadísticamente para demostrar la confiabilidad de los resultados. Se efectuaron pruebas de t con el fin de establecer los límites de confianza para la pendiente y la ordenada al origen.

También, se hicieron análisis de varianza para demostrar que el método validado es reproducible, al comprobarse que no existen diferencias significativas entre dos diferentes analistas, que efectuaron las determinaciones de las muestras en distintos días.

### **1.1.- OBJETIVOS.**

- **D**esarrollar un método analítico para determinar cafeína en un jarabe que también contiene acetaminofén, maleato de clorfeniramina y clorhidrato de fenilpropanolamina.
- **V**alidar el método analítico desarrollado, aplicando cada uno de los siguientes parámetros: especificidad del método, linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud y estabilidad de la muestra analítica.
- **C**omprobar que el método de análisis es preciso, exacto, específico y es lineal.

## **CAPITULO II**

### **2.- GENERALIDADES. <sup>(1)</sup>**

#### **2.1.- Estimulantes del Sistema Nervioso Central.**

**S**e denominan estimulantes del sistema nervioso central o estimulantes centrales, a los fármacos que aumentan la actividad de diversos centros nerviosos. Existen muchas sustancias capaces de estimular este sistema. Es así como se han considerado tres tipos de fármacos estimulantes centrales:

Un primer grupo de fármacos se refiere a aquellos que poseen acción *estimulante a predominio cerebral* y actúan especialmente sobre los centros superiores. Sus acciones principales se ejercen sobre los procesos mentales o emocionales; en este grupo se incluyen los psicofármacos.

El segundo grupo de fármacos, incluye a los que tienen una *acción estimulante bulbar* y corresponde a los denominados analépticos, los cuales, tienen como acción fundamental la de estimular en forma selectiva a los centros del bulbo, en especial al centro respiratorio y al centro vasomotor.

Finalmente, el tercer grupo de fármacos incluye a los *estimulantes a predominio espinal*, también llamados fármacos convulsivantes.

### ***Estimulantes a Predominio Cerebral.***

Los fármacos estimulantes, cuya acción principal se ejerce sobre los centros cerebrales, y que son psicofármacos pueden producir efectos cualitativamente diferentes. Existen tres grupos esenciales de psicofármacos:

1° *Estimulantes Psicomotores.* Este grupo de fármacos posee la propiedad de estimular principalmente la actividad mental. Incluye: a) las xantinas, b) las aminas psicoestimulantes.

2° *Fármacos antidepresivos.* Este grupo de fármacos actúa favorablemente en los estados de depresión mental, es decir, actúan como estimulantes del humor. Se incluye: a) antidepresivos tricíclicos y análogos, no inhibidores de la monoaminooxidasa; b) inhibidores de la monoaminooxidasa.

3° *Psicodislépticos.* Este grupo de fármacos, tiene la propiedad de provocar trastornos mentales, es decir, incluye a los perturbadores psíquicos.

### ***Estimulantes Psicomotores.***

Debido a que el método analítico que se validó correspondió a Cafeína, se hará referencia a dicho principio activo y al grupo de clasificación en que se encuentra incluida.

#### ***a) Las Xantinas.***

Estos estimulantes psíquicos corresponden a fármacos clásicos conocidos desde la antigüedad.

### **a.1) Fuente e Historia. <sup>(1,2)</sup>**

**El** café es la semilla madura desecada de la *coffea arábica* o cafeto, que se cultiva en varios países de América del Sur, Centro América, Arabia e Indonesia. La semilla verde, semiesférica, una vez tostada origina el café, contiene como promedio 1.5% de cafeína, además cafeol, (aceite esencial que le da su aroma característico) así como un tanino no bien identificado.

La teofilina, la cafeína y la teobromina son tres alcaloides estrechamente relacionados que se encuentran en plantas de amplia distribución geográfica. Se cree que el hombre paleolítico descubrió las principales plantas con cafeína en todo el mundo, preparando bebidas con ellas.

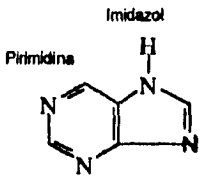
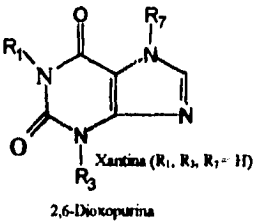
La base de la popularidad de todas las bebidas que contienen cafeína, ha sido la antigua creencia de que ellas tienen acciones estimulantes y antisoporíferas, que levantan el humor, disminuyen la fatiga y aumentan la capacidad para el trabajo.

### **a.2) Química <sup>(1)</sup>**

**El** grupo farmacológico de las xantinas, está formado por la cafeína, la teofilina y la teobromina, que existen en estado natural en una serie de plantas originarias de distintas regiones del mundo: café, té, cacao, mate, kola y guaraná.

**L**a cafeína, la teofilina y la teobromina son derivados de la xantina, por lo que se les denomina xantinas; la xantina deriva a su vez de la purina -unión de los dos heterociclos pirimidina e imidazol-, siendo la 2,6-dioxipurina. Las xantinas de importancia farmacológica resultan de la introducción de grupos metilo en los átomos de nitrógeno heterocíclico; así se originan la teofilina y la teobromina que son dimetilxantinas, y la cafeína que es una trimetilxantina. Estas xantinas pueden considerarse en cierta forma como alcaloides, siendo poco solubles en agua. Forman diversos compuestos que en su mayoría son poco estables, sobre todo en medio ácido.

**a.3) Estructuras Químicas y Potencia. <sup>(1)</sup>**

FARMACO	ESTRUCTURA QUIMICA	ACTIVIDAD FARMACOLOGICA		
		Estimulación Sistema Nervioso Central	Estimulación Cardíaca	Acción Diurética
 <p>PURINA</p>	 <p>2,6-Dioxipurina</p>			
	<p><math>R_1</math>      <math>R_3</math>      <math>R_7</math></p>			
<b>Teofilina</b>	-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -H	++	+++	+++
<b>Teobromina</b>	-H        -CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	+	++	+
<b>Cafeína</b>	-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	+++	+	++

#### **a.4) Mecanismo de Acción. <sup>(1,2,3,4,5,6)</sup>**

**A** continuación se presentan tres acciones celulares básicas de las metilxantinas que explican sus diversos efectos, ellas son:

##### **1) Las asociadas con las translocaciones de calcio intracelular.**

En el músculo esquelético al igual que en el músculo cardíaco, el acoplamiento excitación-contracción se produce por intermedio del ión calcio, que se libera del retículo sarcoplásmico y actúa sobre las proteínas contráctiles del músculo produciendo su contracción.

La cafeína provoca la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico en el músculo estriado. También reduce el ritmo y la capacidad de acumulación del ión calcio por el retículo sarcoplásmico aislado y por mitocondrias. Se considera que este último efecto de la cafeína depende del desacoplamiento de la actividad de la ATPasa del retículo sarcoplásmico y del transporte hacia el interior de calcio. Los efectos de la cafeína sobre los desplazamientos del calcio contribuyen a su capacidad para disminuir el umbral mecánico, aumentar la tensión y prolongar la duración de la sacudida del músculo.

##### **2) Las mediadas por el bloqueo de los receptores de la adenosina.**

Las acciones de la adenosina son mediadas por receptores específicos que residen en las membranas plasmáticas de casi todas las células. El patrón de estas acciones sugiere que la función principal de la adenosina es contribuir en el mantenimiento de un equilibrio entre la disponibilidad y la utilización del oxígeno en una región dada.



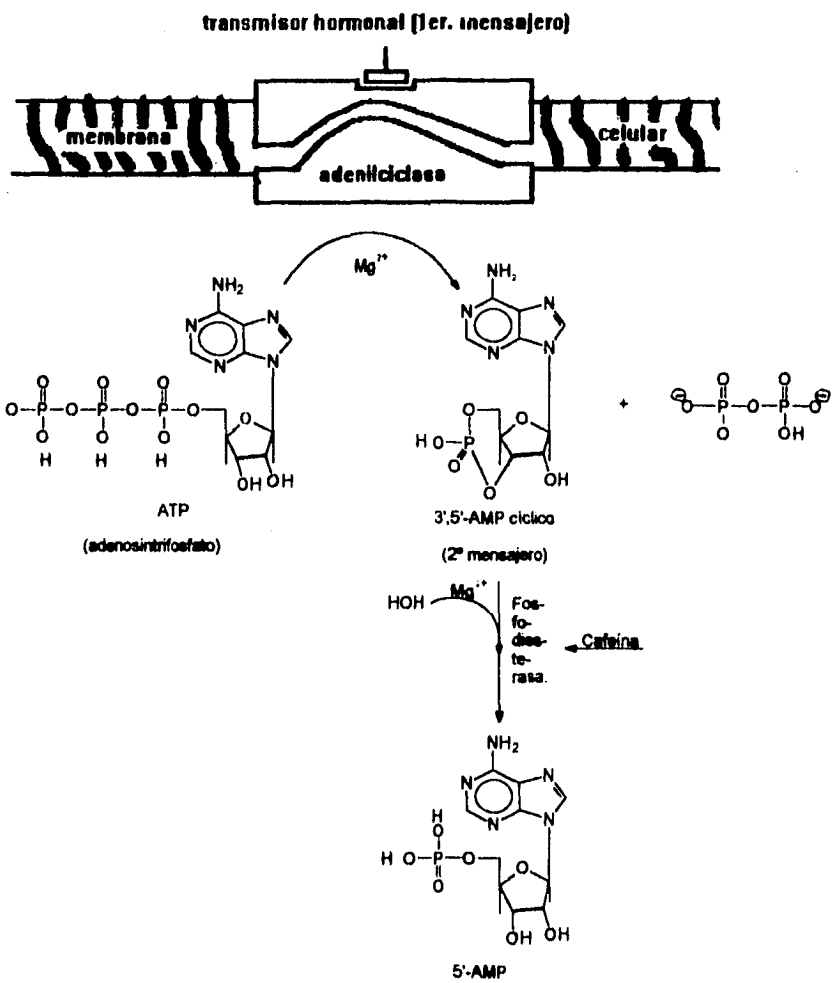
Por ejemplo, la adenosina dilata los vasos sanguíneos cerebrales y coronarios, disminuye la frecuencia de descarga de las neuronas en el sistema nervioso central y en las células de los marcapasos cardíacos, contrae las arteriolas renales aferentes y disminuye el trabajo de absorción de los túbulos renales e inhibe la liberación de neurotransmisores de las estructuras presinápticas.

Los receptores de la adenosina, a veces se denominan receptores purinérgicos  $P_1$ . Los receptores  $P_2$  no están sujetos al bloqueo por las metilxantinas. Se han identificado dos categorías generales de receptores de adenosina (receptores  $P_1$ ); en principio sobre la base de si activan ( $A_2$ ) o inhiben ( $A_1$ ) a la adenilciclase. También apareció evidencia de dos subtipos de receptores  $A_2$  en el tejido cerebral, basada sobre la afinidad relativamente alta ( $A_{2a}$ ) y baja ( $A_{2b}$ ) para la adenosina. La cafeína exhibe una afinidad casi idéntica con todos los tipos de receptores a la adenosina.

### *3) Las mediadas por la acumulación creciente de nucleótidos cíclicos.*

Las metilxantinas deben su acción a la inhibición competitiva del nucleótido cíclico fosfodiesterasa, una enzima que cataliza la conversión del 3',5'-adenosinmonofosfato (3',5'-AMPcíclico) en 5'-adenosinmonofosfato (5'-AMP). En consecuencia aumenta la concentración de 3',5'-AMPcíclico en muchos tejidos. El 3',5'-AMPcíclico juega un papel crítico en la promoción de la glucogenolisis -fuente de producción energética de diversos tejidos, entre ellos el miocardio-. Por consiguiente, un aumento de 3',5'-AMPcíclico puede producir el estímulo psíquico que se observa en la administración de metilxantinas.

El último mecanismo mencionado se resume en el cuadro siguiente:



## b) *CAFEÍNA.*

### \* *Nombre Genérico.* <sup>(7)</sup>

**C**afeína.

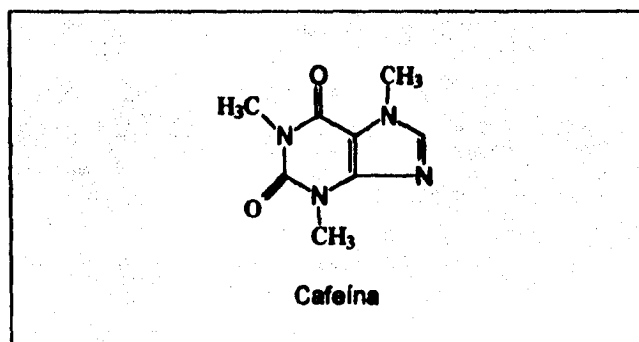
### \* *Nombres Químicos.* <sup>(8,9,10)</sup>

1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina.  
1,3,7-trimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropurina.  
1,3,7-trimetilpurina-2,6(3H,1H)-diona.  
1,3,7-trimetilxantina  
7-metilteofilina.  
1-metilteobromina.

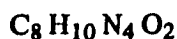
### \* *Sinónimos.* <sup>(9,10)</sup>

Cafeína anhidra.  
Coffeinum.  
Coffeína.  
Guavanina.  
Theína.  
Guaranine.

### \* *Fórmula Desarrollada.* <sup>(8)</sup>



**\* Fórmula Condensada.<sup>(8)</sup>**



**\* Masa Molecular.<sup>(8)</sup>**

194.19

**\* Composición Elemental.<sup>(9)</sup>**

C,49.48%; H,5.19%; N,28.85%; O,16.48%.

**\* Descripción.<sup>(7,8,11,13)</sup>**

**S**e presenta en forma anhidra o hidratada. Corresponde a polvo blanco cristalino o agujas brillantes generalmente aglomeradas; la forma hidratada es eflorescente al aire.

**\* Solubilidad.<sup>(7,8,9)</sup>**

**F**ácilmente soluble en cloroformo y en pirrol; poco soluble en agua, en alcohol y en acetona; ligeramente soluble en benceno y en éter.

**\* Identificación.<sup>(7,11,13)</sup>**

**E**n una cápsula disolver una cantidad de la muestra en ácido clorhídrico, agregar clorato de potasio y evaporar en baño de María hasta sequedad. Invertir la cápsula sobre un recipiente que contenga algunas gotas de SR de amoníaco, el residuo toma coloración púrpura que después desaparece al agregar álcalis fijos.

**\* Punto de Fusión.** <sup>(7,8,11)</sup>

Entre 235° C y 237.5°C determinado después de secar a 80°C por 4 h.

**\* Densidad.** <sup>(8)</sup>

$$d_{4,18} = 1.23$$

**\* Sublimación.** <sup>(8)</sup>

Sublima a 178°C.

**b.1) Espectroscopía de absorción ultravioleta.** <sup>(7)</sup>

El espectro de absorción en la región ultravioleta, de una solución en etanol, exhibe máximo a 273 nm ( $E_{1\%, 1\text{cm}} 519$ ), En solución de ácido clorhídrico 0.1N, presenta máximo a 272 nm ( $E_{1\%, 1\text{cm}} 470$ ).

**b.2) Métodos de Valoración.** <sup>(7,9,11,12)</sup>

**b.2.1) Valoración en medio no acuoso.**

Disolver una cantidad de la muestra en anhídrido acético; calentar suavemente, enfriar, agregar benceno y titular con una solución 0.1N de ácido perclórico, determinar el punto final potenciométricamente.

**b.2.2) Valoración Yodométrica.**

Se mezcla la muestra con una solución (1:1) de ácido sulfúrico y bromuro de iodo. Después se filtra y a una porción del filtrado se adiciona una solución de yoduro de potasio, y la cantidad equivalente de yodo liberado es valorado con tiosulfato de sodio, usando una solución de almidón como indicador.

### **b.3) Parámetros Farmacocinéticos.** <sup>(2,14)</sup>

#### *Tiempo de vida media.*

El tiempo de vida media en el plasma es de 4.9 h.

#### *Volumen de distribución.*

El volumen de distribución es de 0.61 L/Kg

#### *Depuración.*

La depuración en el plasma es de 1.4 mL/min./Kg.

#### *Unión a proteínas.*

En plasma es de 35%.

### **b.4) Farmacocinética.** <sup>(1,10,14,15)</sup>

La cafeína presenta una buena absorción después de una administración oral, y ésta, es más rápida que en una administración intramuscular. La absorción después de una administración rectal es baja y errática.

Con respecto a la absorción digestiva hay que señalar que la cafeína liberada a nivel del estómago se comporta como base sumamente débil y que se encuentra parcialmente ionizada en el jugo gástrico e intestinal, por lo que se absorbe también parcialmente en el estómago e intestino.

La cafeína pasa al sistema nervioso central; concentraciones bajas se encuentran en la leche materna. Se distribuye rápidamente a través del agua corporal pero no parece acumularse en tejidos.

Una vez distribuida por todos los órganos, sufre después la biotransformación, sobre todo en el hígado. La cafeína es metabolizada casi completamente vía oxidación, desmetilación y acetilación; cerca del 85% de la dosis es excretada en la orina en 48 h., con 40% de la dosis como ácido 1-metilúrico, 10 a 15% como 1-metilxantina y alrededor de 35% como 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil y 5-acetilamino-6-amino-3-metiluracilo; otros metabolitos excretados en la orina incluyen teofilina, 1,7-dimetilxantina (paraxantina), 7-metilxantina y ácido 1,3-dimetilúrico.

Todos los metabolitos son excretados por el riñón, así como una pequeña cantidad ( un 10% ) de cafeína no transformada.

### **b.5) Farmacodinamia. (1,2,10,15)**

#### ***Sistema Nervioso central.***

Las xantinas son estimulantes del sistema nervioso central, y actúan primero sobre la corteza cerebral y luego sobre el bulbo.

*Corteza Cerebral.* La cafeína estimula las funciones psíquicas, el esfuerzo intelectual se hace mas fuerte, lo mismo que la asociación de ideas, la atención, la capacidad de concentrarse, existiendo también una sensación de bienestar.

En lo que se refiere, al sueño, la cafeína es capaz de retardar el comienzo del mismo en los sujetos normales, aumenta los movimientos espontáneos que se producen en su transcurso.

*Bulbo.* La cafeína estimula los centros bulbares, especialmente cuando están deprimidos; son estimulados el centro respiratorio, el centro vasomotor y el centro vago.

#### ***Sistema Cardiovascular.***

*Corazón.* La cafeína es un estimulante cardíaco y puede producir pequeñas disminuciones de la frecuencia cardíaca y aumentos modestos de la presión sanguínea sistólica y diastólica.

*Circulación Coronaria.* La cafeína provoca vasodilatación con aumento del caudal sanguíneo coronario.

*Circulación Cerebral.* La cafeína provoca una disminución del caudal sanguíneo cerebral, eso se debe a un aumento de la resistencia periférica por vasoconstricción, que trae aparejado un descenso de la presión del líquido cefalorraquídeo.

#### ***Sistema Respiratorio.***

*Respiración.* Las xantinas son estimulantes respiratorios que actúan sobre el centro bulbar respectivo, siendo el efecto más notable si este centro está deprimido por drogas. La acción es directa sobre este centro.

#### ***Tracto Digestivo.***

*Estómago.* Las xantinas, especialmente la cafeína, por vía oral o parenteral, provocan un aumento prolongado de la secreción gástrica; aumenta tanto la secreción de ácido clorhídrico como la de pepsina. A dosis terapéuticas en el hombre, el peristaltismo no es afectado.

### **Riñón.**

**L**as xantinas son diuréticas; aumentan el volumen urinario en el hombre. Bajo la acción de la cafeína se induce una suave diuresis por el incremento del flujo sanguíneo, así como, de la filtración glomerular y disminuye la reabsorción de sodio y agua a nivel especialmente del túbulo proximal.

### **Músculo Esquelético.**

**L**as xantinas aumentan la capacidad funcional del músculo, haciendo más potente la contracción, mientras que la fatiga disminuye. En el hombre, la cafeína aumenta la capacidad de trabajo muscular, refuerza la contracción y retarda la fatiga. El aumento de la capacidad de trabajo se debe tanto a la acción directa del fármaco sobre el músculo, como a la estimulación del sistema nervioso central, que no sólo mejora la función psíquica sino que también disminuye la sensación de fatiga.

### **b.6) Vía de Administración. <sup>(17)</sup>**

**Oral.**

### **b.7) Dosis. <sup>(17)</sup>**

**L**a dosis inicial es de media a dos cucharaditas 3 veces al día, según edad y peso.

### **b.8) Formas Farmacéuticas Dosificadas. <sup>(17)</sup>**

Grageas que contienen 30mg de cafeína.

Solución oral con 2.5mg de cafeína por cada ml.

Jarabe que contiene 250mg de cafeína por cada 100ml.



**b.9) Contraindicaciones. (1,17)**

**H**ipersensibilidad a los componentes de la fórmula. Hipertensión arterial, cardiopatías; pacientes con glaucoma, asma, hipertrofia prostática, padecimientos renales e hipertiroideos.

No conviene utilizar a la cafeína, en los casos de úlcera gastroduodenal.

**b.10) Usos. (1,10,14,17)**

**L**a principal aplicación terapéutica de la cafeína es como un estimulante del sistema nervioso central.

Se emplea en los estados de fatiga mental y depresión leve, astenia, en la convalecencia de las enfermedades infecciosas, en la depresión central que puedan producir los fármacos sedantes, tranquilizantes y antihistamínicos.

En las intoxicaciones por depresores del sistema nervioso central, la cafeína se comporta como antagonista de estos depresores, siendo especialmente útil la estimulación cortical y del centro respiratorio.

Algunas veces la cafeína se emplea como diurético, aunque esta acción diurética es más débil que utilizar las otras xantinas.

La cafeína es usada sólo o en combinaciones analgésicas para el tratamiento de dolores de cabeza, parenteralmente junto con benzoato de sodio para el tratamiento de insuficiencia respiratoria y oralmente sólo o en combinación con otros fármacos para aliviar la tensión y la retención de fluidos asociados con la menstruación.

La cafeína junto con acetaminofén, maleato de clorfeniramina y clorhidrato de fenilpropanolamina es una preparación usada como antihistamínico y descongestivo del tracto respiratorio, con acción analgésica y antipirética. Está indicada en rinorrea, coriza, rinitis alérgica, nasofaringitis, fiebre del heno y gripe.

**b.11) Efectos Colaterales. (1,10,15,17)**

**C**uando se administra cafeína a individuos sensibles a ella, suele presentarse somnolencia, sequedad de boca, nerviosismo, erupciones cutáneas, insomnio, temblores e hiperestesia, taquicardia y otras arritmias como contracciones ventriculares prematuras; con dosis mayores, se producen convulsiones focales generalizadas.

La cafeína y las bebidas que la contienen son capaces de crear cierta farmacodependencia, tipo cafeínico, leve desde luego, que se caracteriza por tolerancia y dependencia psíquica, acostumbamiento con deseo de ingerirlas; su supresión lleva a algunos pequeños trastornos como cefalea, mareos, irritabilidad e inquietud; no se trata de adicción sino de habituación.

## **2.2) VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.** **(18,19,20,21,22)**

**A**ctualmente existe abundante literatura referente a validación de métodos analíticos, ésto se debe principalmente a que antes de que se manejara la validación como un sistema total e integrado en cualquier empresa farmacéutica, ya se realizaba la validación de la metodología empleada en el análisis rutinario de las formas farmacéuticas elaboradas.

Sin embargo, es importante no perder de vista que la validación de un método analítico es sólo una parte de un programa de validación que integra a proveedores, procesos, personal, áreas, sistemas y todo aquello que de una manera u otra participa en la elaboración de un producto que debe cumplir únicamente un requisito:

### **CALIDAD**

La importancia de la calidad de los medicamentos es un tema que no se pone a discusión. En general, la situación actual del control de calidad de los medicamentos puede considerarse satisfactoria. Sin embargo, siempre es posible mejorar y facilitar dicho control a través de las Buenas Prácticas de Laboratorio y de las verificaciones analíticas de los procedimientos involucrados en la manufactura del producto.

En lo que a verificaciones analíticas se refiere, la metodología empleada para controlar procesos y productos ha venido avanzando a grandes pasos, tanto científica como tecnológicamente. A pesar de ésto, no debe olvidarse que un resultado analítico sólo nos acerca al verdadero valor. Hasta el momento, no es aún posible tener la certeza plena de que el resultado obtenido es la verdad absoluta. Por esta razón, una validación adecuada de la metodología nos permite conocer sobre qué margen de error estamos trabajando y "controlar" dicho error.

Así como se entiende y se acepta que un buen producto es el resultado de un buen proceso y que ambos deben probarse y controlarse para asegurar la calidad final, que es lo que se le va a ofrecer al consumidor, de la misma manera es necesario asegurar la calidad de los procedimientos empleados en el laboratorio y esto sólo se logra con la **validación**.

Un avance importante como base regulatoria lo podemos encontrar en la USP XXIII y en la Ley General de Salud; esta última menciona que el control aplicado a cualquier preparado farmacéutico debe de comprobarse y validar cualquier técnica empleada para ese fin. Con esta regulación, las autoridades sanitarias y del sector salud exigen la validación de métodos analíticos.

La validación de un método analítico 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.

Todo el proceso de validación debe documentarse; esta documentación permite llevar a cabo posteriormente cada uno de los pasos de una validación. En la documentación debe de constar como mínimo:

- Los parámetros de validación.
- La denominación de los lotes, origen de las pruebas y sustancias de comparación.
- La calidad de la sustancia de comparación.
- Los instrumentos utilizados.
- Los espectrogramas, cromatogramas, curvas de registro, etc.
- Los resultados y cálculos.

La validación incluye dos partes:

1) Sistema:

Linealidad.  
Precisión (Repetibilidad).

2) Método:

Especificidad  
Linealidad.  
Exactitud.  
Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad).  
Estabilidad de la muestra analítica.

## **ESPECIFICIDAD.**

### *Definición.*

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al fármaco de interés y no a otros componentes de la muestra, que estén presentes en la formulación.

El parámetro de Especificidad se puede evaluar de dos formas, una es para análisis de control de calidad y otro para métodos indicadores de estabilidad o métodos para análisis de fármacos en fluidos biológicos, la aplicación de uno u otro va a depender del objetivo del método. En este caso al ser un método de control de calidad se procederá como sigue:

### *Determinación:*

Con el método propuesto:

Analizar placebos del producto que contengan todos los componentes de las formulaciones excepto el principio activo que se analiza.

### *Criterio:*

Determinar que el método desarrollado es capaz de separar la sustancia de interés de cualquier interferencia presente, como excipientes, sustancias relacionadas, productos de contaminación, de degradación; de la muestra del material analizado.

## **LINEALIDAD.\***

### *Definición:*

La linealidad es la capacidad para asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente, o bien mediante una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo.

### *Determinación:*

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida), utilizando cuando menos cinco concentraciones diferentes, y haciendo el análisis cuando menos por duplicado, para cada concentración.

\* Los cálculos para cada uno de los parámetros se presentan en el ANEXO I

Cuando se trabaje con el sistema se utiliza solamente la sustancia de referencia, y por el contrario, cuando se trabaje con el método se utiliza el material que se esté analizando.

El intervalo entre las concentraciones a analizar, dependerá del propósito del método; para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración de 100%. Generalmente se recomienda una separación de concentraciones de un 20% - 25%.

La linealidad se expresa generalmente en términos de la varianza alrededor de la pendiente de la recta ajustada (línea de regresión), calculada a partir de una relación matemática con los resultados del análisis de muestras con concentraciones variables y conocidas de la sustancia. La relación matemática que describe la ecuación de la recta es la siguiente:

$$y = m x + b$$

donde:

- y = respuesta medida.
- m = pendiente de la recta.
- x = concentración.
- b = ordenada al origen.

Calcular:

- La pendiente de la recta (m).
- La ordenada al origen (b).

Para conocer si los valores de la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) que se obtienen experimentalmente, son estadísticamente diferentes a los valores considerados como teóricos, se aplican pruebas de t, y se establecen los límites de confianza para (m) y para (b).

- Coeficiente de correlación (r).
- Coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>).

El coeficiente de determinación de la relación lineal simple debe ser mayor o igual a 0.98 y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple no debe ser estadísticamente significativa. Esto es, los datos de la curva de calibración se sujetan a un análisis de varianza en donde los parámetros de evaluación son las F resultantes de la distribución y tratamiento de datos.

### *Criterios de Aceptación:*

- 1.- La pendiente (m) de la línea de regresión debe ser estadísticamente igual a 1.
- 1.1- Si  $|t_{cal}| < t_{tab}(n-2, 0.975)$  y los límites de confianza incluyen al 1, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la pendiente que se obtiene en forma experimental, no es significativamente diferente de 1.
- 2.- La ordenada al origen (b) de la línea de regresión debe ser estadísticamente igual a cero.
- 2.1- Si  $|t_{cal}| < t_{tab}(n-2, 0.975)$  y los límites de confianza incluyen al 0, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la ordenada al origen que se obtiene en forma experimental, no es significativamente diferente de 0.
- 3.- El coeficiente de correlación (r) debe de ser mayor o igual a 0.99
- 4.- El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe de ser mayor o igual a 0.98
- 4.1- Si  $F_{regresión} \geq F_{regresión\ tab}(g.l.r., g.l.er.; 0.01)$ , entonces existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.
- 4.2- Si  $F_{falta\ de\ ajuste} > F_{falta\ de\ ajuste\ tab}(g.l.fa., g.l.ep.; 0.05)$ , entonces existe falta de ajuste a la relación lineal simple, cantidad adicionada, propiedad medida.

## **PRECISIÓN.**

**L**a precisión es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el método se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea de un producto, de una materia prima o de un espécimen en general. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación.

La precisión se evalúa como:

## **REPETIBILIDAD.\***

### *Definición:*

**E**s la precisión y se evalúa como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes de una misma preparación, realizadas bajo las mismas condiciones experimentales.

### *Determinación:*

El análisis se realiza por sextuplicado de una misma preparación (sustancia de referencia en "sistema" y material que se está analizando en "método"), correspondiente al 100%, que generalmente debe ser el punto medio de las curvas de linealidad del sistema y del método.

### *Calcular:*

El coeficiente de variación (CV).

### *Criterio:*

El coeficiente de variación debe ser  $\leq 1.5\%$  para el sistema y  $\leq 3.0\%$  para el método.

## **REPRODUCIBILIDAD.\***

### *Definición:*

**E**s la precisión del método analítico y manifiesta la concordancia entre determinaciones independientes de una muestra homogénea del material que se esté analizando bajo diferentes condiciones, pues se introducen factores de variación, respecto a días, analistas, equipos; por lo cual, se realizan estas determinaciones en diferentes días y con diferentes analistas y/o equipos.

### *Determinación, (Método):*

Se determina en forma independiente y por triplicado por cada analista y en cada día, empleando una muestra homogénea, del material que se analiza, utilizando una sustancia de referencia de la misma naturaleza del ingrediente activo de la muestra.

Los análisis se realizan en diferentes días y por dos analistas; el placebo se carga al 100%, que debe de ser el punto medio de las curvas de calibración de linealidad del sistema y del método.

*\*Los cálculos para cada uno de los parámetros se presentan en el ANEXO I*



Se calcula el coeficiente de variación.

Los resultados de reproducibilidad se sujetan a un diseño factorial de dos factores o dos niveles y a un tratamiento estadístico de análisis de varianza para obtener el coeficiente de variación; donde se generan las F correspondientes a las dos fuentes de variación analítica, días y analistas.

*Criterio de Aceptación:*

En la Reproducibilidad, el parámetro que se emplea es el coeficiente de variación, que debe de cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado. En este caso, el método es espectrofotométrico con un coeficiente de variación  $\leq 3.0\%$ .

Si  $F_{analista} < F_{analista} (g.l.a., g.l.d.; 0.05)$

El método es reproducible por los analistas.

Si  $FD_{dia} < FD_{dia} (g.l.d., g.l.a-d.; 0.05)$

El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Si  $F_{analista-día} < F_{analista-día} (g.l.a-d., g.l.e.; 0.05)$

El método analítico no presenta interacción analista-día.

## **EXACTITUD AL 100%.\***

La exactitud de un método analítico se define como la concordancia entre el valor promedio obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

*Determinación:*

El análisis se realiza por sextuplicado, de una muestra adicionada de una concentración conocida de la sustancia que se analiza o de la sustancia que se analiza adicionada de placebo, simulando las condiciones de la muestra. La concentración resultante de estas preparaciones debe ser del 100%. Las muestras deben prepararse de manera independiente y se cuantifica contra una preparación de la sustancia de referencia.

\*Los cálculos para cada uno de los parámetros se presentan en el ANEXO I

**Cálculos:**

La exactitud se evalúa por medio del modelo probabilístico "t de Student" y el cálculo del intervalo de confianza para la media y/o a través del cálculo del coeficiente de variación para el porcentaje de recobro.

**Criterio de Aceptación.**

El método de medición es exacto si cumple con los siguientes criterios:

1.- Si  $|t_{cal}| < t_{tab(n-2, 0.975)}$  y los límites de confianza incluyen al 100%, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la media que se obtiene en forma experimental, no es significativamente diferente del 100%.

2.- El valor del coeficiente de variación para el porcentaje de recobro, debe de ser  $\leq 3.0\%$  para técnicas espectrofotométricas.

## **ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA.\***

**Definición:**

**M**ediante este análisis se pretende conocer las condiciones en las cuales la muestra en proceso de análisis, mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado. Este proporciona una mayor confiabilidad en los resultados, pues se comprueba que no presenta degradación, antes de medir su respuesta para ser cuantificada.

**Determinación:**

El estudio de estabilidad de las soluciones de la muestra, se realiza de la forma siguiente: las soluciones analizadas previamente, se almacenan en diferentes condiciones, por ejemplo, en refrigeración, en la oscuridad, a temperatura ambiente y en presencia de luz blanca. Posteriormente se vuelven a analizar en determinados tiempos que se establezcan.

**Cálculos:**

Los resultados obtenidos se tabulan con base en el formato del Anexo I.

***Criterio de Aceptación:***

**La media del factor (I) para cada condición/tiempo se debe encontrar entre los valores de 97.0% y 103.0%.**

***\*Los cálculos para cada uno de los parámetro se presentan en el ANEXO I***

## **CAPITULO III**

### **3.- PARTE EXPERIMENTAL**

La parte experimental consistió en aplicar el método para cuantificar cafeína en la forma farmacéutica de jarabe, de uso pediátrico, que presenta la siguiente formulación:

Acetaminofén . . . . .	2000 mg
Maleato de Clorfeniramina . . . . .	80 mg
Clorhidrato de fenilpropanolamina. . . . .	100 mg
Cafeína . . . . .	250 mg
Vehículo . . . . .	cbp 100 ml

El fundamento del método se describió en el capítulo I.

#### **3.1 Desarrollo del Método Analítico.**

##### **a) Reactivos.**

- Solución de Acido Clorhidrico 0.1N
- Cloroformo R.A.
- Hidróxido de Amonio concentrado R.A.
- Solución de Hidróxido de Sodio 0.1N aprox.
- Solución de Hidróxido de Sodio 1.0N aprox.
- Metanol R.A.
- Sulfato de Sodio Anhidro R.A.

##### **b) Fase Móvil.**

La Fase Móvil corresponde a una mezcla de Metanol-Hidróxido de amonio conc., (100:3).

##### **c) Fase Estacionaria:**

Cromatofolios AL de Silicagel 60 F<sub>254</sub> para cromatografía en capa fina. Espesor de la capa 0.2 mm.

**d) Preparación de la Solución de Referencia.**

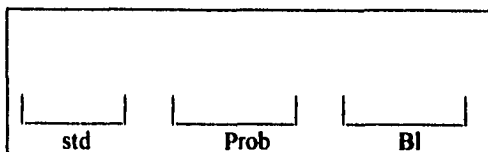
**P**esar exactamente alrededor de 25 mg de cafeína, sustancia de referencia, transferirla cuidadosamente a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar aproximadamente 70 mL de cloroformo R.A., agitar hasta disolución, llevar al aforo con el mismo disolvente y agitar. De esta solución, tomar 2 mL y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar al aforo con cloroformo R.A.

**e) Preparación de la solución de la muestra problema**

**T**ransferir una alícuota de 20 mL del jarabe homogeneizado a un embudo de separación de 250 mL, adicionar 30 mL de agua destilada y 5 mL de solución de hidróxido de sodio 1.0 N, mezclar el contenido del embudo y extraer con tres porciones de cloroformo de 50 mL y una de 25 mL, agitando por 30 seg durante cada extracción. Reunir los extractos clorofórmicos en otro embudo de separación y lavarlos con 30 mL de solución de hidróxido de sodio 0.1N. Desechar la capa acuosa y filtrar la fase clorofórmica a través de papel filtro Whatman No.1 que contenga 0.5 g de sulfato de sodio anhidro, previamente humedecido con cloroformo. Recibir la solución clorofórmica filtrada en un matraz volumétrico de 200 mL, lavar el embudo con porciones de cloroformo, llevar al volumen con el mismo disolvente y mezclar.

**f) Procedimiento.**

**A**plicar en una cromatoplaque de gel de sílice de 10 x 20 cm, 0.4 mL de la solución de la muestra problema, 0.4 mL de la solución de referencia y 0.4 mL de cloroformo (blanco), de acuerdo con el siguiente esquema:



St= Sol. de la Sust. de Ref.  
P= Sol. de la Muestra Problema  
Bl=Sol. del Blanco.

Colocar la cromatoplaca en una cámara cromatográfica que contenga la fase móvil saturada. Dejar correr el disolvente hasta una altura aproximada de 7.5 cm desde el punto de aplicación. Sacar la placa de la cámara, marcar el frente del disolvente, dejarla secar y proceder a identificar y marcar las bandas correspondientes a la cafeína utilizando como revelador lámpara de luz U.V. (254 nm), raspar por separado las bandas marcadas, cuidando que sus dimensiones sean iguales. Transferir el material raspado de cada banda, a 3 matraces volumétricos de 10 mL, agregar a cada uno 5 mL de ácido clorhídrico 0.1N, agitar durante 5 min y llevar al volumen con solución de ácido clorhídrico 0.1N. Filtrar las soluciones y determinar las absorbancias de las soluciones obtenidas (Sol. de la Sustancia de Referencia, de la Muestra Problema y del Blanco -sol. de HCl 0.1N-) en un espectrofotómetro adecuado, a una longitud de onda de 272 nm.

**g) Cálculos.**

Calcular la cantidad de cafeína expresada en mg, contenida en 100 ml de jarabe, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mg de cafeína /100ml} = \frac{\text{Ap - Abl}}{\text{Ast - Abl}} \times \text{C} \times \text{FD} \times 100$$

$$\text{M}$$

- En donde:
- Ap = Absorbancia de la solución de la muestra problema.
  - Ast = Absorbancia de la solución de la sustancia de referencia.
  - Abl = Absorbancia de la solución del blanco
  - C = Concentración de la Solución de la Sustancia de Referencia, expresada en mg/ml
  - FD = Factor de dilución de la muestra.
  - M = Muestra utilizada en el análisis.

\* Para facilitar la expresión de los resultados, éstos se expresarán en µg/ml

### **3.2.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

La validación del método analítico se realizó evaluando los siguientes parámetros:

#### **a) Especificidad.**

Se efectuó un barrido espectrofotométrico de la :

- Solución de la Sustancia de Referencia.
- Solución de la Muestra Problema.
- Solución del Placebo.
- Solución del Blanco.

a un intervalo de longitudes de onda entre 252 y 292 nm.

#### **b) Linealidad del Sistema.**

Se prepararon soluciones de cafeína, sustancia de referencia, en cinco diferentes concentraciones ( 80, 90, 100, 110 y 120% ) de la cantidad de cafeína expresada en el marbete del jarabe que se analiza. Cada una de las concentraciones se analizó por duplicado.

#### **c) Repetibilidad del Sistema.**

Esta prueba se realizó al analizar seis diferentes muestras de soluciones preparadas con cafeína, Sustancia de Referencia correspondiente al 100% de la cantidad expresada en el marbete del jarabe que se analiza.

#### **d) Linealidad del Método.**

Se analizaron muestras de placebos adicionados con cafeína, sustancia de referencia, en concentraciones correspondientes al 80, 100 y 120% de la cantidad expresada en el marbete del jarabe. Cada placebo cargado se analizó por triplicado.

#### **e) Exactitud del Método.**

Se efectuó analizando seis muestras diferentes de placebos adicionados con cafeína, sustancia de referencia, en una concentración del 100% de la cantidad expresada en el marbete del producto. Se compararon los porcentajes de la cantidad encontrada, con los porcentajes adicionados de dicha sustancia de referencia.

#### **f) Repetibilidad del Método.**

Se analizaron seis muestras diferentes de un placebo al que se le adicionó cafeína, en una concentración del 100% de la cantidad expresada en el marbete de la muestra problema.

#### **g) Reproducibilidad del Método.**

Dos analistas realizaron por triplicado, en días diferentes, la valoración en muestras de un placebo al que se le adicionó cafeína, en una concentración del 100% de la cantidad expresada en el marbete del jarabe.

#### **h) Estabilidad de la muestra analítica.**

Para la determinación de este parámetro se analizaron tres muestras de un placebo al que se le adicionó Cafeína, Sustancia de referencia, en una concentración que corresponde al 100% de la cantidad expresada en el marbete. Posteriormente en cada caso se desarrolló el procedimiento indicado hasta obtener las soluciones clorofórmicas de la muestra problema. Dichas soluciones se mantuvieron durante 3, 6 y 24 horas, en las condiciones que a continuación se indican:

- Luz blanca
- Oscuridad
- Refrigeración

Al transcurrir cada tiempo se prosiguió con el procedimiento analítico y se cuantificó la cafeína.



## CAPITULO IV

### 4.- RESULTADOS.

#### 4.1.- Especificidad.

En la tabla No. 1, se presentan los resultados de las muestras analizadas para evaluar este parámetro.

Tabla No 1

	Absorbancia l $\lambda = 272 \text{ nm}$	C adic. ( $\mu\text{g/ml}$ )	C enc. ( $\mu\text{g/ml}$ )
Cafeína (Sust. de Referencia)	0.471	10.10	10.10
Muestra Problema	0.467	10.02	10.01
Placebo	despreciable	----	----
Blanco	0.000	----	----

C adic. = Concentración adicionada de Cafeína.

C enc. = Concentración encontrada de Cafeína.

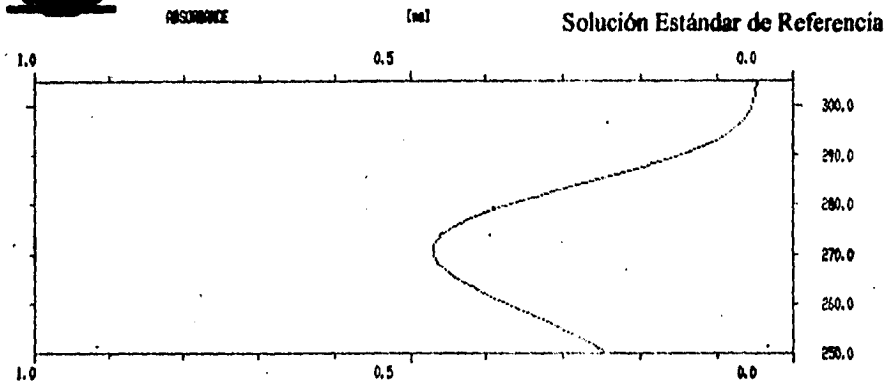
Los espectros de absorción correspondientes son: Cafeína, Sustancia de Referencia, fig. No.1; Muestra Problema, fig. No.2; Placebo, fig No. 3 y Blanco, fig. No.4.

Analizando los datos de la tabla No. 1 y los espectros de absorción de las figuras 1, 2, 3 y 4 se plantea lo siguiente:

- Los espectros de absorción obtenidos al efectuar el procedimiento del método propuesto para la valoración de cafeína en la solución de referencia y en la muestra problema (jarabe), son semejantes. En ambas soluciones se presentan valores de absorbancia cercanos a una  $\lambda$  aproximada a la reportada en la literatura.

**TESIS SIN PAGINACION**

**COMPLETA LA INFORMACION**

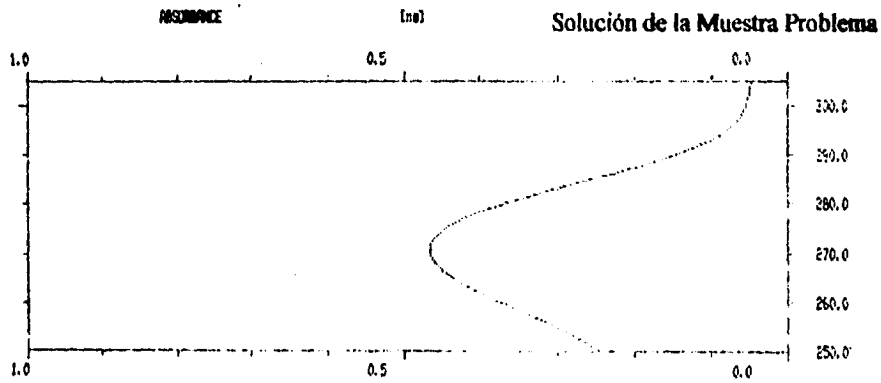


THRESHOLD : 0.000

BATCH: 006

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
001	18-05	271.0 nm (1931)	0.471 006

Figura No. 1



THRESHOLD : 0.000

BATCH: 007

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
001	18-07	271.0 nm (1931)	0.467 007

Figura No. 2

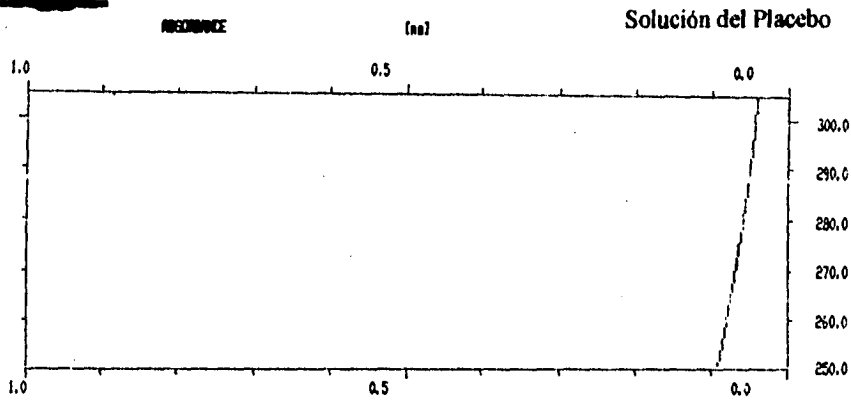


Figura No. 3

THRESHOLD : 0.100

BATCH: 003

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
001	19:23	No Peaks detected !	

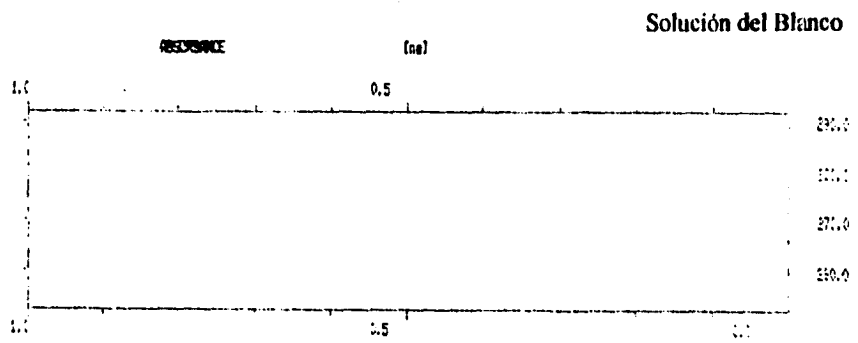


Figura No. 4

THRESHOLD : 0.100

BATCH: 005

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
	17:48	No Peaks detected !	



- El placebo sin cafeína presentó una absorbancia despreciable, esto nos indica que ni el vehículo del jarabe ni los otros componentes de la formulación, interfieren significativamente en la determinación de la cafeína para el método propuesto.
- El blanco no presentó absorbancia por lo que no causa interferencia.

En base a esto, se concluye que el método propuesto para la determinación de cafeína en jarabe es específico.

#### 4.2.-Linealidad del Sistema.

La tabla No. 2 muestra los resultados obtenidos durante la realización de la prueba de Linealidad del Sistema y en la gráfica No. 1 se observa la tendencia lineal de los datos:

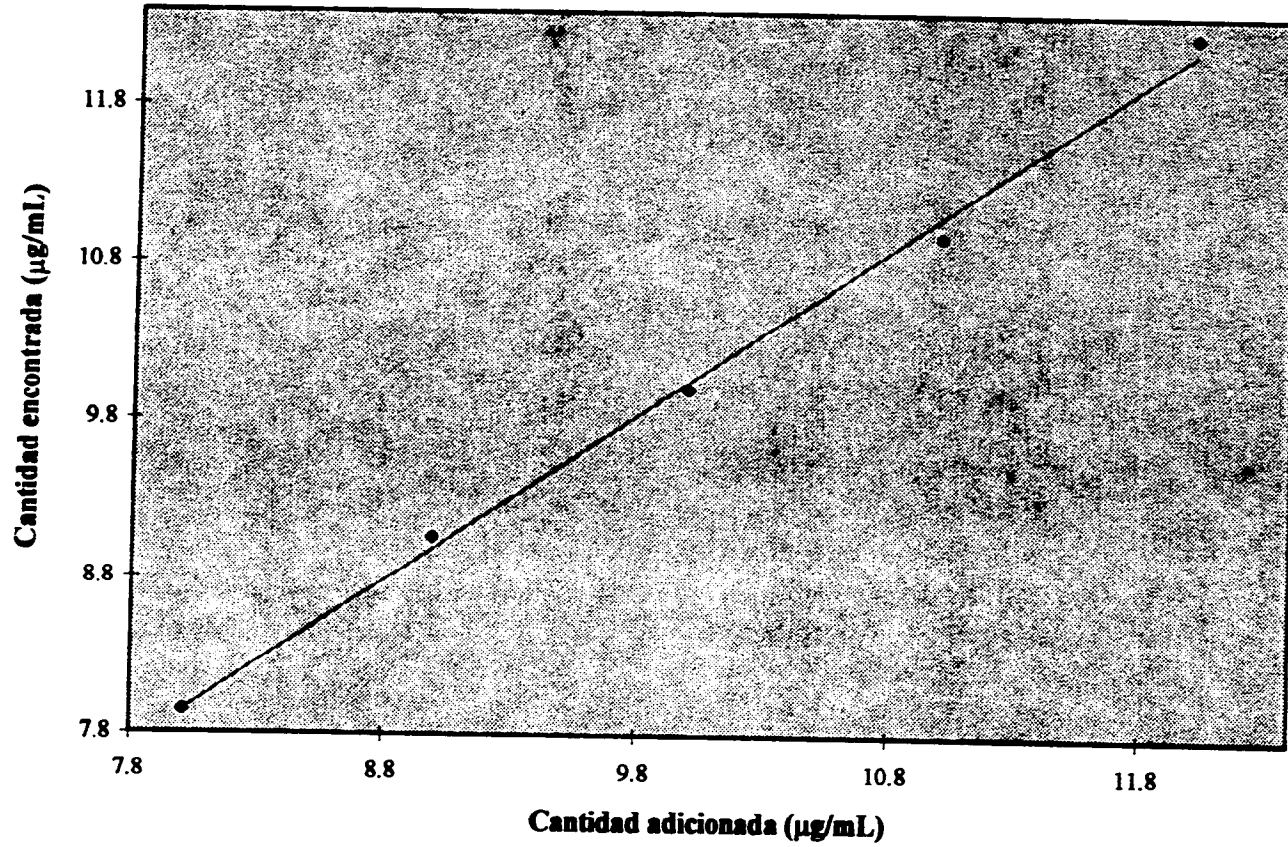
**Tabla No. 2**

<i>Cantidad Adicionada (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i>	<i>Cantidad Encontrada (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i>
7.98	7.94
8.03	7.96
8.99	9.04
8.98	9.07
10.02	10.05
9.98	9.95
10.99	10.97
11.01	10.99
12.02	12.28
12.00	12.26

<i>Promedio de la cantidad adicionada (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i>	<i>Promedio de la cantidad Encontrada (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i>	<i>Regresión Lineal</i>
8.01	7.95	
8.99	9.06	$m = 1.0539$
10.00	10.00	$b = -0.488$
11.00	10.98	$r = 0.9984$
12.01	12.27	$r^2 = 0.9968$

# LINEALIDAD DEL SISTEMA

Solución de Cafeína, Sustancia de Referencia



GRÁFICA No. 1

<i>Ordenada al Origen</i>	<i>Pendiente</i>
$t_{cal} = 2.3777$ $t_{tab(3,0.975)} = 3.1825$ I.C. = $-0.488 \pm 0.7033$ L.S. = 0.2153 L.I. = -1.1913	$t_{cal} = -2.21$ $t_{tab(3,0.975)} = 3.1825$ I.C. = $1.0539 \pm 0.0697$ L.S. = 1.1236 L.I. = 0.9842

Determinación de la prueba de F :

$$\begin{aligned}
SCr &= 22.14 & FR_{tab(1,8; \alpha 0.01)} &= 11.26 \\
SCer &= 0.25 \\
SCep &= -6.55 & Ffa_{tab(3,5; \alpha 0.05)} &= 5.41 \\
SCfa &= 6.8
\end{aligned}$$

<i>Fuente de variación</i>	<i>G. L.</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Media de Cuadrados</i>	<i>F<sub>exp</sub></i>
<i>Regresión</i>	1	22.14	22.14	$F_R = 708.48$
<i>Error de Regresión</i>	8	0.25	0.03125	
<i>Falta de ajuste</i>	3	6.8	2.27	$F_a = -1.7328$
<i>Error Puro</i>	5	-6.55	1.31	

Analizando los resultados se puede decir que el Sistema de medición es lineal, ya que  $b$ ,  $m$  y  $r$  cumplen con los criterios de aceptación, tal como se muestra a continuación:

- Ordenada al origen ( $b$ ):

Como  $|t_{cal}| < t_{tab(3,0.975)}$  y los límites de confianza incluyen al 0, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la ordenada al origen obtenida experimentalmente, no es significativamente diferente de 0.

- Pendiente ( m ):

Como  $|t_{cal}| < t_{tab(3,0.975)}$  y los límites de confianza incluyen al 1, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la pendiente obtenida experimentalmente, no es significativamente diferente de 1.

- Coeficiente de correlación ( r ):

$$r > 0.99$$

Como  $F_R \geq F_{tab(1,8;\alpha 0.01)}$ , entonces existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

Como  $F_n < F_{tab(3,5;\alpha 0.05)}$ , entonces no existe falta de ajuste a la realización lineal simple, cantidad adicionada, propiedad medida.

- Coeficiente de determinación (  $r^2$  ):

$$r^2 > 0.99$$

#### 4.3.- Repetibilidad del Sistema:

La tabla No. 3 presenta los resultados obtenidos para evaluar este parámetro:

**Tabla No. 3**

<i>Cantidad Adicionada</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Cantidad Encontrada</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>% Encontrado</i>
9.98	9.83	98.5
10.00	9.96	99.6
10.02	9.87	98.5
9.98	9.91	99.3
10.02	9.98	99.6
9.98	9.83	98.5

$$n = 6$$

$$X = 99.0 \%$$

$$S_x = 0.6$$

$$\text{C.V.} = 0.6 \%$$



El sistema de medición es repetible, ya que, el C.V. obtenido en forma experimental es menor del 1.5% .

#### 4.4.-Linealidad del Método.

La tabla No. 4 muestra la cantidad adicionada de Cafeína a placebos, la cantidad encontrada en la muestra y el porcentaje correspondiente. En la gráfica No. 2 se observa la tendencia lineal de los datos:

Tabla No. 4

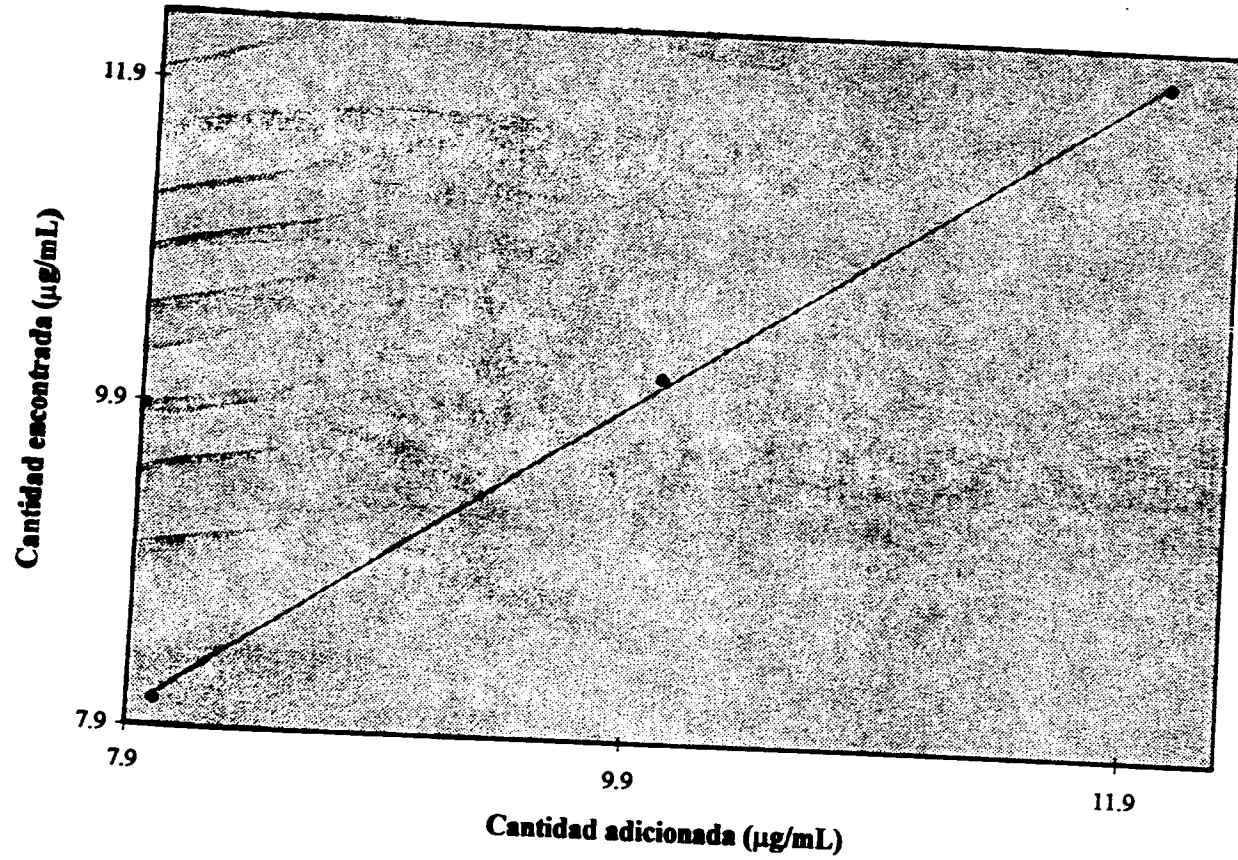
<i>Cantidad Adicionada (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i>	<i>Cantidad Encontrada (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i>	<i>% Encontrado</i>
8.01	8.06	100.6
8.01	8.09	101.0
8.01	8.06	100.6
10.01	10.25	102.4
10.01	10.11	101.0
10.01	10.13	101.2
12.01	12.11	100.8
12.01	12.09	100.7
12.01	12.04	100.2

<i>Promedio Cantidad Adicionada (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i>	<i>Promedio Cantidad Encontrada (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i>	<i>Regresión Lineal</i>
8.01	8.07	$m = 1.0025$
10.01	10.16	$b = 0.0694$
12.01	12.08	$r^2 = 0.9987$
		$r = 0.9993$

<i>Ordenada al Origen</i>	<i>Pendiente</i>
$t_{\text{cal}} = 0.4952$	$t_{\text{cal}} = 0.1809$
$t_{\text{tab}(3,0.975)} = 3.1825$	$t_{\text{tab}(3,0.975)} = 3.1825$
$I.C. = 0.0694 \pm 1.7814$	$I.C. = 1.0025 \pm 0.1753$
$L.S. = 1.8508$	$L.S. = 1.1778$
$L.I. = -1.792$	$L.I. = 0.8272$

# LINEALIDAD DEL MÉTODO

Placebo cargado con Cafeína, Sust. de Ref.



GRÁFICA No 2

**Determinación de la Prueba de F:**

$$\begin{aligned} SCr &= 23.96 & FR_{tab(1,7;\alpha 0.01)} &= 12.25 \\ SCer &= 0.5074 \\ SCep &= -0.6606 & Ffa_{tab(1,6;\alpha 0.05)} &= 5.99 \\ SCfa &= 1.168 \end{aligned}$$

<i>Fuente de Variación</i>	<i>G. L.</i>	<i>Suma de Cuadrado</i>	<i>Medio de Cuadrado</i>	<i>Fexp</i>
<i>Regresión</i>	1	23.96	23.96	<b>FR= 330.5</b>
<i>Error de Regresión</i>	7	0.5074	0.0725	
<i>Falta de Ajuste</i>	1	1.168	1.168	<b>Ffa= -10.6</b>
<i>Error Puro</i>	6	-0.6606	-0.1101	

**El método de medición es lineal, ya que, b, m y r cumplen con los criterios de aceptación, como se muestra a continuación:**

- Ordenada al origen ( b ) :

Como  $|t_{cal}| < t_{tab(3, 0.975)}$  y los límites de confianza incluyen al 0, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la ordenada al origen obtenida en forma experimental, no es significativamente diferente de 0.

- Pendiente ( m ) :

Como  $|t_{cal}| < t_{tab(3, 0.975)}$  y los límites de confianza incluyen al 1, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la pendiente obtenida en forma experimental, no es significativamente diferente de 1.

- Coeficiente de correlación ( r ) :

$$r > 0.99$$

Como  $FR > Fr_{tab(1,7;\alpha 0.01)}$  entonces existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

Como  $F_{fa} < F_{fa_{tab}(1,6; \alpha 0.05)}$  entonces no existe falta de ajuste a la relación lineal simple, cantidad adicionada, propiedad medida.

- Coeficiente de determinación ( $r^2$ ):  
 $r^2 > 0.99$

#### 4.5.- Repetibilidad y Exactitud al 100%.

En la tabla No. 5 se muestran los datos de la cantidad adicionada, cantidad encontrada y su correspondiente porcentaje encontrado, necesarios para evaluar este parámetro.

Tabla No 5

<i>Cantidad Adicionada</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>Cantidad Encontrada</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>% Recuperado</i>
10.01	9.89	98.8
10.01	9.84	98.4
10.01	10.01	100.0
10.01	9.87	98.6
10.01	10.13	101.2
10.01	10.00	99.9

$$n = 6$$

$$X = 99.4$$

$$S_x = 1.08$$

$$C. V = 1.1 \%$$

$$t_{cal} = -1.156$$

$$t_{tab}(5,0.975) = 2.5706$$

Como el coeficiente de variación obtenido ( 1.1% ) es menor que 3.0%, entonces el método de medición es repetible.

Intervalo de Confianza para el % recuperado:

- I. C. =  $99.49 \pm 2.78$
- L. S. = 102.27
- L. I. = 96.71

El método de medición es exacto, ya que:

Como  $|t_{cal}| < t_{tab}(5, 0.975)$  y los límites de confianza incluyen al 100%, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la media obtenida en forma experimental, no es significativamente diferente del 100%.

#### 4.6.- Reproducibilidad del método.

En la tabla No. 6, se presentan los resultados obtenidos al efectuar el procedimiento del método propuesto para la determinación de Cafeína, en la muestra problema, realizada por dos analistas y en días diferentes.

Tabla No. 6

Día (j)	Analista (i)	
	% Recobro	
	1	2
1	98.8	102.6
	99.0	99.2
	100.7	97.0
2	102.4	97.4
	101.1	97.6
	101.3	98.0

Coefficiente de variación:

$$\begin{aligned}n &= 12 \\ \bar{X} &= 99.6 \% \\ S_x &= 1.97 \\ C.V. &= 2.0 \%\end{aligned}$$

Como el coeficiente de variación obtenido es menor que 3.0%, entonces, el método de medición es reproducible.

Tabla de Análisis de Varianza.

Tabla No. 7

<i>F. V.</i>	<i>G. L.</i>	<i>SC</i>	<i>MC</i>	<i>F<sub>cal</sub></i>	<i>F<sub>tab</sub></i>
<i>A(i)</i>	1	11.02	11.02	-1x10 <sup>-4</sup>	161.4
<i>Dj(i)</i>	1	12.22	12.22	-1x10 <sup>-4</sup>	161.4
<i>A-D</i>	1	-109087	-109087	8.248	5.32
<i>E(i)k</i>	8	-79357	-13226		

Como:

- a) Efecto por analista  $-1 \times 10^{-4} < 161.4$
- b) Efecto por día  $-1 \times 10^{-4} < 161.4$
- c) Efecto por interacción analista-día,  $8.45 > 5.32$

Basándose en el análisis de varianza de los datos obtenidos, el método de medición es reproducible, ya que, no existen efectos por analista, por día y sí existe una interacción analista-día.

#### 4.7.- Estabilidad de las soluciones obtenidas en el proceso de análisis.

La tabla No. 8 presenta los resultados obtenidos durante la determinación de cafeína, después de mantener las soluciones en las condiciones indicadas.

**Tabla No. 8**

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Condición</i>		
	<i>% Encontrado</i>		
	<i>Luz Blanca</i>	<i>Oscuridad</i>	<i>Refrigeración</i>
<i>0</i>	99.7	99.9	99.2
<i>3</i>	98.6	98.4	99.7
<i>6</i>	95.1	96.2	95.9
<i>24</i>	91.3	92.6	94.5

Calculando el factor I obtenemos:

**Tabla No. 8.1**

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Condición</i>		
	<i>% Encontrado</i>		
	<i>Luz Blanca</i>	<i>Oscuridad</i>	<i>Refrigeración</i>
<i>3</i>	98.9	98.5	100.5
<i>6</i>	95.4	96.3	96.7
<i>24</i>	91.6	92.7	95.2

Como se observa en la tabla No. 8.1, la muestra sólo es estable durante las 3 primeras horas después de haber realizado el procedimiento y de haber mantenido las soluciones en condiciones de luz blanca, oscuridad y refrigeración, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre 97.0-103.0%.

## CAPITULO V

### 5.- CONCLUSIONES.

5.1.- El método propuesto para la valoración de cafeína en el jarabe estudiado, es *específico*, ya que, los espectros de absorción, así como, los valores de absorbancia de las soluciones obtenidas después de efectuar el procedimiento analítico en la Sustancia de Referencia y en el jarabe, son semejantes. Asimismo, se encontró que en las condiciones de análisis, el placebo presentó una absorbancia despreciable cercana a 272nm, en tanto que el blanco no presentó absorbancia; ésto nos indica que ni el placebo ni el blanco interfieren significativamente en la determinación de cafeína, utilizando el método propuesto.

#### 5.2.- Respecto a la Linealidad del Sistema:

El análisis de la Gráfica No. 1, nos muestra la tendencia *lineal* del sistema cuando se valoró cafeína, Sustancia de Referencia, en un intervalo de concentraciones de 80%, 90%, 100%, 110%, 120%.

Este planteamiento se puede comprobar al analizar las pruebas de  $t$ , donde los valores obtenidos de la ordenada al origen y de la pendiente no son significativamente diferente de 0 y de 1 respectivamente. El coeficiente de correlación obtenido es mayor de 0.99; por lo que podemos decir que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

#### 5.3.- Respecto a la Linealidad del Método:

La Gráfica No. 2, refleja la *linealidad* del método cuando se valoró cafeína en el jarabe estudiado, en un intervalo de concentraciones de 80%, 100% y 120%.



Este planteamiento se comprueba al analizar las pruebas de t, en donde los valores obtenidos de la ordenada al origen y de la pendiente, no son significativamente diferentes de 0 y de 1 respectivamente. El coeficiente de correlación obtenido es mayor de 0.99, por lo que podemos afirmar que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

5.4 **El** método propuesto *es exacto*, ya que, la prueba de t aplicada demuestra que el valor de la media experimental no es significativamente diferente de 100% y el coeficiente de variación obtenido es menor que 3.0%.

5.5.- **El** método propuesto *es repetible*, ya que, en las pruebas efectuadas con la Sustancia de Referencia, el coeficiente de variación obtenido fue menor del 1.5%, y en las determinaciones realizadas al jarabe, el coeficiente de variación fue menor del 3.0%.

5.6.- **El** método *es reproducible*, ya que, al realizar las pruebas de valoración de cafeína en el jarabe, se obtuvieron valores que cumplen satisfactoriamente con los criterios de aceptación especificados para el coeficiente de variación. En cuanto al análisis de variancia efectuado, no existe efecto alguno debido al analista ni al día, y sí existe una interacción analista-día.

5.7.- **La** solución clorofórmica que contiene a la cafeína *es estable* sólo durante las tres primeras horas, independientemente de las condiciones; por lo que el procedimiento analítico deberá continuarse en un lapso menor o igual a 3 horas, ya que, las pruebas realizadas, reflejan que es inestable a las 6 h y 24h en las tres condiciones mencionadas.

#### **Conclusión final:**

**Por** lo antes expuesto, el método de análisis propuesto para la determinación de la cafeína presente en el jarabe, estudiado *es Específico, Lineal, Exacto y Preciso (Repetible y Reproducible)*.

## ANEXO I

### LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL METODO.

*Ecuaciones matemáticas para determinar la linealidad del sistema y del método.*

1) Calcular la pendiente (  $m$  ) de la línea de regresión.

$$m = \frac{N t (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)}{N t (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

2) Calcular el intercepto (  $b$  ) de la línea de regresión.

$$b = \frac{\Sigma y - m (\Sigma x)}{N t}$$

Para conocer si los valores obtenidos experimentalmente son estadísticamente diferentes a los considerados como teóricos, se aplican pruebas de  $t$  y se establecen los límites de confianza para  $m$  y para  $b$ .

a) Prueba de "t de Student" para la pendiente:

$$H_0: m = \alpha \quad \alpha = 1$$

$$H_1: m \neq \alpha$$

$$t_{cal} = \frac{[(m - \alpha)] [S_x] [(n - 1)^{1/2}]}{S_{y/x}}$$

b) Prueba "t de Student" para la ordenada al origen:

$$H_0 : b = \beta \quad \beta = 0$$

$$H_1 : b \neq \beta$$

$$t_{\text{cal}} = \frac{b - \beta}{S_{y/x} \left[ \frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2}}$$

Desviación Estándar en la dirección y ( $S_{y/x}$ ).

$$S_{y/x} = \left[ \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right]^{1/2}$$

C) Intervalos de confianza:

- Desviación Estándar para la ordenada al origen ( $S_b$ ):

$$S_b = S_{y/x} \left[ \frac{\sum x_i^2}{n [\sum (x_i - \bar{x})^2]} \right]^{1/2}$$

C1) Límites de confianza para la ordenada al origen:

$$LC_b = b \pm [t_{\text{tab}}(n-2, 0.975)] [S_b]$$

- Desviación Estándar para la pendiente (Sm):

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{[\sum(x_i - \bar{x})^2]^{1/2}}$$

### C.2) Límites de confianza para la pendiente:

$$LC_m = m \pm [t_{tab(n-2, 0.975)}] [S_m]$$

donde:

**m** = valor de la pendiente experimental

**$\alpha$**  = valor de la pendiente teórica = 1

**b** = valor de la ordenada al origen experimental

**$\beta$**  = valor de la ordenada al origen teórico = 0

**$x_i$**  = cantidad adicionada.

**$y_i$**  = cantidad encontrada de fármaco.

**$\bar{x}$**  = media de las cantidades adicionadas.

**$S_x$**  = desviación estándar de las cantidades adicionadas.

**N** = número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución.

**t** = número de diluciones

**n** = numero de determinaciones.

**$\hat{y}_i$**  = Los valores de  $\hat{y}_i$  son los puntos sobre la línea de regresión calculada y corresponden a los valores individuales de  $x_i$ . Los valores de  $\hat{y}_i$  para un valor dado de  $x_i$ , son fácilmente calculados de la ecuación de regresión.

3) *Cálculo del coeficiente de determinación ( $r^2$ ).*

$$r^2 = \frac{[Nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[Nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][Nt(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$

4) *Cálculo del coeficiente de correlación ( $r$ ).*

$$r = (r^2)^{1/2}$$

Los datos de la curva de calibración se sujetan a un análisis de varianza en donde los parámetros de evaluación son las  $F$  resultantes de la distribución y tratamiento de datos. Por lo tanto se tienen  $F$  de regresión y  $F$  de falta de ajuste a la relación lineal simple.

5.- *Construcción de la Tabla de Análisis de la Varianza:*

- a)  $SCr$  = Suma de cuadrados de regresión.  
 $SCr = (m)(\Sigma xy) + (b)(\Sigma y) - (\Sigma y)^2/n$
- b)  $SCer$  = Suma de cuadrados del error de regresión.  
 $SCer = \Sigma y^2 - (m)(\Sigma xy) - (b)(\Sigma y)$
- c)  $SCep$  = Suma de cuadrados del error puro.  
 $SCep = \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2 / r$
- d)  $SCfa$  = Suma de cuadrados de la falta de ajuste.  
 $SCfa = SCer - SCep$

**TABLA I**

<i>Fuente de Variación</i>	<i>Grados de Libertad</i>	<i>Suma de Cuadrado</i>	<i>Media de Cuadrado</i>	<i>F exp.</i>
<i>Regresión</i>	1	SCr	SCr	$F_r = \frac{MCr}{MCer}$
<i>Error de regresión</i>	n - 2	SCer	$\frac{SCer}{g.l.e.r}$	
<i>Falta de ajuste</i>	(n-2)-t(r-1)	SCfa	$\frac{SCfa}{g.l.f.a}$	$F_{fa} = \frac{MCfa}{MCep}$
<i>Error puro</i>	t ( r - 1 )	SCep	$\frac{SCep}{g.l.e.p.}$	

t = Número de concentraciones.

r = Número de replicaciones por concentración.

n = r t = Número de pares ordenados.

**REPETIBILIDAD.**

Ecuaciones matemáticas para la evaluación de la repetibilidad.

- 1) Determinar la media ( $\bar{y}$ ) de los resultados.

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{N}$$

- 2) Determinar la Desviación Estándar de los resultados:

$$S = \left[ \frac{N (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

- 3) Determinar el coeficiente de Variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

### EXACTITUD AL 100%.

Ecuaciones matemáticas para la evaluación de la exactitud del método.

- 1) Calcular el porcentaje de recobro (R) en cada una de las muestras.
- 2) Calcular la media aritmética del porcentaje de recobro.

$$\bar{R} = \frac{\Sigma R_i}{N}$$

- 3) Calcular la desviación estándar del porcentaje de recobro.

$$S = \left[ \frac{N (\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

- 4) Calcular el coeficiente de variación.

$$CV = \frac{S}{\bar{R}} \times 100$$

5) Prueba de " t de Student " para la media.

$$H_0 : R = \mu \quad \text{donde } \mu = 100\%$$

$$H_1 : R \neq \mu$$

$$t_{cal} = \frac{R - \mu}{\sigma_y}$$

donde:

$$\sigma_y = S / (N)^{1/2}$$

Intervalo de confianza del porcentaje encontrado (I.C.).

$$I.C. = R \pm t_{(n-1,0.975)} [ \sigma_y ]$$

### REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.

Los resultados obtenidos se tabulan de acuerdo con la tabla II, para evaluar la reproducibilidad mediante el análisis de varianza representado en la tabla III. Este análisis permite conocer las interacciones entre analistas, días y analista-día.

TABLA II

		ANALISTA (i)	
		% ENCONTRADO	
		1	2
D i a	1	Y <sub>111</sub>	Y <sub>211</sub>
		Y <sub>112</sub>	Y <sub>212</sub>
		Y <sub>113</sub>	Y <sub>213</sub>
(j)	2	Y <sub>121</sub>	Y <sub>221</sub>
		Y <sub>122</sub>	Y <sub>222</sub>
		Y <sub>123</sub>	Y <sub>223</sub>



Donde " y " es el resultado de cada analista ( primer subíndice ) en cada día ( segundo subíndice ) para cada replicación ( tercer subíndice ).

Calcular las siguientes sumatorias:

$$1) \Sigma y_{ijk} = ( Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + \dots + Y_{223} )$$

$$2) \Sigma Y_i^2 = ( Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} )^2 + ( Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223} )^2$$

$$3) \Sigma Y_j^2 = ( Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} )^2 + ( Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223} )^2$$

$$4) \Sigma Y_{ii}^2 = ( Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} )^2 + ( Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} )^2 + ( Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} )^2 + ( Y_{221} + Y_{222} + Y_{223} )^2$$

$$5) S_{y_{ijk}}^2 = [( Y_{111} )^2 + ( Y_{112} )^2 + ( Y_{113} )^2 + \dots + ( Y_{223} )^2]$$

Proceder conformé la siguiente tabla de análisis de varianza.

TABLA III

<i>Fuente de variación (FV)</i>	<i>Grados de Libertad (GL)</i>	<i>Suma de cuadrados (SC)</i>	<i>Media de cuadrados (MC)</i>	<i>F calculada</i>	<i>F<sub>tab(0.05, GLnum / GL den)</sub></i>
<i>Analista (A)</i> <i>A<sub>i</sub></i>	(i - 1)	$\frac{\sum Y_i^2 - (\sum Y_{ijk})^2}{jk}$	$\frac{SC_A}{(i-1)}$	$\frac{MC_A}{MC_{AD}}$	0.05, $\frac{(i-1)}{(j-1)}$
<i>Día (D)</i> <i>D<sub>j</sub></i>	(j - 1)	$\frac{\sum Y_{ij}^2 - \sum Y_i^2}{k}$	$\frac{SC_D}{(j-1)}$	$\frac{MC_D}{MC_{AD}}$	0.05, $\frac{(j-1)}{(i-1)(j-1)}$
<i>Interacción Analista-día (A-D)</i> <i>A<sub>i</sub> - D<sub>j</sub></i>	(i - 1)(j - 1)	$\frac{\sum Y_{ij}^2 - \sum Y_i^2 - \sum Y_j^2 + (\sum Y_{ijk}^2)}{k}$	$\frac{SC_{AD}}{(i-1)(j-1)}$	$\frac{MC_{AD}}{MCE}$	0.05, $\frac{(i-1)(j-1)}{ij(k-1)}$
<i>Error Experimental (E)</i> <i>E<sub>ijk</sub></i>	ij(k - 1)	$\frac{\sum Y_{ijk}^2 - \sum Y_{ij}^2}{k}$	$\frac{SC_E}{ij(k-1)}$		

Donde: i = número de analistas; j = número de días; k = número de repeticiones

**ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.**

Los resultados obtenidos se tabulan con base al formato de la tabla IV , para calcular el coeficiente de variación.

**TABLA IV**

Tiempo (h)	Condición		
	% Encontrado		
	Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración
0	Y <sub>A</sub>	Y <sub>D</sub>	Y <sub>G</sub>
	Y <sub>B</sub>	Y <sub>E</sub>	Y <sub>H</sub>
	Y <sub>C</sub>	Y <sub>F</sub>	Y <sub>I</sub>
3	Y <sub>1</sub>	Y <sub>10</sub>	Y <sub>19</sub>
	Y <sub>2</sub>	Y <sub>11</sub>	Y <sub>20</sub>
	Y <sub>3</sub>	Y <sub>12</sub>	Y <sub>21</sub>
6	Y <sub>4</sub>	Y <sub>13</sub>	Y <sub>22</sub>
	Y <sub>5</sub>	Y <sub>14</sub>	Y <sub>23</sub>
	Y <sub>6</sub>	Y <sub>15</sub>	Y <sub>24</sub>
24	Y <sub>7</sub>	Y <sub>16</sub>	Y <sub>25</sub>
	Y <sub>8</sub>	Y <sub>17</sub>	Y <sub>26</sub>
	Y <sub>9</sub>	Y <sub>18</sub>	Y <sub>27</sub>

Cálculo del coeficiente de variación :

Para cada condición/tiempo/muestra, calcular el factor ( I ) con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{(\text{análisis muestra/ condición/tiempo})_i}{(\text{análisis inicial } i)} \times 100$$

$$\begin{array}{ccc}
 I_1 = \frac{Y_1}{Y_A} \times 100 & I_{10} = \frac{Y_{10}}{Y_D} \times 100 & I_{19} = \frac{Y_{19}}{Y_G} \times 100 \\
 I_2 = \frac{Y_2}{Y_B} \times 100 & I_{11} = \frac{Y_{11}}{Y_E} \times 100 & I_{20} = \frac{Y_{20}}{Y_H} \times 100 \\
 I_3 = \frac{Y_3}{Y_C} \times 100 & I_{12} = \frac{Y_{12}}{Y_F} \times 100 & I_{21} = \frac{Y_{21}}{Y_I} \times 100 \\
 \cdot & \cdot & \cdot \\
 \cdot & \cdot & \cdot \\
 \cdot & \cdot & \cdot \\
 I_9 = \frac{Y_9}{Y_C} \times 100 & I_{18} = \frac{Y_{18}}{Y_F} \times 100 & I_{27} = \frac{Y_{27}}{Y_I} \times 100
 \end{array}$$

Para cada condición/tiempo calcular la media del factor ( $\bar{I}$ ) con la siguiente fórmula:

$$\bar{I} = \frac{\Sigma I (\text{condición/tiempo})}{N}$$

donde: N = Número de muestras para cada condición/tiempo.

$$I_1 = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{3}$$

$$I_6 = \frac{I_{16} + I_{17} + I_{18}}{3}$$

$$I_2 = \frac{I_4 + I_5 + I_6}{3}$$

$$I_7 = \frac{I_{19} + I_{20} + I_{21}}{3}$$

$$I_3 = \frac{I_7 + I_8 + I_9}{3}$$

$$I_8 = \frac{I_{22} + I_{23} + I_{24}}{3}$$

$$I_4 = \frac{I_{10} + I_{11} + I_{12}}{3}$$

$$I_9 = \frac{I_{25} + I_{26} + I_{27}}{3}$$

$$I_5 = \frac{I_{13} + I_{14} + I_{15}}{3}$$

## **CAPITULO VI**

### **6.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.**

1. Litter, M. "COMPENDIO DE FARMACOLOGÍA ". 4a. edición. Edit. El Ateneo. Argentina (1988). pp 418-429.
2. Goodman & Gilman A. y cols. "LAS BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPEUTICA ". 8a edición. Edit. Médica Panamericana. México (1991). pp 606-611.
3. Bawman, W.C., Rand M. J., " FARMACOLOGÍA. BASES BIOQUIMICAS Y PATOLOGICAS ". 2a. edición. Nueva editorial Interamericana. México (1984). pp 42.34-42.35, 42.13.
4. Lehninger, L. A." BIOQUÍMICA ". 2a. edición. Edit. Omega. México (1982). pp 822-825
5. Katzung, G. B. " PHARMACOLOGY . EXAMINATION & BOARD REVIEW". 3th edition. Appleton & Lange. U.S.A. (1993). pp 35.
6. Korolkovas, A., Burckhalter, J. H., " COMPENDIO ESENCIAL DE QUÍMICA FARMACÉUTICA ". 1a. Edición. Edit. Reverté. España (1979). pp 263-265
7. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 6a edición. México (1994). pp 422-423

- 8. The Merck Index : An Encyclopedia of chemicals, drugs, and Biologicals. Susan Budavari. 11 Edition. Merck & Co., Inc., U.S.A. (1989). pp 1635.**
  
- 9. Florey, K. " ANALYTICAL PROFILES OF DRUG SUBSTANCES ". Vol 15. Edit. Academic Press Inc. London (1986). pp 74.**
  
- 10. Martindale. "THE EXTRA PHARMACOPOEIA".30 edition. Edit. The Pharmaceutical Press. London (1989). pp 1314-1316.**
  
- 11. The Pharmacopoeia of the United States of America XXIII. United States Pharmacopoeial Convention. Inc. U.S.A. (1994). pp 1982-1984.**
  
- 12. Higuchi, T. and Bodin, J.I. " PHARMACEUTICAL ANALYSIS ". Edit. John Wiley & Sons. U. S. A. (1961). pp 241.**
  
- 13. British Pharmacopoeia 1993. Vol I , II. United Kingdom. (1993)**
  
- 14. The Pharmaceutical Codex. Eleventh Edition. Edit. The Pharmaceutical Press. London. (1979). pp 118-119.**
  
- 15. Remigton's Pharmaceutical Sciences. 18th edition. Edit. Mack Publishing Company. U.S.A. (1990). pp 1132-1134.**

16. Moffat A. C. Jackson J. V. y cols. "CLARKE'S. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS ". 2a edition. Edit. The Pharmaceutical Press. London (1986). pp 420-422.
17. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 39 Edition. México (1993). pp 1269-1270.
18. Cassarigne, R. H., Munguía B. y cols., Material del Curso "Control y aseguramiento de la calidad analítica en el laboratorio". (1994).
19. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación. Requisitos mínimos para la validación de un método analítico. Colegio Nacional de Q.F.B. México. (1989).
20. Pharma News. Actualización en Tecnología Farmacéutica. "Procedimiento de validación, parámetros y criterios de aceptación". Vol. 1 No. 6., México (1990).
21. García Martha. "Validación de un método analítico para determinar Metilbromuro de Mepenzolato en una suspensión oral que también contiene Furazolidona". Q.F.B., U.N.A.M. México, (1992).