



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

77
my

"CUATIFICACION DE ACETATO DE PARAMETASONA
POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON
TRANSFORMADAS DE FOURIER"

T E S I S

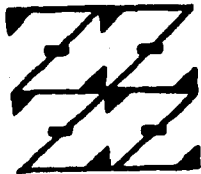
Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

ELSA MARGARITA MORALES RAMIREZ

DIRECTOR DE TESIS M. EN C. LOURDES CASTILLO GRANADA



LO FORMADO
ES
DE NUESTRA REFLEXION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**"CUANTIFICACION DE ACETATO DE PARAMETASONA
POR
ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON
TRANSFORMADAS
DE FOURIER".**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
ELSA MARGARITA MORALES RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. LOURDES CASTILLO GRANADA

MÉXICO, D.F.

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Espectroscopia L-328
y el laboratorio L-314 de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza,
Campo II. UNAM.**

AGRADECIMIENTOS

A mi Director:

M. en C. Lourdes Castillo Granada.

Muchas de las cosas que tiene usted en la actualidad son fruto del esfuerzo y del valor. Sabía que sus triunfos eran una satisfacción pero sobre todo, un gran servicio a los demás. Deseo expresarle que gracias a su apoyo, dedicación y profesionalismo, debo la realización de éste trabajo.

A los Profesores:

Biól. Marcela Arteaga Mejía.

M. en C. Miguel Castillo González.

Lic. Benjamín Garrido Escamilla.

Por la confianza y el apoyo brindado. Deseo que nunca muera el espíritu de ayuda y apoyo que hay en ustedes. Este apoyo es tan grande que abarca tanto lo profesional, como lo emocional así como el tener siempre tiempo cuando uno lo solicita. Se que Dios premiará al gran ser humano que hay en ustedes.

Al Jurado Asignado:

Por sus consejos y Asesorías para la realización de este trabajo.

Presidente: Q.F.B. Margarita Guzmán Arellano.

Vocal: M. en C. Lourdes Castillo Granada.

Secretario: Q. Martha Oliveros García.

Suplente: Biól. Maricela Arteaga Mejía.

Suplente: M. en C. Miguel Castillo González.

DEDICATORIAS

A Mis Padres:

Ma. Teresa Ramírez y Natalio Morales.

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer en esta vida de lucha y superación constante. Deseo expresarles, que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos e inspirados en ustedes que constituyen el legado más grande que pudiera recibir. Con amor, admiración y respeto. Elsa. M.

A mi Hermano:

Oscar.

Al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quien con su ayuda, apoyo y comprensión, me alentó a lograr esta hermosa realidad.

A Mis Tíos:

Maximiliano Hernández y Guadalupe Reyes.

En estas líneas quisiera expresarles mi agradecimiento por haberme apoyado en mi superación y doy gracias a Dios por haberme permitido terminar el mayor de mis anhelos. Mil gracias por todo.

A:

Alejandro:

Por la ayuda, apoyo, comprensión y compañía que me has brindado durante 5 años.

Por ser un joven que imito a un viejo en lo juicioso y prudente, que me conforto y aliento siempre que me dio un consejo.

Por que se intereso en mi bien, censuro mis errores y en mis dichas y dolores se alegre o sufrio también.

A mis Hermanos:

María de Jesús, María Isabel y Marco Antonio.

Por la ayuda, apoyo y comprensión que me brindaron. Gracias.

A mis Amigos con cariño en especial a: Guadalupe Soto, Claudia Olivares, Adriana Montero y Monica Ramirez.

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. FUNDAMENTO DEL TEMA	2
A. ACETATO DE PARAMETASONA	2
1. GENERALIDADES	2
2. NOMBRE CIENTÍFICO	3
3. FORMULA CONDENSADA Y DESARROLLADA	3
4. NOMBRE COMERCIAL	4
5. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	4
6. FARMACODINAMIA	4
7. FARMACOCINETICA	5
8. ACCIONES FARMACOLOGICAS	6
9. INDICACIONES TERAPÉUTICAS	8
10. TOXICIDAD	9
11. CUANTIFICACION	9
B. INFRARROJO	11
1. GENERALIDADES	11
2. DEFINICIONES	15
3. INSTRUMENTACIÓN	16
4. VENTAJAS DEL ESPECTROFOTOMETRO FTIR	22
5. MANEJO DE MUESTRAS	23
6. RELACIÓN DE BEER-LAMBERT Y SU APLICACIÓN	25
CUANTITATIVA	
7. MEDIDAS DE LA ABSORBANCIA EN INFRARROJO Y SU	26
APLICACIÓN CUANTITATIVA	
C. VALIDACIÓN	28
1. GENERALIDADES	28
2. PARÁMETROS ANALÍTICOS	30
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
IV OBJETIVOS	39
V HIPÓTESIS	40

VI MATERIAL	41
VII REACTIVOS	41
VIII METODOLOGÍA	42
IX RESULTADOS	44
X ANÁLISIS DE RESULTADOS	58
XI CONCLUSIONES	61
XII SUGERENCIAS	63
XIII ANEXO	64
XIV BIBLIOGRAFIA	78

RESUMEN.

La Espectroscopia en el Infrarrojo con Transformadas de Fourier, es una técnica que ha venido a renovar los métodos para identificar y cuantificar diferentes fármacos.

En el presente trabajo se desarrollo un método para la cuantificación de acetato de parametasona en tabletas por espectroscopia en el infrarrojo con Transformadas de Fourier.

El acetato de parametasona es un glucocorticoide sintético con propiedades antirreumáticas, antiinflamatorias y antialérgicas cuya presentación farmacéutica se encuentra en tabletas e inyectables.

La USP XXII (The United States Pharmacopeia) describe un método basado en la absorción de radiación ultravioleta el cual consiste en la extracción del fármaco y la formación de un compuesto obteniendo su absorbancia en la región UV, el cual no presenta gran confiabilidad debido a que no se encuentra validado.

El método desarrollado consistió en extraer el principio activo de la tableta con una mezcla de etanol:cloroformo (1:1), obteniendo la absorbancia a 1663 cm^{-1} . Este método se validó para asegurar su confiabilidad.

De acuerdo a los resultados obtenidos el método demostró ser lineal, exacto, preciso y específico. La estabilidad máxima de la muestra analítica es de 24 horas por lo que debe analizarse dentro de este período posterior a la extracción.

El método puede ser utilizado como método cuantitativo y cualitativo así como de control de la estabilidad del fármaco.

I. INTRODUCCIÓN.

En nuestros días, con el desarrollo de nuevos fármacos, el campo del análisis farmacéutico cuantitativo cada día adquiere más importancia, por lo que actualmente se cuenta con instrumentación y técnicas analíticas modernas más precisas y sensibles.

Entre estas técnicas se hace mención especial de la espectroscopia en el infrarrojo, la cuál con el desarrollo de instrumentos que emplean las Transformadas de Fourier para la obtención del espectro, nuevamente ha tomado importancia tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo de moléculas orgánicas, indudablemente, esta técnica analítica permanecerá como un instrumento útil, debido a sus varias y preponderantes ventajas en la solución de diversos problemas (Connors, 1981).

Para asegurar que una técnica proporcione resultados confiables, es necesario la validación del método desarrollado.

En el presente trabajo, se desarrolló un método analítico, para la cuantificación de acetato de parametasona, en tabletas por espectrofotometría en el infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR), el acetato de parametasona es un glucocorticoide sintético, con propiedades antirreumáticas, antiinflamatorias y antialérgicas.

El método desarrollado se validó resultando ser exacto, preciso, lineal y específico bajo las condiciones establecidas.

La espectroscopia infrarroja con Transformadas de Fourier es una técnica que presenta como ventajas: especificidad, sensibilidad y nos permite identificar productos de degradación del principio activo. Esto permite que puedan desarrollarse nuevos métodos de cuantificación de una gran variedad de fármacos.

II. FUNDAMENTO DEL TEMA.

A. ACETATO DE PARAMETASONA.

1. GENERALIDADES.

Se denominan corticosteroides (corticoides o esteroides corticales) a las hormonas de naturaleza esteroide sintetizadas en las tres zonas de la corteza suprarrenal: mineralcorticosteroides (aldosterona) a los producidos en la zona glomerulosa, glucocorticosteroides (cortisol, corticosterona) a los producidos en la zona fascicular y sexoesteroides (dehidroepiandrosterona, androstenediona y testosterona) a los producidos en la zona reticular (Bevan, 1982; Goodman, 1986; Goth, 1989; Velasco, 1993).

Los corticosteroides son esteroides que contienen 21 átomos de carbono, para su actividad biológica requieren dos grupos cetonas en C-3 y C-20, tres grupos hidroxilo en C-11, C-21 y C-17 (glucocorticoide) ó C-18 (mineralcorticoide) y un doble enlace en C3-C4. Las modificaciones introducidas en la molécula se han dirigido a obtener fármacos sin actividad mineralcorticoide y con mayor potencia antiinflamatoria como el acetato de parametasona (Goth, 1984; Velasco, 1993).

El acetato de parametasona es un glucocorticoide de naturaleza sintética el cual se obtiene por introducción de un doble enlace en C1-C2 con lo que se reduce la actividad mineralcorticoide y aumenta la actividad glucocorticoide. La introducción de flúor en posición C-6 aumenta la actividad gluco y mineralcorticoide, pero al introducir un sustituyente α -metilo en C-16, se suprime completamente la actividad mineralcorticoide, por lo que este fármaco posee únicamente actividad glucocorticoide.

La actividad antiinflamatoria aumenta también en la omisión del grupo hidroxilo en C-21 (Goth, 1984; Katzung, 1991; Velasco, 1993).

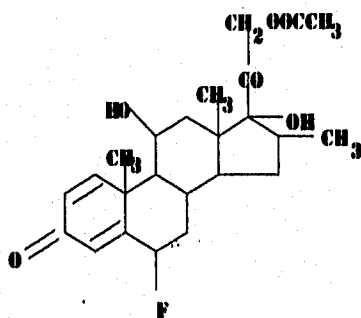
2. NOMBRE CIENTÍFICO.

Pregna-1,4-dien-3,20-diona-21-(acetiloxi)-6-fluor-11,17-dihidroxi-16-metil,(6 α ,11 β ,16 α).

6 α -fluor-11 β ,17-dihidroxi-16 α -metilpregna-1,4-dien-3,20-diona-21-acetiloxi.
(Merck, 1989; USP XXII, 1990).

3. FORMULA.

$C_{24}H_{31}FO_6$



4. NOMBRE COMERCIAL DE DIFERENTES FORMULACIONES FARMACÉUTICAS.

↗	Haldrona	↗	Monocortin
↗	Haldrate	↗	Stemex
↗	Metilar	↗	Dilar
↗	Acetato de parametasona	↗	Sintecort

(Merck, 1989; Simón, 1993; USP XXII, 1990)

5. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.

El acetato de parametasona son cristales de color blanco con un peso molecular de 434.5 y punto de fusión de 228-241 °C. Soluble en etanol, acetona y ligeramente soluble en agua y cloroformo (Merck, 1989; USP XXII, 1990).

6. FARMACODINAMIA.

El acetato de parametasona se une a receptores intracelulares específicos después de penetrar en los tejidos blancos. El complejo macromolecular así formado es transportado al núcleo donde actúa recíprocamente con los constituyentes cromosómicos alterando la expresión de los genes. Estas hormonas alteran la regulación de muchos procesos celulares, incluyendo la síntesis y actividad de las enzimas, la permeabilidad de la membrana, los procesos de transporte y la estructura celular (Katzung, 1991; Simón, 1993).

7. FARMACOCINETICA.

7.1 Absorción.

La absorción del acetato de parametasona se produce por vía oral e intramuscular y se pueden detectar niveles circulantes de 1 a 2 horas después de la administración oral (Velasco, 1993).

La velocidad de absorción por vía intramuscular depende de la solubilidad del preparado. Las sales poco hidrosolubles (acetatos) se absorben lentamente, mientras que las más hidrosolubles (fosfatos) se absorben rápidamente (Katzung, 1991; Velasco, 1993).

7.2 Distribución.

El acetato de parametasona circula en la sangre en forma libre, unido a proteínas plasmáticas, o de ambas formas. Tiene una vida media biológica de 36-72 horas y una vida media plasmática de 300 ó más minutos (Simón, 1993; Velasco, 1993).

7.3 Metabolismo y Eliminación.

El metabolismo del acetato de parametasona se produce fundamentalmente a nivel hepático y en menor grado en riñón y tejidos. Se transforma más lentamente que los corticoides naturales. Los procesos de transformación implicados son los siguientes:

- a. Reducción del doble enlace en C4-C5.
- b. Reducción del grupo cetona en C3 a hidroxilo y posterior esterificación con ácido glucorónico.
- c. Hidroxilación en C6, oxidación en C11 y en C17 y separación del fragmento C20-C21 (dando lugar a los 17 cetosteroides que carecen de actividad corticoidea pero que poseen débil actividad androgénica).
- d. Reducción del grupo cetona en C20.

La eliminación tiene lugar por vía renal detectándose en la orina proporciones variables de los productos metabólicos (Goodman, 1986; Goth, 1984; Velasco, 1993).

8. ACCIONES FARMACOLOGICAS.

La acción del acetato de parametasona ante situaciones de estrés forma parte de la respuesta fisiológica compensadora y tiene como finalidad evitar que los mecanismos de defensa orgánicos salgan fuera de control.

8.1 Acciones Antiinflamatorias.

Este fármaco tiene potentes efectos antiinflamatorios e inmunosupresores que constituyen la base de la mayoría de sus indicaciones terapéuticas, afecta a todos los tipos de inflamación (producida por estímulos físicos, químicos, infecciosos, etc.) y altera tanto las manifestaciones tempranas como las tardías; en la Tabla 1 se muestra una comparación de los efectos de diferentes esteroides (Bevan, 1982; Guyton, 1987; Simón, 1993; Velasco, 1993).

**TABLA 1.
COMPARACIÓN ENTRE LA POTENCIA
DE DIVERSOS ESTEROIDES.**

Esteroides	Potencia antiinflamatoria	Dosis diaria mg	Retención de sodio
Acetato de cortisona	0.8	50-100	0.8
Acetato de parametasona	6	4-6	0
Cortisol	1	50-100	1
Prednisona	2.5	10-20	0.8
Prednisolona	3	10-20	0.8
Metilprednisolona	4	10-20	0
Triamcinolona	5	5-20	0
Dexametasona	20	0.75-3	0
Betametasona	20	0.6-3	0
Deoxicorticosterona	0	1-3	10-25
Fludrocortisona	12	0.1	100
Aldosterona	0.2	0	250

(Goth, 1984).

8.2 Acciones Metabólicas.

8.2.1. Hidratos de Carbono y Proteínas

Tiende a producir una elevación de la glucosa sanguínea que asegure un nivel de hidratos de carbono suficiente para el mantenimiento de las funciones cerebrales, incluso en situaciones de estrés, es por tanto, hormona hiperglucemiante. Para producir esta elevación del nivel de glucosa, el acetato de parametasona utiliza los siguientes mecanismos:

- ↗ Aumento de la gluconeogénesis a partir de las proteínas.
- ↗ Aumento de la glucosa plasmática.
- ↗ Aumento del glucógeno hepático.
- ↗ Aumento de la excreción de nitrógeno en la orina.
- ↗ Disminución de la utilización de la glucosa en la periferia.

(Bevan, 1982; Goth, 1984; Guyton, 1987; Simón, 1993).

8.2.2 Lípidos

El acetato de parametasona favorece la movilización de las grasas, especialmente en las extremidades y su degradación a ácidos grasos libres, los que serán posteriormente utilizados como sustrato para la gluconeogénesis. Este efecto de los corticoides es consecuencia del mecanismo permisivo de la acción de otros agentes lipolíticos como las catecolaminas y la hormona de crecimiento (GH), (Bevan, 1982; Goth, 1984; Guyton, 1987; Simón, 1993).

8.3 Acciones Musculoesqueléticas.

Son consecuencia de las acciones metabólicas de este fármaco, produce:

- ↗ Debilidad muscular, se manifiesta especialmente en hombros, brazos y región glútea. Este efecto es consecuencia de las acciones catabólicas que tienden a movilizar proteínas y grasas para incrementar la gluconeogénesis (Goth, 1984; Velasco, 1993).
- ↗ Osteoporosis, parece estar relacionada con una acción directa de los corticosteroides, disminuyendo la actividad de los osteoblastos y la producción de osteocalcina e indirectamente incrementando la actividad de los osteoclastos (Bevan, 1982; Simón, 1993).

8.4 Acciones sobre el SNC.

Produce desde la elevación del estado de ánimo hasta cuadros claramente psicóticos, dependiendo del sujeto. Con frecuencia se observa euforia, insomnio o incremento de la actividad motora (Bevan, 1982; Goodman, 1986; Simón, 1993).

8.5 Acciones gastrointestinales.

En la mucosa gastroduodenal, los corticoesteroides aumentan la producción de ácido clorhídrico y pepsina. Puesto que las prostaglandinas (PGS) inhiben la secreción de ácido y protegen frente a la úlcera, es posible que la inhibición de la síntesis de PGS pueda contribuir a una mayor vulnerabilidad de la mucosa gastroduodenal. Cuando se utiliza terapéuticamente pueden agravar el curso clínico de la úlcera gastroduodenal (Katzung, 1991; Simón, 1993; Velasco, 1993).

9. INDICACIONES TERAPÉUTICAS.

El acetato de parametasona es un glucocorticoide sintético, con propiedades antiinflamatorias, antiinfecciosas y antialérgicas. Las indicaciones del tratamiento con parametasona son muy numerosas e incluye el **Tratamiento de Enfermedades no Endocrinas** que se basa en la acción antiinflamatoria e inmunosupresora de los glucocorticoides. Siendo las más significativas:

- ↗ Reumáticas: Artritis reumatoide.
- ↗ Alérgicas.
- ↗ Respiratorias: Asma bronquial.
- ↗ Oculares.
- ↗ Renales.
- ↗ Cardíacas.
- ↗ Gastrointestinales.
- ↗ Cutáneas.
- ↗ Cerebral

(Goodman, 1986; Goth, 1984; Simón, 1993; Velasco 1993).

10. TOXICIDAD.

Si bien es cierto que la parametasona se ha asociado con una baja incidencia de efectos secundarios a la dosis recomendada, también lo es el hecho que los pacientes que reciben dosis diarias de 100 mg o mayores durante más de dos semanas, experimentan una serie de cambios que han sido denominados síndrome de Cushing iatrogénico. La velocidad de aparición es función de la dosis administrada. El aspecto de la cara es alterado por la redondez engrosamiento y exceso de grasa. La grasa tiende a ser redistribuida desde las extremidades al tronco y a la cara. Hay proliferación aumentada de pelo fino sobre los muslos, tronco y a veces sobre la cara. El acné puede aumentar o aparecer y se observa insomnio y aumento de apetito. En el tratamiento de padecimientos peligrosos o incapacitantes, estos cambios pueden no requerir el cese de la terapéutica. Sin embargo, los cambios metabólicos de fondo que los acompañan pueden ser muy graves en el momento en que se vuelven obvios. La hidrólisis continua de proteína y la desviación de los aminoácidos hacia la producción de glucosa aumenta la necesidad de insulina y por un tiempo da por resultado aumento de peso, acumulación de grasa, emaciación muscular, adelgazamiento de la piel con estrías y magulladuras, hiperglucemia y finalmente la aparición de osteoporosis, diabetes y necrosis séptica de la cadera. En general, los enfermos tratados con glucocorticoides deben estar con dietas elevadas en proteínas y potasio, se debe administrar esteroides anabólicos cuando se requieran. Otras complicaciones graves incluyen la formación de úlceras pépticas (Bevan, 1982; Goodman, 1986; Goth, 1984; Katzung, 1991).

11. CUANTIFICACIÓN.

En la literatura se describe un método de cuantificación para el acetato de parametasona utilizando espectrofotometría visible la cual consiste, de acuerdo a la USP XXII, en extraer el principio activo de la forma farmacéutica con cloroformo y realizar diluciones para obtener una concentración de 20 mg/ml, a la cual se le adiciona azul de tetrazolium,

hidróxido de tetrametilamonio, ácido acético glacial y se mide su absorbancia a 525 nm. El cálculo de la concentración se hace por comparación de un estándar de concentración conocida trabajado de la misma manera (USP XXII, 1990).

La USP XXII menciona un método de ensayo en el cual utiliza espectroscopia en el infrarrojo pudiendo ser utilizado como técnica de cuantificación, pero para tal finalidad debe ser validada; consiste en realizar una hidrólisis, neutralizar y posteriormente extraer con cloroformo para leer su absorbancia a 6.04 μm (USP XXII, 1990).

B. INFRARROJO.

1. GENERALIDADES.

Los principios del espectro infrarrojo fueron desarrollados principalmente en 1940, y los instrumentos registradores sencillos de uso diario fueron adquiridos por muchos laboratorios en 1950. Con la llegada de los instrumentos que emplean las Transformadas de Fourier esta técnica ha adquirido nuevamente mucha importancia en sus aplicaciones cualitativas y cuantitativas, (Cano, 1985; Fleming, 1970; Perkin Eimer, 1995; Price, 1973; Whetsel, 1968).

Todos los átomos y moléculas son capaces de absorber energía. La energía se puede proporcionar en forma de radiación electromagnética. El tipo y cantidad de radiación absorbida por una molécula guarda relación con la estructura y con el número de moléculas que interaccionan con la radiación. El estudio de estas dependencias se conoce como espectroscopia de absorción (Connors, 1981; Pecsok, 1977).

Un haz de energía luminosa está formado por radiaciones de diferente longitud de onda y frecuencia, el conjunto constituye el espectro electromagnético el cual se ilustra en la Tabla 2 (Koenig, 1994; Skoog, 1985).

De acuerdo con la longitud de onda de las radiaciones se tienen diferentes regiones entre las que se encuentra el infrarrojo, el cual se subdivide en:

↻ Infrarrojo cercano ($14286-4000 \text{ cm}^{-1}$) en esta región se observan picos debidos a vibraciones de estiramiento entre el hidrógeno y otros átomos, así como bandas de sobretono y bandas de combinación.

↻ Infrarrojo medio o fundamental. Se observan vibraciones fundamentales, entre $4000-200 \text{ cm}^{-1}$, se emplea en la determinación de grupos funcionales orgánicos, es la región que tiene más aplicación en el análisis cualitativo y cuantitativo.

↳ Infrarrojo lejano. La longitud de onda de esta región del espectro se encuentra entre $200-20 \text{ cm}^{-1}$, en ella se observan vibraciones y rotaciones de baja frecuencia (Conley, 1979; Hannah, 1969).

TABLA 2
REGIONES DEL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO

Regiones	Intervalos de longitud de onda
Rayos γ	$10^{-10} - 10^{-14} \text{ m}$
Rayos X	$10^{-9} - 6 \times 10^{-12} \text{ m}$
Ultravioleta	$3.8 \times 10^{-7} - 10^{-9} \text{ m}$
Visible	$7.8 \times 10^{-7} - 3.8 \times 10^{-7} \text{ m}$
Infrarrojo	$10^{-3} - 7.8 \times 10^{-7} \text{ m}$
Infrarrojo lejano	$10^{-3} - 3 \times 10^{-5} \text{ m}$
Infrarrojo medio	$10^{-5} - 3 \times 10^{-6} \text{ m}$
Infrarrojo cercano	$10^{-6} - 7.8 \times 10^{-7} \text{ m}$
Microondas	$0.3 - 10^{-3} \text{ m}$

(Harper, 1976).

En la Tabla 3 se muestran algunos enlaces que causan absorción en la región del infrarrojo medio (Castillo, 1992).

TABLA 3
ANÁLISIS ESPECTRAL

REGIÓN ESPECTRAL		ENLACE QUE CAUSA ABSORCIÓN
Longitud de onda μm	Número de onda cm^{-1}	
2.7 - 3.3	3750 - 3000	O-H, N-H, alargamiento.
3.0 - 3.4	3300 - 2900	C=C-H, >C=C<H, Ar-H, (C-H alargamiento).
3.3 - 3.7	3000 - 2700	$\begin{array}{c} \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$ (C-H alargamiento)
4.2 - 4.9	2400 - 2100	C≡C, C≡N, alargamiento
5.3 - 6.1	1900 - 1650	C=O (ácidos, aldehidos, cetonas, amidas, ésteres, anhídridos), alargamiento
5.9 - 6.2	1675 - 1500	>C=C< (alifático y aromático), >C=N- alargamiento.
6.8 - 7.7	1475 - 1300	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{flexión.} \end{array}$
10. - 15.4	1000 - 650	>C=C<, Ar-H, flexión fuera del plano

La espectroscopia en el IR a través del análisis del espectro correspondiente, permite distinguir a un grupo funcional de otro y proporciona las características estructurales más importantes de un compuesto, la variación de la intensidad de alguna banda en particular respecto a la concentración permite su aplicación en el análisis cuantitativo.

La absorción en el IR origina cambios vibracionales moleculares a valores de energía específicos que originan bandas de absorción (Castillo, 1992; Perkin Elmer, 1995; Putzig, 1994).

Para que se verifique la absorción infrarroja debe cumplirse dos condiciones: a). La energía de la radiación debe coincidir con la diferencia de energía vibracional entre el estado excitado y el basal, la molécula absorberá entonces la energía radiante aumentando su vibración molecular. b). Debe ir acompañada de un cambio en el momento dipolo (Putzig, 1994; Willard, 1981).

Las vibraciones fundamentales pueden ser longitudinales (stretching) y de deformación (bending), las primeras no alteran el eje ni los ángulos de enlace a diferencia de las vibraciones de deformación que requieren más energía (Perkin Elmer, 1995; Putzig, 1994; Willard, 1978).

Las vibraciones longitudinales o stretching pueden ser:

☒ Vibración simétrica (A). Es aquella para la que el vector de desplazamiento con respecto a cualquier otro átomo, cuando se refleja en el centro de simetría, coincidirá con el vector del correspondiente átomo que sea su imagen especular. Las vibraciones que son simétricas al centro de simetría y que no producen un cambio en el momento dipolo son inactivas en el Infrarrojo (Putzig, 1994; Skoog, 1985; Willard, 1981).

☒ Vibración asimétrica (B). Se presenta un cambio en el momento dipolo durante estas vibraciones, el centro donde se concentra la carga positiva y negativa se mueve de tal manera que el centro eléctrico del grupo se desplaza alejándose del átomo positivo (Putzig, 1994; Skoog, 1985; Willard, 1981).

Las vibraciones de deformación o bending se caracterizan porque el ángulo entre dos enlaces varía en forma continua, se emplea el símbolo δ si la vibración se presenta en el mismo plano de la molécula y γ si se encuentra fuera del plano, se clasifican como:

☒ Oscilación o flexión especial (C).

☒ Balanceo o flexión plana (D).

☒ Torsión (E).

☒ Deformación o tijereteo (F). Ver fig. 1.

(Perkin Elmer, 1995; Putzig, 1994; Skoog, 1987; Willard, 1981).

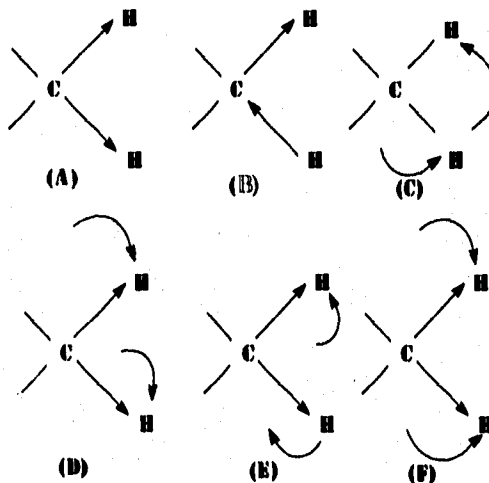


Fig. 1 Vibraciones Longitudinales y de Deformación de los enlaces.

2. DEFINICIONES.

2.1 Frecuencia ν : es el número de ondas que pasan por un punto dado en la unidad de tiempo (Willard, 1981; Putzig, 1994).

2.2 Número de onda $\bar{\nu}$: es el inverso de la longitud de onda (cuando la longitud de onda se expresa en centímetros). Su dimensión es el recíproco de la longitud, y su unidad cm^{-1} , esta es la unidad más empleada en el IR (Putzig, 1994).

2.3 Absorción de la radiación: Cuando una radiación electromagnética pasa a través de un compuesto químico, éste puede absorber una parte de esta. Cada frecuencia de dicha radiación tiene una energía característica, cuando las moléculas absorben radiación pasan de un estado basal (E_1) a un estado excitado (E_2), (ver fig. 2)

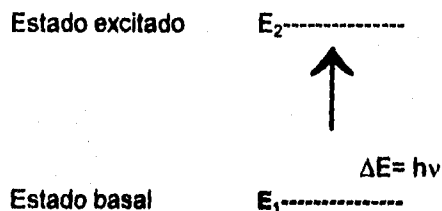


Fig. 2 Absorción de la radiación electromagnética.

Como parte de la radiación se absorbe a una frecuencia determinada, su intensidad disminuye y esta propiedad se aprovecha para la identificación o cuantificación de compuestos (Connors, 1981; Watty, 1982).

3. INSTRUMENTACIÓN.

Los instrumentos empleados para el análisis por infrarrojo son de dos tipos: los dispersivos que actualmente están discontinuados y los que emplean Transformadas de Fourier. Estas dos clases de instrumentos proporcionan el espectro en el IR, la interpretación final es la misma a pesar de que los instrumentos modernos ofrecen más ventajas (Conley, 1979; Willard, 1981).

3.1 Infrarrojo Dispersivo.

Esta intrumentación se basa en la dispersión de la radiación infrarroja proveniente de una fuente por medio de una rejilla de difracción.

La luz policromática de una fuente infrarroja, se divide en dos haces iguales, el de referencia y el de muestra, que pasan a través de un espejo sectorial o Chooper cuya función es permitir el paso de manera intermitente; estas dos señales pasan al monocromador a través de una rendija, el monocromador tiene como elemento dispersante una rejilla de difracción, la luz monocromada pasa a través de la rendija de salida del monocromador al

detector y posteriormente ésta señal se amplifica y registra, dando como resultado un espectro, fig. 3 (Cano, 1985; Willard, 1981).

Los componentes básicos que caracterizan a los instrumentos dispersivo son:

- ☒ Fuente de radiación infrarroja
 - ☒ Región para la muestra
 - ☒ Monocromador (Con rejilla de difracción)
 - ☒ Detector
 - ☒ Sistema de registro
- (Cano, 1985; Conley, 1979; Skoog, 1985; Willard, 1981).

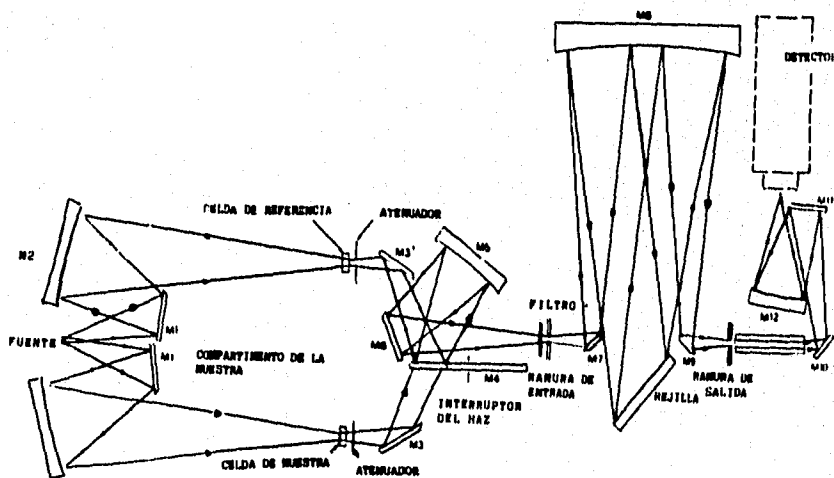


Fig. 3 Diagrama óptico de un espectrofotómetro infrarrojo dispersivo

3.1.1 Fuente de Radiación.

Dos tipos de materiales se emplean de ordinario para suministrar la energía radiante necesaria para el trabajo en la región infrarroja. Estos materiales son sustancias refractarias que se calientan al rojo o un arrollamiento de hilo de Nicrom que se calienta por resistencia hasta la incandescencia (Castillo, 1992; Conley, 1979; Connors, 1981; Willard, 1981).

Las fuentes de radiación más empleadas son:

Filamento de Nernst: es un tubo de óxidos de circonio e itrio formando un cilindro de un diámetro de 1 a 2 mm y una longitud de 20 mm, en los extremos del cilindro hay alambres de platino para el paso de corriente, se calienta eléctricamente a unos 1750 °C. Se requiere además un sistema de enfriamiento para evitar que el calentamiento sea máximo. El filamento de Nernst produce una radiación más intensa, pero, debido a su mayor temperatura de trabajo, es menos duradero (Castillo, 1992; Conley, 1979; Connors, 1981; Pecsok, 1977).

Globar: es una barra de carburo de silicio calentada eléctricamente, generalmente de 5 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro, que opera a temperaturas entre 750 a 1200 °C, a causa de su susceptibilidad a la oxidación, no puede trabajar a temperaturas más altas sin una manifiesta reducción de su vida y tiene la ventaja de un coeficiente positivo de resistencia. Se requiere enfriamiento por agua de los contactos eléctricos. (Castillo, 1992; Conley, 1979; Connors, 1981).

Fuente de Nicromo: es de intensidad menor, pero de mayor duración y menos requerimientos instrumentales. Es una espiral muy apretada de un alambre de níquel/cromo calentado por el paso de una corriente (Castillo, 1992).

3.1.2 Monocromador.

Un monocromador sirve para eliminar o rechazar la radiación de longitud de onda no deseada (Katzung, 1991).

Es un sistema dispersivo donde la radiación policromática emitida por la fuente es convertida en haces monocromáticos a través de una o más rejillas de difracción (Conley, 1979).

3.1.3 Sistema de Detección.

La cantidad de energía que se detecta es muy baja, por lo que los detectores deben ser muy sensibles. Los más utilizados, convierten la radiación incidente en una señal eléctrica proporcional, que se traduce como una señal alterna que es amplificada y medida (Watty, 1982).

Se tienen tres tipos de detectores:

Detectores de Fotones: Consisten de una película delgada de material semiconductor tal como el sulfuro de plomo, telurio de plomo, antimonio de indio o gotas de un vidrio no conductor. La absorción de fotones de suficiente energía, originan una disminución en la resistencia del material. Estos detectores se emplean en el IR lejano (Putzig, 1994; Skoog, 1985; Willard, 1981).

Detectores Térmicos. Pueden ser de varios tipos:

1.- Bolómetro o Termómetros de Resistencia; cambian su resistencia dependiendo de la temperatura. Es una resistencia sensible a la temperatura, con un alambre de platino o un termistor. Cuando el sensor absorbe la radiación infrarroja incidente, el circuito se desequilibra y esta señal es medida y amplificada (Pecsok, 1977; Watty, 1982).

2.- Termopar, desarrollan un voltaje en función de la temperatura. Es el detector del infrarrojo más ampliamente utilizado, generalmente consiste en un trozo de metal noble ennegrecido (p. ej. oro) que actúa como un verdadero absorbente de la radiación, la hoja se solda a dos metales de potencial termoeléctrico muy diferente por lo cual se mide una diferencia de voltaje (Perkin Elmer, 1995; Willard, 1981).

3.- Célula neumática de Golay o Termómetros de gas, se basa en el incremento de la presión con la temperatura de un gas inerte encerrado en un tubo (Conley, 1979; Willard, 1981; Perkin Elmer, 1995).

3.2 Infrarrojo con Transformadas de Fourier.

Llamado así porque en lugar de dispersar la luz, utiliza un interferómetro del que se obtiene una señal llamada Interferograma que es convertida en un espectrograma por medio de una computadora utilizando las ecuaciones de Transformadas de Fourier (Willard, 1981; Skoog, 1985).

El espectrofotómetro de Transformadas de Fourier tiene una fuente luminosa que emite radiación infrarroja policromática, la cual llega a un divisor de haz hecho normalmente de KBr o CsI colocado en una posición de 45 grados y con un pequeño recubrimiento de Germanio en la parte posterior. La función de éste es dividir el haz procedente de la fuente en dos partes iguales: la primera de ellas se refleja hacia un espejo fijo, colocado en la parte superior y cuya función es la de volver a reflejar el haz hacia el divisor de éste. El segundo haz no se refleja, pasa por el divisor hacia un espejo que tiene un movimiento lineal el cual servirá para introducir una variable llamada "Diferencia de paso óptico". Los dos haces se recombinan de nuevo en el divisor de haz interfiriéndose constructiva y destructivamente, dependiendo de la diferencia de paso óptico entre el divisor de haz y los espejos. La radiación recombinada pasa a través de la muestra hacia el detector

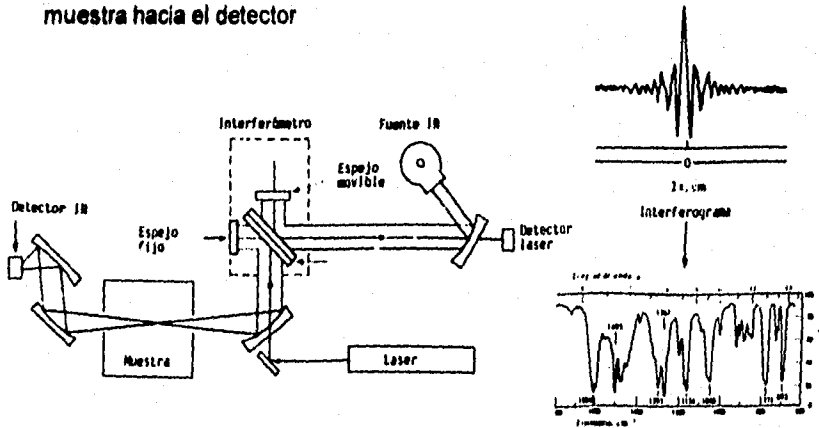


Fig. 4 Diagrama óptico de un espectrofotómetro en el infrarrojo con transformadas de Fourier

En el trayecto del haz infrarrojo corre paralelamente un rayo laser de Helio-Neón que proporciona la exactitud en la frecuencia. La señal que se obtiene al final de éste proceso es un interferograma, que por las ecuaciones de Transformadas de Fourier se convierte en un espectrograma, (ver fig. 4) (Cano, 1985; Perkin Elmer, 1995).

Los componentes básicos de los instrumentos por Transformadas de Fourier en el IR son:

- ☒ Fuente de radiación
- ☒ Interferómetro de Michelson
- ☒ Detectores
- ☒ Sistema de procesamiento de datos (Castillo, 1992; Cano, 1985).

3.2.1 Interferómetro de Michelson.

Es un sistema utilizado para dividir un haz de radiación en dos y luego volver a combinar los haces, introduciendo una diferencia en su trayectoria. Este haz combinado pasa a través de la muestra y va hacia el detector. La división del haz se logra con un separador que transmite aproximadamente el 50% y refleja el resto, obteniendo un patrón de Interferencia (Cano, 1985; Perkin Elmer, 1995).

3.2.2 Detectores Piroeléctricos.

Están formados por cristales como: sulfato de triglicina(TGS), sulfato de triglicina deuterada(DTGS), tantalato de litio, mercurio-cadmio-telurio que tienen una respuesta más rápida que el termopar. Estos detectores poseen una polarización eléctrica interna a lo largo de un eje, originando un alineamiento del momento dipolo, la alteración térmica del espacio de la red causada por la absorción de radiación infrarroja origina un cambio en la polarización eléctrica que se detecta en los electrodos conectados de cristal. Los detectores de este tipo tienen una velocidad de respuesta muy rápida y se emplean en los instrumentos con Transformadas de Fourier (Castillo, 1992; Conley, 1979; Connors, 1981; Willard, 1981).

3.2.3. Sistema de procesamiento de datos.

Consiste de una computadora capaz de realizar las operaciones matemáticas de las ecuaciones de Transformadas de Fourier, para su procesamiento y lograr un interferograma es necesario digitalizar y almacenar la potencia radiante a intervalos iguales de retardo. Es decir, se necesita descomponer un interferograma en elementos de resolución, medir la potencia de cada uno de ellos, digitalizarlos y almacenarlos en la memoria de una computadora. La teoría de la información hace posible calcular el número mínimo de elementos de resolución X que permitirán reconstruir un espectro a partir de un interferograma, sin pérdida de detalles (Cano, 1985; Perkin Elmer, 1995).

4. VENTAJAS DEL ESPECTROFOTOMETRO FTIR RESPECTO AL DISPERSIVO.

Espectrofotómetro FTIR.

⊗ Ventajas Múltiples (ventajas de Fellgett).

Se mide en forma simultánea todas las frecuencias.

Mayor rapidez (mayor número de barridos).

⊗ Ventaja de Jaquinot.

El 95% de la energía de las lámparas se aprovecha (no hay rendijas).

Misma relación señal-ruido.

⊗ Ventaja de Connes.

Usa una referencia de rayo laser Helio-Neón.

Ofrece una calibración de 0.01 cm^{-1} .

⊗ Ventajas de Resolución.

Resolución constante en todas las longitudes de onda.

No hay discontinuidad en el espectro.

⊗ Velocidad.

La electrónica que utiliza tiene una respuesta de segundos.
Debido a la rapidez se puede acoplar a un cromatógrafo de gases.

⊗ Ventajas de Operación.

Capacidad de memoria para guardar de tres a miles de espectros según se amplíe la memoria del instrumento.

Puede hacer uno o más barridos de fondo (Background).

Puede hacer la diferencia de espectros que es de gran ayuda para el análisis cualitativo y cuantitativo.

(Cano, 1985; Perkin Elmer, 1995; Skoog, 1985; Willard, 1981).

Espectrofotómetro Dispersivo.

⊗ Se miden sucesivamente las frecuencias.

⊗ Un solo barrido.

⊗ Solo el 10% de la energía de la lámpara se aprovecha.

⊗ Una rejilla de difracción con menor poder de resolución.

⊗ La resolución varía por las rejillas.

⊗ Hay discontinuidad por la rejilla y los filtros.

(Cano, 1985; Perkin Elmer, 1995; Skoog, 1985; Willard, 1981).

5. MANEJO DE MUESTRAS.

La muestra para un examen infrarrojo puede ser en forma de gas, solución, líquido puro o sólido suspendido en una matriz apropiada.

5.1 Muestras de gases.

Pueden obtenerse espectros de un líquido de bajo punto de ebullición o gas, permitiendo la expansión de la muestra en una celda evacuada. Existe una variedad de celdas para este objeto con longitudes de trayectoria que varían de unos pocos centímetros a varios metros. Las mayores longitudes de trayectoria se obtienen en celdas compactas proporcionando superficies reflectoras internas, de modo que el haz pasa numerosas veces por la muestra antes de salir de la celda (Castillo, 1992; Conley, 1979; Skoog, 1982; Willard, 1981).

5.2 Soluciones.

El empleo de soluciones diluidas para estudios de Infrarrojo ofrece muchas ventajas como: la facilidad de preparación de la muestra, uniformidad de dispersión del soluto, posibilidad de fijar la concentración y reproducibilidad en los datos (Watty, 1982).

Los disolventes más utilizados en los estudios de espectros en solución son: cloroformo, tetracloruro de carbono y disulfuro de carbono. En la selección se debe considerar los intervalos del espectro donde las absorciones de estos son significativamente fuertes (Castillo, 1992; Conley, 1981; Skoog, 1982; Willard, 1981).

5.3 Líquidos Puros.

Cuando la cantidad de muestra es pequeña o cuando no se dispone del disolvente apropiado, es práctica común obtener espectros del líquido puro. Comúnmente, una gota de líquido puro es comprimida entre dos ventanas de cloruro de sodio (Castillo, 1992; Conley, 1979; Skoog, 1982; Willard, 1981).

5.4 Sólidos.

Los sólidos que no pueden disolverse adecuadamente pueden ser suspendidos en un medio transparente formando una mezcla de dos fases.

Se emplean dos métodos; en la primera, de 2 a 5 mg de la muestra finamente triturada se mezclan con una o dos gotas de un aceite pesado (Nujol). Si interfieren las bandas de hidrocarburo, puede usarse Fluoroluble, un polímero halogenado. La mezcla de dos fases resultante se examina como una delgada película entre dos ventanas de NaCl.

En el segundo método 1 mg de la muestra finamente triturada con 100 mg de bromuro de potasio se comprime para obtener una pastilla de KBr (Castillo, 1992; Conley, 1979; Skoog, 1985; Willard, 1981).

6. RELACIÓN DE LAMBERT-BEER Y SU APLICACIÓN CUANTITATIVA.

El análisis cuantitativo infrarrojo se fundamenta en la ley de Lambert-Beer que se basa en la intensidad relativa de radiación que llega al detector o el porcentaje de transmisión de la radiación incidente al pasar por la muestra (Cruz, 1986; Hannah, 1969; Perkin Elmer, 1995; Skoog, 1985; Willard, 1981).

La ley de Beer expresa la relación directa entre la cantidad de energía absorbida y la concentración del compuesto a cuantificar: la absorbancia es directamente proporcional a la trayectoria de la radiación a través de la solución y a la concentración de la especie que produce la absorción. Dependiendo de las unidades de medida, esta ley puede ser escrita en una variedad de formas: (Hannah, 1969; Skoog, 1985)

$$A = \epsilon c l / P.M. = abc = \log I_0 / I = -\log T = \log I / T = \log 100 / \%T = I / I_0$$

donde:

A= absorbancia.

c= concentración en gramos por litro.

l=b= grosor de la celda en cm.

a= ϵ /P.M.= absortividad molar, es una constante de proporcionalidad y es característica del compuesto para esa absorción particular.

e= absorción molar o coeficiente de extinción molar.

Esta es una característica de la muestra en una frecuencia particular y casi es la misma para un grupo de compuestos, si la banda de absorción es característica de ese grupo.

I_0 = intensidad de la radiación incidente.

I= intensidad de radiación transmitida.

T= transmitancia.

El procedimiento para la cuantificación de un componente, es la medida de la absorbancia a diferentes concentraciones del compuesto puro (Perkin Elmer, 1995; Skoog, 1985; Willard, 1981).

7. MEDIDAS DE LA ABSORBANCIA EN INFRARROJO Y SU APLICACIÓN CUANTITATIVA.

El método de la **línea base** consiste en dibujar una línea para representar la línea base de la banda de absorción. Como se observa en la figura 5, la línea base representativa puede dibujarse de varias formas, dependiendo de la forma de la señal seleccionada. El método de la línea base tiene las siguientes ventajas: a) La absorción de la celda y otras absorciones no relacionadas con la banda en estudio se hacen mínimas. b) La recopilación de datos experimentales es rápida, puesto que se necesita un número relativamente pequeño de determinaciones espectrales. c) Los cálculos numéricos son sencillos y rápidos.

En la elección de la línea base debe considerarse lo siguiente:

1. Si no existen sustancias perturbadoras, se dibuja la línea 1.
2. Si está presente una sustancia perturbadora, puede dibujarse la línea base a partir de un solo punto (líneas 2 y 3), que depende de la posición de la interferencia ya sea del lado de mayor o menor longitud de onda de la banda que se estudia.
3. Si la banda perturbadora está cerca de la banda analítica, pero su efecto es esencialmente constante sobre el intervalo de análisis, sería aplicable la línea 4.
4. Cuando la transmitancia del disolvente es constante o al menos cambia linealmente entre los hombros de la banda analítica, se puede aplicar la línea 5 o la 6. La desviación proviene de efectos instrumentales o químicos

En todos los casos se escoge la línea base dibujada teniendo en cuenta la reproducibilidad relativa de esta entre los espectros que se comparan (Castillo, 1992; Conley, 1979; Cruz, 1986; Perkin Elmer, 1995; Skoog, 1982; Willard, 1981).

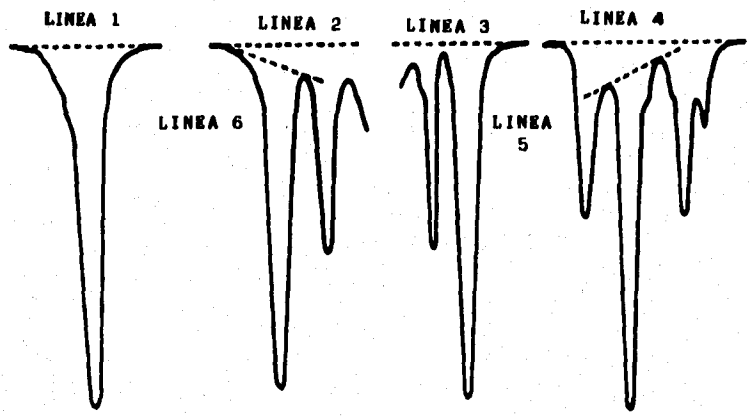


Fig. 5 Formas de dibujar la línea base en una banda de absorción

C. VALIDACIÓN.

1. GENERALIDADES.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada (Catala, 1990; Fontani, 1987; Lual, 1993).

La validación de los métodos analíticos es una petición y exigencia cada vez más generalizada por parte de las Autoridades Sanitarias como parte de los procedimientos de control necesario para su aprobación.

Algunas causas importantes por las que es necesario realizar nuevas metodologías analíticas y su respectiva validación son:

- ✍ Falta de especificidad de métodos oficiales en relación al producto propio.
- ✍ Los métodos alternos permiten mayor eficiencia.
- ✍ La avanzada tecnología ofrece mejores y efectivos controles del producto (Catala, 1990).

Se consideran sujetos de Validación:

- ✍ Los métodos analíticos para formas farmacéuticas.
- ✍ Los métodos analíticos para principios activos.
- ✍ Los métodos de control de la eficiencia del sistema (Fontani, 1987).

La capacidad se expresa en este caso en términos de los siguientes parámetros analíticos: precisión, linealidad, exactitud y especificidad, proporcionando una medida del comportamiento del sistema y del método.

Los parámetros que proporcionan la información para decidir si un método es o no funcional son estudiados estadísticamente, un método que es válido para una situación, puede no serlo en otra (Fontani, 1987).

Dependiendo de la categoría del método a validar se evalúan diferentes parámetros estadísticos, como los que se muestran a continuación.

TABLA 4
PARÁMETROS MÍNIMOS PARA VALIDAR MÉTODOS
ANALÍTICOS

Parámetro	I	II	III	IV	
				A	B
Linealidad y precisión	x	x	x	x	x
Exactitud	x	x	x	x	x
Límite de detección		x			
Límite de cuantificación		x	x		
Reproducibilidad	x	x	x	x	x
Especificidad (interferencia)	x	x	x	x	x
Especificidad (en estabilidad)			x		

(Fontani, 1984; Guerra, 1986).

donde:

- I= Métodos analíticos para pruebas de control de calidad.
- II= Métodos analíticos en pruebas de biodisponibilidad como por ejemplo disolución, fármacos de liberación controlada, etc.
- III= Métodos analíticos indicativos de estabilidad.
- IV= Revalidación del método:
- A= Sin cambio en condiciones de operación.
- B= Con cambio en condiciones de operación.

Las etapas importantes previas a la validación que deben ser tomadas en consideración son:

✎ Etapa de diseño.

Comprende una revisión bibliográfica exhaustiva, con la finalidad de conocer las propiedades físicas, químicas, estabilidad e interacciones del producto, así como referencias para la cuantificación del mismo por el método analítico adecuado (Larry, 1991).

✎ Etapa de desarrollo.

Esta deberá cubrir las siguientes condiciones:

- a. Condiciones analíticas preliminares. Optimización y tipo de detección.
- b. Eficiencia de la extracción, digestión y desarrollo de la reacción.
- c. Selección de la sustancia patrón de referencia (Larry, 1991; CNQFB, 1988).

2. PARÁMETROS ANALÍTICOS.

2.1 Especificidad.

Verifica la capacidad del método para determinar que los excipientes no interfieran con la medida de la potencia del principio activo.

El método analítico es específico cuando la medida usada para la determinación de un compuesto no esté influenciada por la presencia de otros materiales (CNQFB, 1988; Fontani, 1987; Guerra, 1986).

Según la Federal Food Drug (FDA), es necesario disponer de datos que demuestren que:

- a. El placebo no interfiere de forma significativa con el método.
- b. Para los productos sujetos a degradación, no interfieran en la determinación del principio activo.

Criterio:

Muestra	Respuesta
Placebo (todos los excipientes de la forma farmacéutica sin principio activo.	No da respuesta (menor del 2%)
Estándar.	Da respuesta (100%)
Placebo cargado (excipiente + una cantidad del principio activo igual al estándar.	Da respuesta igual al estándar (100%)

2.2 Linealidad.

2.2.1 *Linealidad del sistema*; es la capacidad para asegurar que los resultados analíticos son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado. Los niveles de concentración son tres dependiendo de la cantidad elegida teniendo como central un 100% (CNQFB, 1988; Fontani, 1987; Lual, 1993; Hokanson, 1994).

Criterio de aceptación para la linealidad del sistema:

$$r \geq 0.99$$

$$b=0$$

$$CV \leq 1.5$$

$$r^2 \geq 0.98$$

2.2.2 *Linealidad del método*; es la variación de fármaco recuperado en el análisis en función de la cantidad real de la muestra. Algunas desviaciones de la linealidad del método indican que no está siendo trabajado adecuadamente para las muestras con respecto a las concentraciones del fármaco. En tales casos el estudio puede modificarse y revalidarse (Fontani, 1987, Lual, 1993).

Criterio de aceptación para la linealidad de método:

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada:

B=0

m=1

CV ≤ 3 %

r ≥ 0.99

r² ≥ 0.98

R=97-103%

$t_m < t_{tablas} (n-1, 0.95)$

$t_b < t_{tablas} (n-1, 0.95)$

En el intervalo de confianza para la media, debe localizarse el 100% (CNQFB, 1988).

2.3 Precisión.

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una mezcla homogénea del producto (CNQFB, 1988).

Debe distinguirse claramente entre precisión del método y precisión del sistema, entendiendo la primera como aquella que considera solamente la contribución del error atribuible al sistema operativo en si y no al error debido a la manipulación de la muestra. Las mediciones de la precisión deben calificarse en términos de sus dos fuentes de variación que son repetibilidad y reproducibilidad (Fontani, 1986; Lual, 1993).

2.3.1 Repetibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, instrumentos, laboratorio, tiempo, etc.) (Fontani, 1986; Lual, 1993).

Criterio de aceptación:

%R= 97-103%

CV ≤ 3%

Estadígrafo de contraste:

$t_{calculada} < t_{tablas} (gl, n-2, 0.95)$

2.3.2 Reproducibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (analista, día, instrumento, laboratorio, etc.) (Fontani, 1986; Lual, 1993). La evaluación da base a un modelo anidado, de efectos aleatorios de dos factores (A:analista, D:día) de la forma:

$$X_{ijk} = X + A_i + D_j + E_k \quad (ij)$$

Donde cada variable representa una de las posibles fuentes de variación involucradas en la técnica. Se cuantifica además el error E_k (ij) implícito en cada determinación.

El análisis de varianza (anadeva) mide los efectos de los factores. Para el presente caso; analista-día y la interacción entre los resultados obtenidos.

Criterio de aceptación:

$$CV \leq 3\%$$

Estadígrafo de contraste "F" (Fischer)

Área de aceptación: F calculada $\leq F$ tablas.

El análisis de varianza debe indicar que no hay diferencia significativa entre día y analista en los resultados estadísticos (Alcantara, 1989; Guerra, 1986).

2.4 Exactitud.

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y el valor de referencia. La exactitud al 100% se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de cuando menos seis placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración 100%, aplicando el método bajo las mismas condiciones de operación (Hokanson, 1994; Lual, 1993).

La estimación de la exactitud de un método está asociado con el error total que es la suma del error indeterminado y el error determinado.

El error determinado se debe a una falta de control de calidad de la técnica analítica, es controlable e independiente de la concentración del fármaco. El error indeterminado permanece aún cuando se ha hecho todos los esfuerzos para eliminar el error determinado, son originados por efectos acumulativos de fluctuaciones aleatorias en el proceso de medida, puede medirse con una validación adecuada (Fontani, 1987).

El coeficiente de variación y el porcentaje de recobro depende del tipo de método, forma farmacéutica y concentración del activo presente en la muestra, como se observa en las siguientes tablas.

TABLA 5
PORCENTAJE DE RECOBRO DE LAS DIFERENTES FORMAS FARMACÉUTICAS

Forma Farmacéutica	% De Recobro
Tabletas	98-128
Suspensiones	97-103
Soluciones	98-103
Semisólidos	97-103

TABLA 6
VALORES DE CV PARA EVALUAR LA PRECISIÓN DEL MÉTODO

Método	CV
Cromatográficos	$\leq 2\%$
Químicos Espectrofotométricos Tritrimétricos	$\leq 3\%$
Microbiológicos	$\leq 5\%$

El coeficiente de variación total (CV), debe cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado (Alcantara, 1989; Fontani, 1987; Guerra, 1986).

Criterio de aceptación de la exactitud del método.

Promedio de recobro: 97 - 103%

$CV \leq 3\%$

$t_{calculada} < t_{tablas}(gl, n-2, 0.95)$

2.5 Límite de detección.

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas (CNQFB, 1988).

Esta definición incorpora consideraciones tanto del tamaño de la señal como del ruido de la línea base, de ésta manera, obtener una indicación de la más baja concentración del elemento que puede ser detectada. Se define el límite de detección como la concentración que haga el cociente señal-ruido igual a 3.

Sea S_t el valor total medido para la muestra, S_b el valor del blanco y s la desviación estándar medida. Puede ser demostrado que distribuciones normales $S_t - S_b > 0$ tienen un alto nivel de confiabilidad cerca al 99% cuando la diferencia $S_t - S_b > 3s$. El valor recomendable del límite de detección es $3s$ y el valor para S_b debe aproximarse a cero (Keith, 1983; Long, 1980; McDougall, 1980; Taylor, 1981).

2.6 Límite de cuantificación.

Es la menor concentración de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo condiciones de operación establecidas.

La certeza en la cuantificación del analito se incrementa en tanto que la señal del analito rebasa la del límite de detección.

El valor recomendable para el límite de cuantificación es de $10s$, con una incertidumbre del 30% en el valor medido ($10s \pm 3s$) con una certeza del 99%.

El límite de cuantificación es importante para definir el límite más bajo de rango útil para el método seleccionado. Este valor proporciona el límite de la linealidad, es decir, en donde la concentración del analito deja de ser proporcional a la respuesta medida.

Debe enfatizarse que el límite de cuantificación y de detección no son constantes intrínsecas en la metodología. Aquellos valores publicados pueden ser considerados sólo como típicos o comunes, cada laboratorio debe evaluar su propia precisión y estimar sus valores propios (Keith, 1983; McDougall, 1980; Taylor, 1981).

2.7 Estabilidad de la muestra analítica.

Este parámetro determina el período de tiempo en el cual se debe analizar una muestra, así como las condiciones específicas de almacenamiento que le permitan conservar su integridad física y química. Se efectúa mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras, con los obtenidos a partir de las mismas después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones. (CNQFB, 1986; Inman, 1986).

Las muestras analizadas se almacenan bajo distintas condiciones de temperatura y luz, durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades físicoquímicas de la sustancia. Después se vuelven a analizar bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

El criterio de aceptación para la muestra es, estable si el intervalo de confianza (IC) para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda de $\pm 3\%$. Además, el coeficiente de variación para cada condición/tiempo/muestra (Factor / promedio) debe estar entre 97-103%.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El acetato de parametasona constituye un fármaco ampliamente utilizado en terapéutica. Tiene importantes efectos inhibidores en la mayoría de las enfermedades inflamatorias que se presentan en el ser humano.

A pesar de sus indudables y potentes efectos antiinflamatorios, su empleo clínico se ha visto limitado durante años debido a su toxicidad potencial.

En la literatura se describe un método para la cuantificación de acetato de parametasona por espectroscopia visible, pero es una técnica larga y poco práctica. A partir de esta limitante se hace necesario el desarrollar uno que sea versátil y ofrezca una mayor confiabilidad.

Este trabajo pretende adecuar a las condiciones de laboratorio, el método analítico por espectroscopia en el infrarrojo con Transformadas de Fourier para la cuantificación de este fármaco, ya que al mostrar un espectro con varias bandas de absorción, se puede seleccionar la que cumpla con la ley de Lambert-Beer.

En el desarrollo del método y posterior al establecimiento de las condiciones experimentales óptimas, se requiere conocer que la capacidad de este satisfaga los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas; esta capacidad se expresa en términos de parámetros analíticos como: linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límite de detección y de cuantificación.

IV. OBJETIVOS.

A. OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar y validar un método de análisis para la cuantificación de acetato de parametasona en la forma farmacéutica de tabletas por medio de un método espectrofotométrico en la región infrarroja con Transformadas de Fourier.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ✍ Desarrollar un método analítico para la cuantificación de acetato de parametasona por espectroscopia en el infrarrojo con Transformadas de Fourier.
- ✍ Establecer las condiciones óptimas para la cuantificación de acetato de parametasona en tabletas como: manipulación adecuada de la muestra, elección de la concentración de la muestra en solución, elección del disolvente y de la longitud de onda.
- ✍ Validar el método analítico obtenido en base a los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límite de detección y de cuantificación.

V. HIPÓTESIS.

Si para absorber radiación infrarroja, una molécula debe experimentar un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento vibratorio, entonces, al introducir una solución de acetato de parametasona en el infrarrojo se podrá observar un espectro de absorción de la molécula el cual será específico para ésta. La intensidad de la banda de absorción estará relacionada con la concentración de la sustancia, pudiendo medirse la absorción por el método de la línea base y aplicarlo al análisis cuantitativo de la molécula

VI. MATERIAL.

Anillo
Agitador
Embudo de filtración
Espátula
Matraz aforado Pyrex de 10, 25 y 50 ml.
Matraz erlenmeyer Pyrex de 125 ml.
Perilla
Pipeta pasteur
Pipeta volumétrica Pyrex de 1,2,3,4 y 5 ml
Piseta
Vaso de precipitado Pyrex de 50 y 100 ml

INSTRUMENTOS

Espectrofotómetro Perkin Elmer 1600 Series FTIR
Balanza Analítica Ainsworth. Model 100A

VII. REACTIVOS.

Acetato de parametasona Syntex
Bromuro de potasio Merck
Cloroformo Merck R.A.
Etanol Merck R.A.
Sulfato de sodio anhidro Merck

VIII. MÉTODO.

1. MÉTODO GENERAL.

Se extrajo acetato de parametasona de su forma farmacéutica (tabletas) con una mezcla de disolventes etanol:cloroformo 1:1, realizando diluciones que presentaron un espectro de absorción entre 10 y 90% de transmitancia en el infrarrojo, utilizando una celda desmontable para líquidos.

2. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES.

2.1. Se utilizó una celda desmontable para líquidos.

2.2. Se eligió la banda de absorción mejor definida, reproducible y que cumpla con la ley de Beer-Lambert, corresponde a 1663 cm^{-1} .

2.3. Se preparó una curva de calibración de acetato de parametasona con una concentración de 1, 2, 3, 4 y 5 mg/ml.

2.4. En la extracción del fármaco se trituraron 8 tabletas de acetato de parametasona (6 mg por tableta) se disolvieron con 25 ml de la mezcla de disolventes, se filtro en papel filtro No 22. La operación se repitió 3 veces. La solución filtrada se aforó a 100 ml con la mezcla de disolventes (etanol:cloroformo).

DETERMINACIONES ANALÍTICAS

A). Límite de detección y cuantificación

Se prepararon dos soluciones por duplicado de 0.576 mg/ml, leyendo su absorbancia 20 veces.

B). Linealidad del sistema

Se construyó una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando 5 diluciones, y haciendo análisis por duplicado. Las concentraciones a analizar fueron 1, 2, 3, 4 y 5 mg/ml. La concentración seleccionada como 100% fue de 3 mg/ml.

C). Precisión del sistema

Se determinó en un análisis por sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% (3 mg/ml)

D). Especificidad

Se realizó la respuesta de los excipientes, así como la identificación de la respuesta del principio activo sólo y en la tableta.

E). Linealidad del método

Se determinó con placebos adicionados del principio activo, cada uno de manera independiente, de tres diferentes concentraciones (de las anteriormente elegidas en el punto 3) incluyendo el 100%, haciendo los análisis por triplicado de cada concentración, realizadas por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

F). Exactitud

Se analizaron de manera independiente, en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista, 6 placebos adicionados con el 100% de principio activo.

G). Repetibilidad

Para cuantificar este parámetro se utilizaron los datos obtenidos en la exactitud del método

H). Reproducibilidad

Se llevó a cabo con muestras por triplicado, por dos analistas y en dos días diferentes. Se trabajó de manera independiente, con una muestra homogénea del producto a una concentración del 100% (3 mg/ml).

I). Estabilidad de la muestra analítica

Se determinó mediante la comparación de los resultados obtenidos de los análisis iniciales de 3 muestras, con los resultados de las mismas muestras después de permanecer 24 y 48 horas en condiciones diferentes de temperatura (TA y refrigeración, ± 5 °C) y en diferentes envases de vidrio (ámbar y transparente). Se realizaron bajo las mismas condiciones de operación, usando una solución de referencia recién preparada para cada tiempo de acuerdo a lo establecido en el método analítico.

IX. RESULTADOS.

I. ESPECTRO EN EL INFRARROJO DEL ESTÁNDAR DE ACETATO DE PARAMETASONA (Sadtler).

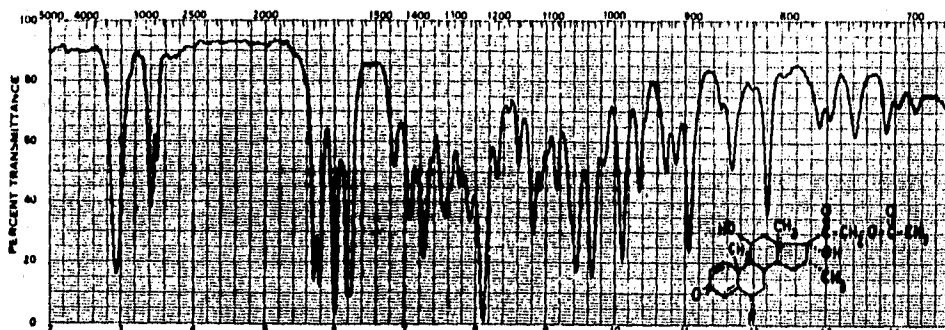


Fig. 6 Espectro en el infrarrojo del estándar de acetato de parametasona

II. ESPECTRO DE TRANSMITANCIA DEL ESTÁNDAR PRIMARIO DE ACETATO DE PARAMETASONA EN FTIR.

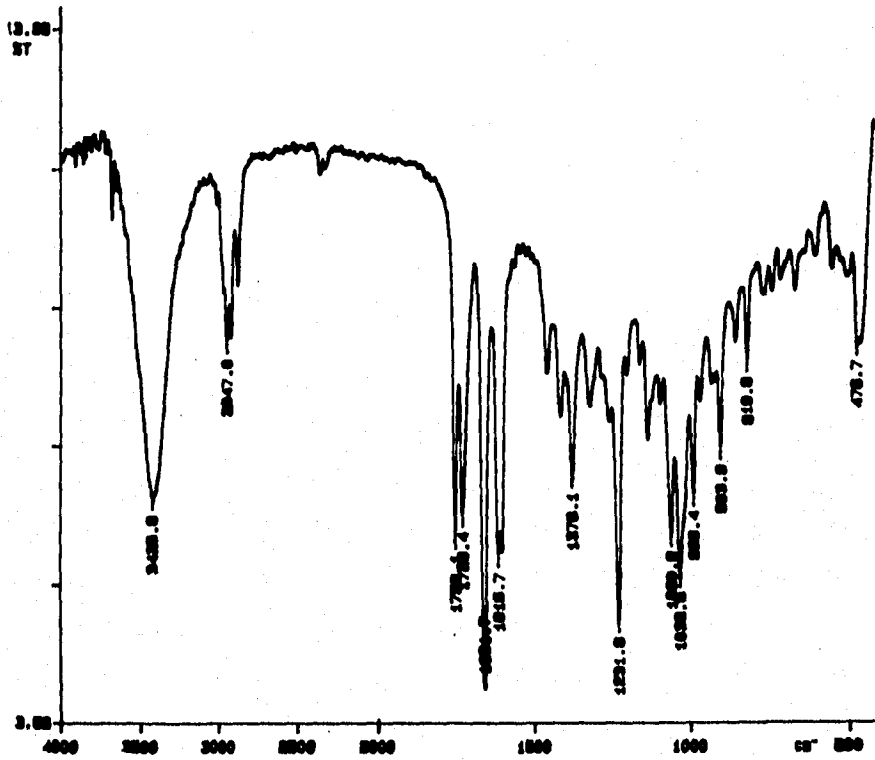


Fig. 7 Transmittancia del estándar primario de acetato de parametasona por espectroscopia Infrarroja con Transformadas de Fourier

III. BANDA DE ABSORCIÓN ELEGIDA PARA REALIZAR LA MEDIDA DE ABSORBANCIA A 1663.5 cm^{-1} .

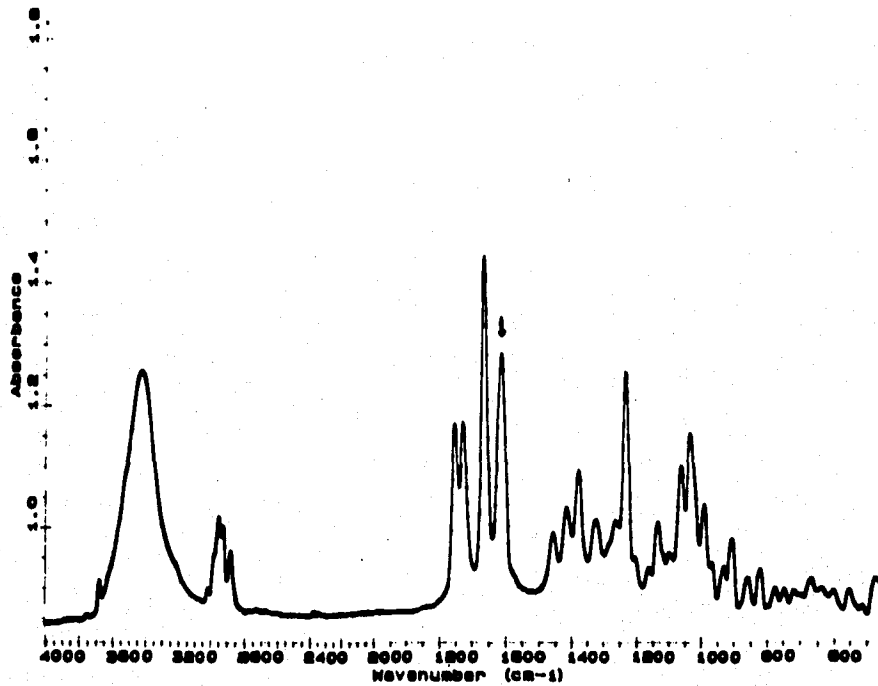


Fig. 8 Absorbancia en el infrarrojo con Transformada de Fourier de acetato de paracetamol

IV. LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACION.

TABLA 7
DATOS DE ABSORBANCIA PARA OBTENER EL LIMITE DE
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

Muestra	Absorbancia (A)
1	0.0581
2	0.0580
3	0.0580
4	0.0585
5	0.0580
6	0.0581
7	0.0586
8	0.0580
9	0.0585
10	0.0585
11	0.0580
12	0.0580
13	0.0585
14	0.0581
15	0.0580
16	0.0580
17	0.0591
18	0.0582
19	0.0580
20	0.0580

Resultados:

$$s = 2.9765 \times 10^{-4}$$

$$LD = 9.891 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

$$LQ = 0.03297 \text{ mg/ml}$$

V. LINEALIDAD DEL SISTEMA

TABLA 8
DATOS PARA OBTENER LA LINEALIDAD DEL SISTEMA

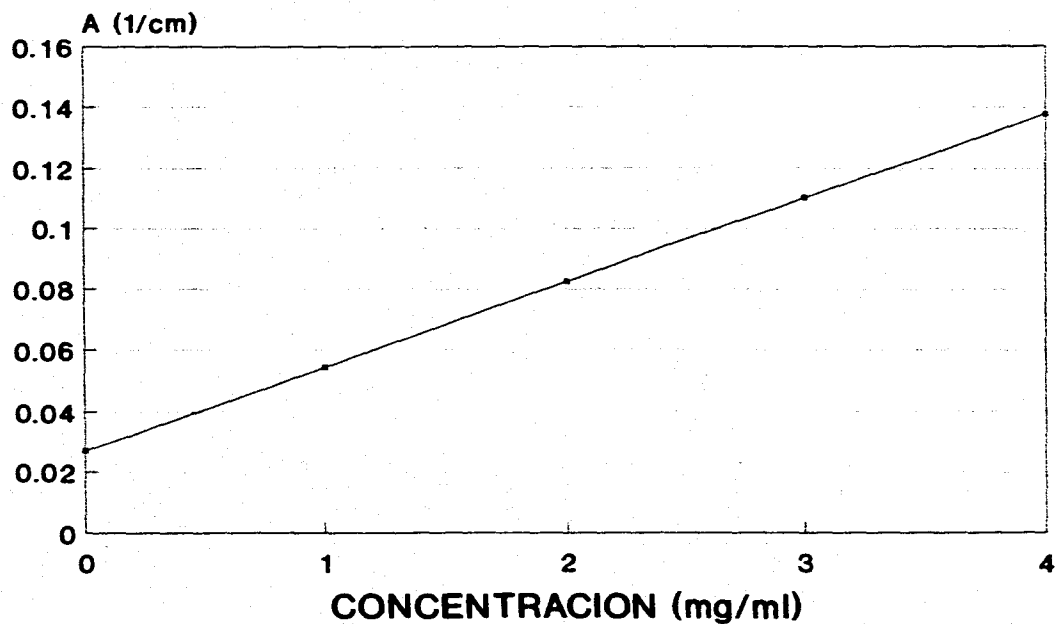
Concentración (mg/ml)	Propiedad medida A	
1.0	0.02715	0.02725
2.0	0.0543	0.0537
3.0	0.0826	0.0817
4.0	0.11025	0.1096
5.0	0.1377	0.1381

TABLA 9
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ESTADÍSTICA PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

Linealidad	Criterio de Aceptación
$r = 0.99992$	$r \geq 0.99$
$r^2 = 0.99985$	$r^2 \geq 0.90$
$CV = 0.89632$	$CV \leq 1.5\%$

Dado que los coeficientes de correlación, determinación y variación cumplen con los criterios de aceptación, el sistema es lineal.

LINEALIDAD DEL SISTEMA ACETATO DE PARAMETASONA



VI. PRECISIÓN DEL SISTEMA.

**TABLA 10
DATOS PARA OBTENER LA PRECISIÓN DEL SISTEMA.**

Concentración (mg/ml)	Absorbancia (A)
2	0.0558
2	0.0553
2	0.0559
2	0.0558
2	0.0559
2	0.0559

**TABLA 11
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ESTADÍSTICA PARA
PRECISIÓN DEL SISTEMA Y CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

Precisión	Criterio de Aceptación
CV= 0.4193%	CV≤1.5%

De acuerdo a la evaluación estadística obtenida el coeficiente de variación cumple con el criterio de aceptación para la precisión del sistema.

VII. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

**TABLA 12
DATOS DE CANTIDAD ADICIONADA Y CANTIDAD RECUPERADA
PARA OBTENER LA LINEALIDAD DEL MÉTODO**

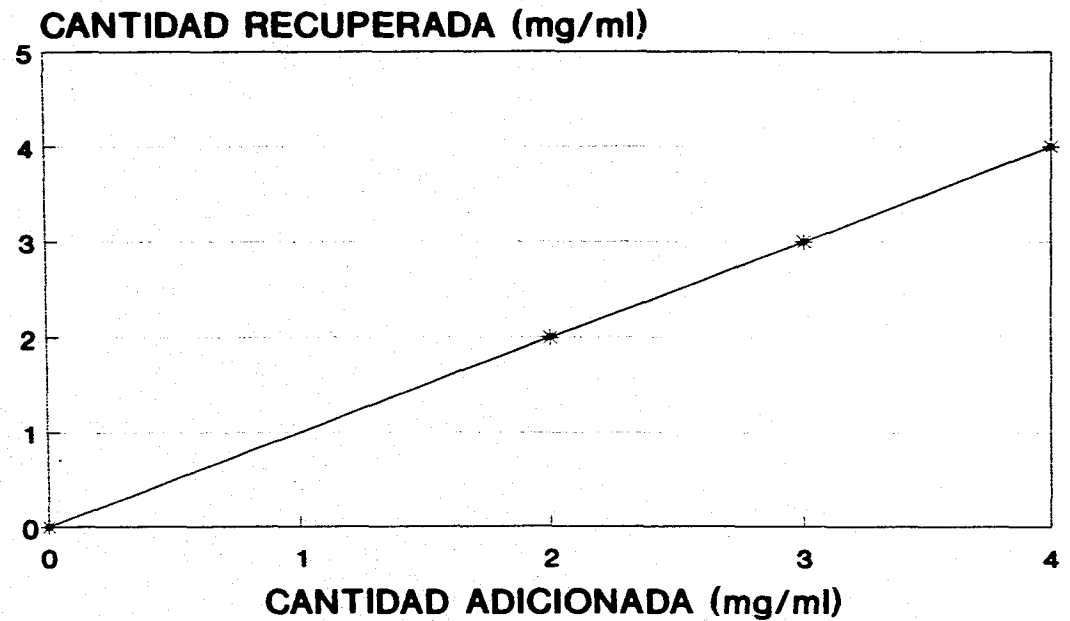
Cantidad Adicionada (mg/ml)	Cantidad Recuperada (mg/ml)	Recobro (%)
2.0	2.0000	100.00
2.0	1.9964	99.82
2.0	1.9964	99.82
3.0	3.0000	100.00
3.0	3.0003	100.01
3.0	3.0000	100.00
4.0	4.0056	100.14
4.0	4.0021	100.05
4.0	4.0000	100.00

**TABLA 13
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ESTADÍSTICA PARA
LINEALIDAD DEL MÉTODO**

Linealidad del Método	Criterio de Aceptación
$m = 1.0024$	$m = 1$
$b = -7.111 \times 10^{-3}$	$b = 0$
$r^2 = 1.00$	$r^2 > 0.98$
$CV = 0.10271$	$CV \leq 3\%$
$R\% = 99.9825$	$R\% = 97-103\%$
$-0.05618 < 1.8595$	$t_m / < t_{tab} (n-1, 0.95)$
$0.02128 < 1.8595$	$t_b / < t_{tab} (n-1, 0.95)$

De acuerdo a los resultados obtenidos se acepta la H_0 , ya que $t_{cal} \leq t_{tab}$, por lo tanto, el método es lineal, es decir, existe una concordancia de los resultados obtenidos en el análisis experimental con respecto al valor de referencia.

LINEALIDAD DEL METODO ACETATO DE PARAMETASONA



VIII. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD.

**TABLA 14
DATOS DE mg ADICIONADOS Y RECUPERADOS PARA
OBTENER LA EXACTITUD DEL MÉTODO**

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recobro
2.00	1.9600	98.00
2.00	1.9904	99.52
2.00	2.0046	100.23
2.00	2.0000	100.00
2.00	2.0140	100.70
2.00	1.9894	99.47

**TABLA 15
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ESTADÍSTICA PARA LA
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO**

Exactitud y Repetibilidad	Criterio de Aceptación
%R= 99.6533	%R= 97-103
CV= 0.9343	CV<3%
$t_{cal} = -0.9123$ $t_{tab} = 2.1318$	$t_{cal} < t_{tab}$
IC= 98.8431-100.4634	

Se acepta la H_0 , ya que $t_{cal} \leq t_{tab}$, por lo tanto, el método es exacto y repetible es decir, existe una concordancia de los resultados obtenidos en el análisis experimental con respecto al valor de referencia.

IX. REPRODUCIBILIDAD

TABLA 16

DATOS DE PORCENTAJE DE RECOBRO OBTENIDOS POR DOS ANALISTAS EN DOS DÍAS DIFERENTES PARA OBTENER LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

Día	Analista 1	Analista 2
1	99.56	99.78
1	99.78	99.78
1	99.56	97.59
2	102.57	100.00
2	100.00	100.00
2	100.10	102.00

TABLA 17

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANAEVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcal	F0.05
Analista (A)	gla = 1	0.3502	Mca = 0.3502	Fa = 0.1013	18.51
Día (D)	gld = 2	6.91019	Mcd = 3.4550	Fd = 2.4650	4.46
Error (E)	gle = 8	11.21287	Mce = 1.4018		

TABLA 18**RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ESTADÍSTICA PARA LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO**

Reproducibilidad	Criterio de Aceptación
CV= 1.2947	CV<3%
Fa= 0.1013<18.51	Si Fa < Fgla, gl _d 0.05 el método analítico es reproducible por los analistas. Si fa > fgl _a , gl _d 0.05 el método analítico no es reproducible por los analistas.
Fd= 2.4650<4.46	Si Fd < Fgl _d , gl _e . 0.05 el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista. Si Fd < Fgl _e , gl _e ; 0.05 el método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista

Por lo tanto el método analítico es reproducible por 2 analistas y en distinto día.

X. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA.

- Estabilidad en envase de vidrio ámbar.

TABLA 19

MUESTRA	INICIAL	TA/24 hr	TA/48 hr	4°C/24 hr	4°C/48 hr
1	100	109.83	112.03	103.99	110.00
2	99.82	100.16	110.88	100.11	109.43
3	99.82	100.31	111.31	100.30	111.00

TABLA 20

CONDICIÓN DE ALMACENAMIENTO	INTERVALO DE CONFIANZA	RESULTADOS
TA/24hr	-3.9636 - 10.9771	ES ESTABLE
TA/48hr	10.6866 - 12.2733	NO ES ESTABLE
4°C/24hr	-2.6323 - 5.712	ES ESTABLE
4°C/48hr	9.1377 - 11.2454	NO ES ESTABLE

TABLA 21

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	FACTOR I (%)	CRITERIO (%)	RESULTADOS
TA/24hr	103.5203	97 - 103	NO ES ESTABLE
TA/48 hr	111.4898	97 - 103	NO ES ESTABLE
4°C/24hr	101.5402	97 - 103	ES ESTABLE
4°C/48hr	110.2239	97 - 103	NO ES ESTABLE

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que la muestra analítica es estable en un período de 24 horas en refrigeración dado que el intervalo de confianza incluye el valor de cero y el factor I se encuentra en el criterio de aceptación.

-Estabilidad en envase de vidrio transparente.

TABLA 22

MUESTRA	INICIAL	TA/24hr	TA/48hr	4 °C/24hr	4 °C/48hr
1	100.00	110.00	111.74	108.11	111.44
2	99.82	100.00	110.03	100.32	110.36
3	99.96	100.47	111.00	99.99	112.01

TABLA 23

CONDICIÓN DE ALMACENAMIENTO	INTERVALO DE CONFIANZA	RESULTADO
TA/24hr	-4.0432 - 11.1743	ES ESTABLE
TA/48hr	9.8335 - 12.1598	NO ES ESTABLE
4 °C/24hr	-3.3173 - 9.0773	ES ESTABLE
4 °C/48hr	10.2066 - 12.4802	NO ES ESTABLE

TABLA 24

CONDICIÓN DE ALMACENAMIENTO	FACTOR I (%)	CRITERIO (%)	RESULTADOS
TA/24hr	103.5630	97 - 103	NO ES ESTABLE
TA/48hr	111.0042	97 - 103	NO ES ESTABLE
4 °C/24hr	103.8803	97 - 103	NO ES ESTABLE
4 °C/48hr	111.3512	97 - 103	NO ES ESTABLE

De acuerdo a los resultados obtenidos se dice que la muestra analítica no es estable en un periodo superior a las 24 hrs, después de su preparación, dado que el intervalo de confianza incluye el valor de cero pero el factor I no se encuentra en el criterio de aceptación.

X. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Debido a que el acetato de parametasona presenta un espectro de absorción en la región infrarroja se desarrollo un método analítico para su cuantificación por espectroscopia en el infrarrojo con Transformadas de Fourier.

Para determinar la confiabilidad del método propuesto primero se establecieron las condiciones experimentales óptimas como son:

1. Manipulación adecuada de la muestra y elección del disolvente para la solubilidad del principio activo.
2. Selección del tiempo de barrido para disminuir la relación señal-ruido. Se considero un tiempo de barrido de 16 segundos.
3. Verificar que la celda estuviera limpia y observar que cerrara herméticamente para evitar la evaporación o goteo del disolvente.
4. Elegir la banda de absorción de mejor definición en la línea base y con mayor reproducibilidad, dado que la intensidad de esta es proporcional a la concentración de la sustancia, la banda seleccionada fue a 1663 cm^{-1} . Se comprobo que la mezcla de disolventes utilizados no absorbían en la región elegida.
5. Las concentraciones de la curva de calibración fueron de 1, 2, 3, 4 y 5 mg/ml.

Una vez establecidas las condiciones experimentales se requirió conocer la capacidad del método para el análisis propuesto, a través de la estimación de la linealidad del sistema. Se preparo una curva de calibración en el rango de concentración establecido.

Los resultados demostraron la proporcionalidad entre la concentración y la absorbancia obtenida como se observa en la gráfica 1. Esto se evaluó a través del coeficiente de determinación (r^2) aproximadamente igual a 1.0 (0.99992) y el coeficiente de variación (CV) que fue menor a 1.5% (0.89632), esto indica que el sistema es lineal.

En la precisión del sistema se obtuvo un coeficiente de variación de 0.4193%, que al ser menor de 1.5%, muestra que el sistema es preciso.

En la evaluación del método se determinó primero la especificidad, en donde se extrajo de las tabletas el principio activo empleando una mezcla de alcohol cloroformo (1:1) el espectro del estándar se comparo con el espectro del material insoluble en este último no se presentaron bandas atribuibles al fármaco por lo que se deduce la eficacia de la extracción y que el excipiente no absorbe en esta región.

En la medición de la linealidad del método como se observa en la gráfica 2, muestra una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada en el análisis, lo cual indica la proporcionalidad existente en el intervalo de concentración analizado, se obtiene una pendiente con valor muy cercano a 1.0 (1.0024), la ordenada al origen se encuentra muy cercana a cero (-7.111×10^{-3}), el coeficiente de determinación es mayor de 0.98 (1.00), el porcentaje de recobro fue de 99.98%, con un coeficiente de variación menor al 3% (0.10271), con lo cual se establece que se cumple con los criterios de linealidad del método.

Finalmente se determinaron los valores de t de Student, para evaluar la ordenada al origen y la pendiente. Se concluye que la pendiente es diferente de 1 y la ordenada al origen diferente de cero, siendo la respuesta analítica obtenida directamente proporcional a la concentración de la muestra.

En el parámetro de precisión se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad.

Para la repetibilidad se observó que si había concordancia entre los valores obtenidos (Tabla 14), el promedio de recobro fue de 99.6533% y el coeficiente de variación es menor de 3% (0.9343), con lo cual el método es repetible al 100% de contenido nominal del principio activo.

La reproducibilidad, se evaluó a través de un diseño al azar para los factores 2 analistas y 2 días diferentes. Cada analista realizó el análisis de manera independiente, empleando 3 replicas a la concentración estipulada como 100% (3 mg/ml). En el análisis de varianza correspondiente no se encuentra diferencia significativa para el analista ni para el día y no se observó tampoco efecto para la interacción día-analista por lo que se puede considerar el método propuesto como reproducible.

En relación a la exactitud del método analítico, éste cumple con los criterios establecidos, debido a que el promedio de recobro fue de 99.65% y el coeficiente de variación de 0.9343, lo que indica que el método es exacto a los niveles de concentración trabajados.

Para el límite de detección se encontró que la concentración mínima detectada por el instrumento es de 9.891×10^{-3} mg/ml y la concentración mínima a cuantificar bajo las condiciones de operación establecidas es de 0.03297 mg/ml.

La muestra analítica es estable en un período de 24 hrs en refrigeración y almacenamiento en frasco color ámbar dado que el intervalo de confianza incluye el valor de cero y el factor *t* se encuentra dentro del criterio de aceptación; para las demás condiciones de almacenamiento se observan muestras con valores altos que indican variaciones en la concentración debido probablemente a la volatilidad de la mezcla de disolventes utilizados en la preparación de las soluciones. Los resultados obtenidos bajo las condiciones de trabajo muestran que ninguno de los resultados se encuentra dentro de los criterios de aceptación. De acuerdo a lo anterior debe analizarse la muestra antes de 24 hrs después de su preparación.

XI. CONCLUSIONES.

A partir del desarrollo del método y la evaluación estadística de los resultados obtenidos se concluye:

✍ La señal de absorbancia adecuada para realizar la cuantificación de acetato de parametasona en la región infrarroja es igual a 1663 cm^{-1}

✍ El límite de detección obtenido tiene un valor de $9.891 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$ límite de cuantificación de 0.03297 mg/ml .

✍ El sistema es lineal en un rango de 1 a 5 mg/ml.


✍ El sistema es preciso ya que el coeficiente de variación obtenido es 0.4193%.

✍ El método es lineal y exacto en el rango de concentración requerido los niveles de acetato de parametasona en tabletas.

✍ El método es preciso y reproducible por dos analistas en dos días.

✍ La muestra analítica es estable en condiciones de refrigeración por horas en frascos color ámbar.

✍ La muestra analítica no es estable a temperatura ambiente y $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas, en frasco transparente. Por lo que debe analizarse en un período menor de 24 hrs. después de su preparación.

 La espectroscopia infrarroja con Transformadas de Fourier y su aplicación en el análisis cuantitativo tiene mucha importancia y ventajas en comparación con los métodos existentes debido a que:

- ☆ Es rápido
- ☆ Es un método accesible
- ☆ No requiere de cálculos adicionales complejos.
- ☆ Es específico y exacto.
- ☆ La muestra de análisis puede ser recuperada, siendo un método no destructivo.

Todos los aspectos anteriores permiten que la espectroscopia en el infrarrojo con Transformadas de Fourier tenga muchas áreas de aplicación como método cualitativo y cuantitativo.

XII. SUGERENCIAS.

- ☒ Colocar el instrumento en un lugar libre de humedad, vibraciones y atmósfera corrosiva.**
- ☒ Calibrar el instrumento con la película de poliestireno.**
- ☒ Considerando la estabilidad de la muestra analítica, es recomendable guardarla en refrigeración y protegido de la luz, si fuera necesario.**
- ☒ Analizar la muestra analítica durante un lapso menor de 24 hrs. después de su preparación.**

XIII. ANEXO.

ABREVIATURAS

b = ordenada al origen.
r = coeficiente de correlación
r² = coeficiente de determinación
CV = coeficiente de variación
IC = intervalo de confianza
m = pendiente
n = número de determinaciones
t = número de diluciones o número de cantidades adicionadas
y = media aritmética
N = número total de determinaciones
s² = varianza
DE = desviación estándar
x = concentración de la solución o cantidad adicionada
y = propiedad medida o cantidad recuperada
%R = porcentaje de recobro
t = valor de distribución "t" de Student con una probabilidad acumulada de 0.95
tm = valor de distribución "t" de Student calculada para la pendiente
tb = Valor de distribución "t" de Student calculada para la ordenada al origen.
F = valor de distribución "F" de Fischer con una probabilidad acumulada de 0.95
gl = grados de libertad
gla = grados de libertad del analista
gld = grados de libertad del día
F = factor para cálculos en la linealidad del sistema
I = factor para cálculos en la estabilidad de la muestra TA= temperatura ambiente

FORMULARIO ESTADÍSTICO

LIMITE DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACION.

Desviación estándar

$$s = \left(\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Donde:

s= desviación estándar

x= cada una de las lecturas individuales

\bar{x} = promedio de las lecturas

n= número de las lecturas

$$LD = \frac{3sc}{x} \quad LD = \frac{10sc}{x}$$

Donde:

s= desviación estándar

c= concentración

LD= límite de detección

LQ= límite de cuantificación

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Concentración de la dilución de la solución patrón (X)	Propiedad medida (Y)
X_1	$Y_{11}, Y_{12}, \dots, Y_{1n}$
X_2	$Y_{21}, Y_{22}, \dots, Y_{2n}$
X_3	$Y_{31}, Y_{32}, \dots, Y_{3n}$
.	...
.	...
X_t	$Y_{t1}, Y_{t2}, \dots, Y_{tn}$

t= número de diluciones

n= número de repeticiones (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón.

$$\sum X = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_t$$

$$\sum Y = Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n} + Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n} + \dots + Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn}$$

$$\sum X^2 = X_1^2 + X_2^2 + X_3^2 + \dots + X_t^2$$

$$\sum Y^2 = Y_{11}^2 + Y_{12}^2 + \dots + Y_{1n}^2 + Y_{21}^2 + Y_{22}^2 + \dots + Y_{2n}^2 + \dots + Y_{t1}^2 + Y_{t2}^2 + \dots + Y_{tn}^2$$

$$\sum XY = X_1(Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n}) + X_2(Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n}) + \dots + X_t(Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn})$$

Cálculo de la pendiente

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

Cálculo de la ordenada al origen:

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

Cálculo del coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{\{(n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y))\}^2}{\{n(\sum X^2) - (\sum X)^2\}\{n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2\}}$$

Cálculo para el coeficiente de variación

$$F_{11} = \frac{y_{11}}{x_1}$$

$$F_{12} = \frac{y_{12}}{x_1}$$

$$F_{1n} = \frac{y_{1n}}{x_1}$$

.

.

.

$$F_{i1} = \frac{y_{i1}}{x_i}$$

$$F_{i2} = \frac{y_{i2}}{x_i}$$

$$F_{in} = \frac{y_{in}}{x_i}$$

$$\sum F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{i1} + F_{i2} + F_{in}$$

$$\sum F^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + F_{i1}^2 + F_{i2}^2 + F_{in}^2$$

$$\bar{F} = \frac{\sum F}{N}$$

Donde N es el número de puntos de la linealidad del sistema

$$DE = \left\{ \frac{N(\sum F^2) - (\sum F)^2}{N(N-1)} \right\} \frac{1}{2}$$

$$CV = \frac{DE}{F} \times 100$$

Cálculos preliminares realizados para obtener la linealidad del sistema:

$$\sum X = 30$$

$$\sum Y = 0.82235$$

$$\sum X^2 = 110$$

$$\sum Y^2 = 0.083009$$

$$\sum XY = 3.0217$$

$$m = 0.0277325$$

$$b = -9.625 \times 10^{-4}$$

$$r^2 = 0.999985$$

$$\sum F = 0.27328$$

$$\sum F^2 = 7.46873 \times 10^{-3}$$

$$\bar{F} = 0.027328$$

$$DE = 2.44948 \times 10^{-4}$$

$$CV = 0.89632$$

PRECISIÓN DEL SISTEMA

$$\sum Y = Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots + Y_n$$

$$\sum Y^2 = Y_1^2 + Y_2^2 + Y_3^2 + \dots + Y_n^2$$

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y}{N}$$

$$DE = \left\{ \frac{N(\sum Y^2) - (\sum Y)^2}{N(N-1)} \right\} \frac{1}{2}$$

Cálculo del coeficiente de variación

$$CV = \frac{DE}{\bar{Y}} \times 100$$

Cálculos preliminares realizados para obtener la precisión del sistema:

$$\sum Y = 0.3346$$

$$\sum Y^2 = 0.0186598$$

$$\bar{Y} = 0.05576$$

$$DE = 2.33809 \times 10^{-4}$$

$$CV = 0.419$$

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Cantidad adicionada (X)	Cantidad recuperada (Y)
X_1	$Y_{11}, Y_{12}, \dots, Y_{1n}$
X_2	$Y_{21}, Y_{22}, \dots, Y_{2n}$
X_3	$Y_{31}, Y_{32}, \dots, Y_{3n}$
.
.
X_t	$Y_{t1}, Y_{t2}, \dots, Y_{tn}$

t= número de cantidades adicionadas

n= número de repeticiones (cantidad recuperada) por cada cantidad adicionada

$$\sum X = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_t$$

$$\sum Y = Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n} + Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n} + \dots + Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn}$$

$$\sum X^2 = X_1^2 + X_2^2 + X_3^2 + \dots + X_t^2$$

$$\sum Y^2 = Y_{11}^2 + Y_{12}^2 + \dots + Y_{1n}^2 + Y_{21}^2 + Y_{22}^2 + \dots + Y_{2n}^2 + \dots + Y_{t1}^2 + Y_{t2}^2 + \dots + Y_{tn}^2$$

$$\sum XY = X_1(Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n}) + X_2(Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n}) + \dots + X_t(Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn})$$

Cálculo de la pendiente

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

Cálculo de la ordenada al origen

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

Cálculo del coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{\{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)\}^2}{\{n(\sum X^2) - (\sum X)^2\} \{n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2\}}$$

Cálculo de por ciento recuperado (R) para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación:

$$R = \frac{Y}{X} \times 100$$

$$\sum R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\sum R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$\bar{R} = \frac{\sum R}{N}$$

$$DE = \left\{ \frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)} \right\} \frac{1}{2}$$

Cálculo del coeficiente de variación

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

Finalmente se determinan los valores de t de student, para evaluar la ordenada al origen y la pendiente estadísticamente.

$$McErr Reg = \frac{\sum Y^2 - n(\sum XY) - b(\sum y)}{n-2}$$

$$Mc Reg = b(\sum Y) + m(\sum XY) - \left\{ \frac{\sum Y^2}{n} \right\}$$

$$Sm = \left\{ McErr Reg \left(\frac{Xp^2}{n(\sum X^2)} + \frac{1}{n} \right) \right\} \frac{1}{2}$$

$$Sb = \left\{ Mc Reg \left(\frac{1}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2} \right) \right\} \frac{1}{2}$$

Donde:

McErrReg= Media Cuadrática de Error de Regresión

McReg= Media Cuadrática de Regresión

Sm= desviación Estándar para la pendiente

Sb= desviación Estándar para la ordenada al origen

x_p= Promedio de x

n= número de datos

$$t_{\text{calcm}} = \frac{1-m}{Snt}$$

$$t_{\text{calcb}} = \frac{a-b}{Sb}$$

La "t" de tablas se determina con n-1 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95.

Cálculos preliminares realizados para obtener la linealidad del método.

$$\sum X = 27$$

$$\sum Y = 27.0008$$

$$\sum X^2 = 87.00$$

$$\sum Y^2 = 87.0346$$

$$\sum XY = 87.0173$$

$$m = 1.0024$$

$$b = -7.11 \times 10^{-3}$$

$$r^2 = 1.00$$

$$\sum R = 899.8425$$

$$\sum R^2 = 89968.5872$$

$$\bar{R} = 99.9825$$

$$DE = 0.1027$$

$$CV = 0.10271$$

Cálculo de los valores de "t" de Student para evaluar la ordenada al origen y la pendiente.

$$McErr \text{ Re } g = 6.57142 \times 10^{-3}$$

$$Mc \text{ Re } g = 6.0293$$

$$Sm = 64.2718 \times 10^{-3}$$

$$Sb = 0.33414$$

$$t_{\text{calm}} = -0.5618$$

$$t_{\text{calb}} = 0.02128$$

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Cálculo del porcentaje recuperado (R) para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación:

$$R = \frac{Y}{X} \times 100$$

$$\sum R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\sum R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

Cálculo de media del porcentaje recuperado.

$$\bar{R} = \frac{\sum R}{N}$$
$$DE = \left\{ \frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)} \right\} \frac{1}{2}$$

Cálculo del coeficiente de variación.

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

Contraste de hipótesis para la exactitud

$$H_0 = m = 0$$

$$H_0 = m \neq 0$$

Cálculo de la "t" de Student

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{R} - 100}{\frac{DE}{\sqrt{n}}}$$

Intervalo de confianza para la media

$$IC = \bar{R} \pm t(\text{gl}, n-2, 0.95) \frac{DE}{\sqrt{n}}$$

Donde:

n= número de recobros independientes

x= cantidad adicionada

y= cantidad recuperada

Cálculos preliminares realizados para obtener la repetibilidad y exactitud del método.

$$\sum R = 597.92$$

$$\sum R^2 = 59589.0542$$

$$\bar{R} = 99.6533$$

$$DE = 0.93092$$

$$CV = 0.9343$$

$$t_{\text{calc}} = -0.9123$$

$$IC = 100.4634 - 988431$$

REPRODUCIBILIDAD

ANALISTA			
DÍA	1	1	2
		Y11	Y211
		Y112	Y212
	2	Y113	Y213
		Y121	Y221
		Y122	Y222
Y123	Y223		

$$\sum Y_{...} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

$$\sum Y^2_{...} = Y^2_{111} + Y^2_{112} + Y^2_{113} + Y^2_{121} + Y^2_{122} + Y^2_{123} + Y^2_{211} + Y^2_{212} + Y^2_{213} + Y^2_{221} + Y^2_{222} + Y^2_{223}$$

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y_{...}}{N}$$

$$DE = \left\{ \frac{N(\sum Y^2) - (\sum Y_{...})^2}{N(N-1)} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

N= número total de determinaciones

Cálculo del coeficiente de variación

$$CV = \frac{DE}{\bar{Y}} \times 100$$

Una prueba estadística adicional para conocer la reproducibilidad es utilizando un modelo anidado de efectos aleatorios de dos factores (A:analista, D:día) el cual se representa con la siguiente ecuación:

$$y_{ijk} = m + A_i + D_{j(i)} + E_{k(ij)}$$

Donde:

y_{ijk} = Porcentaje cuantificado asociado a la K-ésima repetición el j-ésimo día para el i-ésimo analista.

m = cantidad de principio activo en la muestra.

A_i = efecto del analista en el porcentaje cuantificado.

$D_j(i)$ = efecto del j-ésimo día en el i-ésimo analista sobre el porcentaje cuantificado.

$E_k(ij)$ = error experimental.

a = número de analistas.

d = número de días.

r = número de replicaciones.

Cálculo de la suma de las combinaciones analista-día (y_{ij}):

$$Y_{11} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113}$$

$$Y_{12} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_{21} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_{22} = Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

Cálculo de la suma para cada analista ($y_{i..}$):

$$Y_1 = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_2 = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

Cálculo de la suma total ($y_{...}$):

$$Y_{..} = Y_1 + Y_2$$

Cálculo de la suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$\sum \sum y_{ij}^2 = (Y_{11})^2 + (Y_{12})^2 + (Y_{21})^2 + (Y_{22})^2$$

Cálculo de las sumas del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$(\sum y_{i..})^2 = (Y_1)^2 + (Y_2)^2$$

Cálculo de la suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\sum \sum \sum y_{ijk}^2 = (Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + \dots + (Y_{221})^2 + (Y_{222})^2 + (Y_{223})^2$$

Cálculo de la suma de cuadrados del analista (S_{ca}) efecto del factor analista.

$$S_{ca} = \frac{\sum \sum \sum y_{ij}^2}{r} - \frac{(\sum y_{i..})^2}{dr}$$

Cálculo de la suma de cuadrados del día anidado en el analista (S_{cd})

$$S_{cd} = \frac{\sum \sum \sum y_{ij}^2}{r} - \frac{(\sum y_{i..})^2}{dr}$$

Cálculo de la suma de cuadrados del error (S_{ce}):

$$F_a = \frac{M_{ca}}{M_{cd}}$$

Tabla de análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F 0.05*
Analista (A)	gla= a-1	Sca	$Mca = \frac{.Sca}{gla}$	$Fa = \frac{.Mca}{Mcd}$	$\frac{Fgla}{gld}$
Día (D)	gld= (d-1)a	Scd	$Mcd = \frac{.Scd}{gld}$	$Fd = \frac{.Mcd}{Mce}$	$\frac{Fgld}{gle}$
Error (E)	gle= (r-1)ad	Scce	$Mce = \frac{.Scce}{gle}$	-	-

Los valores de $F = 0.05^*$ se obtienen de la tabla de F localizando el cruce del valor de los grados de libertad (gl) del numerador horizontalmente y el valor de los grados de libertad del denominador.

Cálculos preliminares realizados para obtener la reproducibilidad del método

$$Y = 1201.09$$

$$\sum Y^2 = 120236.5723$$

$$\bar{Y} = 100.0908$$

$$DE = 129.59$$

$$CV = 12.47$$

Cálculo de la suma de las combinaciones analista-día (Y_{ij})

$$Y_{11} = 298.9$$

$$Y_{12} = 302.67$$

$$Y_{21} = 297.15$$

$$Y_{22} = 302.37$$

Cálculo de la suma para cada analista ($Y_{i..}$)

$$Y_{1.} = 601.57$$

$$Y_{2.} = 599.52$$

Cálculo de la suma total ($Y_{...}$):

$$Y = 601.57 + 599.52 = 1201.09$$

Cálculo de la suma del cuadrado de cada analista en cada día

$$\sum \sum y_{ij}^2 = 360676.0783$$

Cálculo de las sumas del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$\sum Y_{i.}^2 = 721310.6953$$

Cálculo de la suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\sum \sum \sum y_{ijk}^2 = 120236.5723$$

Cálculo de la suma de cuadrados del analista (SCa) efecto del factor analista

$$SCa = 0.3502$$

Cálculo de la suma de cuadrados del día anidado en el analista (Scd).

$$SCd = 6.91019$$

Cálculo de la suma de cuadrados del error (Sce)

$$Sce = 11.21287$$

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Inicial	Condición/Tiempo		
	1	2	m
Y ₁	Y ₄	Y ₇	Y _{n-2}
Y ₂	Y ₅	Y ₈	Y _{n-1}
Y ₃	Y ₆	Y ₉	Y _n

-Cálculos preliminares para el intervalo de confianza:

$$Sce = 11.21287$$

Media $\bar{Y}_0, \bar{Y}_1, \bar{Y}_2, \bar{Y}_m$

Varianza $S_0^2, S_1^2, S_2^2, S_m^2$

Varianza Ponderada

$$Sp_1^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_1^2}{2(c+1)}$$

$$Sp_2^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_2^2}{2(c+1)}$$

$$Sp_m^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_m^2}{2(c+1)}$$

$$IC = (Y_1 - Y_0) \pm t^* \left[Sp_1^2 \left(\frac{2}{3} \right) \right]^{\frac{1}{2}}$$

Donde t* = valor de la "t" de Dunnet con C comparaciones y 2(c+1) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

-Cálculos preliminares para el coeficiente de variación:

Para cada condición/tiempo/muestra calcular el factor (Y):

$$I = \frac{\text{Análisis} \cdot \text{muestra} / \text{condición} / \text{tiempo}}{\text{Análisis} \cdot \text{inicial}}$$

$$I_2 = \frac{Y_4}{Y_2} \times 100$$

$$I_1 = \frac{Y_5}{Y_1} \times 100$$

$$I_3 = \frac{Y_6}{Y_3} \times 100$$

$$I_4 = \frac{Y_7}{Y_1} \times 100$$

$$I_5 = \frac{Y_8}{Y_2} \times 100$$

$$I_1 = \frac{Y_{n-2}}{Y_1} \times 100$$

$$I_6 = \frac{Y_9}{Y_1} \times 100$$

$$I_8 = \frac{Y_{n-1}}{Y_1} \times 100$$

$$I_9 = \frac{Y_n}{Y_1} \times 100$$

-Cálculo de la media del factor (I) para cada condición/tiempo:

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

Donde N es el número de muestras por cada condición tiempo.

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

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

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

Cálculos preliminares para obtener la estabilidad de la muestra analítica:

-Envase ámbar

Media $\bar{Y}_0 = 99.9266$ $\bar{Y}_1 = 103.4333$ $\bar{Y}_2 = 111.4066$ $\bar{Y}_3 = 101.466$

Varianza $S_0^2 = 8.933 \times 10^{-3}$ $S_1^2 = 30.6936$ $S_2^2 = 0.3376$ $S_3^2 = 9.5688$ $S_4^2 = 0.6313$

Varianza Ponderada

$Sp_1^2 = 10.234$

$Sp_2^2 = 0.1155$

$Sp_3^2 = 3.1925$

IC/24 hrs/TA = (-3.9636-10.9771)

IC/48 hrs/TA = (10.6866-122733)

IC/24 hrs/refrigeración = (-2.6323-5.712)

IC/48 hrs/refrigeración = (9.1377-11.2954)

Y1/24 hrs/TA = 103.5203

Y1/48 hrs/TA = 111.4898

Y1/24 hrs/refrigeración = 101.5402

Y1/48 hrs/refrigeración = 110.2239

-Envase transparente

Media $\bar{Y}_0 = 99.9266$ $\bar{Y}_1 = 103.49$ $\bar{Y}_2 = 110.9233$ $\bar{Y}_3 = 102.8066$

Varianza $S_0^2 = 8.933 \times 10^{-3}$ $S_1^2 = 31.8403$ $S_2^2 = 0.7354$ $S_3^2 = 21.1212$ $S_4^2 = 0.7023$

Varianza Ponderada

$Sp_1^2 = 10.6164$

$Sp_2^2 = 0.2481$

$Sp_3^2 = 7.0433$

IC/24 hrs/TA = (-4.0432-11.1743)

IC/48 hrs/TA = (9.8335-12.1598)

IC/24 hrs/refrigeración = (-3.3173-9.0773)

IC/48 hrs/refrigeración = (10.2066-12.4802)

Y1/24 hrs/TA = 103.55630

Y1/48 hrs/TA = 111.0042

Y1/24 hrs/refrigeración = 103.8803

Y1/48 hrs/refrigeración = 111.3512

XIV. BIBLIOGRAFÍA.

1. Alcantara A., "Validación de Métodos Analíticos", Material de apoyo editado por la Asociación Farmacéutica Mexicana, México, 1989.
2. Cano J., Zavala D.; "Introducción a la Espectroscopia de Infrarrojo", México, Perkin Elmer de México, 1985.
3. Castillo G.L., Arteaga M.M., "Notas para el Curso de Espectroscopia Infrarroja", FES-Zaragoza, UNAM, 1992.
4. Catala M. Y., "Validación de Procesos en la Industria Farmacéutica"; Rev. Mex. Cien. Farm., 21(1):17-23 1990.
5. Conley R.T., "Espectroscopia Infrarroja", 2ª edición, España, Alhambra, 1979, pp. 1-328.
6. Connors A. Kenneth, "Curso de Análisis farmacéutico", 2ª edición, Reverté, México, 1981.
7. Cruz M. M. T.; "Análisis Cualitativo y Cuantitativo por Espectroscopia de IR de los Componentes de las Lacas Acrílicas Usadas Como Recubrimiento"; Tesis; ENEP Zaragoza; UNAM; 1986; pp. 12-14.
8. Drill, "Farmacología Médica", 2ª edición; México; Prensa Médica; 1978; pp. 1509-1568.
9. Fleming I., Williams H. D.; "Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica"; Bilbao, Urmo, 1970.
10. Fontani, F., "Criterios de validación de Métodos Analíticos", Bol. Chem. Pharm. 126(2).1987.
11. Goodman G. A., Goodman S. L.; "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica", 7ª edición, Panamericana, 1986; pp. 1384-1411.

12. Goth A., "Farmacología Médica. Principios y Conceptos". Barcelona; Doyma; 1984; pp. 480-490.
13. Guerra J.; "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories", Pharm. Tech., 10(3); 1986.
14. Guyton A. C.; "Tratado de Fisiología Médica"; 7ª ed.; México; Interamericana; 1987; pp. 1025, 1115-1130.
15. Hannah R. W., "Experiments in Techniques of Infrared Spectroscopy"; U.S.A; Perkin Elmer Corporation, 1969.
16. Harper A. H., "Manual de Química Fisiológica"; 7ª ed.; México; El Manual Moderno; 1980; pp. 610-584.
17. Hokanson G. C., "A Life Cycle Approach to the Validation of Analytical Methods During Pharmaceutical Product Development. Part I: The Initial Method Validation Process", Pharm. Tech., 1994 18(9):118-130.
18. Inman E.L.; Frischmann P.J., Winkel G.D.; "General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples"; J. Chrom. Sci; 1987; 25:252-256.
19. Katzung G. B., "Farmacología Básica y Clínica"; 4ª edición; México; El Manual Moderno; 1991; pp. 486-499.
20. Koenig J.L., "Industrial Problem Solving With Molecular Spectroscopy; Anal. Chem., 1994; 66(9):515A-521A.
21. Larry W. P., "USP Perspectives on Analytical Methods Validation, Pharm. 1991; 15(3):130-141.
22. Lual; "Componentes para un Program de Validación de Métodos Analíticos"; Pharma News, 1993; 4(5):39,40
23. Lual; "Modelos Estadísticos y Validación de Métodos Analíticos", Pharma News; 1993; 4(7):32-44.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

24. Lual; "Modelos Estadísticos y Validación de Métodos Analíticos", Pharma News; 1993; 4(7):24,25.
25. Lual; "Modelos Estadísticos y Validación de Métodos Analíticos", Pharma News; 1993; 4(10):16-19.
26. Lual; "Modelos Estadísticos y Validación de Métodos Analíticos", Pharma News; 1993; 4(11):26-28.
27. Perkin Elmer de México, "Notas para el Curso Básico de Espectroscopia Infrarroja, México, 1995
28. Pecsok R. L., "Métodos Modernos de Análisis Químico"; México; Limusa; 1977; pp. 165-225.
29. Price W. J., "A Course in the Principles and Practice of Infrared Spectroscopy"; 3ª, England; Pye Unicam Ltd., 1973; pp. 1, 2, 41-47, 56.
30. Putzig C.L., Leugers M.A., McKelvy M.L., "Infrared Spectroscopy"; Anal. Chem. 1994, 66(12):26R-66R.
31. "Process Validation Concepts for Drug Products", Pharm. Tech., 1985, September:78-82.
32. "Quantitative Analysis by FTIR", 1992, Joul. of Chem. 69(8).
33. Simón E. R., "Gula de Farmacologia para Farmacéuticos y Médicos"; España; Madrid; 1993; pp 65-73.
34. Skoog A. Douglas, West M. Donald; "Análisis Instrumental", Interamericana, México; 1982.
35. Taylor K. John, "Validation of Analytical Methods", 1983; Anal. Chem. 55(6).

36. The Merck Index, 11a, U.S.A, Editorial Merck & Co; 1989; pp. 1112.
37. USP XX, "The United States Pharmacopeia", U.S.A; 1980; pp. 1017-1018.
38. Watty B. M., "Química Analítica", Alhambra, México, 1982; pp. 428-459, 579-493.
39. Whetsel K., "Infrared Spectroscopy"; Chemical Engineering News; 1968; 46:82-92,.
40. Willard H. Hobart, Merritt L. Lynne, Dean A. John; "Métodos Instrumentales de Análisis"; México; Continental; 1981, pp. 175, 177-179, 183-188 196, 197.
41. Colegio Nacional de Q.F.B., "Validación de Métodos Analíticos", Reportes Internos del Comité de Validaciones, México, 1988.
42. Velasco M. A., Lorenzo F. P., Serrano S. J.; "Farmacología"; 16º edición, Interamericana, España, 1993; pp. 839-855.