

60
Wj



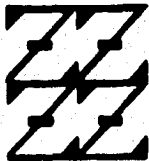
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
" ZARAGOZA "**

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UNA TECNICA
ESPECTROFOTOMETRICA PARA LA
CUANTIFICACION DE ALANTOINA EN SHAMPOO**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
GRISelda VIRGINIA SANDOVAL JERONIMO.

**U N A M
F E S
Z A R A G O Z A**



**LO FORMADO EN
SU NUESTRA REFLEXION**

MEXICO, D. E.

1996

**TESIS CON
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.

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN

LABORATORIO BIOCLON. S.A DE C.V.

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. ALEJANDRO ALCANTARA PINEDA.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Como un reconocimiento a sus esfuerzos y sacrificios, a quienes debo todo lo que soy.

A MIS HERMANOS:

(Ma. de los Angeles, Eduardo, Sergio, Salvador, Mario y Veronica).

Por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi carrera.

A MIS AMIGOS:

Por su amistad ofrecida sin reservas.

Carlos y Victoria.

Como un grato recuerdo de toda la vida.

Rosalba.

Por todo lo compartido.

**Agradesco al creador, por haberme dado la
oportunidad de llevar acabo esta meta y
por lo que me permitirá emprender más
adelante.**

AL Q.F.B ALEJANDRO ALCANTARA PINEDA.

**Por la orientación y conocimientos otorgados
para ser posible la realización de este trabajo.**

**ESTE TRABAJO DE TESIS ESTA DEDICADO CON MUCHO CARIÑO
Y VENERACION A UNA PERSONA MUY ESPECIAL**

ESPERANIA JERONIMO PEREZ.

TABLA DE CONTENIDO

página

1	INTRODUCCION.....	1
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3	FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	4
	3.1.0 Nombre químico.....	4
	3.1.1 Nombre genérico.....	4
	3.1.2 Fórmula molecular.....	4
	3.1.3 Fórmula semidesarrollada.....	4
	3.1.4 Fórmula desarrollada.....	4
	3.1.5 Antecedentes.....	5
	3.1.6 Fuentes naturales.....	5
	3.1.7 PERFIL ANALITICO.....	6
	3.1.7.0 Descripción.....	6
	3.1.7.1 Solubilidad.....	6
	3.1.7.2 Peso molecular.....	6
	3.1.7.3 Punto de fusión.....	6
	3.1.7.4 Rotación óptica.....	6
	3.1.7.5 Espectro de absorción ultravioleta.....	7
	3.1.7.6 Reacción de identificación.....	7
	3.1.7.7 Conservación.....	7
	3.1.7.8 Generalidades de shampoo.....	7
	3.1.8 Antecedentes de los métodos de cuantificación de alantoína.....	9
	3.1.9 Fundamentación de la espectrofotometría UV.....	18
	3.2.0 Validación de métodos analíticos.....	20
	3.2.0.1 Definiciones.....	21
	3.2.1 Diseños factoriales	23

4	OBJETIVOS	24
5	HIPOTESIS DE TRABAJO	25
6	PARTE EXPERIMENTAL	26
6.1.0	Desarrollo de la metodología analítica para determinar alantoina	26
6.1.1	Descripción del método analítico a estudiar	27
6.1.2	Selección de factores mediante un diagrama de Causa-Efecto	29
6.1.3	Estudio de la influencia de los parámetros: tiempo y temperatura de reacción	33
6.1.4	Evaluación de la influencia del tiempo de hidrólisis alcalina, tiempo de hidrólisis ácida y tiempo de enfriamiento	39
6.1.5	Fijación de las condiciones de análisis: tiempo de hidrólisis alcalina y tiempo de hidrólisis ácida	51
6.1.6	Conclusiones	58
6.2.0	Validación del método de cuantificación para determinar alantoina en producto terminado	59
6.2.1	Cuantificación de alantoina en shampoo	62
6.2.2	Determinación de la precisión del sistema	64
6.2.3	Determinación de la linealidad del sistema	68
6.2.4	Determinación de la especificidad del método	73
6.2.5	Determinación de la exactitud del método al 100%	77
6.2.6	Determinación de la linealidad del método	82
6.2.7	Determinación de la precisión del método	89
7	CONCLUSIONES	94
8	SUGERENCIAS	95

9	SECCION DE ANEXOS.....	96
9.1	Anexo 1.....	97
9.2	Anexo 2.....	99
9.3	Anexo 3.....	106
10	SECCION DE GRAFICAS DE CONTORNO.....	116
10.1	Gráfica I.....	117
10.2	Gráfica II.....	117
10.3	Gráfica III.....	118
10.4	Gráfica IV.....	118
10.5	Gráfica V.....	119
11	BIBLIOGRAFIA.....	120

1 INTRODUCCION

En los últimos años el desarrollo de la farmacia como industria ha sido, paralela a la comercialización de otras actividades humanas, así como el avance de lo artesanal a la producción masiva. Su iniciación en el desarrollo de nuevas técnicas le permiten transformar radicalmente el panorama de su desarrollo. Sin embargo, debido a la responsabilidad moral y civil de sus productos es una industria severamente legislada en lo que a seguridad y eficacia de sus procesos se refiere.

La validación de métodos analíticos es una de las herramientas que conforman la calidad de los productos farmacéuticos. Mediante esta, se determinan las variables por controlar con el propósito de garantizar la fabricación consistente de un producto. Junto con los controles de calidad en el proceso y los análisis finales constituyen un pilar importante para asegurar la calidad del producto farmacéutico.

La validación dentro de una compañía farmacéutica debe planearse racionalmente, unido a la coordinación de actividades dentro de la planta con la finalidad de mantener los costos dentro de límites preestablecidos mientras se cumple con cierto estándar de calidad.

Por otra parte, la alantoína tiene una gran importancia farmacéutica al haberse descubierto su capacidad estimulante del crecimiento de los tejidos, produciendo una rápida granulación de las áreas ulceradas; Por eso, es utilizada como cicatrizante para estimular la proliferación celular en el tratamiento de úlceras y heridas de difícil curación. De ahí que su administración y absorción sea por vía tópica.

El empleo de alantoina con semejantes fines está doblemente indicado, pues posee también cierto poder antiséptico y diurético al igual que los alcaloides purínicos, estimula el sistema nervioso y el trabajo muscular.

Debido a las propiedades terapéuticas de la alantoina descritas anteriormente es incorporada en diversas preparaciones cosméticas tales como: cremas, ungüentos, lociones, lápiz labial y preparaciones para afeitar. Con el incremento del uso de alantoina en estos productos se requieren métodos adecuados para su determinación en el control de calidad.

El presente estudio surgió de la necesidad del laboratorio farmacéutico donde se realizó, de contar con un método colorimétrico confiable para determinar alantoina en shampoo, dado que actualmente se cuenta con métodos que son aplicables a pequeñas cantidades de muestra de naturaleza biológica en análisis metabólicos de rutina, los cuales no son prácticos o aplicables para valorar el principio activo en la formulación de interés.

El trabajo se estructuró de tal forma que se muestran las etapas de investigación para el desarrollo del método analítico y la validación del mismo.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El notable avance tecnológico de la última década, manifiesta su efecto en la industria farmacéutica, debido a la importancia social que reviste su buen funcionamiento, tiene un mayor énfasis en el mejoramiento de los sistemas que han conducido hacia una evolución industrial sin precedente en la producción de medicamentos, tanto desde el punto de vista interno de cada compañía como desde el punto de vista de las dependencias oficiales.

La finalidad de obtener medicamentos cada vez mejores es reforzado por la adopción y práctica de métodos de manufactura reconocidos como correctos y efectivos. Un aspecto de importancia central en el empleo de técnicas y procedimientos de fabricación es la utilización de métodos analíticos confiables.

Por otro lado, una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, para valorar el principio activo tanto en producto a granel como del producto terminado, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. Dentro de la farmacia como industria existen pequeñas compañías cuyos recursos materiales no son iguales a los de las grandes empresas. Por ello el propósito de este trabajo, es desarrollar y validar un método analítico espectrofotométrico para determinar alantoina en producto terminado ya que el método oficial indicado en la Farmacopea Nacional es por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.

Durante el desarrollo se fijan parámetros que permitan obtener la respuesta analítica adecuada y la validación, estudiando los parámetros analíticos: linealidad y precisión del sistema, especificidad, exactitud al 100%, linealidad y precisión del método, determinan su confiabilidad para el propósito deseado.

3 FUNDAMENTACION DEL TEMA.

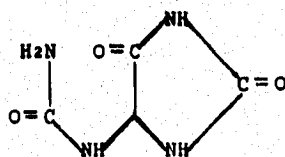
3.1.0 NOMBRE QUIMICO: (2,5-Dioxoimidazo(idinil-4)urea. (7)
(2,5-Dioxo-4-imidazolidinil)urea. (1)
5-Ureidoimidazolidina-2,4-diona (3)
5-Ureido-hidantoina. (1, 2, 5)

3.1.1 NOMBRE GENERICO: Alantoina. (1, 2, 3)
Gloxildiureido. (1, 2, 4, 6)
Cordianina. (1, 5)
Psoralon. (1)
Alyoxildiureido. (5)
Septalan. (1)

3.1.2 FORMULA MOLECULAR: $C_4H_6N_4O_3$ (5)

3.1.3 FORMULA SEMIDESARROLLADA: $NH \cdot CO \cdot NH \cdot CO \cdot CH \cdot NH \cdot CO \cdot NH_2$ (29)

3.1.4 FORMULA DESARROLLADA:



ALANTOINA

(4)

3.1.5 ANTECEDENTES:

Fue descubierta por Vauquelin en 1800 y sintetizada por Wohler y Liebig en 1838, al oxidar el ácido úrico con dióxido de plomo. El método de oxidación del ácido úrico es el más frecuente para preparar alantoina; Aparte de PbO_2 y de permanganato de potasio, se utilizan diversos oxidantes como : oxígeno atmosférico en presencia de catalizadores adecuados, ozono, MnO_2 , ferricianuro potásico, persulfato potásico, ácido nitroso, etc. En todo caso, se requiere que durante la oxidación, no exista una reacción ácida, pues se produciría aloxana o aloxantina. La alantoina es el producto típico de una oxidación alcalina del ácido úrico. Posteriormente en 1877, fue preparada por Grimaux al condensar ácido glioxílico con urea. Como productos secundarios de la oxidación, se forman en pequeñas cantidades los ácidos uroxánico, oxónico y oxalúrico. (4)

3.1.6 FUENTES NATURALES:

La alantoina es el producto final del metabolismo de las purinas en los mamíferos, a excepción del hombre y de los monos antropoides. Por ello se le encuentra en muy diversos líquidos de organismos animales; orina de vaca, perro, gato, conejo y otros mamíferos (en la orina humana sólo se halla en muy pequeña cantidad); Fue descubierta en el líquido amniótico de la vaca; líquido alantoico de la ternera (de donde toma el nombre); sangre de diversos mamíferos, excepto en la sangre humana; leche de vaca, etc. Los insectos también producen alantoina, especialmente las larvas, por ejemplo las de mosca y las de abeja.

En el reino vegetal, la alantoina se le encuentra en: cascarilla de arroz, corteza del castaño de indias, semilla

del tabaco, remolacha azucarera, gérmenes del trigo, consuelda (0.84), etc.(4)

3.1.7 PERFIL ANALITICO:

3.1.7.0 DESCRIPCION: Prismas monoclinicos o polvo cristalino, blanco, insípido e inodoro.(4)

3.1.7.1 SOLUBILIDAD: Es soluble 1 g en 190 ml de agua y 1 g en 500 ml de alcohol es más soluble en agua caliente y alcohol caliente; prácticamente insoluble en éter. En solución acuosa saturada tiene un pH cercano a 5.5.(1,2)

3.1.7.2 PESO MOLECULAR: 158.1 g/mol. (3)

3.1.7.3 PUNTO DE FUSION: 228-230 °C calentando deespacio; si se introduce el capilar en el baño calentando previamente hacia 230°C no funde sino hasta 238-240°C.(4,e)

3.1.7.4 ROTACION OPTICA: Mendel y Dakin demostraron que la alantoina es ópticamente inactiva a pesar de que está posees un carbono quiral. Este fenómeno se debe quizáe a un cambio tautomérico. Las formas d y l de

alantoina han podido ser preparadas.(s)

3.1.7.5 ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA La alantoina en solución a pH 9.4, presenta un máximo a 224 (E 1% , 1 cm 350 nm).(s)

3.1.7.6 REACCION DE IDENTIFICACION Al tratar una solución de muestra de alantoina en etanol con solución concentrada de furfuraldehído y adición de una pequeña cantidad de ácido clorhídrico da una coloración violeta.(s)

3.1.7.7 CONSERVACION: Desde un punto de vista farmacéutico debe tenerse en cuenta que la alantoina no es estable en disolución. Por adición de una pequeña cantidad de cloreto se logran estabilizar las soluciones de alantoina. Además se debe guardar en recipientes muy bien cerrados.(s,s)

3.1.7.8 GENERALIDADES DE SHAMPOO.

DEFINICION DE SHAMPOO: Son cosméticos o jabones dotados de poder detergente que se emplean para limpiar el pelo y cuero cabelludo.(37)

FUNCIONES DE UN SHAMPOO: La función primaria de un shampoo es la limpieza del cabello y el cuero cabelludo.

El cabello se ensucia por las secreciones naturales del cuero cabelludo, el polvo acumulado por el medio ambiente y los residuos de los productos aplicados para el arreglo del cabello, usados por el consumidor. (38)

Dentro de sus funciones secundarias, puede actuar sobre el cuero cabelludo con objeto de normalizar sus funciones alteradas y vigorizar la producción de cornea. (38)

TIPOS Y FORMAS DE SHAMPOOS.

Los shampoos se disponen en una variedad de tipos y formas que pueden clasificarse dentro de los siguientes grupos.

- 1) SHAMPOO EN POLVO.
- 2) SHAMPOO LIQUIDO.
- 3) SHAMPOO EN CREMA LIQUIDA.
- 4) SHAMPOO EN LOCIONES.
- 5) SHAMPOO EN PASTA O CREMA.
- 6) SHAMPOO EN GEL.
- 7) SHAMPOO EN AEROSOL.
- 8) SHAMPOOS ESPECIALES (DESINCrustANTES Y SUAVISADORES). (38)

Los shampoos estan constituidos quimicamente por una fase fundamental con carácter detergente, a la que se añade, según las necesidades, agentes condensadores, acondicionadores, taponadores diluyentes, perfumes, conservadores y otros productos dotados de efectos particulares. (38)

3.1.8 ANTECEDENTES DE LOS METODOS DE CUANTIFICACION DE ALANTOINA.

Una serie de métodos colorimétricos, espectrofotométricos y de otro tipo se han reportado en la literatura para determinar alantoína en muestras biológicas (sangre, tejidos, orina, etc) y preparaciones farmacéuticas. Algunos de ellos son complejos y poco prácticos para ser utilizados en el trabajo de rutina del laboratorio; a continuación se describen algunas de las características de los métodos citados.

En 1923, More descubrió una reacción aplicable a la determinación de alantoína, una solución de alantoína se reduce con solución de Nessler's con gradual precipitación de sales de mercurio; la reacción es sensible a 0.001 g por 10 ml. El avance de la reacción con mercurio después de 12 horas puede determinarse con una solución de yodo (I₂), que es equivalente a un mol de alantoína. Como determinación cuantitativa es efectiva en 92%; puede utilizarse un factor de corrección.(11)

Langfeldt y Holmsen en 1925, determinaron alantoína en presencia de ácido úrico, creatinina y aminoácidos por medio de precipitación mercuríca, en presencia de pequeñas cantidades de aminoácidos, creatinina y ácido úrico en cantidades semejantes a las contenidas en la orina normal. Cuando los aminoácidos están presentes en un grado de 0.2% o más, las cifras dan altas.(12)

En 1930 Fesso, Brunel, Graeve, Thomas y Berazin; utilizaron la semilla de soya de habichuela para liberar la uricasa en la detección y determinación de alantoína. Esta enzima es una sustancia que se estudia para usarla en la determinación de alantoína en sangre y suero de perro. Además la presencia

de alantoina puede ser determinada y detectada en una dilución 1/100,000. (13)

Allen y Cerecedo en 1931 remueven la urea formada por la ureasa y la alantoina es descompuesta por hidrólisis ácida; la urea resultante precipita como dixantidrilurea, la cuál es determinada por oxidación con dicromato de potasio y ácido sulfúrico. (14)

En 1932 Larson hizo pruebas en muestras de orina para determinar alantoina; estas fueron tratadas con ácido fosfotúngstico y acetato de plomo, el primero permite remover sustancias de interferencia y el segundo elimina el exceso de ácido sulfúrico, por último, se trata con hidróxido de sodio para neutralizar. La solución resultante se calienta a ebullición con reactivo de Folin Amoniacal y a la solución ya fría, se le adiciona ácido molibdico, en seguida se realiza una dilución de manera que se obtenga 1 mg de alantoina como estándar y se realiza una comparación colorimétrica. (15)

En 1935 Borsock Henry, establece un método en el cuál la alantoina es convertida a ácido alantoico por una enzima preparada a base de soya de habichuela. El ácido alantoico es hidrolizado a ácido glioxílico y urea. Coloriméricamente es medido el ácido glioxílico, aunque el color que se desarrolla tiende a desvanecerse en una proporción de 40 a 50%. El método es muy laborioso pero es sensible. Sólo se requieren 2 ml de solución bajo los límites de 0.05 mg por ciento, con un error de ± 5 por ciento. Modificando este método puede ser usado en el análisis de sangre, orina, fluidos tisulares y otros. Este consiste en colocar 10 mg de polvo seco de enzima, 0.5 ml de solución de carbonato de amonio-cianuro, 2 ml de solución problema y una gota de cloroformo, se coloca la mezcla en un tubo de ensayo adecuado a una temperatura de 37°C durante 12

horas y con agitación. Se toman 2 ml de la solución suspendida y se transfiere a otro tubo de ensayo, se le adiciona 0.2 ml de ácido tricloroacético al 10% y 0.1 ml de tungstato de sodio al 2%, se mezcla y adiciona 0.1 ml de ácido sulfúrico 0.06 Normal, se agita e incuba en baño de agua a una temperatura de 90°C durante 5 minutos, se enfría. Se adiciona 0.3 ml de fenilhidrazina al 0.5% en ácido clorhídrico 0.07 Normal. Nuevamente se pone a incubar en agua caliente y a enfriar en baño de hielo. Centrifugar y del sobrenadante obtenido se toma 0.2 ml y adiciona 1.5 ml de ácido clorhídrico frío, se adiciona 0.2 ml de ferricianuro de potasio al 1.25%, se mezcla bien y se coloca en baño de hielo durante 5 minutos. Después de 10 minutos y a temperatura ambiente se desarrolla un color rojo y se procede a leer en el colorímetro a 535 μ m y se compara con un estándar. (16)

Bosson en 1937, realizó un estudio sobre el mecanismo del metabolismo del nitrógeno necesario para determinar pequeñas cantidades de alantoina en sangre, orina y soluciones de alantoina pura. Retomando lo que realizó Fosse y Borsook sobre la transformación hacia el ácido alantoico como resultado de la acción de la enzima ureasa de soya de habichuela en presencia de cianuro de potasio y la hidrólisis hasta ácido glioxílico, el cuál da un intenso color rojo al tratarse con fenilhidrazina, ácido clorhídrico y ferricianuro de potasio. La solución final es medida fotométricamente. Este método requiere 2 ml de la solución problema y esta debe estar en un rango de 0.01 a 0.1 mg de alantoina. Los resultados que se obtienen son precisos en un 5%. (17)

Fearon estableció en 1939 la reacción carbamido-diacetil, la cuál ocurre en solución ácida y entre compuestos sustitutos de la urea, dentro de los cuales se encuentra la alantoina. Esta prueba se realiza acidificando la solución problema con ácido clorhídrico, y

adicionando unas gotas de diacetil monoxima al 3%, la mezcla se calienta a ebullición durante 3 a 4 minutos y en este tiempo se desarrolla un color rojo naranja, para una prueba positiva. El color pasa a rojo o permanece después de adicionar una gota de persulfato de potasio al 1%. La reacción de diacetil monoxima en solución ácida manifiesta una gran selectividad. (18)

En 1941 Young y Conway cuantificaron alantoina en una muestra de orina por medio de la reacción de Rimini-Schriver donde el ácido alantoico es hidrolizado a urea y ácido glioxílico a pH ácido, se forma una hidrazona y por oxidación con ferricianuro de potasio se desarrolla un color rojo. La solución final se compara con un estándar de ácido alantoico, se lee en un colorímetro Klett. El método consiste en tomar una alícuota de 1 a 2 ml de orina que teóricamente contiene 0.05 a 1 mg de alantoina y colocar en un matraz aforado de 50 ml y diluir a la marca con agua destilada. Tomar una alícuota de 5 ml y adicionarla en un tubo de ensayo de 25 ml, agregar 1 ml de hidróxido de sodio 0.5 Normal. En otro tubo colocar 5 ml de solución estándar de ácido alantoico y 5 gotas de ácido clorhídrico 0.5 Normal. Después adicionar a cada tubo 1 ml de fenilhidrazina, incubar los tubos en agua caliente durante 2 minutos, dejar en baño de hielo y sal a -10° durante 3 minutos, todavía en el baño adicionar a cada tubo 3 ml de ácido clorhídrico frío y 1 ml de ferricianuro de potasio, mezclar y después de 30 minutos leer las muestras en el colorímetro Dubocq. (19)

Kawerau en 1946 realizó un análisis bioquímico en el que describe un método colorimétrico simple y directo para la determinación de urea y compuestos carbamido relacionados dentro de los cuáles esta la alantoina. El método se basa en la reacción carbamido diacetil o de Fearon que puede ser modificado para propósitos de cuantificación. Además, utiliza un instrumento

Fotoeléctrico Spekker o de otro tipo y un espectro de filtro en gelatina azul (=602) con un máximo de transmisión cercano a 475 μm útil para el pigmento amarillo para el caso de alantoína así como mezclas de ácidos como oxidantes.

El método para el análisis de sangre-urea consiste en medir 3.4 ml de agua destilada en un pequeño tubo de ensayo y adicionar 0.2 ml de sangre y centrifugar. Agregar al sobrenadante 0.2 ml de tungstato de sodio al 10% y 0.2 ml de ácido sulfúrico 0.66 Normal. El precipitado se torna café, filtrar el contenido del tubo. Tomar 2 ml del filtrado y colocarlo en un tubo de Folin-Wo. Agregar 2 ml de reactivo diacetil monoxima y 3 ml de un oxidante a base de mezcla de ácidos, diluir a 9 ml, mezclar e incubar en baño de agua caliente por 20 minutos, enfriar en chorro de agua fría. Medir la absorción en el colorímetro, comparando con un estándar. (20)

En 1947 Debeaumont y Desotd retomaron estudios anteriores para determinar colorimétricamente a la alantoína mediante el ácido glioxílico que da un color rojo, con clorhidrato de fenilhidrazina y ferricianuro de potasio en presencia de ácido clorhídrico concentrado. La intensidad del color dentro de ciertos límites es una función directa de la concentración del ácido glioxílico. (21)

Nantes en 1953 propone una reacción de identificación para alantoína de manera cualitativa, mezclando una pequeña muestra de alantoína en 2 ml de agua, 1 ml de una solución de 50 g de bromuro de potasio y 8.5 ml de Br₂ en 82 ml de agua, 1 ml de hidróxido de sodio al 10% que da como resultado un color inestable que va de rosa a violeta. (22)

En 1954 Ridi, Magd y Masry modificaron un método fotométrico para determinar alantoína en presencia de ácido úrico; utilizan alantoína pura y la colocan en solución acuosa, calientan en baño

de agua durante 10 minutos, enfrían y adicionan reactivo de ácido molibdico y el espectro de absorción del color azul desarrollado es rojo en el espectrofotómetro. (23)

En 1964 Katz, Turse y Mecca determinan alantoina y sales de aluminio de alantoina en varios cosméticos y preparaciones farmacéuticas mediante dos diferentes métodos espectrofotométricos: el método de folín molibdato ácido, tartrato de cobre y el de fenilhidrazina ferricianuro. La forma de extracción depende del tipo de muestra y el método a seguir es especificado por los autores. Los métodos siguen la ley de Beer con respecto a la alantoina en concentración de 0.1 a 1 mg/ml. (24)

Siest y Panek en 1967 establecen las condiciones en que la 2,3-dioxobutano de monoxima, ciclohexano-1,2 diona de dioxima forman compuestos coloridos fluorescentes con urea, alantoina, ácido alantoico, citrulina y ácido carbamilaspartico. La longitud de onda de excitación se encuentra en el intervalo de 384-470 μm y la longitud de onda de emisión se encuentra en el rango de 404-530 μm . (25)

En 1968 Bonadeo y Bottazzi proponen un método para determinar y cuantificar alantoina en presencia de glicerol y se basa en la separación del glicerol a partir de la mezcla por medio de cromatografía en capa fina, cromatograma de silica gel y subsecuente determinación de alantoina por espectrofotometría uv a 220 μm . (26)

Estrin en 1983 por medio de una titulación potenciométrica determinó alantoina. El método consiste en pesar 500 mg de alantoina, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml. Con una bureta adicionar aproximadamente 25 ml de hidróxido de sodio 0.1 Normal, anotar el volumen. Agitar la muestra hasta que se disuelva,

colocar el electrodo de vidrio y calomel dentro de la solución, titular adicionando hidróxido de sodio 0.1 Normal en la manera usual para titulaciones potenciométricas hasta un pH de 11.5. Registrar el volumen desde el principio de la titulación y después de cada adición del mismo, así como su correspondiente pH. Construir la curva de titulación de volumen de solución contra pH. (27)

En 1988 Nita Voiculescu estableció un método para determinar alantoina en preparaciones farmacéuticas. Este consiste en disolver 5 g de muestra en 10 ml de agua y mezclar la solución con 25 ml de ácido tricloroacético al 20%, filtrar la mezcla, lavar el filtrado con 5 ml de ácido tricloroacético, diluir a 100 ml con agua. Tomar una alícuota de 2 ml de solución, mezclar con 2 ml de hidróxido de sodio al 2.5%. Calentar en baño de agua durante 15 minutos. Adicionar 1 ml de solución de 2-4 dinitrofenilhidrazina al 0.1% en ácido clorhídrico al 7% y calentar nuevamente durante 5 minutos. Enfriar la solución y adicionar 5 ml de hidróxido de sodio al 10%. Diluir con agua a 25 ml. Después de 10 minutos medir la absorbancia a 450 nm. (28)

En el presente estudio se utilizó la técnica del ácido glioxílico por medio de fenilhidrazina-ferricianuro para determinar alantoina. El procedimiento consiste en lo siguiente: Preparar una solución que contenga alantoina aproximadamente 1.5 mg/ml. Mezclar 1 ml de la muestra anterior con 1 ml de solución de carbonato de sodio al 1%. Calentar a ebullición por 15 minutos en baño de agua. Adicionar una gota de solución indicadora de fenolftaleína, neutralizar con ácido clorhídrico 1 Normal. Agregar 2 gotas de ácido en exceso. Antes de que la solución se enfríe, colocar 4 gotas de solución de clorhidrato de fenilhidrazina al 0.5%, 2 ml de ácido clorhídrico concentrado y 2 gotas de solución de ferricianuro de potasio al 5%, agitar. Un color rojo se desarrolla. Después de

10 minutos diluir a 10 ml con agua destilada, comparar con el color desarrollado de un estándar de ácido glioxílico.(10)

En seguida se describe el mecanismo de la reacción por el método del ácido glioxílico por fenilhidrazina-ferricianuro.

La alantoina por hidrólisis alcalina origina ácido alantoico que por hidrólisis ácida forma ácido glioxílico y urea. En una reacción de condensación del ácido glioxílico con fenilhidrazina se forma una fenilhidrazona que en medio ácido y un agente oxidante como el ferricianuro de potasio origina un cromoforo de color rojo cereza. Ver mecanismo de la reacción en la figura 1.

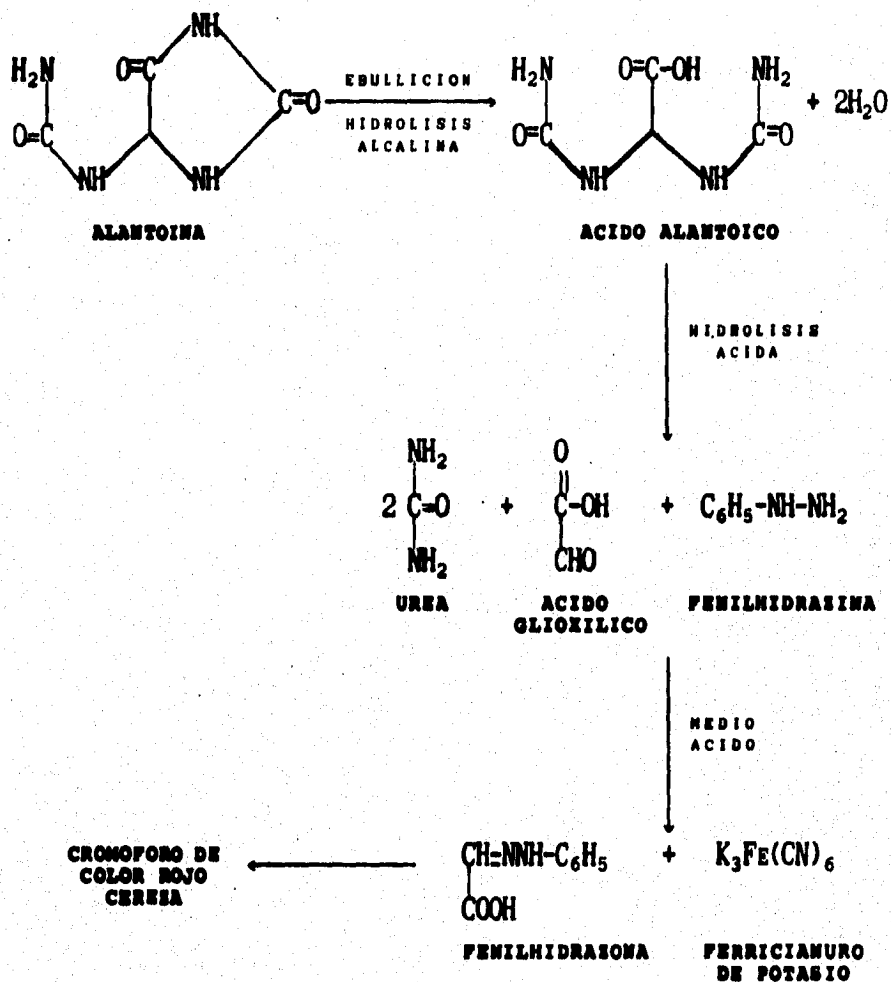


FIGURA 1 MECANISMO DE REACCION POR EL METODO DEL ACIDO GLIOXILICO POR MEDIO DE FENILHIDRASINA-FERRICIANURO

3.1.9 FUNDAMENTACION DE LA ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE.

Los átomos y moléculas son capaces de absorber energía de acuerdo con ciertas características que dependen de la estructura de la sustancia. La Espectrofotometría de absorción consiste básicamente en la medida de la absorción por ciertas sustancias de una radiación electromagnética de longitud de onda situada en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática. En el espectro electromagnético las bandas usadas en la medida de la absorción abarcan las cortas longitudes de onda de la región ultravioleta de 200 a 400 nm hasta la región visible de 400 a 780 nm (anteriormente conocida como colorimetría). (7)

Los términos siguientes son usados en la espectrofotometría de absorción.

LONGITUD DE ONDA (λ): Es la distancia lineal desde cualquier punto de la onda hasta el punto correspondiente de la onda adyacente. La dimensión de la longitud de onda, cuya unidad es el centímetro (cm), subdividido en milimicras ($m\mu = 10^{-7}$ cm), nanómetros ($nm = 10^{-7}$ cm), angstroms ($\text{\AA} = 10^{-8}$ cm) o micrometros ($\mu m = 10^{-4}$ cm). (30)

FRECUENCIA (ν): Es el número de ondas que pasan por un punto dado en la unidad de tiempo. Su dimensión es la inversa del tiempo (T^{-1}) y sus unidades son el seg^{-1} , ciclos por segundo (cps) o hertz (Hz). (30)

ABSORBANCIA (A): Es el logaritmo decimal del inverso de la transmitancia (T). El término densidad de transmisión interna puede emplearse como sinónimo de absorbancia. Se le representa con la siguiente fórmula. (7)

$$A = \log_{10}(1/T)$$

TRANSMITANCIA (T): Es la relación que existe entre el poder de radiación transmitido por una muestra (P) y el poder de radiación que incide sobre la muestra de (P₀). Se expresa con la fórmula siguiente.(40)

$$T = P/P_0$$

ABSORTIVIDAD (a): Es el cociente de dividir la absorbancia (A) entre el producto de la concentración de la sustancia (c) en gramos por litro, y el espesor atravesado por la energía luminosa (b) en cm. Sus unidades son litro por gramo-cm y su fórmula es la siguiente.(7)

$$a = A/bc$$

ABSORTIVIDAD MOLAR (ε): Es la absorbancia cuando la concentración se expresa en moles por litro y el paso de la luz en cm. Tiene dimensiones de litro por mol-cm.(40)

CRONOFOROS: Se definen como grupos funcionales que absorben radiación en el ultravioleta cercano o en el visible cuando están unidos a un residuo saturado que no absorbe y no tiene electrones de valencia no compartidos y de no enlace.(30)

LEY DE BEER: Establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración del soluto absorbente. Se expresa por la siguiente ecuación.(30)

$$A = \epsilon bc$$

Donde:

A = Absorbancia.

c = Coeficiente de extinción molar ó absorbividad molar.

c = concentración en g/lt, mol/lt, etc.

b = espesor de la celda en cm.

3.2.0 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

La validación de métodos analíticos permite conocer el comportamiento de un proceso bajo diferentes condiciones de operación, y posteriormente utilizarlo en lo posible para procesos rutinarios.

La validación es una parte esencial de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y su aplicación es actualmente requerida por las autoridades de Salud en el registro de productos.

La calidad de los productos farmacéuticos debe cumplir con los requisitos de seguridad, eficacia y equivalencia. Muchas formas farmacéuticas no pueden ser garantizadas individualmente, ya que el control las destruiría. En este caso cada forma posee una probabilidad de calidad que puede ser incrementada a un nivel máximo aplicando las BPM a las operaciones productivas.

La validación es definida por la FDA (Food and Drug Administration) como un programa documentado que provee un alto grado de seguridad de que un proceso específico producirá consistentemente un producto, dentro de sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados.

El Comité de Redacción de Guías Generales de Validación definen a la validación como el método científico, que proporciona la evidencia documentada para demostrar la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de cualquier instrumento de medición de variables.

La FIP (Federación Internacional Farmacéutica) define a la validación como la evaluación de procesos productivos por medios sistemáticos, el cual sea confiable y repetible.

La validación debe incluir una evaluación de la linealidad, precisión, exactitud y especificidad con objeto de establecer que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. (31, 32, 33)

3.2.0.1 DEFINICIONES:

LINEALIDAD DE SISTEMA: Es la relación que se establece por medio de un modelo lineal entre una propiedad física, química y/o biológica con la cantidad de fármaco. (34)

PRECISION DE SISTEMA: Es el grado de concordancia entre mediciones analíticas individuales obtenidos bajo las mismas condiciones de análisis, cuando el procedimiento se repite a diferentes muestreos de una muestra homogénea de la solución patrón. (34)

ESPECIFICIDAD DE METODO: Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a los otros componentes de la muestra. En la práctica la especificidad se demuestra dependiendo de la aplicación del método analítico a analizar. (32)

a) **Métodos de Control de Calidad:** Se analizan placebos del producto con el método de medición y si es posible adicionar al placebo sustancias relacionadas (precursores de síntesis, posibles contaminantes de la síntesis, entre otras) así como sustancias auxiliares que se sospeche puedan estar presentes durante la manufactura del producto. (32, 34)

b) **Métodos Indicadores de Estabilidad:** Con el método de medición, se analizan placebos adicionados con posibles productos de degradación o placebos envejecidos adicionados de posibles productos de degradación. Cuando no se conocen con certeza los productos de degradación o no se dispone de ellos, se someten el fármaco, el placebo y muestra de producto terminado a condiciones de almacenamiento (temperatura, luz ultravioleta, luz fluorescente,

medio oxidante, medio alcalino, medio ácido, etc) que aceleren cualquier reacción de descomposición en el producto. Los productos de degradación se detectan con cualquiera de las técnicas de cromatografía como: cromatografía de líquidos de alta presión, cromatografía de gases o cromatografía de capa delgada. (32, 34)

EXACTITUD DE METODO: Es la concordancia entre un valor 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. (32)

LINEALIDAD DE METODO: Es la relación establecida mediante una recta, entre una propiedad medible (cantidad de farmaco recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad de farmaco adicionado). (34)

PRECISION DE METODO: Es la concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación. (32)

A) REPETIBILIDAD: Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.). (32)

B) REPRODUCIBILIDAD: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.). (32)

3.2.1 DISEÑOS FACTORIALES FRACCIONARIOS Y DE PLACKETT-BURMAN.

Finney en 1945 fue el primero en proponer los experimentos factoriales fraccionales los cuales tienen un gran número de aplicaciones, principalmente en la industria. Debido a que la variabilidad aleatoria es pequeña y el proceso de respuesta es rápido.

Los factoriales fraccionales (los más usuales son factoriales 2^n fraccionados), se usan en los siguientes casos:

1. En situaciones preliminares de filtrado de factores. Cuando se tienen muchos factores que influyen en un proceso, sin embargo se espera que solo unos cuantos sean importantes, pero no se sabe cuales son estos.

2. Experimentación secuencial, donde se van agregando nuevos tratamientos de acuerdo con los resultados anteriores.

3. Al tener un grupo de factores que son importantes y principal objeto de estudio. Además se tiene otro grupo de factores que se espera de poco efecto, cuando más solo con efectos principales pero no interacciones. A los primeros se les denomina factores mayores y a los segundos factores menores. Se espera interacción entre los mayores pero no entre, o con los menores.

Los diseños de Plackett-Burman son diseños factoriales fraccionales de dos niveles, utilizados para estudiar $K = N - 1$ variables en N ensayos, en donde N es múltiplo de 4. (35, 36)

4 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar alantoina por colorimetría en una formulación de shampoo.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Estudiar las distintas variables analíticas del método analítico.
- 2) Fijar las condiciones analíticas del método más apropiadas.
- 3) Validar la metodología analítica; evaluando los siguientes parámetros analíticos del método: linealidad y precisión del sistema, especificidad, exactitud, linealidad y precisión del método.

5 HIPOTESIS DE TRABAJO:

El estudio de las variables analíticas permitirán determinar las mejores condiciones de operación del método y la validación permitirá conocer si la metodología colorimétrica utilizada, es confiable para la cuantificación de alantoina en shampoo.

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1.0 DESARROLLO DE LA METODOLOGIA ANALITICA PARA DETERMINAR ALANTOINA.

**DIAGRAMA DE FLUJO
DESARROLLO DEL METODO ANALITICO**

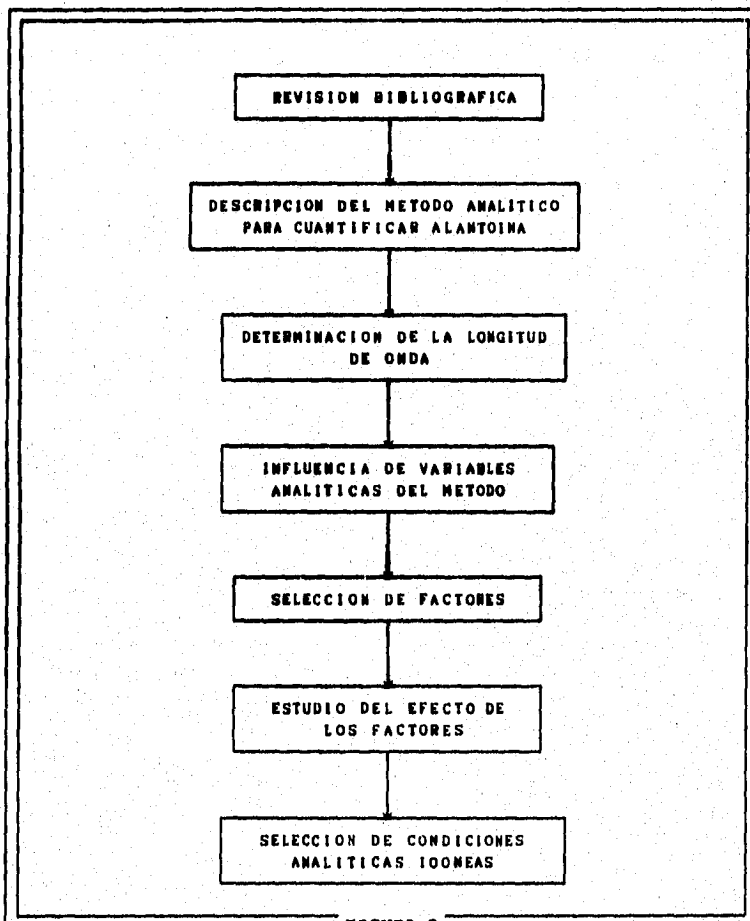


FIGURA 2

6.1.1 DESCRIPCION DEL METODO ANALITICO.

MATERIAL Y EQUIPO:

Matraz volumétrico de 50 ml, Marca Pyrex.
Pipeta volumétrica de 10 ml, Marca Pyrex.
Matraz volumétrico de 100 ml, Marca Pyrex.
Pipeta volumétrica de 2 ml y 4 ml, Marca Pyrex.
Tubos de ensayo de 23x200 mm, Marca Pyrex.
Pipeta volumétrica de 5 ml, Marca Pyrex.
Pipeta graduada de 1 ml y 2 ml, Marca Pyrex.
Pipeta volumétrica de 1 ml, Marca Pyrex.
Pipeta volumétrica de 10 ml, Marca Pyrex.
Pipeta graduada de 1 ml, Marca Pyrex.
Matraz volumétrico de 50 ml, Marca Pyrex.
Vasos de precipitados de 50 ml, Marca Pyrex.

OTROS:

Espátula de acero inoxidable.
Agitadores de vidrio.
Gradilla grande.

APARATOS:

Balanza Analítica, Marca: Sauter, capacidad 200 g.
Parrilla Eléctrica, Marca: Sybron Thermolyne, Modelo: 2200.
Espectrofotómetro Spectrometer Lambda 2, Perkin Elmer uv/vis.

REACTIVOS:

1. Carbonato de Sodio anhidro, Marca: JT Baker, No.de Catálogo:3602.
2. Fenolftaleína, Marca: Merck, No.de Catálogo: 414888.
3. Acido Clorhídrico, Marca: Merck, No.de Catálogo: 11033.
4. Clorhidrato de Fenilhidrazina, Marca:Merck, No.de Catálogo:3013699.
5. Acido Clorhídrico, Marca: JT Baker, No.de Catálogo: 9535-62.

6. Ferricianuro de Potasio, Marca: JT Baker, No.de Catálogo: 3104.
7. Alcohol Etilico, Marca: Merck, No.de Catálogo: 5702.
8. Alantoína, Estándar de Referencia.

SOLUCIONES:

1. Solución de Carbonato de Sodio al 1%.
Disolver 0.5 g de Carbonato de Sodio en 50 ml de agua destilada.
2. Solución Indicadora de Fenolftaleína.
Disolver 1 g de Fenolftaleína en 100 ml de Alcohol Etilico.
3. Solución de Clorhidrato de Fenilhidrazina al 0.5%.
Disolver 0.25 g de Clorhidrato de Fenilhidrazina en 50 ml de agua destilada.
4. Solución de Ferricianuro de Potasio al 5%.
Disolver 2.5 g de Ferricianuro de Potasio en 50 ml de agua destilada.

NOTA: Las soluciones 3 y 4 deben ser preparadas en el momento de su uso, debido a su inestabilidad. Procurar envasarlos en frascos color ambar para protegerlos de la luz.

PROCEDIMIENTO:

Pesar 100 mg de alantoína estándar de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar al volumen con agua destilada. Tomar una alícuota de 10 ml, colocar en un matraz volumétrico de 100 ml, diluir a la marca con agua destilada.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

De esta solución transferir por duplicado una alícuota de 4 ml a tubos de ensayo de 23x200 mm. Adicionar 5 ml de solución de carbonato de sodio al 1% y medir el pH con papel de intervalo 5-10. Calentar en baño de agua a ebullición durante 15 minutos. Adicionar 0.2 ml de solución indicadora de fenolftaleína y 1.1 ml de ácido clorhídrico 1 Normal. Antes de que se enfríe la solución, adicionar 1 ml de solución de clorhidrato de fenilhidrazina al 0.5%. Enfríar en baño de agua fría. Adicionar 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y 0.5 ml de solución de ferricianuro de potasio al 5%, agitar ligeramente los tubos.

Esperar a que se desarrolle un color rojo rubí y después de 10 minutos diluir en matraz aforado de 50 ml al volumen, con agua destilada.

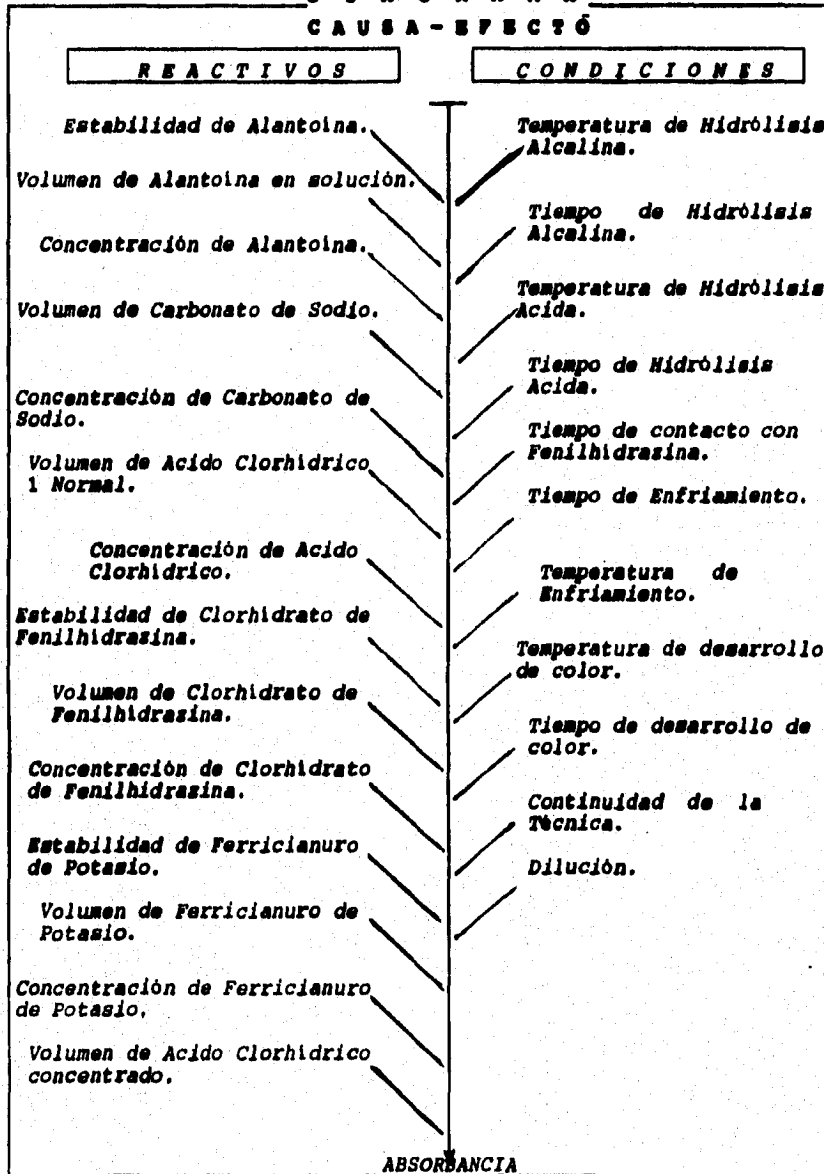
Leer las absorbancias de las muestras en el Espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm (Ver Anexo 1), contra el blanco correspondiente.

BLANCO: Colocar 4 ml de agua destilada en un tubo de ensayo de 23x200 mm, tratarlos de la misma manera que las muestras en el desarrollo de color.

6.1.2 SELECCION DE FACTORES MEDIANTE UN DIAGRAMA DE CAUSA-EFECTO.

Para elegir aquellos factores que podrían impactar en la respuesta analítica (absorbancia a 520 nm) se muestra el siguiente diagrama Causa-Efecto en la figura 3; al analizar la metodología analítica propuesta.

**D I A G R A M A
CAUSA - EFECTO**



ABSORBANCIA
FIGURA 3

Revisando con detalle el diagrama de Causa-Efecto junto con las reacciones que se llevan a cabo en la técnica (ver en apartado 3.1.8 la figura 1) se seleccionaron los siguientes factores como los más importantes y se establecieron los niveles de estos, para su estudio.

Los factores a estudiar son los siguientes:

A: Tiempo de incubación en baño maría para la hidrólisis alcalina.

B: Tiempo de incubación en baño maría para la hidrólisis ácida.

C: Temperatura de enfriamiento.

D: Tiempo de enfriamiento.

E: Temperatura de desarrollo de color.

F: Tiempo de desarrollo de color.

Los niveles de los factores se describen en la tabla 1.

TABLA 1		
FACTOR	NIVEL	CONDICION DE ANALISIS
A	-	15 MINUTOS
	+	20 MINUTOS
B	-	0 MINUTOS
	+	5 MINUTOS
C	-	HIELO
	+	AGUA
D	-	5 MINUTOS
	+	10 MINUTOS
E	-	HIELO
	+	TEMPERATURA AMBIENTE
F	-	10 MINUTOS
	+	20 MINUTOS

- = NIVEL BAJO
+ = NIVEL ALTO

La clasificación es la siguiente:
 Todos los factores son cruzados.
 Todos los factores son fijos.

Los factores cuantitativos son: A, B, D, F
 Los factores cualitativos son: C y E

El modelo es:

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1A + \alpha_2B + \alpha_3C + \alpha_4D + \alpha_5E + \alpha_6F + \epsilon$$

Donde:

α = Coeficientes lineales.

ϵ = Error experimental.

El estudio de las variables más importantes del método analítico se describe en tres experimentos que se mencionan en seguida.

6.1.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS PARAMETROS: TIEMPO Y TEMPERATURA DE REACCION.

OBJETIVO: Determinar cuales son los factores y condiciones de análisis descritos anteriormente, que presentan mayor impacto en la respuesta analítica (absorbancia) mediante un Diseño de Plackett-Burman.

Utilizando el Diseño de Plackett Burman se plantearon las condiciones de análisis para los factores que se muestran en la tabla 2, a los cuales se les aplicó el método del ácido glicólico por medio de fenilhidrazina-ferricianuro que se menciona en el apartado 6.1.1. Las experiencias se efectuaron por duplicado para alicuotas de 2 ml y 4 ml de solución estándar de alantoina. La absorbancia de las muestras se determinó en el Espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm contra el blanco correspondiente.

TABLA 2
MATRIZ DE TRATAMIENTOS

C.A	FACTORES						V.R
	A	B	C	D	E	F	
1	20 MIN.	0 MIN.	HIELO	10 MIN.	HIELO	20 MIN.	Y11 Y12
2	20 MIN.	5 MIN.	AGUA	5 MIN.	T.AMB.	10 MIN.	Y21 Y22
3	20 MIN.	5 MIN.	HIELO	5 MIN.	HIELO	20 MIN.	Y31 Y32
4	15 MIN.	5 MIN.	HIELO	10 MIN.	HIELO	10 MIN.	Y41 Y42
5	20 MIN.	0 MIN.	HIELO	10 MIN.	T.AMB.	10 MIN.	Y51 Y52
6	15 MIN.	5 MIN.	AGUA	10 MIN.	T.AMB.	20 MIN.	Y61 Y62
7	15 MIN.	0 MIN.	HIELO	5 MIN.	T.AMB.	20 MIN.	Y71 Y72
8	15 MIN.	0 MIN.	AGUA	5 MIN.	HIELO	10 MIN.	Y81 Y82

C.A = CONDICION DE ANALISIS, T.AMB. = TEMPERATURA AMBIENTE,
MIN. = MINUTOS Y V.R = VARIABLE DE RESPUESTA.

RESULTADOS:

En las tablas 3 y 4 se muestra las lecturas de absorbancia obtenidos en las ocho condiciones de análisis para las alícuotas de 2 ml y 4 ml respectivamente.

TABLA 3							
VOLUMEN 1							
C. A	FACTORES						ABSORBANCIA
	A	B	C	D	E	F	
1	+	-	-	+	-	+	0.0 0.0
2	+	+	-	-	+	-	0.865 0.616
3	+	+	+	-	-	+	0.431 0.314
4	-	+	+	+	-	-	0.768 0.958
5	+	-	+	+	+	-	0.111 0.0
6	-	+	-	+	+	+	0.769 0.820
7	-	-	+	-	+	+	0.210 0.131
8	-	-	-	-	-	-	0.0 0.168

VOLUMEN 1 = EMPLEANDO 2 ML DE SOLUCION ESTANDAR DE ALANTOINA.
Y C.A = CONDICION DE ANALISIS.

TABLA 4
VOLUMEN 2

C. A	FACTORES						ABSORBANCIA
	A	B	C	D	E	F	
1	+	-	-	+	-	+	0.285 0.205
2	+	+	-	-	+	-	1.931 1.710
3	+	+	+	-	-	+	1.266 1.166
4	-	+	+	+	-	-	2.435 2.540
5	+	-	+	+	+	-	0.506 0.771
6	-	+	-	+	+	+	2.580 2.580
7	-	-	+	-	+	+	0.860 0.608
8	-	-	-	-	-	-	0.422 0.558

VOLUMEN 2 = EMPLEANDO 4 ML DE SOLUCION ESTANDAR DE ALANTOINA.
Y C. A = CONDICION DE ANALISIS.

ANALISIS DE RESULTADOS:

El análisis estadístico de los resultados por volumen para estimar los efectos se describe en el anexo 2; al sustituir y reducir se obtiene los valores de los coeficientes lineales de la tabla 5.

T A B L A 5			
VALOR DE LOS COEFICIENTES LINEALES			
F A C T O R	COEFICIENTE	VOLUMEN 1	VOLUMEN 2
-	α_0	0.385	1.276
A	α_1	-0.093	-0.296
B	α_2	0.308	0.750
C	α_3	0.020	-0.007
D	α_4	0.044	0.211
E	α_5	0.055	0.167
F	α_6	-0.051	0.083

VOLUMEN 1 = EMPLEANDO 2 ML DE SOLUCION ESTANDAR DE ALANTOINA.
VOLUMEN 2 = EMPLEANDO 4 ML DE SOLUCION ESTANDAR DE ALANTOINA.

Al sustituir los valores de los coeficientes en el modelo se obtiene lo siguiente:

Para 2 ml.

$$Y = 0.3851 - 0.093A + 0.308B + 0.020C + 0.044D + 0.055E - 0.051F + e$$

Para 4 ml.

$$Y = 1.2764 - 0.296A + 0.750B - 0.007C + 0.211D + 0.167E + 0.083F + c$$

Para 2 ml el orden del efecto en valor absoluto de los factores considerando los coeficientes lineales en la absorbancia es:

B (Tiempo de incubación de hidrólisis ácida) > A (Tiempo de incubación de hidrólisis alcalina) > E (Temperatura de desarrollo de color) > F (Tiempo de desarrollo de color) D (Tiempo de enfriamiento) > C (Temperatura de enfriamiento).

Para 4 ml el orden del efecto en valor absoluto de los factores considerando los coeficientes lineales en la absorbancia es:

B (Tiempo de incubación de hidrólisis ácida) > A (Tiempo de incubación de hidrólisis alcalina) > D (Tiempo de enfriamiento) > E (Temperatura de desarrollo de color) > F (Tiempo de desarrollo de color) > C (Temperatura de enfriamiento).

En base a los resultados obtenidos para 2 ml y 4 ml pudieron determinarse como los principales factores con mayor efecto en la absorbancia: Tiempo de incubación de hidrólisis ácida y el tiempo de incubación de hidrólisis alcalina.

Así mismo, pudieron fijarse los siguientes factores y sus condiciones de análisis.

1. Factor C (Temperatura de enfriamiento):
En agua a temperatura ambiente.
2. Factor E (Temperatura de desarrollo de color):

Temperatura ambiente.

3. Factor F (Tiempo de desarrollo de color):
10 minutos.

Estos factores presentaron menor impacto en la respuesta analítica y las condiciones de análisis se eligieron con base en lo siguiente:

Para el factor C (Temperatura de enfriamiento en agua) y factor E (Temperatura de desarrollo de color) se seleccionó para ambos factores el nivel alto, en base a su coeficiente lineal, el cuál presenta mayor respuesta en la absorbancia.

Para el factor F (Tiempo de desarrollo de color) se seleccionó como condición de análisis al nivel bajo dado que se observó que era más práctico que el nivel alto.

6.1.4 EVALUACION DE LA INFLUENCIA DEL TIEMPO DE HIDROLISIS ALCALINA, TIEMPO DE HIDROLISIS ACIDA Y TIEMPO DE ENFRIAMIENTO.

OBJETIVO: Investigar el efecto de los factores tiempo de incubación de hidrólisis alcalina, tiempo de incubación de hidrólisis ácida y tiempo de enfriamiento así como las condiciones de análisis mediante un Diseño factorial con 3 factores a 2 niveles (2^3).

Los factores a estudiar son los siguientes:

X: Tiempo de incubación en baño maria para la hidrólisis alcalina.

Z: Tiempo de incubación en baño maria para la hidrólisis ácida.

W: Tiempo de enfriamiento.

Los niveles de los factores se describen en la tabla 6.

TABLA 6		
FACTOR	NIVEL	CONDICION DE ANALISIS
X	-	5 MINUTOS
	+	15 MINUTOS
Z	-	2 MINUTOS
	+	7 MINUTOS
W	-	7 MINUTOS
	+	13 MINUTOS

- = NIVEL BAJO
+ = NIVEL ALTO

La clasificación es la siguiente:

Todos los factores son cruzados.

Todos los factores son fijos.

Los factores cuantitativos son: X, Z, W.

El modelo es:

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X + \alpha_2 Z + \alpha_3 W + \alpha_{12} XZ + \alpha_{13} XW + \alpha_{23} ZW + \alpha_{123} XZW + \epsilon$$

Donde:

α = Coeficientes lineales de efectos principales e interacciones.

ϵ = Error experimental.

En la matriz de tratamientos que se muestra en la tabla 7 donde se fijan las condiciones de análisis. Se determinó la absorbancia de las muestras en el Espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm contra el blanco correspondiente. Efectuando por duplicado la experiencia para alicuotas de 2 ml y 4 ml.

TABLA 7
MATRIZ DE TRATAMIENTOS

C.A	FACTORES			V.R
	X	Y	W	
1	5 MINUTOS	2 MINUTOS	7 MINUTOS	Y1111 Y1112
2	5 MINUTOS	2 MINUTOS	13 MINUTOS	Y1121 Y1122
3	15 MINUTOS	2 MINUTOS	7 MINUTOS	Y1211 Y1212
4	15 MINUTOS	2 MINUTOS	13 MINUTOS	Y1221 Y1222
5	5 MINUTOS	7 MINUTOS	7 MINUTOS	Y2111 Y2112
6	5 MINUTOS	7 MINUTOS	13 MINUTOS	Y2121 Y2122
7	15 MINUTOS	7 MINUTOS	7 MINUTOS	Y2211 Y2212
8	15 MINUTOS	7 MINUTOS	13 MINUTOS	Y2221 Y2222

C.A = CONDICION DE ANALISIS Y V.R = VARIABLE DE RESPUESTA.

RESULTADOS:

En las tablas 8 y 9 se muestra las lecturas de absorbancia obtenidos en las ocho condiciones de análisis para las alicuotas de 2 ml y 4 ml respectivamente.

T A B L A 8				
LECTURA DE ABSORBANCIAS DE LOS PATRONES PARA VOLUMEN 1				
X	X1		X2	
Z	Z1	Z2	Z1	Z2
W1	0.789	0.702	0.934	0.431
	0.933	0.819	0.977	0.502
W2	0.558	0.416	1.111	0.592
	0.644	0.528	1.066	0.760

VOLUMEN 1 - EMPLEANDO 2 ML DE SOLUCION ESTANDAR DE ALANTOINA.
X, Z Y W - FACTORES.

T A B L A 9
LECTURA DE ABSORBANCIAS DE LOS PATRONES
PARA VOLUMEN 2

X	X1		X2	
	S1	S2	S1	S2
W1	2.153	2.014	2.344	1.205
	2.315	1.672	2.353	1.198
W2	1.656	1.159	2.704	2.200
	1.833	1.380	2.403	2.611

VOLUMEN 2 = EMPLEANDO 4 ML DE SOLUCION ESTANDAR DE ALANTOINA.
X, Z Y W = FACTORES.

ANALISIS DE RESULTADOS:

El análisis estadístico de los resultados por volumen se describe en el anexo 2 y el análisis de la varianza se muestra en las tablas de Anadava 10 y 11.

T A B L A 1 0
TABLA DE ANADEVA
PARA VOLUMEN 1

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal
X	1	SCx= 0.06051	MCx= 0.06051	10.58*
Z	1	SCz= 0.31979	MCz= 0.31979	55.9174**
W	1	SCw= 0.010604	MCw= 0.010604	1.855
XZ	1	SCxz= 0.112896	MCxz=0.112896	19.74**
XW	1	SCxw= 0.19847	MCxw= 0.19847	34.70**
ZW	1	SCzw= 0.000576	MCzw= 0.000576	0.1007
XZW	1	SCxzw= 0.002756	MCxzw= 0.002756	0.481
c	8	SCc= 0.045752	MCc = 0.005719	

VOLUMEN 1 • EMPLEANDO 2 ML DE SOLUCION ESTANDAR DE ALANTOINA.

** ALTAMENTE SIGNIFICATIVO.

* SIGNIFICATIVO.

T A B L A 1 1
TABLA DE ANADEVA
PARA VOLUMEN 2

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal
X	1	SCx= 0.50268	MCx= 0.50268	16.65**
Z	1	SCz= 1.16748	MCz= 1.16748	38.67**
W	1	SCw= 0.02992	MCw= 0.02992	0.99
XZ	1	SCxz= 0.04601	MCxz= 0.04601	1.52
XW	1	SCxw= 1.5277	MCxw= 1.5277	50.60**
ZW	1	SCzw= 0.20931	MCzw= 0.20931	6.93*
XZW	1	SCxzw= 0.29322	MCxzw= 0.29322	9.71*
c	8	SCc= 0.24151	MCc = 0.03018	

VOLUMEN 2 = EMPLEANDO 4 ML DE SOLUCION ESTANDAR DE ALANTOINA.

** ALTAMENTE SIGNIFICATIVO.

* SIGNIFICATIVO.

La interpretación de la tabla 10 de análisis de la varianza para 2 ml es la siguiente:

1. Existe efecto lineal significativo del factor X (Hidrólisis alcalina) en la absorbancia de alantoina.
2. Existe efecto lineal altamente significativo del factor Z (Hidrólisis ácida) en la absorbancia de alantoina.
3. No existe efecto lineal del factor W (Tiempo de enfriamiento) en la absorbancia de alantoina.
4. Existe interacción altamente significativa del efecto lineal de los factores: X (Hidrólisis alcalina) y Z (Hidrólisis ácida) en la absorbancia de alantoina.
5. Existe interacción altamente significativa del efecto lineal de los factores: X (Hidrólisis alcalina) y W (Tiempo de enfriamiento) en la absorbancia de alantoina.
6. No existe interacción del efecto lineal de los factores: Z (Hidrólisis ácida) y W (Tiempo de enfriamiento) en la absorbancia de alantoina.
7. No existe interacción del efecto lineal de los factores: X (Hidrólisis alcalina), Z (Hidrólisis ácida) y W (Tiempo de enfriamiento) en la absorbancia de alantoina.

La interpretación de la tabla 11 de análisis de la varianza para 4 ml es la siguiente:

1. Existe efecto lineal altamente significativo del factor X (Hidrólisis alcalina) en la absorbancia de alantoina.
2. Existe efecto lineal altamente significativo del factor Z (Hidrólisis ácida) en la absorbancia de alantoina.
3. No existe efecto lineal del factor W (Tiempo de enfriamiento) en la absorbancia de alantoina.
4. No existe interacción del efecto lineal de los factores: X (Hidrólisis alcalina) y Z (Hidrólisis ácida) con la absorbancia de alantoina.
5. Existe interacción altamente significativa del efecto lineal de los factores: X (Hidrólisis alcalina) y W (Tiempo de enfriamiento) en la absorbancia de alantoina.
6. Existe interacción significativa del efecto lineal de los factores: Z (Hidrólisis ácida) y W (Tiempo de enfriamiento) en la absorbancia de alantoina.
7. Existe interacción significativa del efecto lineal de los factores: X (Hidrólisis alcalina), Z (Hidrólisis ácida) y W (Tiempo de enfriamiento) en la absorbancia de alantoina.

Para estimar los efectos del modelo (ver anexo 2) se determinó el valor de los coeficientes lineales que se muestra en la tabla 12.

T A B L A 1 2
VALOR DE LOS COEFICIENTES LINEALES

F A C T O R	COEFICIENTES	VOLUMEN 1	VOLUMEN 2
-	σ_0	0.7354	1.9500
X	σ_1	0.0615	0.1773
Z	α_2	-0.1414	-0.2701
W	α_3	-0.0258	0.0433
XZ	α_{12}	-0.0840	-0.0536
XW	α_{13}	0.1114	0.3090
ZW	α_{23}	0.0060	0.1144
XZ	α_{12}	0.0131	0.1354

VOLUMEN 1 = EMPLEANDO 2 ML DE SOLUCION ESTANDAR DE ALANTOINA.
VOLUMEN 2 = EMPLEANDO 4 ML DE SOLUCION ESTANDAR DE ALANTOINA.

Al sustituir los valores de los coeficientes en el modelo se obtiene lo siguiente.

Para 2 ml.

$$Y = 0.7354 + 0.0615X - 0.1414Z - 0.0258W - 0.0840XZ + 0.1114XW + 0.0060ZW + 0.0131XZW + \epsilon$$

Para 4 ml.

$$Y = 1.9500 + 0.1773X - 0.2701Z + 0.0433W - 0.0536XZ + 0.3090XW + 0.1144ZW + 0.1354XZW + \epsilon$$

En seguida se indica la descripción de las gráficas de contorno de las absorbancias obtenidas para los dos volúmenes de alicuota. Ver sección 10 de gráficas de contorno.

En la Gráfica I para volumen de 2 ml se presentan los contornos para absorbancias de 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1 y 1.1. Para 15 minutos de hidrólisis alcalina.

En la Gráfica II para volumen de 2 ml se presentan los contornos para absorbancias de 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 y 0.9. Para 5 minutos de hidrólisis alcalina.

En la Gráfica III para volumen de 4 ml se presentan los contornos para absorbancias de 1.1, 1.3, 1.5, 1.7, 1.9, 2.1, 2.3 y 2.5. Para 15 minutos de hidrólisis alcalina.

En la Gráfica IV para volumen de 4 ml se presentan los contornos para absorbancias de 1.3, 1.5, 1.7, 1.9, 2.1, y 2.3. Para 5 minutos de hidrólisis alcalina.

En base a los resultados pudo fijarse el factor W (Tiempo de enfriamiento en baño de agua) en 10 minutos por observarse en las gráficas de contorno que en este tiempo la respuesta en la absorbancia es favorable, además de ser más práctico para la metodología analítica.

Además se estableció que el volumen de alicuota sería de 2 mililitros.

Esto se determinó en base a la comparación de las gráficas de contorno I, II, III, y IV descritas anteriormente para los volúmenes de 2 ml y 4 ml. Observándose que la gráfica I para el volumen de 2 ml presenta mejor respuesta para fines analíticos en la absorbancia dado que se detectan lecturas de 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 que en comparación con la gráfica III para volumen de 4 ml se observan absorbancias que van de 1.1, 1.3, 1.5, 1.7, 1.9, 2.1, 2.3 y 2.5, así como en la gráfica IV se observan absorbancias de 1.3, 1.5, 1.7, 1.9, 2.1 y 2.3 siendo menos significativas.

Por lo tanto, se decidió seguir adelante desarrollando el siguiente experimento.

6.1.5 FIJACION DE LAS CONDICIONES DE ANALISIS: TIEMPO DE HIDROLISIS ALCALINA Y TIEMPO DE HIDROLISIS ACIDA.

OBJETIVO: Determinar las condiciones de análisis de los factores: Tiempo de incubación de hidrólisis alcalina y tiempo de incubación de hidrólisis ácida, utilizando un Diseño factorial con 2 factores a 2 niveles manteniendo en 2 mililitros el volumen de alícuota.

Los factores a estudiar son los siguientes:

X: Tiempo de incubación en baño maría para la hidrólisis ácida.

Z: Tiempo de incubación en baño maría para la hidrólisis alcalina.

Los niveles de los factores se muestran en la tabla 13.

TABLA 13		
FACTOR	NIVEL	CONDICION DE ANALISIS
X	-	2 MINUTOS
	+	6 MINUTOS
Z	-	10 MINUTOS
	+	20 MINUTOS

- = NIVEL BAJO
+ = NIVEL ALTO

La clasificación es la siguiente:

Todos los factores son cruzados.

Todos los factores son fijos.

Los factores cuantitativos son: X y Z.

El modelo es:

$$Y = a_0 + a_1X + a_2Z + a_{12}XZ + \epsilon$$

Donde:

a_1 = Coeficiente lineal de X.

a_2 = Coeficiente lineal de Z.

a_{12} = Interacción lineal-lineal de X y Z.

ϵ = Error experimental.

En la matriz de tratamientos que se muestra en la tabla 14 se describen las condiciones de análisis. Se leyeron las absorbancias de las muestras en el Espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm contra el blanco correspondiente. La experiencia se realizó por duplicado para alícuotas de 2 ml de solución estándar de alantoina.

TABLA 14
MATRIZ DE TRATAMIENTOS

C.A	FACTORES		V.R
	X	Z	
1	2 MINUTOS	10 MINUTOS	Y111 Y112
2	6 MINUTOS	10 MINUTOS	Y121 Y122
3	2 MINUTOS	20 MINUTOS	Y211 Y212
4	6 MINUTOS	20 MINUTOS	Y221 Y222

C.A = CONDICION DE ANALISIS. Y V.R = VARIABLE DE RESPUESTA.

RESULTADOS:

En la tabla 15 se muestra las lecturas de las absorbancias obtenidas para las cuatro condiciones de análisis.

T A B L A 1 5
LECTURAS DE ABSORBANCIAS DE LOS
PATRONES PARA VOLUMEN 1

Z	X	
	X ₁	X ₂
Z ₁	0.874	0.776
	0.884	0.873
Z ₂	0.749	1.302
	0.639	1.244

VOLUMEN 1= EMPLEANDO 2 ML DE SOLUCION ESTANDAR DE ALANTOINA. X y Z = FACTORES.

ANALISIS DE RESULTADOS:

El análisis estadístico de los resultados se explica en el anexo 2 y el análisis de la varianza se describe en la tabla de Anadeva 16.

TABLA 16
TABLA DE ANADEVA
PARA VOLUMEN DE 2 ML

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal
X	1	SCx = 0.13755	MCx = 0.13755	44.064**
Z	1	SCz = 0.034715	MCz = 0.034716	11.1213*
XZ	1	SCxz = 0.200661	MCxz = 0.200661	64.2815**
c	4	SCc = 0.012486	MCc = 0.003122	

** ALTAMENTE SIGNIFICATIVO.

* SIGNIFICATIVO

La interpretación de la tabla de análisis de la varianza es la siguiente.

1. Existe efecto lineal altamente significativo del factor X (Hidrólisis ácida) en la absorbancia de alantoina.
2. Existe efecto lineal significativo del factor Z (Hidrólisis alcalina) en la absorbancia de alantoina.

3. Existe interacción altamente significativa del efecto lineal de los factores X (Hidrólisis ácida) y Z (Hidrólisis alcalina) en la absorbancia de alantoina.

La estimación de los efectos del modelo (ver anexo 2) se determina con el valor de los coeficientes lineales que se muestra en la tabla 17.

T A B L A 1 7		
VALOR DE LOS COEFICIENTES LINEALES		
FACTOR	COEFICIENTE	VOLUMEN 1
-	α_0	0.9176
X	α_1	0.1311
Z	α_2	0.0659
XZ	α_{12}	0.1584

VOLUMEN 1: EMPLEANDO 2 ML DE SOLUCION ESTANDAR DE ALANTOINA.

Al sustituir los valores de los coeficientes lineales en el modelo se obtiene lo siguiente:

$$Y = 0.9176 + 0.1311X + 0.0659Z + 0.1584XZ + c$$

A continuación se describe la gráfica de contorno de las absorbancias obtenidas para volumen de alicuota de 2 ml. Ver sección 10.

En la gráfica V para volumen de 2 ml se presentan los contornos para absorbancias de 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, 1, 1.05, 1.1, 1.15, 1.2, 1.25, 1.3, 1.35. Para un intervalo de 10 minutos a 20 minutos de hidrólisis alcalina y de 2 a 6 minutos de hidrólisis ácida.

En base a los resultados pudieron fijarse los siguientes factores y sus condiciones de análisis:

X (Tiempo de incubación en baño maria para la hidrólisis ácida): 4 minutos.

Z (Tiempo de incubación en baño maria para la hidrólisis alcalina): 15 minutos.

Esto se obtuvo en base a la gráfica de contorno V en la que se observa que en la curva de 0.9 de absorbancia existe un minimáximo en el que existe una mejor respuesta. Al extrapolar en el eje de las ordenadas para hidrólisis alcalina y en el eje de las abscisas para hidrólisis ácida se obtuvieron los valores de las condiciones de análisis.

6.1.6 CONCLUSIONES:

En base a la discusión de resultados pudieron fijarse los siguientes factores y sus condiciones de análisis para la metodología analítica final.

1. Temperatura de enfriamiento en agua:
Temperatura ambiente.
2. Temperatura de desarrollo de color:
Temperatura ambiente.
3. Tiempo de desarrollo de color:
10 minutos.
4. Tiempo de enfriamiento:
10 minutos.
5. Volumen de alicuota:
2 mililitros.
6. Tiempo de incubación en baño maría para hidrólisis alcalina:
15 minutos.
7. Tiempo de incubación en baño maría para hidrólisis ácida:
4 minutos.

6.2.0 VALIDACION DEL METODO DE CUANTIFICACION PARA DETERMINAR ALANTOINA EN SHAMPOO.

DIAGRAMA DE FLUJO
VALIDACION DEL METODO ANALITICO

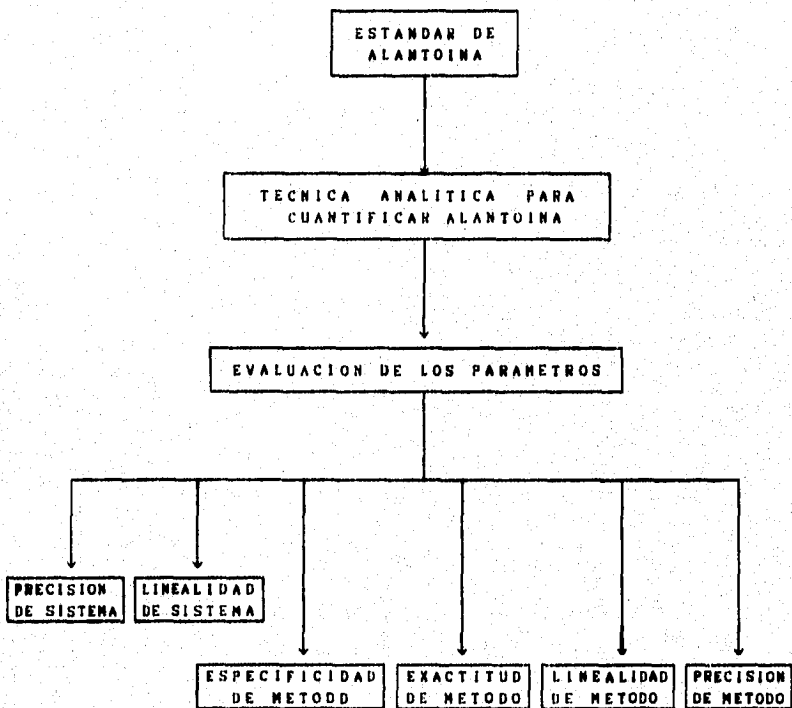


FIGURA 4

MATERIAL Y EQUIPO:

Matraz volumétrico de 50 ml, Marca: Pyrex.
Pipeta volumétrica de 10 ml, Marca: Pyrex.
Matraz volumétrico de 100 ml, Marca: Pyrex.
Vasos de precipitados de 25 ml, Marca: Pyrex.
Matraz volumétrico de 10 ml, Marca: Pyrex.
Tubos de ensayo para centrifuga de 13x100 mm: Marca: Pyrex.
Pipeta Pasteur, Marca: Pyrex.
Pipeta volumétrica de 2 ml, Marca: Pyrex.
Tubos de ensayo de 23x200 mm, Marca: Pyrex.
Pipeta volumétrica de 5 ml, Marca: Pyrex.
Vaso de precipitados de 1000 ml, Marca: Pyrex.
Pipetas graduadas de 1 ml y de 2 ml, Marca: Pyrex.
Pipetas volumétricas de 1 ml y de 0.5 ml, Marca: Pyrex.
Pipeta volumétrica de 10 ml, Marca: Pyrex.
Matraz volumétrico de 50 ml, Marca: Pyrex.

APARATOS:

Balanza Analítica, Marca: Sauter, capacidad 200 g.
Parrilla Eléctrica, Marca: Sybron Thermolyne, Modelo:2200.
Centrifuga, Marca: Heka BHG, Modelo:15557.
Espectrofotómetro Spectrometer Lambda 2, Perkin Elmer uv/vis.

OTROS:

Espátula de acero inoxidable.
Gradilla grande.
Agitadores de vidrio.

REACTIVOS

1. Carbonato de Sodio anhidro Marca:JT Baker, No.de Catálogo:3602.
2. Fenoltaleína Marca: Merck, No.de Catálogo: 414888.

3. Acido Clorhídrico Marca: Merck, No.de Catálogo:11033.
4. Clorhidrato de Fenilhidrazina Marca:Merck, No.de Catálogo:3013699
5. Acido Clorhídrico Marca: JT Baker, No.de Catálogo:9535-62.
6. Ferricianuro de Potasio Marca: JT Baker, No.de Catálogo:3104.
7. Alcohol Etilico Marca: Merck, No.de Catálogo: 5702.
8. Alantoína Estándar de Referencia.
9. Placebo de shampoo.
10. Producto terminado de shampoo.

SOLUCIONES:

1. Solución de Carbonato de Sodio al 1%.
Disolver 0.5 g de Carbonato de Sodio en 50 ml de agua destilada.
2. Solución Indicadora de Fenolftaleína.
Disolver 1 g de Fenolftaleína en 100 ml de Alcohol Etilico.
3. Solución de Clorhidrato de Fenilhidrazina al 0.5%.
Disolver 0.25 g de Clorhidrato de Fenilhidrazina en 50 ml de agua destilada.
4. Solución de Ferricianuro de Potasio al 5%.
Disolver 2.5 g de Ferricianuro de Potasio en 50 ml de agua destilada.

NOTA: Las soluciones 3 y 4 deben ser preparadas en el momento de su uso, debido a su inestabilidad. Procurar envasarlos en frascos color ambar para protegerlos de la luz.

6.2.1 CUANTIFICACION DE ALANTOINA EN PRODUCTO TERMINADO.

En el método para cuantificar alantoína se preparan soluciones patrón de placebo adicionado a una concentración de 160 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ y 240 $\mu\text{g/ml}$. Así como muestras con producto terminado a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$, cada una por triplicado.

PREPARACION DE LOS PATRONES.

Pesar 200 mg de alantoína estándar de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar con agua destilada. De esta solución tomar por separado alícuotas de 0.8 ml, 1 ml y 1.2 ml. Adicionar las alícuotas a 1 gramo de placebo, transferir a matraces aforados de 10 ml y llevar a la marca con agua destilada, agitar. Centrifugar las muestras durante 50 minutos a una velocidad de 6000 rpm. Separar la fase acuosa de la fase sólida con una pipeta pasteur.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Pesar por triplicado 1 gramo de producto terminado (equivalente a 2 mg de alantoína), disolver en una pequeña cantidad de agua destilada, transferir a matraces volumétricos de 10 ml y aforar con agua destilada. Centrifugar durante 50 minutos a una velocidad de 6000 rpm. Separar la fase acuosa de la fase sólida con una pipeta pasteur.

Transferir por separado en tubos de ensayo de 23x200 mm, 2 ml de la fase acuosa de las soluciones patrón, 2 ml de la fase acuosa

de las muestras problema y 2 ml de agua destilada para el blanco.

DESARROLLO DE COLOR

Adicionar a cada tubo 5 ml de solución de carbonato de sodio al 1%. Calentar en baño de agua a ebullición durante 15 minutos. Adicionar 0.2 ml de solución indicadora de fenolftaleína y 1.1 ml de ácido clorhídrico 1 Normal. Poner los tubos a calentar en baño de agua a ebullición durante 4 minutos. Antes de que se enfríe la solución, adicionar 1 ml de solución de clorhidrato de fenilhidrazina al 0.5%. Enfriar las muestras en baño de agua fría durante 10 minutos. Adicionar 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y 0.5 ml de solución de ferricianuro de potasio al 5%. Agitar ligeramente los tubos y después de 10 minutos en reposo, aforar en matraces volumétricos de 50 ml con agua destilada.

Leer en el Espectrofotómetro, las absorbancias de las soluciones patrón y de las muestras a 520 nm contra el blanco correspondiente. Registrar las lecturas.

CALCULOS:

Para calcular el porcentaje de alantoina en la muestra de shampoo se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$A = K_{DM} + \bar{F}_R$$

$$\% = \frac{A_{bm1} + A_{bm2} + A_{bm3}}{3} \cdot \frac{\frac{80}{A_{p1}} + \frac{100}{A_{p2}} + \frac{120}{A_{p3}}}{3}$$

Donde:

% = Porcentaje de alantoina en la muestra de shampoo.

\bar{A}_{bm} = Promedio de las absorbancias de las muestras.

\bar{F}_R = Promedio de los factores respuesta de los patrones.

A_{bm} = Absorbancia de la muestra.

A_p = Absorbancia del patrón.

6.2.2 DETERMINACION DEL PARAMETRO ANALITICO: PRECISION DEL SISTEMA.

PREPARACION DE LA SOLUCION PATRON DE ALANTOINA.

Pesar 100 mg de alantoina estándar de referencia, realizar diluciones con agua destilada hasta obtener una concentración de 200 µg/ml de solución patrón, equivalente al 100% con respecto al contenido teórico de alantoina por cada 100 g de producto terminado.

PREPARACION DE LOS PATRONES.

De la solución patrón transferir por sextuplicado alícuotas de

2 ml en tubos de ensayo de 23x200 mm. A estas muestras aplicar el procedimiento para el desarrollo de color, ver apartado 6.2.1.

PREPARACION DEL BLANCO.

Preparar la solución blanco con 2 ml de agua destilada y tratar de la misma manera que las muestras en el procedimiento para el desarrollo de color.

Leer las absorbancias de las muestras en el Espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm contra el blanco correspondiente y registrar las lecturas.

RESULTADOS.

En la tabla 18 se reporta las lecturas de absorbancias de los patrones.

PATRON	ABSORBANCIA
1	0.897
2	0.760
3	0.763
4	0.732
5	0.733
6	0.989

ANALISIS DE RESULTADOS:

El análisis estadístico de los resultados se describe en el anexo 3; al sustituir en las ecuaciones respectivas se obtiene los valores de la desviación estándar, la media aritmética y el coeficiente de variación.

$$s = 0.10611 \text{ abs}$$

$$\bar{y} = 0.81233 \text{ abs}$$

$$CV = 13.06$$

Donde:

abs = absorbancia

El sistema no es preciso debido a que el Coeficiente de Variación (desviación estándar relativa) de la respuesta de las soluciones patrón es mayor de 1.5%.

Se prosiguió con la validación para determinar si esta variación es transferida al método analítico.

6.2.3 DETERMINACION DEL PARAMETRO ANALITICO: LINEALIDAD DEL SISTEMA.

PREPARACION DE UNA CURVA DE CALIBRACION.

Preparar una curva de calibración a partir de una solución concentrada de alantoina.

Pesar 100 mg de alantoina estándar de referencia, efectuar diluciones con agua destilada hasta obtener una concentración de 160 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ y 240 $\mu\text{g/ml}$, equivalente al 80%, 100% y 120% con respecto al contenido teórico de alantoina por cada 100 g de producto terminado.

PREPARACION DE LOS PATRONES.

De cada solución transferir por triplicado alícuotas de 2 ml a tubos de ensayo de 23x200 mm. Aplicar el procedimiento para desarrollo de color, ver apartado 6.2.1.

PREPARACION DEL BLANCO.

Preparar la solución blanco con 2 ml de agua destilada y tratar de la misma manera que las muestras en el procedimiento para el desarrollo de color.

Leer las absorbancias de las muestras en el Espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm contra el blanco correspondiente y registrar las lecturas.

RESULTADOS.

En la tabla 19 se muestra las lecturas de absorbancias de los patrones para la curva de calibración.

CONCENTRACION µg/ml	ABSORBANCIA
160	0.733
	0.780
	0.995
200	1.044
	0.842
	0.982
240	1.045
	1.139
	1.224

ANALISIS DE RESULTADOS.

Para determinar que el sistema se comporta adecuadamente, la curva de calibración a 3 diluciones debe presentar los siguientes supuestos:

- a) Efecto altamente significativo entre la transmitancia y la

concentración de alantoina, dado un modelo de regresión lineal simple.

b) No se presenta falta de ajuste al modelo de regresión lineal simple.

c) Variación aceptable.

Para evaluar los dos primeros supuestos debe realizarse un análisis estadístico (ver anexo 3), al sustituir en las ecuaciones respectivas se determino lo siguiente:

Los valores de m y b son:

$$m = 0.00750 \text{ abs/\%}$$

$$b = 0.226 \text{ abs}$$

Donde:

abs = absorbancia.

Los valores de $S_{y,x}$, CV y r^2 son:

$$S_{y,x} = 0.10575 \text{ abs}$$

$$CV = 10.84 \%$$

$$r^2 = 0.63298$$

El último supuesto se evalúa realizando el análisis estadístico que se presenta en el anexo 3 y en la tabla 20 se muestra los resultados del análisis de la varianza de la curva de calibración de alantoina.

TABLA 20				
TABLA DE ANADEVA PARA LA CURVA DE CALIBRACION DE ALANTOINA				
FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{cal}
REGRESION	GLR= 1	SCR=0.135000	MCR=0.135000	12.07*
ERROR DE REGRESION	GLER= 7	SCER=0.078276	MCER=0.011182	
FALTA DE AJUSTE	GLFA= 1	SCFA=0.001800	MCFA=0.001800	0.72 ^{NS}
ERROR PURO	GLEP= 6	SCEP=0.076476	MCEP=0.012746	

*=SIGNIFICATIVO
NS=NO SIGNIFICATIVO

Existe una asociación lineal significativa entre la concentración de alantoina y la absorbancia, en el intervalo de 160 µg/ml (80%) a 240 µg/ml (120%), ya que el efecto de regresión es significativo en la tabla de análisis de la varianza (Tabla 20).

El modelo lineal representa de manera correcta la relación entre concentración de alantoina y absorbancia, ya que no existe falta de ajuste al modelo lineal, es decir, no se presenta efecto significativo de la falta de ajuste en la tabla de análisis de la varianza (Tabla 20).

La variación relativa de la absorbancia en el intervalo de concentración de alantoina de 160 µg/ml a 240 µg/ml es de 10.84% (CV).

Los criterios de aceptación, se cumplen parcialmente. Respecto a la asociación lineal, esta es significativa; el modelo lineal es correcto y la variación no es aceptable debido a que se excede del 1.5%.

Se decidió seguir con la validación, para determinar si los criterios que no se cumplen, afectan de manera negativa tanto en la exactitud, como en la precisión del método.

6.2.4 DETERMINACION DEL PARAMETRO ANALITICO: ESPECIFICIDAD DEL METODO.

PREPARACION DE MUESTRAS DE PLACEBO.

Pesar por triplicado 1 gramo de placebo de producto terminado, disolver en una pequeña cantidad de agua destilada, transferir a matraces volumétricos de 10 ml y aforar con agua destilada.

Centrifugar las muestras durante 50 minutos a una velocidad de 6000 rpm. Separar la fase acuosa de la fase sólida con una pipeta pasteur.

Transferir por separado en tubos de 23x200 mm, 2 ml de la fase acuosa de las muestras de placebo, a estas muestras aplicar el procedimiento para el desarrollo color, ver apartado 6.2.1.

PREPARACION DEL BLANCO.

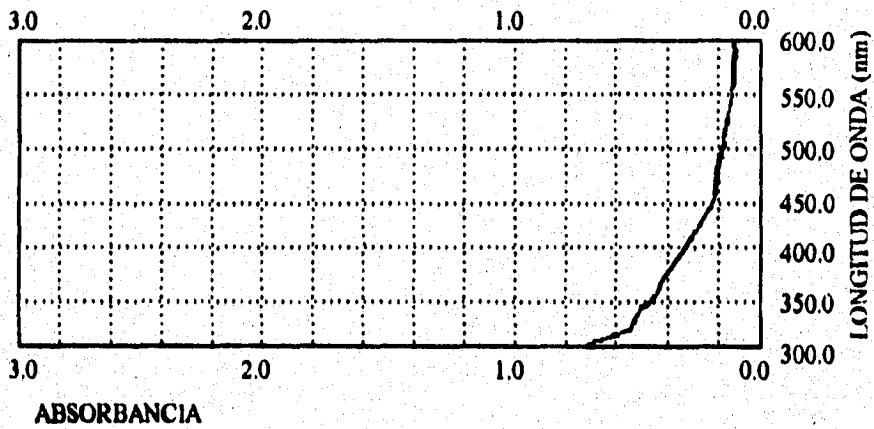
Preparar la solución blanco con 2 ml de agua destilada y tratar de la misma manera que las muestras de placebo en el procedimiento para el desarrollo de color.

Leer los espectros de absorción de las muestras en el Espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm contra el blanco correspondiente y registrar las lecturas.

RESULTADOS.

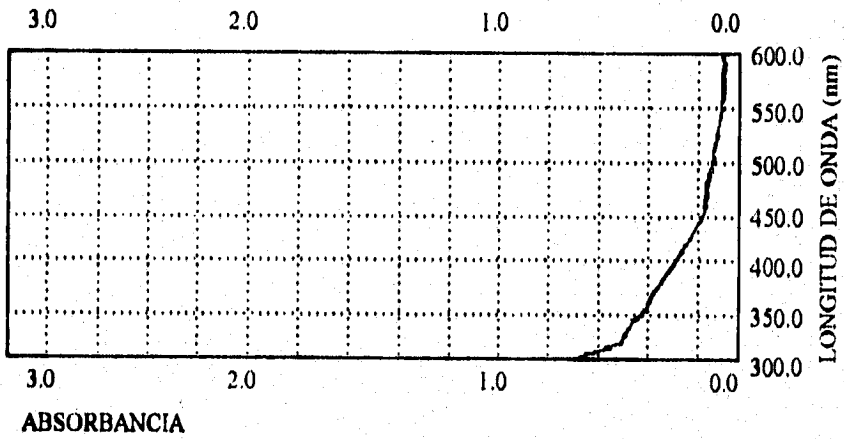
En seguida se informa los espectros de absorción de las tres muestras de placebo de la formulación.

ESPECTRO DE ABSORCION DE MUESTRA DE PLACEBO (1)



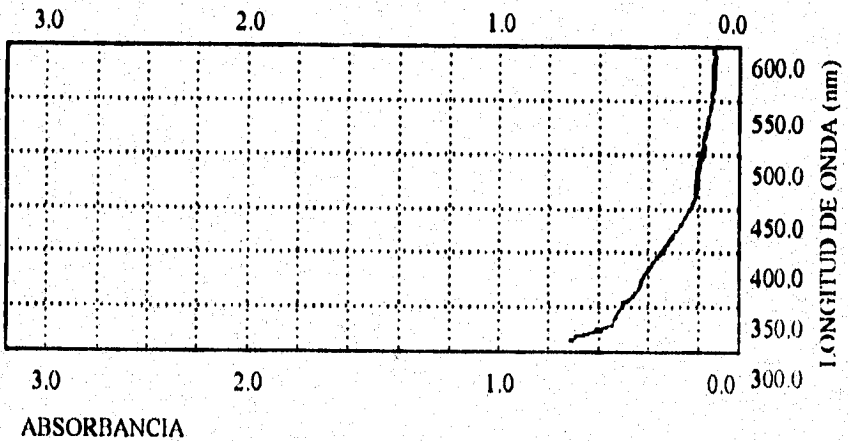
**LECTURA:
NO DETECTA PICOS**

ESPECTRO DE ABSORCION DE MUESTRA DE PLACEBO (2)



LECTURA:
NO DETECTA PICOS

ESPECTRO DE ABSORCION DE MUESTRA DE PLACEBO (3)



LECTURA:
NO DETECTA PICOS

ANALISIS DE RESULTADOS:

En los espectros de absorción de los placebos se aprecia que no hay respuesta, indicando que no hay interferencia por los excipientes presentes en la formulación y su respuesta se debe únicamente a la alantoina (ver anexo 1) con lo que se asegura la especificidad del método.

6.2.5 DETERMINACION DEL PARAMETRO ANALITICO: EXACTITUD AL 100%

PREPARACION DE LA SOLUCION PATRON DE ALANTOINA.

Pesar 200 mg de alantoina estándar de referencia, realizar diluciones con agua destilada hasta obtener una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$.

A partir de esta solución, preparar tres soluciones patrón, transferir alícuotas de 0.8 ml, 1 ml y 1.2 ml a un gramo de placebo, realizar diluciones con agua destilada hasta obtener una concentración de 160 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ y 240 $\mu\text{g/ml}$ equivalente al 80%, 100% y 120% respectivamente.

Centrifugar las muestras durante 50 minutos a una velocidad de 6000 rpm. Con una pipeta pasteur, separar la fase acuosa de la fase sólida.

PREPARACION DE PLACEBOS ADICIONADOS AL 100%.

Pesar por triplicado 1 g de placebo, adicionar 1 ml de solución patrón de alantoina a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. Realizar diluciones con agua destilada hasta obtener una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ equivalente al 100%.

Centrifugar las muestras durante 50 minutos a una velocidad de 6000 rpm. Con una pipeta pasteur, separar la fase acuosa de la fase sólida.

De las tres soluciones patrón preparadas al 80%, 100% y 120%, así como las tres muestras de placebos adicionados preparados al 100%, transferir 2 ml de la fase acuosa a tubos de ensayo de 23x200 mm. A estas muestras, aplicar el procedimiento para desarrollar

color, ver apartado 6.2.1.

PREPARACION DEL BLANCO.

Preparar la solución blanco con 2 ml de agua destilada y tratar de la misma manera que las muestras en el procedimiento para el desarrollo de color.

Leer las absorbancias de las muestras en el Espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm contra el blanco correspondiente y registrar las lecturas.

Repetir el procedimiento por el mismo analista.

RESULTADOS.

En la tabla 21 se informa de las lecturas de absorbancias de los patrones y placebos adicionados.

TABLA 21	
LECTURAS DE ABSORBANCIAS DE PATRONES Y PLACEBOS ADICIONADOS	
MUESTRAS	ABSORBANCIAS
<i>Placebo adicionado</i>	
M1 100x	0.759
M2 100x	0.716
M3 100x	0.969
<i>Patrones</i>	
P11 80x	0.787
P21 100x	0.730
P31 120x	0.911

MUESTRAS	ABSORBANCIAS
<i>Placebo adicionado</i>	
M4 100x	0.943
M5 100x	0.933
M6 100x	0.906
<i>Patrones</i>	
P12 80x	0.814
P22 100x	0.849
P32 120x	1.004

ANALISIS DE RESULTADOS.

Para calcular el % recuperado (%R) se considera lo siguiente:

Para el caso del porcentaje recuperado de las muestras 1, 2 y 3; se utilizan las lecturas de los patrones P_{11} , P_{21} y P_{31} . Para el caso de las muestras 4, 5 y 6; se utilizan las lecturas de los patrones P_{12} , P_{22} y P_{32} .

Al sustituir las lecturas de absorbancia respectiva en la ecuación (10) del anexo 3, se genera la Tabla 22, donde se reporta el porcentaje recuperado de cada muestra.

TABLA 22	
PORCENTAJE RECUPERADO DE ALANTOINA	
MUESTRA	%R
M1	93.70
M2	88.39
M3	119.63
M4	105.49
M5	104.37
M6	101.35

De la tabla 22 se define como variable de respuesta (y), al porcentaje recuperado de la muestra (%R).

El análisis estadístico de la variable de respuesta se describe en el anexo 3; al sustituir en las ecuaciones correspondientes se determino lo siguiente:

los valores de \bar{y} , s y CV son:

$$\bar{y} = 102.1537 \%$$

$$s = 10.7960 \%$$

$$CV = 10.57 \%$$

El valor del intervalo de confianza para la variable de respuesta es:

$$90.82 \% < \mu < 113.49 \%$$

El método es exacto a una cantidad adicionada del 100%, ya que en el intervalo de confianza para el valor del parámetro (media poblacional del recobro experimental) se incluye el 100%.

La repetibilidad del método medida en términos de CV es de 10.57%. el cuál se considera elevado.

6.2.6 DETERMINACION DEL PARAMETRO ANALITICO: LINEALIDAD DEL METODO.

PREPARACION DE LA SOLUCION PATRON DE ALANTOINA.

Pesar 200 mg de alantoina estándar de referencia, realizar la dilución con agua destilada hasta obtener una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$.

A partir de esta solución, transferir alícuotas de 0.8 ml, 1 ml y 1.2 ml a un gramo de placebo, diluir con agua destilada hasta obtener respectivamente concentraciones de 80 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ y 120 $\mu\text{g/ml}$ equivalente al 80%, 100% y 120% .

Centrifugar las muestras durante 50 minutos a una velocidad de 6000 rpm. Con una pipeta pasteur separar la fase acuosa de la fase sólida.

PREPARACION DE PLACEBOS ADICIONADOS AL 85%.

Pesar por triplicado 1 gramo de placebo, adicionar 0.85 ml de la solución patrón de alantoina a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$, realizar diluciones con agua destilada hasta obtener una concentración de 170 $\mu\text{g/ml}$ equivalente al 85%.

PREPARACION DE PLACEBOS ADICIONADOS AL 100%.

Pesar por triplicado 1 gramo de placebo, adicionar 1 ml de la solución patrón de alantoina a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$, realizar diluciones con agua destilada hasta obtener una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ equivalente al 100%.

PREPARACION DE PLACEBOS ADICIONADOS AL 115%.

Pesar por triplicado 1 gramo de placebo, adicionar 1.15 ml de la solución patrón de alantoina a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$, realizar diluciones con agua destilada hasta obtener una concentración de 230 $\mu\text{g/ml}$ equivalente al 115%.

Centrifugar Las muestras de placebo adicionado al 85%, 100% y 115% durante 50 minutos a una velocidad de 6000 rpm. Con una pipeta pasteur separar, la fase acuosa de la fase sólida.

De las soluciones patrón preparadas al 80%, 100% y 120%, así como los placebos adicionados al 85%, 100% y 115%, transferir 2 ml de la fase acuosa a tubos de ensayo de 23x200 mm. A estas muestras aplicar el procedimiento para desarrollo de color, ver apartado 6.2.1.

PREPARACION DEL BLANCO.

Preparar la solución blanco con 2 ml de agua destilada y tratar de la misma manera que las muestras en procedimiento para el desarrollo de color.

Leer las absorbancias de las muestras en el Espectrofotómetro a 520 nm contra el blanco correspondiente.

RESULTADOS.

En la tabla 23 se informa de las lecturas de absorbancias de los patrones y placebos adicionados.

TABLA 23																																					
LECTURAS DE ABSORBANCIAS DE PATRONES Y PLACEBOS ADICIONADOS																																					
<table border="1"><thead><tr><th>MUESTRAS</th><th>ABSORBANCIA</th></tr></thead><tbody><tr><td colspan="2"><i>Placebos adicionados</i></td></tr><tr><td>M1 85x</td><td>0.839</td></tr><tr><td>M2 85x</td><td>0.830</td></tr><tr><td>M3 85x</td><td>0.873</td></tr><tr><td colspan="2"><i>Patrones</i></td></tr><tr><td>P80x</td><td>0.876</td></tr><tr><td>P100x</td><td>1.056</td></tr><tr><td>P120x</td><td>1.268</td></tr></tbody></table>	MUESTRAS	ABSORBANCIA	<i>Placebos adicionados</i>		M1 85x	0.839	M2 85x	0.830	M3 85x	0.873	<i>Patrones</i>		P80x	0.876	P100x	1.056	P120x	1.268	<table border="1"><thead><tr><th>MUESTRAS</th><th>ABSORBANCIA</th></tr></thead><tbody><tr><td colspan="2"><i>Placebos adicionados</i></td></tr><tr><td>M4 100x</td><td>0.759</td></tr><tr><td>M5 100x</td><td>0.716</td></tr><tr><td>M6 100x</td><td>0.969</td></tr><tr><td colspan="2"><i>Patrones</i></td></tr><tr><td>P80x</td><td>0.787</td></tr><tr><td>P100x</td><td>0.730</td></tr><tr><td>P120x</td><td>0.911</td></tr></tbody></table>	MUESTRAS	ABSORBANCIA	<i>Placebos adicionados</i>		M4 100x	0.759	M5 100x	0.716	M6 100x	0.969	<i>Patrones</i>		P80x	0.787	P100x	0.730	P120x	0.911
MUESTRAS	ABSORBANCIA																																				
<i>Placebos adicionados</i>																																					
M1 85x	0.839																																				
M2 85x	0.830																																				
M3 85x	0.873																																				
<i>Patrones</i>																																					
P80x	0.876																																				
P100x	1.056																																				
P120x	1.268																																				
MUESTRAS	ABSORBANCIA																																				
<i>Placebos adicionados</i>																																					
M4 100x	0.759																																				
M5 100x	0.716																																				
M6 100x	0.969																																				
<i>Patrones</i>																																					
P80x	0.787																																				
P100x	0.730																																				
P120x	0.911																																				
<table border="1"><thead><tr><th>MUESTRAS</th><th>ABSORBANCIA</th></tr></thead><tbody><tr><td colspan="2"><i>Placebos adicionados</i></td></tr><tr><td>M7 115x</td><td>1.237</td></tr><tr><td>M8 115x</td><td>1.108</td></tr><tr><td>M9 115x</td><td>1.154</td></tr><tr><td colspan="2"><i>Patrones</i></td></tr><tr><td>P80x</td><td>0.727</td></tr><tr><td>P100x</td><td>1.039</td></tr><tr><td>P120x</td><td>1.179</td></tr></tbody></table>		MUESTRAS	ABSORBANCIA	<i>Placebos adicionados</i>		M7 115x	1.237	M8 115x	1.108	M9 115x	1.154	<i>Patrones</i>		P80x	0.727	P100x	1.039	P120x	1.179																		
MUESTRAS	ABSORBANCIA																																				
<i>Placebos adicionados</i>																																					
M7 115x	1.237																																				
M8 115x	1.108																																				
M9 115x	1.154																																				
<i>Patrones</i>																																					
P80x	0.727																																				
P100x	1.039																																				
P120x	1.179																																				

ANALISIS DE RESULTADOS:

Para el cálculo del % recuperado (%R) de cada muestra en el nivel respectivo del % adicionado de alantoina, se calcula con la ecuación (10) del anexo 3.

Al sustituir las lecturas de absorbancia respectiva en la ecuación (10), se genera la Tabla 24, donde se reporta el porcentaje recuperado de cada muestra.

TABLA 24	
PORCENTAJE RECUPERADO DE ALANTOINA	
MUESTRA	%R
M1	78.49
M2	77.65
M3	81.68
M4	93.70
M5	88.39
M6	119.63
M7	127.03
M8	113.78
M9	118.50

A partir de la tabla 23 y la tabla 24, se genera la tabla 25; donde se reporta el porcentaje adicionado de alantoina (x) y la cantidad recuperada de alantoina (y).

TABLA 25	
PORCENTAJE ADICIONADO Y RECUPERADO DE ALANTOINA	
x	y
85	78.49
	77.65
	81.68
100	93.70
	88.39
	119.63
115	127.03
	113.78
	118.50

De la tabla 25 se establece como variable predictor (x) a la cantidad adicionada y como variable de respuesta (y) a la cantidad recuperada.

El análisis estadístico se describe en el anexo 3; al sustituir en las ecuaciones respectivas se determino lo siguiente:

Los valores de m y b son:

$$m = 1.34989 \text{ } \%a / \%r$$

$$b = -35.11667 \text{ } \%r$$

Donde:

$\%a$ = porcentaje adicionado

$\%r$ = porcentaje recuperado

Los valores de $S_{y.x}$, CV y r^2 son los siguientes:

$$S_{y.x} = 9.71219 \%r$$

$$CV = 9.73 \%$$

$$r^2 = 0.78839$$

El análisis de la varianza en regresión lineal simple se describe en la tabla 26.

TABLA 26				
TABLA DE ANADEVA PARA LA LINEALIDAD DEL METODO DE ALANTOINA				
FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAS	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F_{cal}
REGRESION	GLR=1	SCR=2459.97002	MCR=2459.97002	26.08 ^{**}
ERROR DE REGRESION	GLER=7	SCER=660.28634	MCEP=94.32662	
FALTA DE AJUSTE	GLFA=1	SCFA=2.21201	MCFA=2.21201	0.89 ^{NS}
ERROR PURO	GLEP=6	SCEP=658.07433	MCEP=109.67906	

** = ALTAMENTE SIGNIFICATIVO
 NS = NO SIGNIFICATIVO

El intervalo de confianza del 85% para la ordenada al origen es:

$$-98.09 \%r < B < 27.85 \%r$$

El intervalo de confianza del 95% para el coeficiente de regresión (pendiente) es:

$$0.72485 \text{ } \mu\text{g/ml} / \text{ } \mu\text{g/ml} < M < 1.97493 \text{ } \mu\text{g/ml} / \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Existe una asociación lineal altamente significativa entre la cantidad adicionada y recuperada de alantoina en el intervalo de 170 $\mu\text{g/ml}$ (85%) a 230 $\mu\text{g/ml}$ (115%) (véase tabla 26).

El modelo lineal representa de manera correcta la relación entre la cantidad adicionada y recuperada de alantoina (véase tabla 26).

En el intervalo de confianza al 85% del parámetro ordenada al origen se incluye el cero, por lo que el método carece de error sistemático proporcional constante.

En el intervalo de confianza al 95% del parámetro pendiente se incluye el uno, por lo que el método carece de error sistemático proporcional.

El coeficiente de variación de la regresión lineal simple es mayor de 7.5%; pero un análisis por duplicado de la muestra, disminuye su variación porcentual (CV) a un valor menor del 7.5%.

6.2.7 DETERMINACION DEL PARAMETRO ANALITICO: PRECISION DEL METODO.

PREPARACION DE LA SOLUCION PATRON DE ALANTOINA.

Pesar 200 mg de alantoina estándar de referencia, diluir con agua destilada hasta obtener una concentración de 200 µg/ml.

A partir de esta solución, transferir alícuotas de 0.85 ml, 1 ml y 1.15 ml a 1 gramo de placebo, realizar diluciones con agua destilada hasta obtener respectivamente concentraciones de 170 µg/ml, 200 µg/ml y 230 µg/ml, equivalente al 85%, 100% y 115%.

Centrifugar las muestras durante 50 minutos a una velocidad de 6000 rpm. Con una pipeta pasteur separar la fase acuosa de la fase sólida.

PREPARACION DE MUESTRAS CON PRODUCTO TERMINADO.

Pesar por triplicado 1 gramo de producto terminado (equivalente a 2 mg de alantoina), realizar diluciones con agua destilada hasta obtener una concentración de 200 µg/ml equivalente al 100%.

Centrifugar las muestras durante 50 minutos a una velocidad de 6000 rpm. Con una pipeta pasteur separar la fase acuosa de la fase sólida.

De las soluciones patrón preparadas al 85%, 100% y 115%, así como las tres muestras de producto terminado, transferir 2 ml de la fase acuosa a tubos de ensayo de 23x200 mm. A estas muestras aplicar el procedimiento para desarrollo de color, ver el apartado 6.2.1.

PREPARACION DEL BLANCO.

Preparar la solución blanco con 2 ml de agua y tratar de la misma manera que las muestras en el desarrollo de color.

Se leyeron las absorbancias de las muestras en el Espectrofotómetro a 520 nm contra el blanco correspondiente y se registraron las lecturas.

Se repitió todo el procedimiento por el mismo analista en otra corrida independiente.

RESULTADOS.

En la tabla 27 se informa de las lecturas de absorbancias de los patrones y de las muestras (provenientes de un lote de shampoo como producto terminado).

TABLA 27		
LECTURAS DE ABSORBANCIAS DE PATRONES Y MUESTRAS		
ABSORBANCIAS DE LAS MUESTRAS		
MUESTRA (100%)	D I A	
	1	2
M1	1.064	0.874
M2	0.961	0.805
M3	0.855	0.769
PATRON		
P65%	0.885	0.614
P100%	0.869	0.717
P115%	1.110	0.876

ANALISIS DE RESULTADOS.

Para el cálculo del % de alantoina (%R) presente en el producto, se utiliza la ecuación (16) del anexo 3.

Para el caso del porcentaje recuperado de las muestras, se emplea la absorbancia de la curva de calibración respectiva.

Al sustituir las lecturas de absorbancia respectiva en la ecuación (16), se genera la tabla 28, donde se reporta el porcentaje de alantoina de las muestras, analizadas en los 2 días.

TABLA 28	
PORCENTAJE DE ALANTOINA EN SHAMPOO	
D I A	
1	2
111.62	119.21
100.82	109.80
88.58	100.95

De la tabla 28 se establece como variable de respuesta al porcentaje de alantoina en el producto y como factor bajo estudio, el día.

El análisis estadístico se describe en el anexo 3, en la tabla 29 se informa el análisis de la varianza.

TABLA 29				
TABLA DE ANADEVA				
EVALUACION DEL EFECTO DEL DIA EN LA DETERMINACION DE ALANTOINA EN SHAMPOO				
FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F_{cal}
δ_1	GLD = 1	SCD = 139.5872	MCD = 139.5872	1.29 ^{NS}
$\epsilon_{j(d)}$	GLE = 4	SCE = 432.5324	MCE = 108.1331	

NS = NO SIGNIFICATIVO

El análisis de la varianza indica que la fuente de variación día no afecta a la variable de respuesta.

El valor del coeficiente de variación total CV es:

$$CV = 10.17 \%$$

La variación de un análisis por triplicado, disminuye el coeficiente de variación a 5.87 ($CV / \sqrt{3}$), el cual es menor a 7.5%.

El coeficiente de variación total excede el 7.5%, pero el coeficiente de variación de un análisis por triplicado, no lo excede.

El método es reproducible entre días.

7 CONCLUSIONES:

De acuerdo con los resultados obtenidos en el desarrollo del método puede decirse que los modelos estadísticos utilizados permitieron encontrar las variables analíticas para definir la técnica final.

En cuanto a la validación del método puede decirse lo siguiente:

El sistema no es preciso debido a que el coeficiente de variación no cumple con el criterio de aceptación.

La linealidad del sistema cumple de manera parcial con los criterios de aceptación.

Cumple con la especificidad para un método de control de calidad en la determinación de alantoina para la formulación de interés.

El método es exacto a una cantidad adicionada de 100%.

Es lineal el método dado que cumple con los criterios de aceptación de la linealidad, siempre y cuando la muestra sea analizada como mínimo por duplicado.

En cuanto a la precisión del método este es reproducible entre días.

Se concluye que el método puede usarse con cierta confiabilidad para determinar alantoina en shampoo.

Por consiguiente se cumplieron los objetivos planteados.

8 SUGERENCIAS:

En la exactitud del método se sugiere que la muestra sea analizada por triplicado.

En la linealidad del método, el coeficiente de variación de la regresión lineal simple es mayor de 7.5%, por lo que se recomienda realizar el análisis por duplicado o triplicado de la muestra con lo que disminuye la variabilidad del método.

Para la precisión del método el coeficiente de variación total excede del 7.5% por lo que se sugiere realizar el análisis de la muestra por triplicado para que disminuya su valor.

9 SECCION DE ANEXOS

9.1 ANEXO 1

DETERMINACION DE LA LONGITUD DE ONDA.

Para determinar la longitud de onda a la que se leyeron las muestras en el Espectrofotómetro se realizó lo siguiente;

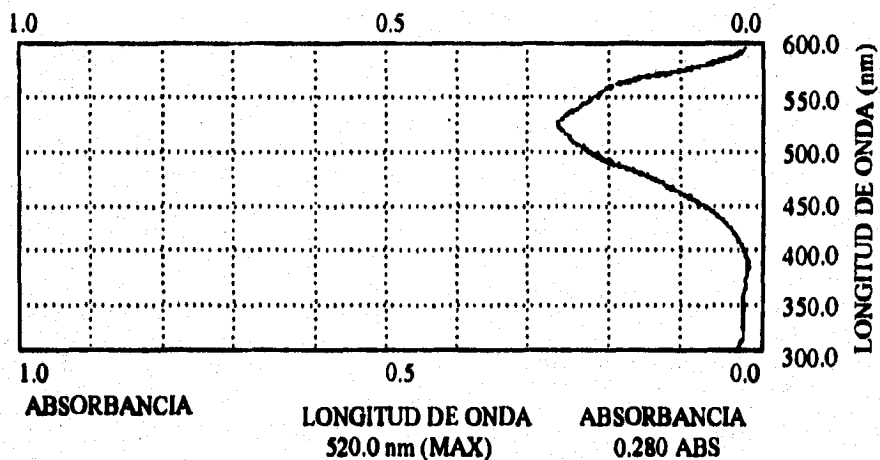
Se trataron algunos componentes del producto terminado, así como a la alantoina y se realizaron barridos en el Espectrofotómetro para determinar su posible interferencia en la obtención del máximo de la alantoina.

Por otro lado, se trató a la alantoina así como producto terminado con la técnica descrita en el apartado (6.1.1) y se realizaron barridos en el Espectrofotómetro.

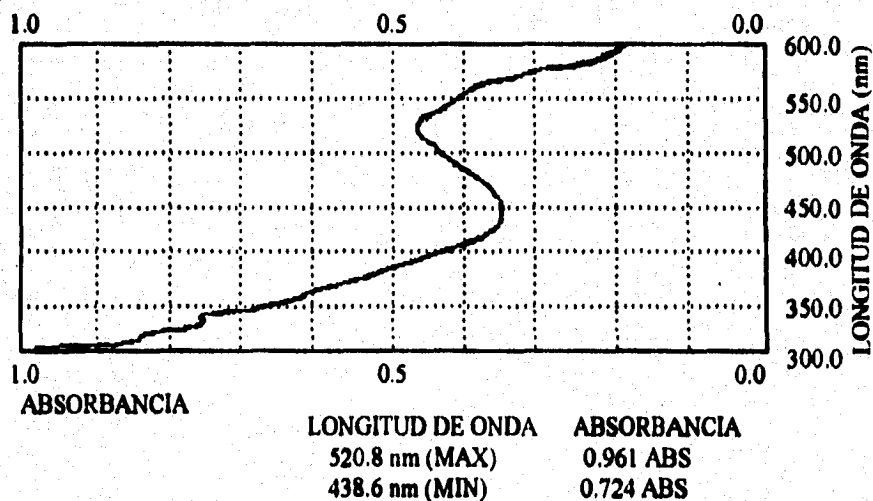
Con la obtención y comparación de los máximos de absorción tanto del producto terminado y alantoina pudo determinarse la longitud de onda a la que se realizarían las lecturas de las muestras tratadas, siendo esta de 520 nm.

Los espectros de absorción obtenidos para una muestra de alantoina y producto terminado se muestran a continuación.

**ESPECTRO DE ABSORCION DE UNA MUESTRA DE SOLUCION ESTANDAR
DE ALANTOINA (CONCENTRACION 8 mcg/ml)**



**ESPECTRO DE ABSORCION DE UNA MUESTRA DE PRODUCTO TERMINADO
DE ALANTOINA (CONCENTRACION 176 mcg/ml)**



9.2 ANEXO 2

2.1.0 Análisis estadístico por el Diseño de Plackett-Burman.

El análisis estadístico por volumen consiste en:

1) Calcular los totales de cada condición de análisis mediante las siguientes ecuaciones.

$$Y_1. = Y_{11} + Y_{12}$$

$$Y_2. = Y_{21} + Y_{22}$$

$$Y_3. = Y_{31} + Y_{32}$$

$$Y_4. = Y_{41} + Y_{42}$$

$$Y_5. = Y_{51} + Y_{52}$$

$$Y_6. = Y_{61} + Y_{62}$$

$$Y_7. = Y_{71} + Y_{72}$$

$$Y_8. = Y_{81} + Y_{82}$$

Al sustituir y reducir se obtiene su valor.

2) Calcular el valor de los coeficientes lineales con las siguientes ecuaciones.

$$\alpha_0 = \frac{Y_1. + Y_2. + \dots + Y_8.}{8 r}$$

$$\alpha_1 = \frac{(Y_1. + Y_2. + Y_3. + Y_5.) - (Y_4. + Y_6. + Y_7. + Y_8.)}{8 r}$$

$$\alpha_2 = \frac{(Y_2. + Y_3. + Y_4. + Y_6.) - (Y_1. + Y_5. + Y_7. + Y_8.)}{8 r}$$

$$aB = \frac{(Y_1. + Y_3. + Y_6. + Y_7.) - (Y_2. + Y_4. + Y_5. + Y_8.)}{8r}$$

Donde

r = número de replicaciones (en nuestro caso $r = 2$).

Al sustituir y reducir se obtiene el valor de los coeficientes lineales (ver tabla 5).

2.2.0 Análisis estadístico por el Diseño Factorial con 3 factores a 2 niveles.

El análisis estadístico por volumen consiste en:

1) Calcular los totales de cada condición de análisis con las siguientes ecuaciones.

$$Y_{111} = Y_{1111} + Y_{1112}$$

$$Y_{112} = Y_{1121} + Y_{1122}$$

$$Y_{121} = Y_{1211} + Y_{1212}$$

$$Y_{122} = Y_{1221} + Y_{1222}$$

$$Y_{211} = Y_{2111} + Y_{2112}$$

$$Y_{212} = Y_{2121} + Y_{2122}$$

$$Y_{221} = Y_{2211} + Y_{2212}$$

$$Y_{222} = Y_{2221} + Y_{2222}$$

Al sustituir y reducir se obtiene su valor.

2) Construir la tabla de Anadeva.

En la tabla A se muestra la tabla de análisis de la varianza (Tabla de Anadeva). Al sustituir y reducir se obtiene la tabla 10 y 11.

T A B L A A				
TABLA DE ANADEVA				
FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal
X	1	$SC_x = \frac{q_x^2}{8r}$	$MC_x = SC_x$	MC_x/MC_ϵ
Z	1	$SC_z = \frac{q_z^2}{8r}$	$MC_z = SC_z$	MC_z/MC_ϵ
W	1	$SC_w = \frac{q_w^2}{8r}$	$MC_w = SC_w$	MC_w/MC_ϵ
XZ	1	$SC_{xz} = \frac{q_{xz}^2}{8r}$	$MC_{xz} = SC_{xz}$	MC_{xz}/MC_ϵ
XW	1	$SC_{xw} = \frac{q_{xw}^2}{8r}$	$MC_{xw} = SC_{xw}$	MC_{xw}/MC_ϵ
ZW	1	$SC_{zw} = \frac{q_{zw}^2}{8r}$	$MC_{zw} = SC_{zw}$	MC_{zw}/MC_ϵ
XZW	1	$SC_{xzw} = \frac{q_{xzw}^2}{8r}$	$MC_{xzw} = SC_{xzw}$	MC_{xzw}/MC_ϵ
ϵ	$8(r-1)$	$SC_\epsilon = \frac{\sum \sum \sum y_{ijkl}^2 - \frac{\sum \sum \sum y_{ijk}^2}{r}}{r}$	$MC_\epsilon = SC_\epsilon/8(r-1)$	

Donde:

Los valores de los contrastes de X, Z, W, XZ, XW, ZW y XZW se calculan mediante la tabla B y las ecuaciones correspondientes.

TABLA B							
TOTAL	FACTORES						
	X	Z	W	XZ	XW	ZW	XZW
Y111.	-	-	-	+	+	+	-
Y112.	-	-	+	+	-	-	+
Y121.	-	+	-	-	+	-	+
Y122.	-	+	+	-	-	+	-
Y211.	+	-	-	-	-	+	+
Y212.	+	-	+	-	+	-	-
Y221.	+	+	-	+	-	-	-
Y222.	+	+	+	+	+	+	+

$$qx = (Y_{211} + Y_{212} + Y_{221} + Y_{222}) - (Y_{111} + Y_{112} + Y_{121} + Y_{122})$$

$$qz = (Y_{121} + Y_{122} + Y_{221} + Y_{222}) - (Y_{111} + Y_{112} + Y_{211} + Y_{212})$$

$$qw = (Y_{112} + Y_{122} + Y_{212} + Y_{222}) - (Y_{111} + Y_{121} + Y_{211} + Y_{221})$$

$$qxz = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{221} + Y_{222}) - (Y_{121} + Y_{122} + Y_{211} + Y_{212})$$

$$qxw = (Y_{111} + Y_{121} + Y_{212} + Y_{222}) - (Y_{112} + Y_{122} + Y_{211} + Y_{221})$$

$$qzw = (Y_{111} + Y_{122} + Y_{211} + Y_{222}) - (Y_{112} + Y_{121} + Y_{212} + Y_{221})$$

$$qxzw = (Y_{112} + Y_{121} + Y_{211} + Y_{222}) - (Y_{111} + Y_{122} + Y_{212} + Y_{221})$$

Al sustituir y reducir para cada volumen se obtiene su valor.

3) Estimar los efectos del modelo, mediante el calculo del valor de los coeficientes lineales con las siguientes ecuaciones:

$$\alpha_0 = \frac{Y_{111} + Y_{112} + Y_{121} + \dots + Y_{222}}{8r}$$

$$\alpha_1 = \frac{qX}{8r}$$

$$\alpha_2 = \frac{qZ}{8r}$$

$$\alpha_3 = \frac{qW}{8r}$$

$$\alpha_{12} = \frac{qXZ}{8r}$$

$$\alpha_{13} = \frac{qXW}{8r}$$

$$\alpha_{23} = \frac{qZW}{8r}$$

$$\alpha_{123} = \frac{qXZW}{8r}$$

Donde r = número de replicaciones (en nuestro caso r= 2).

Al sustituir y reducir para cada volumen se obtiene su valor, ver tabla 12.

2.3.0 Análisis estadístico por el Diseño Factorial con 2 factores a 2 niveles.

El análisis estadístico para el volumen de 2 ml consiste en.

1) Calcular los totales de cada condición de análisis mediante las siguientes ecuaciones.

$$Y_{11} = Y_{111} + Y_{112}$$

$$Y_{12} = Y_{121} + Y_{122}$$

$$Y_{21} = Y_{211} + Y_{212}$$

$$Y_{22} = Y_{221} + Y_{222}$$

Al sustituir y reducir se obtiene su valor.

2) Construir la tabla de Anadeva.

En la tabla C se describe la tabla de análisis de la varianza (Tabla de Anadeva). Al sustituir y reducir se genera la tabla 16.

T A B L A C TABLA DE ANADEVA				
FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal
X	1	$SCx = \frac{qx^2}{4r}$	MCx = SCx	MCx/MC _e
Z	1	$SCz = \frac{qz^2}{4r}$	MCz = SCz	MCz/MC _e
XZ	1	$SCxz = \frac{qxz^2}{4r}$	MCxz = SCxz	MCxz/MC _e
e	4(r-1)	$SCe = \sum \sum y_{ijk}^2 - \frac{(\sum y_{ij})^2}{r}$	MC _e = $\frac{SCe}{4(r-1)}$	

Donde:

Para calcular los contrastes de los factores X, Z y XZ se considera la Tabla D.

TABLA D			
TOTAL	X	Z	XZ
Y ₁₁ .	-	-	+
Y ₁₂ .	-	+	-
Y ₂₁ .	+	-	-
Y ₂₂ .	+	+	+

X, Z y XZ: FACTORES.

Los valores de los contrastes de los factores se obtiene mediante las siguientes ecuaciones:

$$q_x = (Y_{21} + Y_{22}) - (Y_{11} + Y_{12})$$

$$q_z = (Y_{12} + Y_{22}) - (Y_{11} + Y_{21})$$

$$q_{xz} = (Y_{11} + Y_{22}) - (Y_{12} + Y_{21})$$

3) Estimar los efectos del modelo, calculando el valor de los coeficientes lineales con las siguientes ecuaciones:

$$\alpha_0 = \frac{Y_{11} + Y_{12} + Y_{21} + Y_{22}}{4r}$$

$$\alpha_1 = \frac{q_x}{4r}$$

$$\alpha_2 = \frac{q_z}{4r}$$

$$\alpha_3 = \frac{q_{xz}}{4r}$$

Donde r = número de replicaciones (en nuestro caso r = 2)

Al sustituir y reducir se obtiene la tabla 17.

9.3 ANEXO 3

3.1.0 Análisis estadístico de la precisión del sistema.

El análisis estadístico consiste en:

- 1) Definir la variable de respuesta (y). Para este caso la variable de respuesta (y), es la absorbancia de las soluciones coloridas, las cuales se reportan en la tabla 18.
- 2) Calcular el coeficiente de variación (CV) de la variable de respuesta (y = absorbancia), empleando la ecuación (1).

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} 100 \quad \dots(1)$$

Donde:

s = desviación estándar de y .

\bar{y} = media aritmética de y .

Para obtener s y \bar{y} , se emplean las ecuaciones (2) y (3):

$$s = \sqrt{\frac{n^2 \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}} \quad \dots(2)$$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n} \quad \dots(3)$$

Al sustituir y reducir se obtiene su valor.

3.2.0 Análisis estadístico de la linealidad del sistema.

El análisis estadístico consiste en:

1) Ajustar la relación bivariada a un modelo de regresión lineal simple:

$$\hat{y} = m x + b \quad \dots(4)$$

Donde:

\hat{y} = variable de respuesta estimada por el modelo
 x = variable predictora
 m = coeficiente de regresión
 b = ordenada al origen.

La variable de respuesta (y), es la absorbancia y la variable predictoria (x) es la concentración expresada en $\%$. La concentración de 160 $\mu\text{g/ml}$, representa un 80%, la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ representa un 100% y la concentración de 240 $\mu\text{g/ml}$ representa un 120%.

Los estimados de m y b , utilizando el método de mínimos cuadrados, se calculan con las ecuaciones (5) y (6), utilizando la información de la tabla 19.

$$m = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2} \quad \dots(5)$$

$$b = \frac{\Sigma y - m (\Sigma x)}{n} \quad \dots(6)$$

Al sustituir y reducir en las ecuaciones (5) y (6) se obtiene su valor.

2) Estimación de la variación de la variable de respuesta ajustada al modelo y la medida de asociación entre las variables dado el modelo.

La desviación estándar de regresión ($S_{y.x}$), el coeficiente de variación (CV) y el coeficiente de determinación (r^2), se calculan con las ecuaciones (7), (8) y (9).

$$S_{y.x} = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - m (\Sigma xy) - b (\Sigma y)}{n - 2}} \quad \dots(7)$$

$$CV = \frac{S_{y.x}}{\bar{y}} \cdot 100 \quad \dots(8)$$

$$r^2 = \frac{(n (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y))^2}{(n (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2) (n (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2)} \quad \dots(9)$$

Al sustituir la información en las ecuaciones respectivas y al reducir se obtiene su valor.

3) Determinar si existe asociación altamente significativa entre las variables x y y (predictora y de respuesta), y se presenta falta de ajuste al modelo lineal, mediante el análisis de la varianza del modelo de regresión simple. En la tabla E se presenta la tabla de análisis de la varianza.

TABLA E				
TABLA DE ANADEVIA				
FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F_{cal}
REGRESION	$GLR=1$	$SCR = m (\sum xy) + b(\sum y) - \frac{(\sum y)^2}{n}$	$MCR = \frac{SCR}{GLR}$	$\frac{MCR}{MCEP}$
ERROR DE REGRESION	$GLEP=n-2$	$SCER = \sum y^2 - m (\sum xy) - b(\sum y)$	$MCEP = \frac{SCER}{GLEP}$	
FALTA DE AJUSTE	$GLFA=GLR-GLEP$	$SCFA = SCER - SCEP$	$MCFA = \frac{SCFA}{GLFA}$	$\frac{MCFA}{MCEP}$
ERROR PURO	$GLEP=C(r-1)$	$SCEP = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{r}$	$MCep = \frac{SCEP}{GLEP}$	

Donde:

n = Número de pares ordenados x y y (predictora y de respuesta).

$\sum y$ = Suma de la absorbancia en la curva estándar.

$\sum xy$ = Suma del producto cruzado de la concentración de alantoina adicionada (mg/ml) con la absorbancia.

$\sum y^2$ = Suma del cuadrado de la absorbancia en la curva estándar.

- r = Número de replicaciones por concentración de la alantoina adicionada.
 c = Número de concentraciones de la curva de calibración.
 $\sum y_i^2$ = Suma de los cuadrados de los totales de absorbancia de cada concentración.

Al efectuar los cálculos respectivos y al reducir, se genera la tabla 20.

3.3.0 Análisis estadístico de la exactitud de método.

Para determinar el % recuperado (%R) se emplea la ecuación (10).

$$\%R = \left[\frac{\frac{80}{A_{80}} + \frac{100}{A_{100}} + \frac{120}{A_{120}}}{3} \right] A_m \quad \dots(10)$$

Donde:

- A_m = Absorbancia de la muestra
 A_{80} = Absorbancia del patrón al 80%.
 A_{100} = Absorbancia del patrón al 100%.
 A_{120} = Absorbancia del patrón al 120%.

El análisis estadístico de la variable de respuesta (y), consiste en:

1) Estimación de la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) de la variable de respuesta (y) se determinan con las ecuaciones (3), (2) y (1) anteriormente descritas.

2) Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el verdadero valor de la variable de respuesta. El intervalo se describe en la ecuación (11).

$$\bar{y} - t_{0.975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{y} + t_{0.975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad ..(11)$$

Al sustituir y reducir se obtiene su valor.

3.4.0 Análisis estadístico de la linealidad del método.

El análisis estadístico consiste en:

1) Ajustar la relación bivariada al modelo de regresión lineal simple mediante la siguiente ecuación.

$$\hat{y} = m x + b$$

Donde:

\hat{y} = variable de respuesta estimada por el modelo.

x = variable predictora.

m = coeficiente de regresión (pendiente).

b = ordenada al origen.

Los estimados de m y b , utilizando el método de mínimos cuadrados se obtiene con las ecuaciones (5) y (6).

2) Estimación de la variación de la variable de respuesta ajustada al modelo, y la medida de asociación entre las variables dado el modelo, mediante la desviación estándar de regresión ($S_{y.x}$), coeficiente de variación (CV) y coeficiente de determinación (r^2) que se calculan con las ecuaciones (7), (8) y (9).

3) Determinar si existe asociación entre ambas variables (predictora y de respuesta) y el modelo lineal es el correcto, para describir la relación entre x y y . El análisis de la varianza en regresión lineal simple se describe en la tabla 26. Los cálculos se realizan de acuerdo con las fórmulas indicadas en la Tabla E.

4) Estimación por intervalo con una confianza del 85% para el valor del parámetro de la ordenada al origen.

El intervalo de confianza está dado por la ecuación (12).

$$b - t_{0.975, n-2} S_b < B < b + t_{0.975, n-2} S_b \quad \dots(12)$$

Donde:

$$S_b = S_{y.x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} \quad \dots(13)$$

Al sustituir la información respectiva en las ecuaciones (12) y (13); y al reducir se obtiene su valor.

5) Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el valor del parámetro del coeficiente de regresión (pendiente). El intervalo de confianza se calcula con la ecuación (14).

$$m - t_{0.975, n-2} S_m < M < m + t_{0.975, n-2} S_m \quad \dots(14)$$

Donde:

$$S_m = S_{y.x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} \quad \dots(15)$$

Al sustituir la información respectiva en las ecuaciones (14) y (15); y al reducir se obtiene su valor.

3.5.0 Análisis estadístico de la precisión del método.

Para calcular el % de alantoina (%R) presente en el producto, se utiliza la ecuación (16).

$$\%R = \left[\frac{\frac{85}{A_{85}} + \frac{100}{A_{100}} + \frac{115}{A_{115}}}{3} \right] A_m \quad \dots(16)$$

Donde:

- A_m = Absorbancia de la muestra
- A_{85} = Absorbancia del patrón al 85%.
- A_{100} = Absorbancia del patrón al 100%.
- A_{115} = Absorbancia del patrón al 115%.

El análisis estadístico consiste:

1) Definir al modelo que represente la relación entre la variable de respuesta y el factor bajo evaluación mediante la ecuación (17).

$$y_{ij} = \mu + \delta_i + \epsilon_{j(i)} \quad \dots(17)$$

Donde:

- y_{ij} = Variable de respuesta.
- μ = Media poblacional de la variable de respuesta.
- δ_i = Efecto del día (corrida o análisis) en la variable de respuesta. ($i=1..d$)
- $\epsilon_{j(i)}$ = Error de método. ($j=1..r$)

2) Establecer si la fuente de variación (día) afecta a la variable de respuesta, mediante el análisis de la varianza. La tabla del análisis se describe en la tabla F.

TABLA F
TABLA DE ANADIVA
EVALUACION DEL EFECTO DEL DIA EN LA DETERMINACION DE ALANTOINA
EN SHAMPOO

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F_{cal}
δ_i	$GLD=d-1$	$SCD = \frac{\sum y_{i.}^2}{r} - \frac{y_{..}^2}{dr}$	$MCD = \frac{SCD}{GLD}$	$F_D = \frac{MCD}{MCE}$
$\epsilon_{j(i)}$	$GLE=d(r-1)$	$SCE = \sum \sum y_{ij}^2 - \frac{\sum y_{i.}^2}{r}$	$MCE = \frac{SCE}{GLE}$	

Al realizar los cálculos correspondientes y al reducir se obtiene la tabla 29.

3) Calcular el coeficiente de variación total, que esta dado por la ecuación (18).

$$CV = \frac{\sqrt{\frac{(\sum \sum y_{ij}^2 - \frac{y_{..}^2}{dr})}{dr - 1}}}{\frac{y_{..}}{dr}} \cdot 100 \dots (18)$$

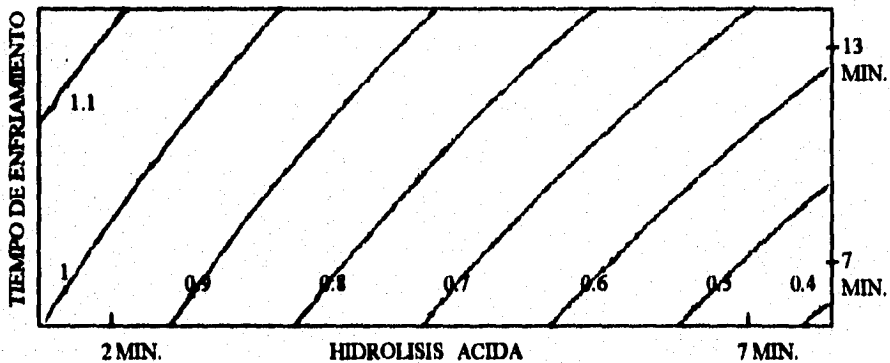
Al efectuar los cálculos, al sustituir y reducir se obtiene su valor.

**10 SECCION DE GRAFICAS
DE CONTORNO**

GRAFICA DE CONTORNO I DEL MODELO

VOLUMEN: 2 mililitros.

X = HIDROLISIS ALCALINA = 15 MIN.

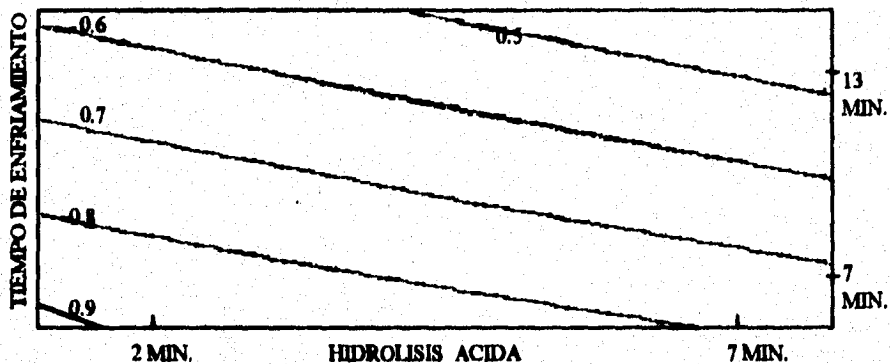


Y = ABSORBANCIA DE ALANTOINA
MIN. = MINUTOS

GRAFICA DE CONTORNO II DEL MODELO

VOLUMEN: 2 mililitros.

X = HIDROLISIS ALCALINA = 5 MIN.

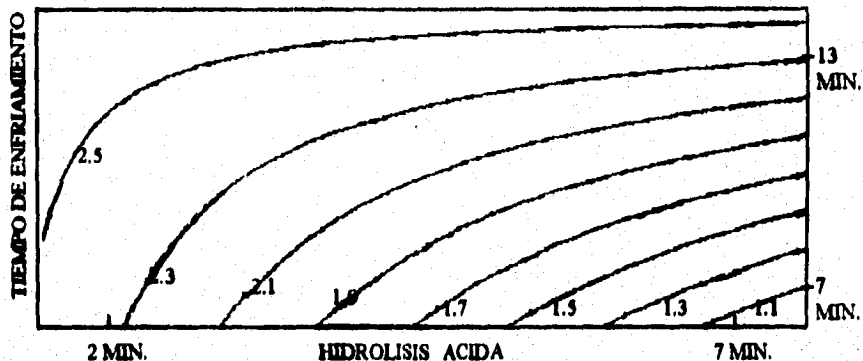


Y = ABSORBANCIA DE ALANTOINA
MIN. = MINUTOS

GRAFICA DE CONTORNO III DEL MODELO

VOLUMEN: 4 mililitros.

X = HIDROLISIS ALCALINA = 15 MIN.

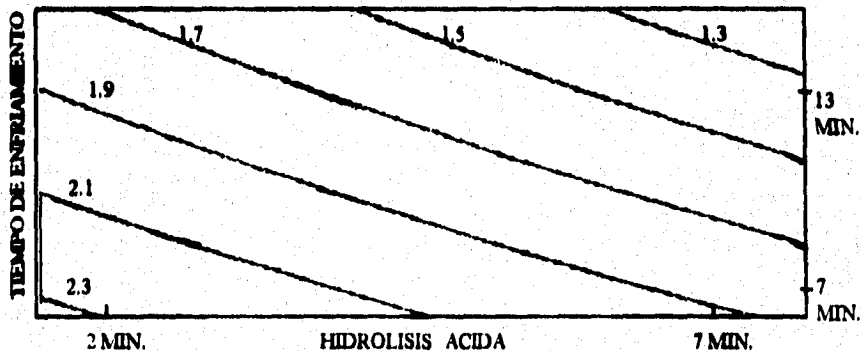


Y = ABSORBANCIA DE ALANTOINA
MIN. = MINUTOS

GRAFICA DE CONTORNO IV DEL MODELO

VOLUMEN: 4 mililitros.

X = HIDROLISIS ALCALINA = 5 MIN.

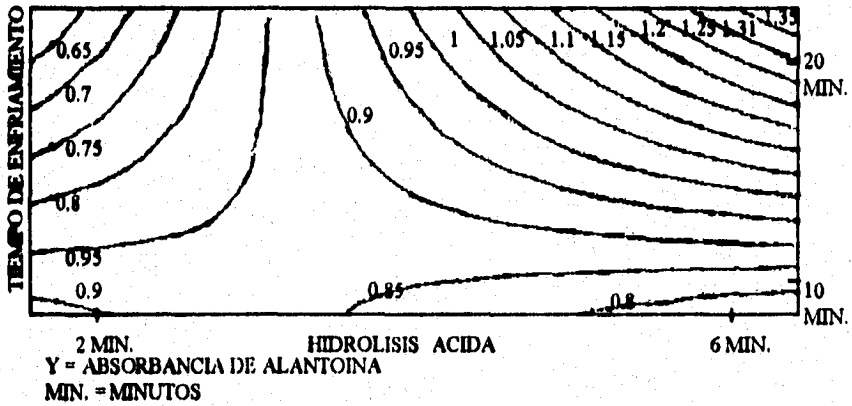


Y = ABSORBANCIA DE ALANTOINA
MIN. = MINUTOS

GRAFICA DE CONTORNO V DEL MODELO

VOLUMEN: 2 mililitros.

X = HIDROLISIS ALCALINA = 15 MIN.



11 BIBLIOGRAFIA

- 1. THE MERCK INDEX AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS, DRUGS, AND BIOLOGICALS, Published by Merck & Co Inc., Eleventh Edition, U.S.A. 1989 p 244.**
- 2. Hawley Gessner G. DICCIONARIO DE QUIMICA Y DE PRODUCTOS QUIMICOS, Ediciones Omega, Barcelona España 1975 p 28.**
- 3. MARTINDALE THE EXTRAPHARMACOPEIA, Twenty-Eighth Edition, Edited by James E. F. Reynolds, The Pharmaceutical Press, London 1982 p 490.**
- 4. Giral Francisco, PRODUCTOS QUIMICOS Y FARMACEUTICOS, Volumen III, México 1946 p 1821-1823.**
- 5. Clarke M. G. C. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS, Edited by The Pharmaceuticals Press, Great Britain London, 1969 p 178-179.**
- 6. ENCICLOPEDIA FARMACEUTICA DROGAS Y PRODUCTOS, Editorial Cientifico-Médica, Barcelona 1962, Tomo I p 77.**
- 7. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 5a. Edición, México 1988 p 503-505, 151.**
- 8. Hawk B. Philip and Bergelm Claf, PRACTICAL PHYSIOLOGICAL CHEMISTRY, eleventh edition, Edited by The Blakiston Company, U.S.A. 1944 p 619-621.**
- 9. Rosenstein Emilio, DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS PLM, Editorial PLM, 37a. Edición, México 1991, p 34, 58, 261, 940-941, 502-503.**

10. Snell Foster Dec and Snell Cornelia T. COLORIMETRIC METHODS OF ANALYSIS INCLUDING SOME TURBIDIMETRIC AND NEPHELOMETRIC METHODS, Volumen 11, U.S.A. Edited by D. Van Mostrand Company Inc., 1937 p 186-189.
11. More J., A reaction of allantoin applicable to do its determination. J. Pharm. Chim. 27: 209-14 (1923).
12. Langfeldt Einar and Holmsen Jorgen; Estimation of allantoin in presence of uric acid, creatinine and aminoacids, Biochem J. 19, 710-6, (1925).
13. Fosse R. Brunel A. Graeve De P. Thomas P. E. and Sarazin J., Utilization of the soja hispida see freed from uricase in the detection and determination of allantoin, Compt. Rend. 191, 1388-90 (1930).
14. Allen and Cercedo; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 28, 486 (1931).
15. Larson; J. Biol. Chem., 94, 727 (1932).
16. Borsook Henry; Micromethods for determination of ammonia, urea, total nitrogen, uric acid, creatinine, creatine, and allantoin. J. Biol. Chem. 110, 481-493 (1935).
17. Bosson Gh.; Microchemical and photometric determination of allantoin. Microchim Acta. 2, 73-9 (1937).
18. Fearon W. Robert; The carbamido diacetyl reaction a test for citrulline. Biochem J. 33, 902-907 (1939).

19. Young Gordon and Conway Catherine. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. J. Biol. Chem. 142, 839-853 (1941).
20. Kawerau Einhart. Biochemical analyses with the Spekter Absorptiometer I. Estimation of urea, citrulline, allantoin, and related carbamido compounds. Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. 24, 63-70 (1946).
21. Debeaumont Arsene and Desotd Jean. The optimal conditions for the reaction of Schryver, Fosse, Paget and Berger. Bull. Soc. Pharm. Lille No. 4, 42-9 (1947).
22. Nantes M. Albert; Allantoin and its identification. Rev. Asoc. Bioquim. Argentina.
23. Ridi El M.S., Magd Aboul A., and Masry El.; Modified photometric method for the determination of allantoin. Proc. Pharm. Soc. Egypt.Sci. Ed. 36, No. 6, 71-7 (1954).
24. Katz A. Sidney, Turse Richard and Mecca S. B.; Determination of allantoin and aluminum allantoinates in various cosmetic and pharmaceutical preparations. J. Soc. Cosmetic Chemists. 15, 303-10 (1964).
25. Siest Gerard and Panek Edwige; Color and fluorescent reactions of diketones with biological carbamide derivatives. Bull. Soc. Chim. Biol. 49, (12) 1879-83 (1967) Fr.
26. Bonadeo Iginio, Bottazi Giuseppe; Pharmacological biological activity of allantoin and its method of determination in the presence of glycerol. Essence-prefumi. Piante Offic. Aromi-

Saponi Cosmet. Aerosol (50)(2) 78-80 (1968) Ital.

27. Estrin Norman F. COMPENDIUM OF COSMETIC INGREDIENT COMPOSITION METHODS. Editorial Advisory Board, Whashington D.C. 1983 p D12-1.

28. Nita S. Voiculescu and A. Chirirta A.; Determination of allantoin in pharmaceuticals. Rev. Chim. (Bucharest), 39(8) 708-711 (1988).

29. Chemical Abstracts; 97-59-6 (1967-1971) p 66-75.

30. Connors K.A CURSO DE ANALISIS FARMACEUTICO (ENSAYO DEL MEDICAMENTO), Editorial Reverte, p 195-220, España 1980.

31. Cemeli J. La validación una filosofía y un sistema, volumen 4 No. 8, Ago 1985 p 220-226.

32. Castañeda Pedro y Giral Barnés, VALIDACION DE METODOS ANALITICOS, Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica, México p 1-3, 6-31.

33. Alvarado José de Jesús et al, VALIDACION DE PROCESOS FARMACEUTICOS, México 1982, Editorial Asociación farmacéutica mexicana, p 11-21.

34. U. S. PHARMACOPEIA NATIONAL FORMULARY NF XVII, (1990) p 1710-1712.

35. Montgomery C. Douglas, DISEÑO Y ANALISIS DE EXPERIMENTOS, Grupo Editorial Iberoamericana, México 1991, p 334-335.

36. Méndez Ignacio; Experimentos factoriales, Comunicaciones Técnicas, No. 28, 1-15 (1980).

37. Remington; FARMACIA, Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires 1987 p 1079-1080.

38. Balsam M. S. and Sagarin Edward, COSMETICS SCIENCE AND TECHNOLOGY, volumen 2, second edition, Editorial Board, U.S.A. 1972, p 73-83.

39. Pecsok L. Robert, METODOS MODERNOS DE ANALISIS QUIMICO, Editorial Limusa, México 1983, 3a. edición, p 151-152.

40. Ayres H. Gilbert, ANALISIS QUIMICO CUANTITATIVO, Ediciones Marla, Buenos Aires 1975, p 459-470.