

26
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE SULFAMETOXAZOL Y TRIMETOPRIM POR MEDIO DE LOS METODOS DE RAZONES DE ABSORBANCIA Y MINIMOS CUADRADOS PARCIALES”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
ROGELIO GARCIA VEGA
LAURA RESENDIZ TAPIA

ASESOR: JOSE A. GARDUÑO ROSAS

2608571

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA F.E.S.-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



AT'N: Ing. Jaime de Anda Montañez
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S.-C

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Determinación Espectrofotométrica de Sulfametoxazol y Trimetoprim
por medio de los Métodos de Razones de Absorbancia y Mínimos Cuadrados Parciales".

que presenta el pasante: Rogelio García Vega
con número de cuenta: 8739113-6 para obtener el TÍTULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, a 16 de Enero de 1998

PRESIDENTE	M. en C. Guadalupe Pérez Caballero	
VOCAL	D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez	
SECRETARIO	Q.F.B. José A. Garduño Rosas	
RIMER SUPLENTE	Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera	
SEGUNDO SUPLENTE	M. en C. Julio C. Botello Pozos	

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E

AT'N: Ing. Jaime de Anda Montañez
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES-C

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Determinación Espectrofotométrica de Sulfametoxazol y Trimetoprim
por medio de los Métodos de Razones de Absorbancia y Mínimos Cua-
drados Parciales".

que presenta la pasante: Laura Reséndiz Taóia
con número de cuenta: 8738088-2 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, a 16 de Enero de 1998

PRESIDENTE	<u>M. en C. Guadalupe Pérez Caballero</u>
VOCAL	<u>O.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>
SECRETARIO	<u>O.F.B. José A. Garduño Rosas</u>
RIMER SUPLENTE	<u>O.F.B. Guadalupe Reboollar Barrera</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Julio C. Botello Pozos</u>

**DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE
SULFAMETOXAZOL Y TRIMETOPRIM POR MEDIO DE LOS
MÉTODOS DE RAZONES DE ABSORBANCIA Y MÍNIMOS
CUADRADOS PARCIALES.**

Autores.

Laura Reséndiz Tapia
Rogelio García Vega.

Asesor

José A. Garduño Rosas.

- *Lo que puedes hacer, o has soñado que podrás hacer, debes comenzarlo.
La osadía lleva en sí genio, poder y magia.*

- *Para triunfar en la vida no te fíes demasiado en tí mismo.
Pide consejo a alguien que tenga experiencia.
No seas precipitado en tus acciones.
Pondera las circunstancias y cuando estés seguro, actúa sin vacilaciones.*

- *Algunos sueñan con alcanzar grandes logros,
otros se mantienen despiertos, se esfuerzan y los hacen posibles.*

- *“ Y si dieras tu pan al hambriento, y saciaras el alma afligida,
en las tinieblas nacerá tu luz y tu oscuridad será como el día”.*

AGRADECIMIENTOS

ANTONIO GARDUÑO R.

Por su ayuda como Profesor y como amigo. ¡ GRACIAS !

A LOS SINODALES Y PROFESORES.

Por compartir sus conocimientos en favor de nuevos profesionistas.

IMPORTADORA Y MANUFACTURERA BRULUART.

Por su valiosa ayuda en la elaboración de éste trabajo.

A MIS PADRES:

"Papá Nito y Mamá Mary" porque con su cariño, confianza y ejemplo he logrado realizar uno de mis anhelos

A MIS HERMANOS:

Ma Elena, Guadalupe, J Antonio y Carmen porque siempre estuvieron conmigo cuando más lo necesité.

A MIS DOS AMORES:

Rogelio. Por ser el "Motivo" que todos necesitamos para seguir adelante. ¡Gracias por ser como eres!

R. Giovany Porque a pesar de su corta edad sabe darme el ánimo necesario para no claudicar en mi trabajo y por ser mi eterna fuente de inspiración. Los amo

A MIS ABUELOS.

Pepito, Carmelita, Lolita y Juve porque sembraron en mí el ímpetu de "luchar" para alcanzar mis ideales

A MIS CUÑADOS:

Fernando y Guillermo por su ayuda incondicional y por sus consejos.

A MIS AMIGAS:

Verito y Claus por su cariño y amistad (¡Recuerden nuestra promesa!).

A MIS SOBRINOS:

Uriel, Javier, Humberto y Sinué porque junto con Giovany son la chispa de alegría en la casa

Y a todas aquellas personas que ocupan un lugar en mi corazón...

LAURA

DEDICATORIAS

A MIS PADRES.

"Paz y Nico. A quienes sería imposible explicarles todas las razones por las que les dedico este trabajo, pero sobre todo GRACIAS por su ayuda, cariño y comprensión".

A MI ESPOSA:

"Laura. Por darme ese cariño y apoyo necesario para salir adelante".

A MI HIJO:

"R. Giovany. Por iluminar con sus sonrisas todo mi ser y camino"

A MIS HERMANOS:

"Tere y Juan por su inapreciable amistad, apoyo y confianza".

A MIS PROFESORES:

"J. Antonio Garduño y Vicente Alonso. Por ser pilares fundamentales en mi desarrollo profesional".

ROGELIO

INDICE

Pág.

I	Abreviaturas	
II	Índice de figuras	
III	Índice de tablas	
1	Objetivos	1
2	Introducción	2
	2.1. Generalidades Sulfametoxazol	3
	2.2. Generalidades Trimetoprim	5
	2.3. Espectroscopía UV-VIS	9
3	Fundamentos	
	3.1. Método de Razones de absorbancia	15
	3.2. Método de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP)	24
4.	Desarrollo Experimental.	
	4.1 Calibración	30
	4.2. Predicción	33
5	Resultados y Discusión	36
6	Conclusiones	68
7.	Apéndice 1	70
8.	Apéndice 2	77
9	Apéndice 3	114
10	Bibliografía	119

ABREVIATURAS

SMX	Sulfametoxazol
TMP	Trimetoprim
SMX-TMP	Mezcla de sulfametoxazol y trimetoprim
Excip	Excipientes
MCP	Mínimos Cuadrados Parciales
RCP	Regresión del Componente Principal
PABA	Acido p-amino benzoico
T_h	Vector indicador (Score)
W_h	Vector de ponderación (loadings)
PRESS	Suma de cuadrados de los errores residuales de predicción
Outliers	Muestra desechable
MCC	Mínimos Cuadrados Clásicos
MCI	Mínimos Cuadrados Inversos
ANADEVA	Análisis de Variancia
Sol	Solución
U.V.	Ultravioleta
Vis	Visible
λ	Longitud de onda
λ_i	Longitud de onda de isoabsorción
Conc.	Concentración
Vol	Volúmen
NaOH	Hidróxido de Sodio
N	Normal
A	Analista
D	Día
E	Error
F.V	Fuente de Variación
G.L	Grados de libertad
S.C.	Suma de cuadrados
M.C.	Media de cuadrados

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO
1	Aditividad de las absorbancias de Sulfametoxazol y Trimetoprim disueltos en NaOH 0.1 N y Metanol respectivamente y mezcla de ambos, disuelta en Metanol-NaOH 0.1 N 1:1.
2	Espectro de Absorción Sulfametoxazol
3	Longitud de onda Vs W_h del Sulfametoxazol obtenido a partir del método de MCP.
4	Espectro de Absorción Trimetoprim
5	Longitud de onda contra W_h del Trimetoprim obtenido a partir del método de MCP
6	Linealidad del sistema de Sulfametoxazol empleando el método de Razones de absorbancia
7	Linealidad del sistema de Trimetoprim empleando el método de Razones de absorbancia
8	Linealidad del sistema de Sulfametoxazol empleando el método de MCP
9	Concentración adicionada contra t_h del Sulfametoxazol obtenido a partir del método MCP
10	Linealidad del sistema de Trimetoprim empleando el método de MCP
11	Concentración adicionada contra t_h del Trimetoprim obtenido a partir del método MCP
12	Linealidad del método de Sulfametoxazol empleando el método de Razones de Absorbancias
13	Linealidad del método de Trimetoprim empleando el método de Razones de Absorbancias
14	Linealidad del método de Sulfametoxazol empleando el método de MCP
15	Linealidad del método de Trimetoprim empleando el método de MCP
16	Esquemmatización de los conceptos precisión y exactitud, con una analogía de tiro al blanco.

ÍNDICE DE TABLAS

No.	TÍTULO
1	Mezcla de estándares de SMX y TMP en NaOH 0.1N manteniendo constante la concentración de SMX y variando la del TMP.
2	Mezcla de estándares de SMX y TMP en NaOH 0.1N variando la concentración de ambos.
3	Mezclas de SMX y TMP provenientes de comprimidos comerciales disueltos en Metanol-NaOH 0.1 N 1:1 para la etapa de Linealidad del Método.
4	Mezcla de SMX y TMP provenientes de comprimidos comerciales disueltos en Metanol-NaOH 0.1 N 1:1 para la etapa de Precisión y Exactitud del Método.
5	ANADEVA de las estimaciones de SMX obtenidas en la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia
6	ANADEVA de las estimaciones de TMP obtenidas en la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia.
7	ANADEVA de las estimaciones de SMX obtenidas en la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de MCP
8	ANADEVA de las estimaciones de TMP obtenidas en la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de MCP
9	ANADEVA de las estimaciones de SMX obtenidas en la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia.
10	ANADEVA de las estimaciones de TMP obtenidas en la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia.
11	ANADEVA de las estimaciones de SMX obtenidas en la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de MCP.
12	ANADEVA de las estimaciones de TMP obtenidas en la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de MCP.
13	ANADEVA para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de Precisión y Exactitud del Sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia (SMX).
14	ANADEVA para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de Precisión y Exactitud del Sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia (TMP).
15	ANADEVA para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de Precisión y Exactitud del Sistema empleando el Método de MCP (SMX)
16	ANADEVA para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de Precisión y Exactitud del Sistema empleando el Método de MCP (TMP).

- 17 ANADEVA para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de Precisión y Exactitud del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia (SMX).
- 18 ANADEVA para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de Precisión y Exactitud del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia (TMP).
- 19 ANADEVA para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de Precisión y Exactitud del Método empleando el Método de MCP (SMX).
- 20 ANADEVA para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de Precisión y Exactitud del Método empleando el Método de MCP (TMP).
- 21 Prueba de Exactitud del Sistema para el Método de Razones de Absorbancia
- 22 Prueba de Exactitud del Sistema para el Método de MCP.
- 23 Prueba de Exactitud del Método para el Método de Razones de Absorbancia.
- 24 Prueba de Exactitud del Método para el Método de MCP.
- 25 Concentraciones de SMX y TMP estimadas en la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de Razones de absorbancia
- 26 Concentraciones de SMX y TMP estimadas en la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de MCP.
- 27 Concentraciones de SMX y TMP estimadas en la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia.
- 28 Concentraciones de SMX y TMP estimadas en la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de MCP.
- 29 Análisis de Regresión para la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia (SMX).
- 30 Análisis de Regresión para la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia (TMP).
- 31 Análisis de Regresión para la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de MCP (SMX)
- 32 Análisis de Regresión para la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de MCP (TMP).
- 33 Análisis de Regresión para la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia (SMX).
- 34 Análisis de Regresión para la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia (TMP).
- 35 Análisis de Regresión para la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de MCP (SMX).
- 36 Análisis de Regresión para la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de MCP (TMP).
- 37 Estimación de concentraciones de SMX para la etapa de Precisión y Exactitud del Sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia (Analista 1).
- 38 Estimación de concentraciones de SMX para la etapa de Precisión y Exactitud del Sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia (Analista 2).
- 39 Estimación de concentraciones de TMP para la etapa de Precisión y Exactitud del Sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia (Analista 1).
- 40 Estimación de concentraciones de TMP para la etapa de Precisión y Exactitud del Sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia (Analista 2).
- 41 Estimación de concentraciones de SMX para la etapa de Precisión y Exactitud del Sistema empleando el Método de MCP (Analista 1).

- 42 Estimación de concentraciones de SMX para la etapa de Precisión y Exactitud del Sistema empleando el Método de MCP (Analista 2).
- 43 Estimación de concentraciones de TMP para la etapa de Precisión y Exactitud del Sistema empleando el Método de MCP (Analista 1).
- 44 Estimación de concentraciones de TMP para la etapa de Precisión y Exactitud del Sistema empleando el Método de MCP (Analista 2).
- 45 Estimación de concentraciones de SMX para la etapa de Precisión y Exactitud del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia (Analista 1)
- 46 Estimación de concentraciones de SMX para la etapa de Precisión y Exactitud del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia (Analista 2).
- 47 Estimación de concentraciones de TMP para la etapa de Precisión y Exactitud del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia (Analista 1).
- 48 Estimación de concentraciones de TMP para la etapa de Precisión y Exactitud del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia (Analista 2).
- 49 Estimación de concentraciones de SMX para la etapa de Precisión y Exactitud del Método empleando el Método de MCP (Analista 1).
- 50 Estimación de concentraciones de SMX para la etapa de Precisión y Exactitud del Método empleando el Método de MCP (Analista 2).
- 51 Estimación de concentraciones de TMP para la etapa de Precisión y Exactitud del Método empleando el Método de MCP (Analista 1).
- 52 Estimación de concentraciones de TMP para la etapa de Precisión y Exactitud del Método empleando el Método de MCP (Analista 2).

OBJETIVOS:

- Determinar las condiciones espectrofotométricas necesarias para aplicar el método de razones de absorbancia en la cuantificación de **Sulfametoxazol** y **Trimetoprim** en comprimidos.
- Determinar las condiciones espectrofotométricas necesarias para cuantificar **Sulfametoxazol** y **Trimetoprim** en comprimidos, con ayuda del método de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP)
- Proponer la técnica para la cuantificación de sulfametoxazol y trimetoprim en comprimidos

INTRODUCCIÓN.

En el análisis de medicamentos, lo ideal es utilizar técnicas analíticas que sean rápidas, sencillas, económicas y que además cumplan con criterios de precisión, exactitud, especificidad y reproducibilidad, principalmente. Sin embargo debido a la complejidad de algunos medicamentos y/o sus principios activos, tras su desarrollo, las técnicas de análisis precisas exactas y reproducibles, no siempre resultan rápidas, sencillas y económicas como se quisiera.

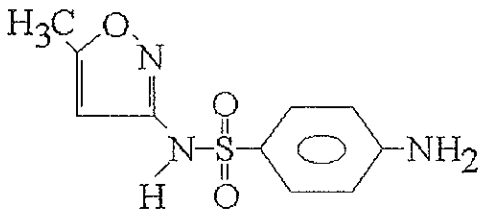
Dentro de las causas que complican el análisis de medicamentos, está la presencia de más de un principio activo en las formas farmacéuticas. Esto obliga, por lo general, a buscar primeramente un método de separación para poder realizar una determinación cuantitativa individual de los activos presentes.

Una alternativa para poder simplificar las técnicas de análisis de productos con más de un principio activo, es el análisis de multicomponentes por espectroscopía (Clarke's isolation and identification of drugs. 1986. pp 221, 988, 989, 1049-1050). Por este método, se han reportado análisis de mezclas de dos o tres componentes sin necesidad de su separación. Los análisis comúnmente se realizan utilizando dos o más longitudes de onda de lectura de las muestras. La estadística multivariable es una colección muy poderosa de herramientas matemáticas que pueden ser aplicadas al análisis químico cuando se requiere más de una medición (Beebe, K 1987. pp. 1007A - 1017A)

El análisis de multicomponentes por espectroscopía, ofrece otro campo de investigación en busca de la posibilidad de utilizar métodos accesibles, sencillos y de bajo costo, para análisis de rutina, que puedan sustituir técnicas complejas y que involucren un mayor costo cuando se analizan mezclas de principios activos.

GENERALIDADES.

SULFAMETOXAZOL (Rudy, B.C. 1973, pp. 467-486).



$C_{10}H_{11}N_3O_3S$ (253.28)

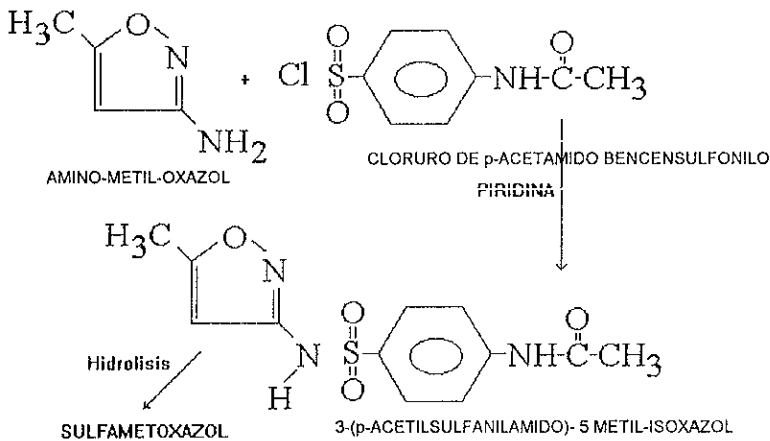
SINÓNIMOS.

4- amino-n-(5-metil-3-isoxasolil)bencensulfonamida.

Sulfisomezol sulfametil isoxazol, 3-sulfanilamido-5-metilisoxazol,(THE MERCK INDEX1989. pp. 8626, 8892).

N-(5-metil-3-isoxazolil) sulfanilamida

PREPARACIÓN.



DESCRIPCIÓN.

Polvo cristalino blanco, ligeramente opaco o amarillento; prácticamente inodoro; estable al aire; punto de fusión 168-172 °C (CLARKE'S ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS 1986. pp. 221, 988-989,1049-1050) (Litter, M. 1988.pp 749-759) $pka=1.69\pm 0.07$ y 5.81 ± 0.05 (Dahlan, R 1987.pp. 246-251)

SOLUBILIDAD

(mg/ml) 25°C

Etanol 95%	37.8
Metanol	90.3
NaOH 0.1 N	16 0
Isopropanol	8.8
Éter etílico	2.7
Cloroformo	2.3
Agua	0 5

FARMACOLOGÍA.

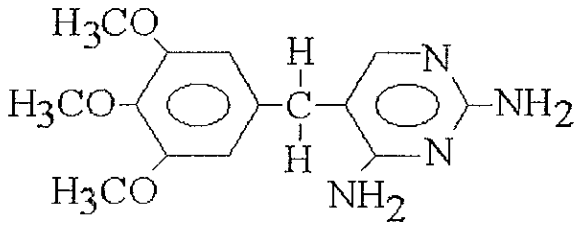
El sulfametoxazol es una sulfonamida de amplio espectro antibacteriano, su acción es bacteriostática. Tiene similitud química con el ácido p-aminobenzoico (PABA) por lo que inhibe competitivamente a la dihidropteroato sintetasa, enzima bacteriana responsable de la incorporación del PABA en ácido fólico para formar ácido dihidrofólico, evitando así la síntesis de los ácidos nucleicos, que son la base fundamental de la célula bacteriana.

FARMACOCINÉTICA.

Se absorbe rápida y adecuadamente en el aparato digestivo. Se distribuye fácilmente en el organismo (Litter, M. 1988 pp. 749-759). Se biotransforma rápidamente. Cerca del 15% en la sangre está presente como productos acetilados. Cerca del 25% de la dosis se excreta sin modificación en orina ácida y este porcentaje se eleva hasta el 40% o más en la orina alcalina. Cuando se administra con trimetoprim su biotransformación no sufre alteración.

DOSIS. 2 g iniciales, seguidos por 1 g dos o tres veces al día.

TRIMETOPRIM (Remington 1990 Vol 1 pp. 851. Vol. 2.pp. 1512,1595) .



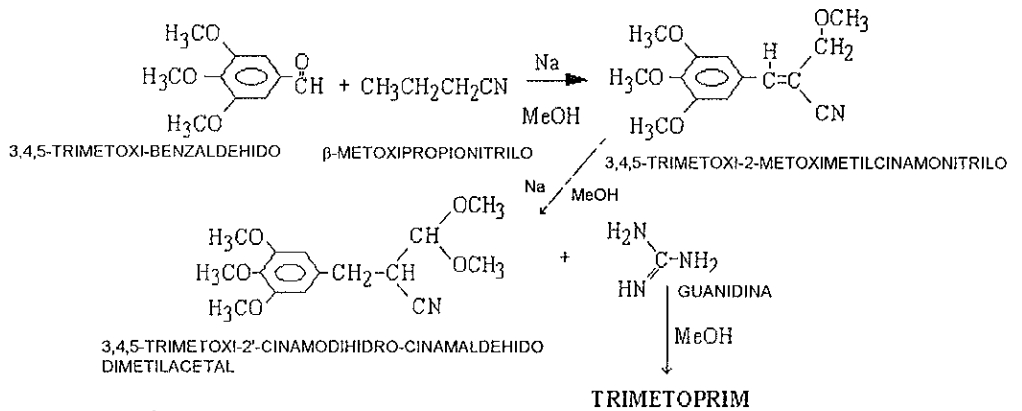
C₁₄H₁₈N₄O₃ (290.32)

SINÓNIMOS.

2,4- diamino-5-(3,4,5-trimetoxibencil)-pirimidina (Remington. 1990. Vol.1 pp. 851 Vol. 2 pp. 1512,1595).

5-[(3,4,5,-trimetoxifenil)metil]2,4-pirimidinadiamina

PREPARACIÓN(Remington. 1990 Vol 1 pp. 851. Vol. 2 pp. 1512,1595).



DESCRIPCIÓN

Cristales o polvo cristalino blanco a color crema; inodoros; de sabor amargo, punto de fusión 199-203 C (CLARKE'S ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS 1986. pp. 221, 988-989, 1049-1050) $pka= 7.02 \pm 0.05$ (Dahlan, R 1987.pp. 246-251) .

SOLUBILIDAD.	(mg/ml)25°C
Dimetilacetamida	138.6
Alcohol bencílico	72.9
Propilénglicol	25.7
Cloroformo	18.5
Metanol	12.1
Etanol 95%	8.1
Acetona	3.5
Isopropanol	1.2
Agua	0.4
Benceno	0.02

FARMACOLOGÍA.

El trimetoprim es un derivado sintético de la diaminopiridina que interfiere en el metabolismo de los folatos, con lo que evita la síntesis de los ácidos nucleicos. Se utiliza generalmente combinado con sulfonamidas, particularmente con sulfametoxazol.

A la combinación de trimetoprim con sulfametoxazol se le conoce como Co-trimoxazol que se usa como profiláctico primario y medicamento terapéutico para infecciones de vías respiratorias superiores (amigdalitis y faringitis), vías respiratorias inferiores (bronquitis, influenza, neumonía), infecciones de oído, nariz y garganta, infecciones genitourinarias, renales, de sistema digestivo, piel, tejido blando y oculares (Manius, G J 1978. pp. 445-475) (DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACÉUTICAS. 1984 pp. 87) .

El Co-trimoxazol presenta un sinergismo de potenciación al inhibir pasos secuenciales en la formación de ácido tetrahidrofólico, dicha inhibición se caracteriza por la acción independiente en dos pasos consecutivos. El sulfametoxazol inhibe a la enzima dihidropteroato sintetasa, entonces, disminuye la cantidad de sustrato de que dispone la dihidrofolato reductasa, cuya actividad se reduce aún más por la acción del trimetoprim. Por lo anterior, la acción bacteriostática puede volverse bactericida (Foye, W.O. 1984. pp. 589-594, 751, 765, 766).

La concentración mínima inhibitoria del sulfametoxazol disminuye cuando se utiliza junto con trimetoprim, que por ser el que posee mayor potencia (Connors, K:A1980. pp. 623-632) , se utiliza menor proporción 1:5 (trimetoprim-sulfametoxazol) en preparados comerciales.

FARMACOCINÉTICA.

El trimetoprim se absorbe rápidamente después de su administración oral (aprox. 2 horas) (Litter, M 1988,pp 749-759) .Se distribuye ampliamente en la mayor parte de los tejidos corporales, excepto sistema nervioso central. Las reacciones de biotransformación incluyen: oxidación del grupo metileno a un grupo hidroximetilo, n-oxidación, o-demetilación, hidroxilación y conjugación con ácido glucorónico o sulfato. Los productos de biotransformación son excretados en la orina. Aproximadamente el 50% se excreta sin alteración (Manius, G J. 1978. pp. 445-475) . Menos del 4% se elimina en las heces.

DOSIS.

400 mg diarios en promedio pero varía de acuerdo al tratamiento.

ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE

(Martín, A.1983 pp. 119-120) (Pernarowski, M. 1961.pp. 943-953) .

Todos los átomos y moléculas son capaces de absorber energía, de acuerdo a ciertas limitaciones relacionadas con su estructura. La espectroscopía de absorción se encarga del estudio de las dependencias que existen entre el tipo y cantidad de radiación absorbida por una molécula con su estructura así como de la relación entre la cantidad de radiación absorbida con el número de moléculas presentes. Entonces, la espectrometría de absorción se refiere a la medida de absorción electromagnética por átomos, moléculas o iones; si la medición se realiza utilizando celdas fotoeléctricas el término adecuado será espectrofotometría.

Los términos útiles para describir una onda de luz, son:

Longitud de onda: Es la distancia lineal desde cualquier punto de la onda hasta el punto correspondiente de la onda adyacente (sus unidades más comunes son los nanómetros $1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m} = 10\text{ \AA} = 1\mu\text{m}$).

Frecuencia: Es el número de ondas que pasan por un punto dado por unidad de tiempo (sus unidades son seg^{-1})

Debido al campo eléctrico asociado con la luz una partícula cargada, como un electrón, colocada en la ruta de una onda de luz, experimentará una fuerza y será capaz de absorber energía del campo eléctrico de la onda de luz. Si el electrón de una molécula absorbe energía del campo eléctrico de una onda de luz, pasará de un nivel energético menor (estado basal o fundamental) a otro mayor (estado excitado) en la molécula Sin embargo, no todas las frecuencias de luz pueden ser absorbidas por electrones moleculares. Al considerar a la luz como un flujo de partículas, cada partícula (fotón) tendrá asociada una cantidad definida de energía, la cual sólo depende de su frecuencia, entonces:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

Donde:

h = constante de Planck

λ = longitud de onda

ν = Frecuencia

c = velocidad de la luz.

Una condición necesaria para que la luz de una frecuencia dada sea absorbida por una molécula en su estado basal es que se cumpla la relación:

$$E_e - E_b = h\nu$$

Donde:

E_e = energía del estado excitado.

E_b = energía del estado basal

Es decir, la diferencia de energía entre los dos niveles energéticos debe ser igual a la energía del fotón absorbida, si ésta condición no se cumple, se dice entonces que la molécula es transparente a la luz de ésta frecuencia.

TRANSICIONES ELECTRÓNICAS.

La energía electrónica más baja posible que una molécula puede tener es referida como su estado electrónico basal y corresponde al estado en el cual todos los electrones están en los orbitales de menor energía disponibles. La promoción de un electrón desde un orbital que está ocupado en el estado basal a uno que normalmente está desocupado en el mismo estado resulta en la formación de un estado electrónicamente excitado de la molécula. Al salto de energía de un nivel de estado basal a otro estado excitado, se le conoce como transición.

Las transiciones electrónicas de moléculas, que involucran absorción de luz en las regiones visible y de ultravioleta cercano (750-400 nm y 400-200 nm respectivamente) son llamados transiciones de singulete.

Las moléculas absorberán luz de una longitud de onda particular, de acuerdo al tipo de transición electrónica asociada con la absorción (Monson; J. W 1984. pp 456-459) y dependerá del tipo de orbitales presentes en la molécula, siendo de mayor importancia para región UV-VIS, los electrones de los orbitales externos.

En las moléculas orgánicas que absorben en la región UV-VIS son importantes los siguientes tipos de electrones.

1) Electrones en enlaces sencillos σ . Cada átomo participante en el enlace contribuye con un orbital atómico para formar el nuevo orbital σ^* , los dos electrones que lo ocupan pueden provenir, uno de cada átomo (enlace covalente), o ambos del mismo átomo (enlace covalente coordinado), por lo que se requiere de gran energía para promoverlos a orbitales desocupados, por consiguiente su absorción se observará en el UV lejano.

2) Electrones en orbitales π , presentes en los dobles y triples enlaces. Estos enlaces son más débiles que los σ , por lo que se requiere de menos energía para la excitación de sus electrones, por lo tanto son los principales responsables de la absorción de las moléculas en la región UV-VIS.

3) Electrones de no enlace conocidos como electrones n como los del oxígeno, azufre, nitrógeno y halógenos. Debido a que estos electrones están en un nivel energético mayor que los π o σ , deben considerarse contribuyentes potenciales de rasgos espectrales distintivos de las moléculas que los poseen.

Cada molécula tiene asociados a los orbitales moleculares de baja energía varios orbitales de alta energía, los cuales están normalmente desocupados en ausencia de fuertes perturbaciones y son llamados orbitales moleculares de antienlace

APLICACIONES CUANTITATIVAS.

(Clarke's Isolation and Identification of Drugs. 1986. pp. 221, 988-989, 1049-1050).

La espectroscopía UV-VIS encuentra su principal aplicación en el análisis cuantitativo cuando se encuentran bandas con picos definidos dentro de un margen estrecho de longitudes de onda en el espectro.

La base fundamental del análisis espectroscópico cuantitativo recae en dos leyes principalmente:

1) Ley de Lambert. Establece que para una concentración dada de un sistema absorbente, la intensidad transmitida disminuye exponencialmente con incremento de la longitud de la ruta.

2) Ley de Beer. Establece que para una longitud de ruta definida, la intensidad transmitida disminuye exponencialmente con incremento en la concentración del sistema absorbente homogéneo.

Combinando las dos leyes se tiene la ecuación:

$$A = k b C$$

El término k en la ecuación de Beer es una constante de proporcionalidad que es independiente del paso de la luz e intensidad de la radiación incidente. Se conoce como absorptividad; y depende de la temperatura, disolvente, estructura molecular del soluto absorbente y de la longitud de onda. Las unidades de k se determinan a partir de las de b y C , cuando b está en cm y C en g/l, se expresa en l/g-cm (connotación reconocida por convención en la unión americana y definida como la absorbancia de una solución de 1 g/l en una celda de un cm).

Si C es una concentración molar, k se cambia por el símbolo ϵ y se denomina absorptividad molar, sus unidades son l/mol-cm

1%

Cuando C se expresa en porcentaje peso volumen, A se escribe $A_{1\text{cm}}$ o $A(1\%, 1\text{ cm})$, se abrevia A^1 y puede denominarse absorptividad específica.

1

La ecuación de la ley de Beer representa una línea recta que puede construirse experimentalmente determinando las absorbancias de varias soluciones con diferentes concentraciones sucesivas de una especie absorbente; las lecturas deben hacerse bajo las mismas condiciones de disolución, temperatura y longitud de onda. Cuando se representa la absorbancia en función de la concentración, se obtiene lo que se denomina curva de calibración. De esta curva se obtiene el intervalo que se ajusta a la ecuación de la ley de Beer (que representa una línea recta). La pendiente de la recta representa la absorptividad.

La aplicación cuantitativa de la ecuación de la ley de Beer se obtiene al determinar la absorbancia de una solución de concentración desconocida e interpolando en la curva de calibración de la sustancia correspondiente, o despejando C en la ecuación de la ley de Beer y sustituyendo los valores de A , k y b .

Otras aplicaciones de la ley de Beer son:

- a) Determinación de constantes de equilibrio
- b) Monitoreo de la cinética de degradación de un fármaco
- c) Determinación de estequiometrías complejas

ERRORES EN ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN.

La ley de Beer representa limitaciones por el hecho de no tomar en consideración los efectos del pH, temperatura, longitud de onda o interacciones soluto-solvente y soluto-soluto; por lo anterior la ley de Beer se aplica generalmente a soluciones diluidas en que estas interacciones son insignificantes.

En realidad algunas de las desviaciones de la ley de Beer son aparentes pues son debidas a algún proceso o procesos secundarios; estos pueden ser los errores instrumentales y los errores debidos a factores químicos.

Dentro de los errores instrumentales están los relativos a la concentración. El intervalo óptimo de concentraciones medibles es aquel en que se demuestre que hay linealidad.

Otro factor instrumental es la capacidad del aparato para proporcionar luz monocromática. Además, para evitar errores por luz desviada, deben de evitarse las longitudes de onda de los extremos del intervalo de UV-VIS.

Los errores por factores químicos surgen de varias fuentes. Una de ellas es el control de pH que afecta la ionización de una molécula, lo que afecta en gran medida su espectro, un cambio en el estado de protonación puede producir una variación en la longitud de onda máxima.

Por último otro efecto que hay que considerar para evitar los errores por factores químicos, son las interacciones soluto-soluto en que hay que tomar en cuenta la agregación molecular y los equilibrios de asociación-disociación influidos también por el pH, además de reacciones ácido-base y de formación de complejos

$$\frac{A^1}{A^2} = \frac{k_x^1 \cdot b \cdot C_x}{k_x^2 \cdot b \cdot C_x} = \frac{k^1}{k^2} = Q : \lambda_1, \lambda_2 \quad (3)$$

En la ecuación 3 se observa que la razón de dos valores de absorbancia es igual a la razón de sus absorptividades correspondientes. Tal razón es una constante designada como Q (por el término en inglés "Quotient = cociente"), término por el cual éste método también se conoce como "Método de análisis Q".

Para una mezcla binaria la absorbancia total A_T a la longitud de onda λ_1 es igual a la suma de las absorbancias debidas a X y a Y, expresando esto con cada una de las expresiones de la ley de Beer para los compuestos X y Y ;

$$A_T^1 = k_x^1 \cdot b \cdot C_x + k_y^1 \cdot b \cdot C_y \quad (4)$$

De igual modo la absorbancia total a la longitud de onda λ_2 será:

$$A_T^2 = k_x^2 \cdot b \cdot C_x + k_y^2 \cdot b \cdot C_y \quad (5)$$

Al dividir 4 entre 5 y considerar la longitud de la celda como $b = 1$,

$$\frac{A_T^1}{A_T^2} = \frac{k_x^1 \cdot C_x + k_y^1 \cdot C_y}{k_x^2 \cdot C_x + k_y^2 \cdot C_y} = Q_0 \text{ (razón de absorbancia)} \quad (6)$$

Dividiendo cada término de la derecha entre $(C_x + C_y)$ y sustituyendo:

$$\frac{C_x}{C_x + C_y} \text{ por } F_x \quad \text{o} \quad \frac{C_y}{C_x + C_y} \text{ por } F_y$$

$$Q_0 = \frac{k_x^1 \cdot F_x + k_y^1 \cdot F_y}{k_x^2 \cdot F_x + k_y^2 \cdot F_y} \quad (7)$$

Esta ecuación puede simplificarse si la longitud de onda λ_2 es una longitud de onda de isoabsorción λ_i , en la cual los dos compuestos tienen la misma absorptividad k_i . La suma de $F_x + F_y$ es igual a 1, por lo tanto $F_y = 1 - F_x$, sustituyendo en la ecuación 7,

$$Q_0 = \frac{k_x^1 \cdot F_x + k_y^1 (1 - F_x)}{k_i F_x + k_i (1 - F_x)} \quad (8)$$

al reorganizar 8 tenemos,

$$Q_0 = F_x \left[\frac{k_x^1}{k_i} - \frac{k_y^1}{k_i} \right] + \frac{k_y^1}{k_i} \quad (9)$$

k_x^1 / k_i corresponde a la razón de absorptividades para el compuesto x por lo que se puede sustituir por un símbolo Q_x , mientras que k_y^1 / k_i se puede sustituir por otro Q_y que corresponderá a la razón de absorptividades para el compuesto y puro por consiguiente.

$$Q_0 = F_x (Q_x - Q_y) + Q_y \quad (10)$$

La ecuación anterior representa una línea recta con pendiente igual a $(Q_x - Q_y)$ e intercepto Q_y

Para obtener esta ecuación en función de concentraciones absolutas, despejamos F_x de la ecuación 10 y sustituimos por; $\frac{C_x}{C_x + C_y}$, entonces,

$$\frac{C_x}{C_x + C_y} = \frac{Q_0 - Q_y}{Q_x - Q_y} \quad (11)$$

Despejando C_x , se tiene:

$$C_x = \frac{Q_0 - Q_y}{Q_x - Q_y} (C_x + C_y) \quad (12)$$

Si retomamos la ecuación de la absorbancia de la mezcla en el punto de isoabsorción, obtenemos:

$$A' = k_i (C_x + C_y) \quad (13)$$

De donde:

$$(C_x + C_y) = \frac{A'}{k_i} \quad (14)$$

sustituyendo 14 en 11;

$$C_x = \frac{[Q_o - Q_y]}{[Q_y - Q_x]} \frac{A'}{k_i} \quad \text{ó} \quad C_y = \frac{[Q_o - Q_x]}{[Q_x - Q_y]} \frac{A'}{k_i} \quad (15)$$

De la ecuación 15 se puede determinar la concentración del compuesto x y de manera similar se establece una ecuación para y.

Hasta aquí se tienen las ecuaciones para aplicar el método de análisis Q, bajo consideraciones teóricas. En los trabajos donde se reporta la aplicación del método de análisis Q (Pernarowski, M. 1961.p.p. 943-946) (Pernarowski, M. 1961 pp 946-53), también se habla de limitaciones que recaen principalmente, en las limitaciones de la espectrometría, cuya exactitud recae, a su vez, en la validez de la ley de Beer.

Un factor que afecta la exactitud del análisis es la proporción de las especies absorbentes, así una mezcla de proporción 50:50 dará resultados más exactos que una mezcla de proporción 90:10, en la que pequeñas variaciones del componente minoritario en la mezcla provocará grandes diferencias.

Las características espectrales juegan un papel importante en la exactitud del método, principalmente la intensidad de absorción a las dos longitudes de onda utilizadas, ya que afecta la pendiente de la curva Q vs Fx (entre menor sea ésta, el análisis es menos exacto).

Una mezcla factible de ser utilizada para aplicar el método de análisis de multicomponentes, es la formada por sulfametoxazol y trimetoprim. Esta mezcla ha sido objeto de varios estudios en los que se han utilizado diferentes longitudes de onda de lectura y fundamentando las determinaciones en diversos métodos matemáticos (Pernarowski, M. 1961, pp 943-946).

FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS MULTIVARIADO

(López de Alba, P. L. 1996.pp 34-44)

En el análisis cuantitativo se busca alguna relación lineal entre la medición y la concentración de un componente en particular. En espectroscopía, la Ley de Beer define la relación entre la absorbancia y la concentración; así, para una trayectoria de luz constante a través de la disolución:

$$A_1 = C_1 K_1 \quad (16)$$

donde A_1 es la absorbancia a cierta longitud de onda y C_1 y K_1 la concentración y absorptividad del componente, respectivamente. Esto implica que es posible conocer la concentración de cualquier especie (si el estudio es libre de interferencias) tras medir simplemente la absorbancia de una muestra de concentración conocida y deducir la absorptividad, utilizando ésta en cualquier cálculo posterior. Como se observa, la ecuación puede resolverse estudiando una sola muestra; sin embargo, ante las limitaciones por ruido, error en la manipulación de las soluciones, etc., se recomienda analizar cierto número de muestras de distinta concentración, trazar los resultados y localizar la línea recta que mejor comprenda los puntos mediante lo que se conoce matemáticamente como ajuste por mínimos cuadrados, el cual encuentra simplemente la ecuación de la recta donde el error total entre las absorbancias sea mínimo

Si la mezcla contiene dos componentes, es posible establecer dos ecuaciones:

$$A_1 = C_1 K_1 + E_1 \quad (17)$$

$$A_2 = C_2 K_2 + E_2 \quad (18)$$

donde A_1 y A_2 son las absorbancias a dos longitudes de onda diferentes, K_1 y K_2 los coeficientes de absorptividad de los dos componentes a esas longitudes de onda, E_1 y E_2 los errores residuales obtenidos a partir de la línea ajustada por mínimos cuadrados y las absorbancias reales (los errores serán siempre cero cuando se ajusten sólo dos puntos). Nuevamente es fácil dar solución a cada ecuación de manera independiente mientras la absorbancia de un componente no interfiera con la absorbancia del otro (bandas bien resueltas). Partiendo de que la Ley de Beer es aditiva, también es permisible resolver las ecuaciones simultáneamente y así

manejar el caso donde existe interferencia entre las dos absorbancias dentro de un espectro (bandas traslapadas).

$$A_1 = C_1 K_{11} + C_2 K_{21} + E_1 \quad (19)$$

$$A_2 = C_1 K_{12} + C_2 K_{22} + E_2 \quad (20)$$

Sin embargo, solucionar ecuaciones simultáneas manualmente se convierte en algo tedioso cuando se trata de más de dos componentes.

Un camino particularmente eficiente para resolver ecuaciones simultáneas es utilizar métodos matriciales, pues si bien implican numerosos cálculos, éstos pueden efectuarse por computadora. En términos matriciales las ecuaciones anteriores se expresan así :

$$A_{(n,p)} = C_{(n,m)} K_{(m,p)} + E_{(n,p)} \quad (21)$$

En éstas ecuaciones "n" es el número de disoluciones patrón, "p" el número de valores de longitud de onda y "m" el número de componentes. Por ejemplo, para dos muestras, dos componentes y dos longitudes de onda, las ecuaciones son :

Para la muestra # 1:

$$A_{11} = C_{11} K_{11} + C_{12} K_{21} + E_{11} \quad (22)$$

$$A_{12} = C_{11} K_{12} + C_{12} K_{22} + E_{12} \quad (23)$$

Para la muestra # 2.

$$A_{21} = C_{21} K_{11} + C_{22} K_{21} + E_{21} \quad (24)$$

$$A_{22} = C_{21} K_{12} + C_{22} K_{22} + E_{22} \quad (25)$$

O en notación matricial:

$$A = CK + E \quad (26)$$

Utilizando álgebra matricial es fácil encontrar la solución de éstas expresiones por computadora y plantear la Matriz de Calibración (o Matriz de Coeficientes de Absortividad), que

proporciona la línea (o líneas) que se ajuste mejor a los datos por mínimos cuadrados. Una vez resuelta la matriz K , puede utilizarse para predecir concentraciones de muestras desconocidas

VECTORES INDICADORES ("SCORES, t_i ") Y DE PONDERACIÓN ("LOADINGS, w_i ").

En el ejemplo de la mezcla de dos componentes, hay dos variantes independientes en el sistema; el espectro puede recrearse sumando los espectros puros de A y B. En la realidad, el caso no es tan simple, ya que generalmente hay algunas variaciones instrumentales o de la muestra. Además, las interacciones entre los dos componentes pueden dar origen a compuestos intermediarios o simplemente cambiar la forma de los espectros de los componentes puros. Si estos espectros se calculasen de alguna manera, podrían sumarse las cantidades apropiadas de cada uno, integrarse y ajustarse para obtener el espectro desconocido y, finalmente, relacionarlas con las concentraciones de los componentes. Por convención, éstas cantidades se conocen como vectores indicadores ("scores") y los espectros se denominan vectores de ponderación ("loadings"). Tal proceso reduce enormemente la complejidad de los datos, al permitir reconstruir o modelar cualquier dato desconocido con el análisis de un pequeño número de " w_i ", además, como siempre se utilizan los mismos " w_i " para modelar los espectros desconocidos, las únicas diferencias entre espectros de componentes con distinta concentración es la cantidad de cada " w_i " adicionado. Los " t_i " son únicos para cada componente y espectro patrón y pueden usarse en lugar de las absorbancias.

En el método de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP), la descomposición espectral implica ponderar las concentraciones, lo que significa que los espectros de disoluciones con altas concentraciones son considerados de mayor peso que aquellos de bajas concentraciones. Por ello, los "vectores de Ponderación" extraídos del método de MCP son un tanto distintos de los obtenidos con el método de Regresión del Componente Principal (RCP) en el cual los espectros son descompuestos basándose en las máximas variancias entre los datos. La idea del método de MCP es introducir tanta información sobre concentraciones como sea posible en los primeros "vectores de Ponderación".

SELECCIÓN DEL NÚMERO ÓPTIMOS DE FACTORES.

El camino más efectivo para establecer el número óptimo de factores es la aplicación del PRESS (Suma de los Cuadrados de los Errores Residuales de Predicción) Si conceptualmente la

técnica es simple requiere de numerosos cálculos por computadora. Por ejemplo, para el análisis de 10 muestras de concentraciones conocidas, los pasos a seguir son.

1.- Separación de una de las disoluciones. Ejecución de la descomposición con los nueve restantes para un factor (" w_h ") y cálculo de la matriz de calibración mediante regresión.

2 - Uso de la matriz de calibración para la predicción de la concentración de la muestra que quedó fuera.

3.- Establecer la diferencia entre la concentración calculada y la real, para elevarla al cuadrado. El resultado será un valor de PRESS simple.

4.- Separación de otra muestra de la serie de calibración e incorporación al grupo de la que se había excluido anteriormente, para repetir el proceso hasta que las diez mezclas hayan sido separadas y computadas para un factor. Entonces, sumar los cuadrados de los errores residuales calculados a los errores previos.

5.- Retorno al inicio del procedimiento utilizando dos factores, y así sucesivamente hasta un valor razonable.

Los valores del PRESS son un indicador de qué tan bien se están evaluando las concentraciones de las soluciones patrón con cada número de factores

DETECCIÓN DE MUESTRAS DESECHABLES ("OUTLIERS")

La detección de las muestras desechables resulta igualmente importante que el diseño y medición adecuada de las disoluciones patrón o la elección del número de factores óptimo para la elaboración de la matriz, ya que si una o más muestras son erróneas, darán lugar a enormes errores en la calibración y finalmente, falsos resultados en la predicción de muestras reales. Una de las disoluciones patrón puede tener su valor de concentración incorrecto debido a equivocaciones en la calibración primaria (concentration "outliers"), o a la medición del espectro por una manipulación inadecuada de la muestra u otros errores relacionados (spectral "outliers"). Una poderosa herramienta para la detección de muestras desechables resulta ser el método de dejar uno fuera, descrito anteriormente en el cálculo del PRESS.

ANÁLISIS MULTIVARIADO: MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES

El análisis multivariado se refiere a una gama de técnicas descriptivas e inferenciales. (Jobson J. D. 1992 pp. 1-3).

La estadística multivariada es una colección de poderosas herramientas matemáticas que pueden ser aplicadas en análisis químico cuando más de un componente está siendo analizado en la muestra (Beebe, K. 1987. pp. 1007A - 1017A) (Despaigne, F 1997.pp 3391).

El método de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP) está relacionado con métodos de calibración multivariada tales como Mínimos Cuadrados Clásicos (MCC), Mínimos Cuadrados Inverso (MCI) y Regresión del Componente Principal (RCP), que han sido usados en análisis espectrales cuantitativos. El método MCP analiza un componente químico a la vez usando el algoritmo correspondiente (Haaland M.,D. 1988. pp. 1193 - 1202).

Este método es muy popular en el análisis cuantitativo ya que ha sido utilizado con diversos tipos de análisis, como los espectroscópicos y cromatográficos. Estudios recientes muestran que el método de MCP es una mejor alternativa que el uso de los métodos de MCC y RCP pues es un método más robusto, es decir, los parámetros del modelo no cambian mucho cuando se toman en cuenta nuevas muestras de calibración en la población (Gerald, P. 1986 pp 1-17). El método de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP) es una importante ganancia en algunos campos de la química analítica, física, clínica y control de procesos industriales, en los cuales ha aportado beneficios (Gerald, P. 1986.pp 1-17).

Este método consta de dos etapas: Calibración y Predicción (Haaland M, D 1988. pp. 1193 - 1202).

CALIBRACIÓN

Puede decirse que calibrar consiste en usar datos empíricos y conocimientos previos para establecer como predecir información cuantitativa desconocida. Y a partir de mediciones disponibles X , a través de alguna función matemática de transformación. La calibración

multivariada consiste entonces en utilizar muchas variables medidas $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$, simultáneamente para cuantificar alguna variable y . Por ejemplo, las variables x pueden ser mediciones cromatográficas (Jimena G., J. A. 1996. pp 273-278) (Garrido F., A. 1996. pp 27-38) ó espectroscópicas y la variable objeto concentración del analito.

Para poder predecir la información Y a partir de las mediciones X , debe identificarse la fórmula de predicción $Y = f(X)$ a través de uno de los métodos ya existentes de calibración multivariada. Para la expresión $Y = f(X)$, los datos X son registrados en un instrumento y transformados en Y por un programa determinado; la función tiene una forma matemática particular basada en un modelo que establece la relación X y Y . Así, la calibración multivariante es una técnica quimiométrica que requiere de una modelación matemática multivariante y los parámetros de los modelos deben estimarse a partir de datos empíricos.

De este modo, con la calibración multivariante es posible construir modelos que permitan determinar con gran confianza información a gran velocidad y partiendo de datos no tan selectivos, simplificando enormemente el análisis. Al efectuar la calibración, el usuario especifica el número de componentes y sus respectivas concentraciones en cada uno de los espectros, selecciona la región del espectro que proporcione más datos sobre el comportamiento del sistema y a partir de esta información, plantea la matriz de calibración que le servirá para "predecir" la concentración de los componentes en cada muestra real que analice bajo las mismas condiciones.

La calibración del método de MCP se compone de una serie de pasos simplificados de los métodos de MCC y MCI.

PREDICCIÓN

El modelo de calibración se usa en la predicción teniendo en cuenta que los objetos a estimar obedecen a la misma estructura del modelo utilizado en la calibración. Así, la predicción es un paso de prueba (Haaland M., D. 1988 pp. 1093 - 1202) (López de Alba, P. L. 1996. pp 34-44)

ALGORITMO DEL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (MCP).

(Haaland M.,D 1988. pp. 1993 - 1202).

Calibración:

PASO 1: Pretratamiento de los datos. Centrar A y c: La media del espectro de calibración es sustraída a cada valor del espectro (A) y la media de calibración de las concentraciones es sustraída de cada concentración (c).

"A" es la matriz n x p del espectro de calibración,"c" es la matriz n x m de las absorbancias del componente , "n" son las calibraciones estándar, "p" son las absorbancias, "m" los componentes químicos. Con letras mayúsculas se designa a las matrices, con una comilla a una matriz o vector transpuesto y los vectores se representan con letras minúsculas.

PASO 2: Formación del vector de ponderación ("loading") w_h :

$$A = c w_h' + E_A \quad (27)$$

$$w_h = A'c / c'c \quad (28)$$

Este paso del algoritmo de Mínimos Cuadrados Parciales es en realidad una calibración de Mínimos Cuadrados Clásicos (MCC) en la cual los análisis se ejecutan suponiendo que la concentración de uno de los componentes se conoce de las muestras de calibración. Una vez obtenidos los valores de w_h se normalizan. Este paso pertenece al modelo de Regresión del Componente Principal (RCP) en donde la información de la concentración es directamente introducida en el cálculo de los vectores de carga.

PASO 3: Formación del vector indicador ("score") t_h :

$$A = t_h w_h' + E_A \quad (29)$$

$$t_h = A w_h \quad (30)$$

Este paso del algoritmo de MCP es similar al paso de predicción del modelo de MCC, en el cual se supone que solo está presente el componente de interés en las muestras de calibración; w_1 se usa como un componente en el paso de predicción del modelo de MCC para estimar la cantidad (ó concentración) del componente espectral w_h en cada espectro de calibración.

El vector t_1 representa la intensidad o cantidad del primer vector de ponderación en las muestras de calibración para el sistema coordinado de MCP, con éste se puede determinar la cantidad presente de componente puro en A y c.

PASO 4: Al relacionar el vector indicador t_h y las concentraciones, se tiene:

$$c = v_h t_h + e_c \quad (31)$$

$$v_h = t_h' c / t_h' t_h \quad (32)$$

El vector indicador t_h puede ser relacionado con las concentraciones usando una regresión de mínimos cuadrados lineal.

PASO 5. Formación de b_h vector cargador para A:

$$A = t_h b_h' + E_A \quad (33)$$

$$b_h = A' t_h / t_h' t_h \quad (34)$$

En donde b_h es el vector cargador de $n \times 1$ en el MCP. A diferencia del primer vector cargador del PCR el primer vector cargador del MCP, b_1 , no explica la máxima variancia en el espectro de calibración.

PASO 6: Cálculo de residuales en A y c:

espectros residuales $E_A = A - t_h b_h'$ (35)

concentraciones residuales $e_c = c - v_h t_h$ (36)

El producto del vector indicador (t_h) y vector carga (b_h) es una aproximación del MCP para el espectro de calibración. El producto de v_h por t_h representa la concentración estimada por el método de MCP basado en el espectro

PASO 7. Incrementar h, sustituyendo E_A para A y e_c para c en el paso 2 y continuar para obtener tantos factores como sea necesario para optimizar el modelo (PRESS mínimo)

Predicción:

Esta etapa se usa para encontrar la concentración de muestras desconocidas mediante el uso de los datos obtenidos durante la calibración.

PASO 1: Centrar "a" usando los datos de la calibración, es decir, sustraer la media de la calibración a cada uno de los valores espectrales.

PASO 2: Cálculo de la variable latente

$$t_h = w_h \hat{a} \quad (37)$$

PASO 3: Cálculo de la concentración

$$c_h = c_{h-1} + v_h t_h \quad (38)$$

PASO 4: Cálculo de residuales.

$$e_h = e_{h-1} - b_h t_h \quad (39)$$

PASO 5 Incrementar h: sustituir e_h por a y repetir desde el paso 2, hasta completar el número de "h" utilizadas en la calibración.

Nota: W_h , V_h y b_h ; se obtuvieron en la etapa de calibración, C_0 es la media de las concentraciones del analito en las muestras de calibración y $e_0 = a$

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Tabla 1.

SOLUCIÓN	VOL. SOL. SMX (ml) 50 µg/ml	VOL. SOL. TMP (ml) 10 µg/ml	VOL. FINAL (ml)	CONC. SMX (mcg/ml)	CONC. TMP (mcg/ml)
1	3	3	10	15	3
2	3	4	10	15	4
3	3	5	10	15	5
4	4	3	10	20	3
5	4	4	10	20	4
6	4	5	10	20	5
7	5	3	10	25	3
8	5	4	10	25	4
9	5	5	10	25	5

Mezcla de estándares de SMX y TMP en NaOH 0.1 N, manteniendo constante la concentración de SMX y variando la del TMP.

Cada mezcla se preparó por duplicado y se leyeron a las longitudes de onda establecidas para cada método. Este proceso fue realizado por dos analistas dos días diferentes cada uno.

2). Estimación de parámetros del modelo.

a) Método de Razones de Absorbancia. Ecuación 10

b) Mínimos Cuadrados Parciales (Algoritmo de Calibración).

3) Estimación de concentraciones

Para la estimación de las concentraciones de sulfametoxazol y trimetoprim se utilizaron los métodos de:

a) Razones de Absorbancia : ecuaciones 15

b) Mínimos Cuadrados Parciales (Algoritmo de Predicción).

4). Análisis estadístico.

A los datos obtenidos con cada método se les realizó un Análisis de Variancia (ANADEVA) para determinar la linealidad del sistema.

Precisión y exactitud del sistema

1) Se prepararon 3 soluciones de mezclas estándar de sulfametoxazol y trimetoprim en NaOH 0.1 N con concentraciones constantes de ambos como se muestra en la tabla 2:

Tabla 2. Mezcla de estándares de SMX y TMP en NaOH 0.1 N, variando las concentraciones de ambos

SOLUCIÓN	SOL.SMX (ml) 50 µg/ml	SOL.TMP (ml) 10 µg/ml	VOL.FINAL (ml)	CONC. SMX (mcg/ml)	CONC. TMP (mcg/ml)
1	3	3	10	15	3
2	4	4	10	20	4
3	5	5	10	25	5

Cada solución se preparó por sextuplicado y fueron leídas a las longitudes de onda establecidas para cada método. Este proceso también fue realizado por dos analistas dos días diferentes cada uno.

2) Estimación de concentraciones

Para la estimación de las concentraciones de sulfametoxazol y trimetoprim se utilizaron los métodos de:

a) Razones de Absorbancia · ecuacion 15.

b) Método de Mínimos Cuadrados Parciales· (Algoritmo de Predicción).

3) Análisis estadístico.

A los datos obtenidos con cada método se les realizó un Análisis de Variancia (ANADEVA) para determinar la repetibilidad entre analistas y entre días

PREDICCIÓN: Linealidad del Método

1) Se trabajó con mezcla estándar de sulfametoxazol y trimetoprim preparadas de acuerdo al siguiente procedimiento:

a) Mezcla estándar.

- 1.- Tomar 4 ml de solución de sulfametoxazol de concentración 50 mcg/ml.
- 2.- Verter en matraz volumétrico de 10 ml.
- 3.- Tomar 4 ml de solución de trimetoprim 10 mcg/ml.
- 4.- Verter en matraz volumétrico que contiene el sulfametoxazol 50 mcg/ml.
- 5.- Llevar al volumen de aforo con NaOH 0.1N.

Se trabajó también con comprimidos comerciales que contenían sulfametoxazol y trimetoprim (400-80 mg/comprimido respectivamente) estos fueron disueltos en una mezcla de Metanol-NaOH 0.1 N y se prepararon soluciones de acuerdo a la tabla 3:

Tabla 3. Comprimidos comerciales de SMX y TMP disueltos en metanol-NaOH 0.1 N (1:1). Soluciones utilizadas en la etapa de linealidad del método

SOLUCIÓN	mg DE POLVO	CONTENIDO DE SMX(mg)	CONTENIDO DE TMP(mg)	CONC. SMX (mcg/ml)	CONC. TMP] (mcg/ml)
1	75.20	50.00	10.00	16.00	3.20
2	84.60	56.75	11.25	18.00	3.60
3	94.00	62.50	12.50	20.00	4.00
4	103.40	68.75	13.75	22.00	4.40
5	112.80	75.00	15.00	24.00	4.80

Cada solución se preparó por triplicado y se obtuvieron las absorbancias a las longitudes de onda establecidas para cada método. Este procedimiento fue realizado por dos analistas en dos días diferentes cada uno.

2) Estimación de concentraciones.

Para la estimación de las concentraciones de sulfametoxazol y trimetoprim se utilizaron los métodos de:

- a) Razones de Absorbancia : ecuación 15
- b) Método de Mínimos Cuadrados Parciales: (Algoritmo de predicción)

3) Análisis estadístico.

A los datos obtenidos con cada método se les realizó un Análisis de Variancia (ANADEVA) para determinar la linealidad del método

Precisión y exactitud del método.

1) En esta fase se trabajó con mezclas físicas y placebos cargados con diferentes proporciones de la mezcla de sulfametoxazol y trimetoprim de acuerdo a la tabla 4.

Tabla 4. Comprimidos comerciales de SMX y TMP disueltos en metanol-NaOH 0.1 N (1:1). Soluciones utilizadas en la etapa de precisión y exactitud del método.

SOLUCIÓN	mg DE POLVO	CONTENIDO DE SMX(mg)	CONTENIDO DE TMP(mg)	CONC. SMX (mcg/ml)	CONC. TMP (mcg/ml)
1	94.00	50.00	10.00	16.00	3.20
2	94.00	62.50	12.50	20.00	4.00
3	94.00	75.00	15.00	24.00	4.80

Cada solución se preparó por sextuplicado y se leyeron a las longitudes de onda establecidas para cada método. El ensayo fue realizado por dos analistas dos días diferentes cada uno

2) Estimación de concentraciones.

Para la estimación de las concentraciones de sulfametoxazol y trimetoprim se utilizaron los métodos de:

- a) Razones de Absorbancia . ecuación 15.
- b) Método de Mínimos Cuadrados Parciales ecuaciones 37 y 38 en base a los resultados obtenidos en la etapa de calibración.

3) Análisis estadístico.

A los datos obtenidos con cada método se les realizó un Análisis de Variancia (ANAEVA) para determinar la reproducibilidad entre analistas y entre días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Condiciones de ensayo.

Se determinó que el medio adecuado de trabajo era el alcalino, debido a que a pH bajos (ácidos), están presentes en solución 2 especies de sulfametoxazol, una precipita y por lo tanto no se cuantifica en su totalidad. Esto se observó cuando se trabajó a un pH de 2, utilizando ácido clorhídrico 0.1 N.

Se trabajó con una mezcla de metanol-NaOH 0.1 N 1:1 pues según las pruebas que se hicieron era la mezcla en donde se disolvían Ver apéndice 3.

- Espectros de absorción

Como se observa en los espectros de la figura 1, las longitudes de onda adecuadas para aplicar el Método de Razones de Absorbancia son 240.5 nm (longitud de onda de isoabsorción) y 247 nm, que es la longitud de onda que tuvo el coeficiente de variación menor de 7 longitudes de onda previamente seleccionadas. En el espectro se observa lo siguiente.

- 1) A la longitud de onda de isoabsorción (240.5 nm) las $dA/d\lambda$ del Sulfametoxazol y Trimetoprim son contrarias. La pendiente del sulfametoxazol está menos pronunciada que la del trimetoprim, lo que implica que el sulfametoxazol tenga menos variaciones en la absorbancia en intervalos mayores de longitud de onda que el trimetoprim.
- 2) La aditividad es muy notoria en el intervalo de 200 - 320 nm lo que implica no interferencia y no interacción.
- 3) El espectro de excipientes muestra que no hay influencia significativa de absorptividad en el intervalo de 200 - 320 nm.
- 4) Se observan 2 puntos de isoabsorción (240.5 y 279 nm), solo se trabajó con el de 240.5 nm debido a que mostraba menor variación, al realizar un análisis de suma de cuadrados.

Para el Método de Mínimos Cuadrados Parciales las longitudes de onda que se trabajaron fueron las siguientes:

300 nm: es una longitud de onda en la cual se observa que no hay respuesta notable del Sulfametoxazol, por lo tanto la absorbancia obtenida será dada principalmente por el Trimetoprim.

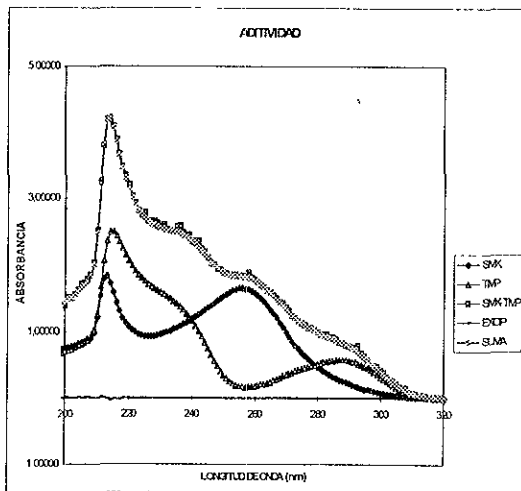
287.5 y 257 nm: longitudes de onda de máxima absorción del Sulfametoxazol y Trimetoprim

279 y 240.5 nm: longitudes de onda del espectro de absorción donde ambas sustancias proporcionan la misma respuesta (puntos de isoabsorción).

272, 266 y 247 nm: longitudes de onda donde los espectros de absorción están separados claramente y el coeficiente de variación es adecuado

No se consideraron longitudes de onda próximas a los 200 y 320 nm, debido a que son segmentos del espectro de absorción donde no hay confiabilidad en la respuesta debido a errores por luz desviada.

FIGURA 1 Aditividad de las absorbancias de SMX [25 µg/ml] y TMP [25 µg/ml] disueltos en NaOH 0.1 N y metanol respectivamente Mezcla [1:1]. Para demostrar la aditividad se suma la absorbancia de cada analito estándar y se compara contra la mezcla de SMX - TMP.



En la ecuación 28 con la que se obtienen los valores de W_h , se observa que éste vector depende de la absorbancia y la concentración. Si se compara con la ley de Beer observamos que $K=W_h$. Por lo tanto W_h es un equivalente al coeficiente de absorptividad.

Figuras 2-5.

FIGURA 2. Espectro de absorción del Sulfametoxazol estándar de 25 µg/ml en NaOH 0.1N.

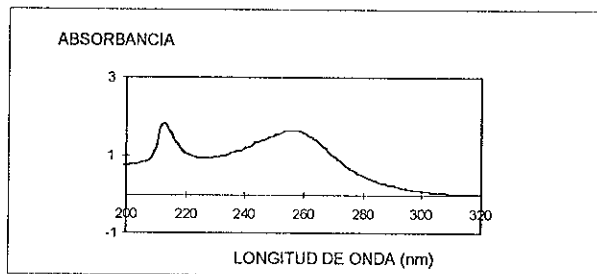
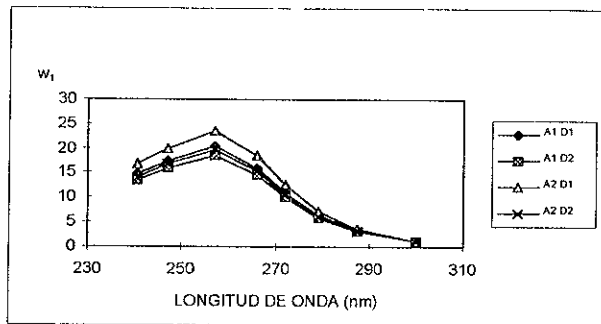


FIGURA 3. Longitud de onda vs w_h del sulfametoxazol obtenido a partir del Método de Mínimos Cuadrados Parciales. Se observa similitud del espectro de SMX en el intervalo de 240 -300 nm.



A= Analista.

D= Día.

FIGURA 4. Espectro del Trimetoprim estándar de 25 $\mu\text{g/ml}$ en NaOH 0.1 N.

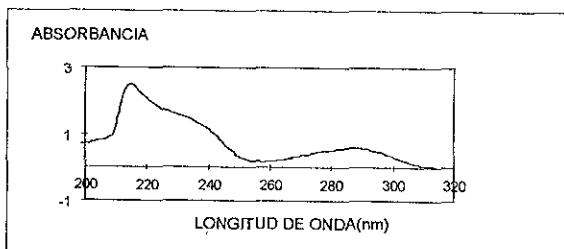
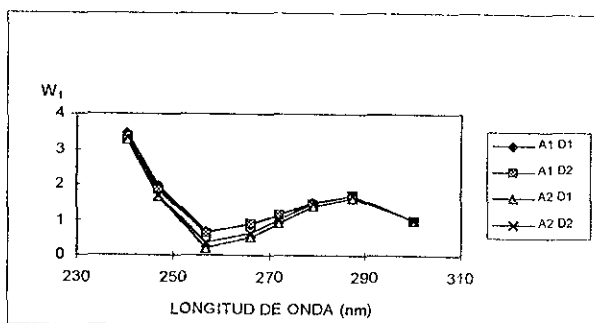


FIGURA 5. Longitud de onda vs w_1 del Trimetoprim obtenido a partir del Método de Mínimos Cuadrados Parciales. Se observa similitud del espectro de TMP en el intervalo de 240 -300 nm.



A= Analista

D= Día.

En las figuras 6 y 7 se muestra que el sistema tiende a ser lineal para SMX y TMP cuando se emplea el método de Razones de Absorbancia. Los resultados del Análisis de Variancia (ANADEVA, tabla 5) muestran que utilizando el Método de Razones de Absorbancia el sistema es lineal para Sulfametoxazol así como para el Trimetoprim. La tabla 25 para sulfametoxazol nos muestra que a concentraciones de 15 y 20 mcg/ml hay una sobrestimación en la determinación de Sulfametoxazol, lo cual provoca que los datos experimentales se desvíen de la mejor línea. Por lo tanto, estadísticamente el sistema no es lineal, pero los coeficientes de correlación son

mayores de 0.99 (tabla 29) lo que significa que más del 99 % de las variaciones queda explicada por la regresión lineal, por lo que se considera que el sistema es prácticamente lineal.

FIGURA 6. Linealidad del Sistema de Sulfametoxazol empleando el Método de Razones de Absorbancia

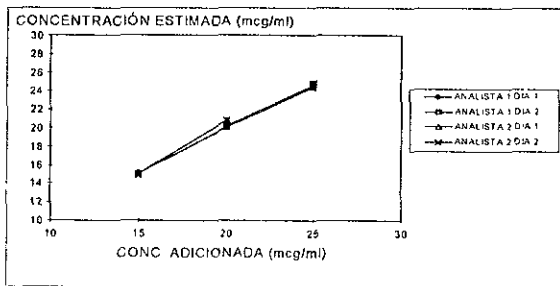


FIGURA 7. Linealidad del Sistema de Trimetoprim empleando el Método de Razones de Absorbancia

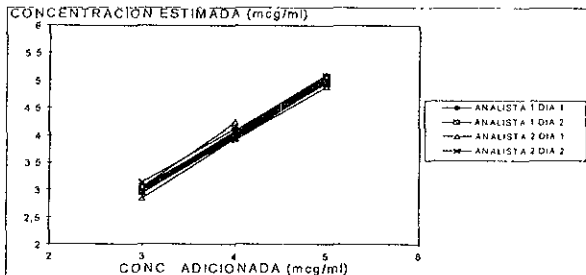


TABLA 5. Análisis de Variancia de las estimaciones de Sulfametoxazol obtenidas en la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia.

Valor de $F_{95}(1,16) = 4.49$ y $F_{95}(4,12) = 3.26$

ANALISTA 1 DÍA 1

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	276.77	276.77	11954.62
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.37	0.02	
FALTA DE AJUSTE	4	0.34	0.08	31.48
ERROR PURO	12	0.03	0.00	

ANALISTA 1 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	308.71	308.71	13159.24
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.38	0.02	
FALTA DE AJUSTE	4	0.34	0.08	25.12
ERROR PURO	12	0.04	0.00	

ANALISTA 2 DÍA 1

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	271.17	271.17	3858.40
ERROR DE REGRESIÓN	16	1.12	0.07	
FALTA DE AJUSTE	4	0.68	0.17	4.65
ERROR PURO	12	0.44	0.04	

ANALISTA 2 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	283.35	283.35	2928.30
ERROR DE REGRESIÓN	16	1.55	0.10	
FALTA DE AJUSTE	4	1.24	0.31	11.87
ERROR PURO	12	0.31	0.03	

TABLA 6. Análisis de Variancia de las estimaciones de Trimetoprim obtenidas en la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia.

Valor de $F_{95}(1,16) = 4.49$ y $F_{95}(4,12) = 3.26$

ANALISTA 1 DÍA 1

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	12.37	12.37	5396.88
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.04	0.00	
FALTA DE AJUSTE	4	0.02	0.01	4.16
ERROR PURO	12	0.02	0.00	

ANALISTA 1 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	12.97	12.97	5257.52
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.04	0.00	
FALTA DE AJUSTE	4	0.01	0.00	1.45
ERROR PURO	12	0.03	0.00	

ANALISTA 2 DÍA 1

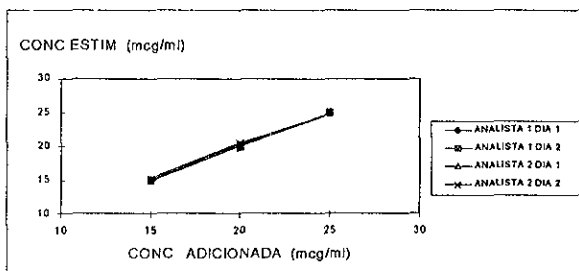
<i>FUENTE DE VARIACIÓN</i>	<i>GRADOS DE LIBERTAD</i>	<i>SUMA DE CUADRADOS</i>	<i>MEDIA DE CUADRADOS</i>	<i>F</i>
REGRESIÓN	1	11.85	11.85	1348.38
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.14	0.01	
FALTA DE AJUSTE	4	0.05	0.01	1.63
ERROR PURO	12	0.09	0.01	

ANALISTA 2 DÍA 2

<i>FUENTE DE VARIACIÓN</i>	<i>GRADOS DE LIBERTAD</i>	<i>SUMA DE CUADRADOS</i>	<i>MEDIA DE CUADRADOS</i>	<i>F</i>
REGRESIÓN	1	12.01	12.01	2193.42
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.09	0.01	
FALTA DE AJUSTE	4	0.04	0.01	3.05
ERROR PURO	12	0.04	0.00	

En las figuras 8 y 10 se muestra que el sistema tiende a ser lineal para SMX y TMP cuando se emplea el método de Mínimos Cuadrados Parciales. Esto se demuestra con los resultados de las tablas 7 y 8 donde se observa que la F calculada es menor que las F's críticas, con los coeficientes de determinación mostrados en las tablas 31 -32, los cuales son mayores de 0.99.

FIGURA 8. Linealidad del Sistema de Sulfametoxazol empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.



En las figuras 9 y 11 se muestra que el t_1 obtenido con el método de MCP se relaciona con la concentración. Se observa una tendencia lineal.

FIGURA 9 Concentración adicionada vs t_1 del Sulfametoxazol obtenido a partir del Método de Mínimos Cuadrados Parciales

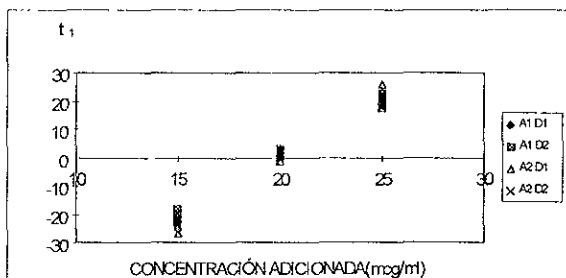


TABLA 7. Análisis de Variancia de las estimaciones de Sulfametoxazol obtenidas en la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

Valor de $F_{95} (1,16) = 4.49$ y $F_{95} (4,12) = 3.26$

ANALISTA 1 DÍA 1

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	300.65	300.65	23416.93
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.21	0.01	
FALTA DE AJUSTE	4	0.14	0.04	6.86
ERROR PURO	12	0.06	0.01	

ANALISTA 1 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	333.21	333.21	49198.16
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.11	0.01	
FALTA DE AJUSTE	4	0.04	0.01	1.90
ERROR PURO	12	0.07	0.01	

ANALISTA 2 DÍA 1

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	298.86	298.86	10390.68
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.46	0.03	
FALTA DE AJUSTE	4	0.11	0.03	0.96
ERROR PURO	12	0.35	0.03	

ANALISTA 2 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	298.15	298.15	6106.80
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.78	0.05	
FALTA DE AJUSTE	4	0.30	0.07	1.83
ERROR PURO	12	0.48	0.04	

TABLA 8. Análisis de Variancia de las estimaciones de Trimetoprim obtenidas en la etapa de Linealidad del Sistema empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales

Valor de $F_{95}(1,16) = 4.49$ y $F_{95}(4,12) = 3.26$

ANALISTA 1 DÍA 1

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	12.12	12.12	32778.20
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.01	0.00	
FALTA DE AJUSTE	4	0.00	0.00	0.95
ERROR PURO	12	0.00	0.00	

ANALISTA 1 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	12.41	12.41	27356.47
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.01	0.00	
FALTA DE AJUSTE	4	0.00	0.00	1.47
ERROR PURO	12	0.00	0.00	

ANALISTA 2 DÍA 1

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	12.21	12.21	7045.78
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.03	0.00	
FALTA DE AJUSTE	4	0.02	0.00	3.99
ERROR PURO	12	0.01	0.00	

ANALISTA 2 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	12.05	12.05	36106.28
ERROR DE REGRESIÓN	16	0.01	0.00	
FALTA DE AJUSTE	4	0.00	0.00	1.60
ERROR PURO	12	0.00	0.00	

FIGURA 10. Linealidad del Sistema de Trimetoprim empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

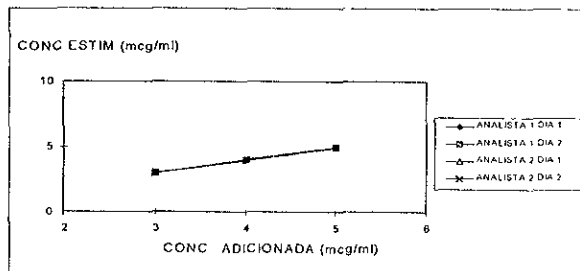
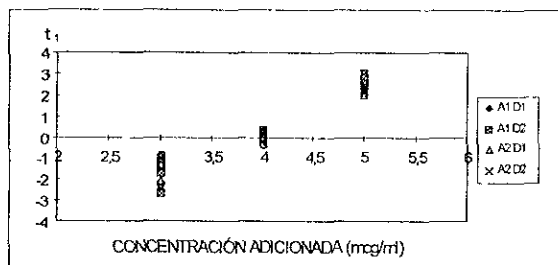


FIGURA 11. Concentración adicionada vs t_1 del Trimetoprim obtenido a partir del Método de Mínimos Cuadrados Parciales



En las figuras 12 - 15 se muestran en forma gráfica los resultados obtenidos al aplicar los métodos de Razones de Absorbancia y MCP. Como se puede observar existe una relación lineal que fue comprobada mediante el análisis de variancia (tablas 9 y 12). El análisis de regresión mostró coeficientes de determinación mayores de 0.99 (tabla 33) con interceptos estadísticamente nulos.

FIGURA 12. Linealidad del Método de Sulfametoxazol empleando el Método de Razones de Absorbancia

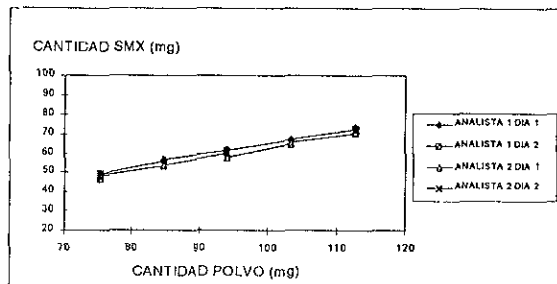


FIGURA 13. Linealidad del Método de Trimetoprim empleando el Método de Razones de Absorbancia.

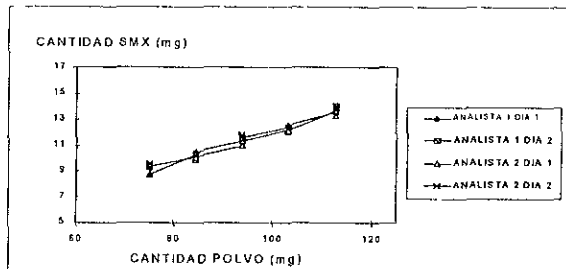


FIGURA 14. Linealidad del Método de Sulfametoxazol empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

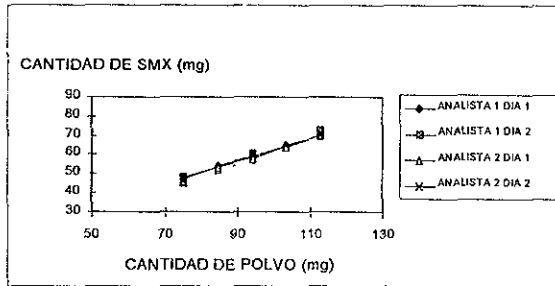


FIGURA 15. Linealidad del Método de Trimetoprim empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

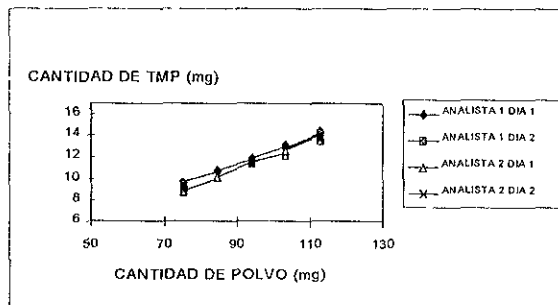


TABLA 9. Análisis de Variancia de las estimaciones de Sulfametoxazol obtenidas en la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia.

Valor de $F_{95}(1,6) = 5.99$, $F_{95}(1,7) = 5.59$, $F_{95}(1,13) = 4.67$ y $F_{95}(3,10) = 3.71$

ANALISTA 1 DÍA 1

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	1028.11	1028.11	3837.23
ERROR DE REGRESIÓN	13	3.48	0.27	
FALTA DE AJUSTE	3	1.16	0.39	1.67
ERROR PURO	10	2.32	0.23	

ANALISTA 1 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	832.74	832.74	5964.01
ERROR DE REGRESIÓN	7	0.98	0.14	
FALTA DE AJUSTE	1	0.39	0.39	4.01
ERROR PURO	6	0.59	0.10	

ANALISTA 2 DÍA 1

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	1015.20	1015.20	2427.09
ERROR DE REGRESIÓN	13	5.44	0.42	
FALTA DE AJUSTE	3	0.79	0.26	0.56
ERROR PURO	10	4.65	0.47	

ANALISTA 2 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	829.43	829.43	2217.93
ERROR DE REGRESIÓN	7	2.62	0.37	
FALTA DE AJUSTE	1	1.14	1.14	4.60
ERROR PURO	6	1.48	0.25	

TABLA 10. Análisis de Variancia de las estimaciones de Trimetoprim obtenidas en la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de Razones de Absorbancia.

Valor de $F_{95}(1,6) = 5.99$, $F_{95}(1,7) = 5.59$, $F_{95}(1,13) = 4.67$ y $F_{95}(3,10) = 3.71$

ANALISTA 1 DÍA 1

<i>FUENTE DE VARIACIÓN</i>	<i>GRADOS DE LIBERTAD</i>	<i>SUMA DE CUADRADOS</i>	<i>MEDIA DE CUADRADOS</i>	<i>F</i>
REGRESIÓN	1	36.97	36.97	2404.37
ERROR DE REGRESIÓN	13	0.20	0.02	
FALTA DE AJUSTE	3	0.02	0.01	0.40
ERROR PURO	10	0.18	0.02	

ANALISTA 1 DÍA 2

<i>FUENTE DE VARIACIÓN</i>	<i>GRADOS DE LIBERTAD</i>	<i>SUMA DE CUADRADOS</i>	<i>MEDIA DE CUADRADOS</i>	<i>F</i>
REGRESIÓN	1	30.48	30.48	2711.43
ERROR DE REGRESIÓN	7	0.08	0.01	
FALTA DE AJUSTE	1	0.04	0.04	4.94
ERROR PURO	6	0.04	0.01	

ANALISTA 2 DÍA 1

<i>FUENTE DE VARIACIÓN</i>	<i>GRADOS DE LIBERTAD</i>	<i>SUMA DE CUADRADOS</i>	<i>MEDIA DE CUADRADOS</i>	<i>F</i>
REGRESIÓN	1	39.55	39.55	1453.85
ERROR DE REGRESIÓN	13	0.35	0.03	
FALTA DE AJUSTE	3	0.11	0.04	1.47
ERROR PURO	10	0.25	0.02	

ANALISTA 2 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	30.19	30.19	1546.52
ERROR DE REGRESIÓN	7	0.14	0.02	
FALTA DE AJUSTE	1	0.05	0.05	3.96
ERROR PURO	6	0.08	0.01	

TABLA 11. Análisis de Variancia de las estimaciones de Sulfametoxazol obtenidas en la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

Valor de $F_{95}(1,6) = 5.99$, $F_{95}(1,7) = 5.59$, $F_{95}(1,13) = 4.67$ y $F_{95}(3,10) = 3.71$

ANALISTA 1 DÍA 1

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	1047.02	1047.02	1359.60
ERROR DE REGRESIÓN	13	10.01	0.77	
FALTA DE AJUSTE	3	2.97	0.99	1.41
ERROR PURO	10	7.04	0.70	

ANALISTA 1 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	828.75	828.75	1387.58
ERROR DE REGRESIÓN	7	4.18	0.60	
FALTA DE AJUSTE	1	0.15	0.15	0.23
ERROR PURO	6	4.03	0.67	

ANALISTA 2 DÍA 1

<i>FUENTE DE VARIACIÓN</i>	<i>GRADOS DE LIBERTAD</i>	<i>SUMA DE CUADRADOS</i>	<i>MEDIA DE CUADRADOS</i>	<i>F</i>
REGRESIÓN	1	1073.33	1073.33	2480.11
ERROR DE REGRESIÓN	13	5.63	0.43	
FALTA DE AJUSTE	3	2.28	0.76	2.27
ERROR PURO	10	3.35	0.33	

ANALISTA 2 DÍA 2

<i>FUENTE DE VARIACIÓN</i>	<i>GRADOS DE LIBERTAD</i>	<i>SUMA DE CUADRADOS</i>	<i>MEDIA DE CUADRADOS</i>	<i>F</i>
REGRESIÓN	1	853.62	853.62	2414.67
ERROR DE REGRESIÓN	7	2.47	0.35	
FALTA DE AJUSTE	1	0.39	0.39	1.13
ERROR PURO	6	2.08	0.35	

TABLA 12 Análisis de Variancia de las estimaciones de Trimetoprim obtenidas en la etapa de Linealidad del Método empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

Valor de $F_{95}(1,6) = 5.99$, $F_{95}(1,7) = 5.59$, $F_{95}(1,13) = 4.67$ y $F_{95}(3,10) = 3.71$

ANALISTA 1 DÍA 1

<i>FUENTE DE VARIACIÓN</i>	<i>GRADOS DE LIBERTAD</i>	<i>SUMA DE CUADRADOS</i>	<i>MEDIA DE CUADRADOS</i>	<i>F</i>
REGRESIÓN	1	40.65	40.65	4675.75
ERROR DE REGRESIÓN	13	0.11	0.01	
FALTA DE AJUSTE	3	0.05	0.02	3.11
ERROR PURO	10	0.06	0.01	

ANALISTA 1 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	30.63	30.63	847.97
ERROR DE REGRESIÓN	7	0.25	0.04	
FALTA DE AJUSTE	1	0.02	0.02	0.44
ERROR PURO	6	0.24	0.04	

ANALISTA 2 DÍA 1

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	44.35	44.35	1279.03
ERROR DE REGRESIÓN	13	0.45	0.03	
FALTA DE AJUSTE	3	0.13	0.04	1.31
ERROR PURO	10	0.32	0.03	

ANALISTA 2 DÍA 2

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESIÓN	1	34.02	34.02	1572.66
ERROR DE REGRESIÓN	7	0.15	0.02	
FALTA DE AJUSTE	1	0.03	0.03	1.39
ERROR PURO	6	0.12	0.02	

Con los resultados de las tablas 13 - 20 se muestra la reproducibilidad entre analistas y entre días. Para ambos métodos se observa que hay reproducibilidad entre analistas ya que la $F_{calculada}$ es menor que las F 's críticas, sin embargo de acuerdo a los resultados obtenidos no hay reproducibilidad entre días, ya que en todos los casos la $F_{calculada}$ es mayor que las F 's críticas. Sin embargo hay que considerar que toda diferencia estadística se debe a la extraordinaria precisión de los resultados. Los coeficientes de variación obtenidos son muy pequeños (0.25 - 0.75 % para SMX y 0.40 - 1.36 % para TMP en el método de MCP; 0.16 - 0.36

% para SMX y 0.19 - 1.13 % para TMP con método de Razones de Absorbancia), con respecto al crítico, de 2 %, establecido para métodos espectrofotométricos. Ver tablas 45-52.

TABLA 13. Análisis de Variancia para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de precisión y exactitud del sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia

Valores de $F_{95\%}(1,2) = 18.51$ y $F_{95\%}(2,20) = 3.49$

SULFAMETOXAZOL 80%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	0,00244	0,00244	0,30735
D	2	0,0159	0,00795	2,57
E	20	0,06182	0,00309	
TOTAL		0,08016		

SULFAMETOXAZOL 100%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	0,02512	0,02512	0,32195
D	2	0,15604	0,07802	27,397
E	20	0,05695	0,00285	
TOTAL		0,23811		

SULFAMETOXAZOL 120%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	0,01678	0,01678	0,36043
D	2	0,09312	0,04656	14,1257
E	20	0,06592	0,0033	
TOTAL		0,17583		

TABLA 14. Análisis de Variancia para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de precisión y exactitud del sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia

Valores de $F_{95\%}(1,2) = 18.51$ y $F_{95\%}(2,20) = 3.49$

TRIMETOPRIM 80%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	2,1E-05	2,1E-05	0,00083
D	2	0,05123	0,02561	15,5
E	20	0,03298	0,00165	
TOTAL		0,08423		

TRIMETOPRIM 100%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	0,00127	0,00127	0,03528
D	2	0,0721	0,03605	26,5387
E	20	0,02717	0,00136	
TOTAL		0,10054		

TRIMETOPRIM 120%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	0,00974	0,00974	0,85743
D	2	0,02272	0,01136	8,29614
E	20	0,02738	0,00137	
TOTAL		0,05984		

TABLA 15. Análisis de Variancia para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de precisión y exactitud del sistema empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

Valores de $F_{95\%}(1,2) = 18.51$ y $F_{95\%}(2,20) = 3.49$

SULFAMETOXAZOL 80%

<i>F.V.</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>M.C.</i>	<i>F</i>
A	1	0,21615	0,21615	0,723
D	2	0,59792	0,29896	23,5
E	20	0,25491	0,01275	
TOTAL		1,06898		

SULFAMETOXAZOL 100%

<i>F.V.</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>M.C.</i>	<i>F</i>
A	1	0,24681	0,24681	0,37979
D	2	1,29973	0,64986	45,728
E	20	0,28423	0,01421	
TOTAL		1,83077		

SULFAMETOXAZOL 120%

<i>F.V.</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>M.C.</i>	<i>F</i>
A	1	0,11806	0,11806	0,83692
D	2	0,28213	0,14106	6,17628
E	20	0,45679	0,02284	
TOTAL		0,85698		

TABLA 16. Análisis de Variancia para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de precisión y exactitud del sistema empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

Valores de $F_{95\%}(1,2) = 18.51$ y $F_{95\%}(2,20) = 3.49$

TRIMETOPRIM 80%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	0,00052	0,00052	0,01153
D	2	0,09012	0,04506	23,4
E	20	0,03856	0,00193	
TOTAL		0,1292		

TRIMETOPRIM 100%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	0,00169	0,00169	0,02841
D	2	0,11868	0,05934	36,4759
E	20	0,03254	0,00163	
TOTAL		0,1529		

TRIMETOPRIM 120%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	0,04739	0,04739	1,20622
D	2	0,07858	0,03929	20,6632
E	20	0,03803	0,0019	
TOTAL		0,164		

TABLA 17. Análisis de Variancia para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de precisión y exactitud del método empleando el Método de Razones de Absorbancia

Valores de $F_{95\%}(1,2) = 18.51$ y $F_{95\%}(2,20) = 3.49$

SULFAMETOXAZOL 80%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	32,384218	32,384218	0,6235935
D	2	103,86323	51,931617	398
E	20	2,6100554	0,1305028	
TOTAL		138,85751		

SULFAMETOXAZOL 100%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	13,665382	13,665382	0,722105
D	2	37,848736	18,924368	157,85733
E	20	2,3976546	0,1198827	
TOTAL		53,911772		

SULFAMETOXAZOL 120%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	433,69292	433,69292	1,9685365
D	2	440,62473	220,31236	3796,3316
E	20	1,1606592	0,058033	
TOTAL		875,47831		

TABLA 18. Análisis de Variancia para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de precisión y exactitud del método empleando el Método de Razones de Absorbancia

Valores de $F_{95\%}(1,2) = 18.51$ y $F_{95\%}(2,20) = 3.49$

TRIMETOPRIM 80%

<i>F.V.</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>M.C.</i>	<i>F</i>
A	1	4,4844611	4,4844611	0,594582
D	2	15,084417	7,5422086	50,2
E	20	3,0033348	0,1501667	
TOTAL		22,572213		

TRIMETOPRIM 100%

<i>F.V.</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>M.C.</i>	<i>F</i>
A	1	15,924471	15,924471	6,7508336
D	2	4,7177792	2,3588896	17,121418
E	20	2,755484	0,1377742	
TOTAL		23,397734		

TRIMETOPRIM 120%

<i>F.V.</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>M.C.</i>	<i>F</i>
A	1	1,2592854	1,2592854	0,0850916
D	2	29,598352	14,799176	23,706976
E	20	12,485081	0,6242541	
TOTAL		43,342719		

TABLA 19. Análisis de Variancia para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de precisión y exactitud del método empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

Valores de $F_{95\%}(1,2) = 18.51$ y $F_{95\%}(2,20) = 3.49$

SULFAMETOXAZOL 80%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	2,5979869	2,5979869	0,7181238
D	2	7,2354845	3,6177423	1,73
E	20	41,734309	2,0867154	
TOTAL		51,56778		

SULFAMETOXAZOL 100%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	50,808587	50,808587	0,3912123
D	2	259,74942	129,87471	30,37155
E	20	85,523926	4,2761963	
TOTAL		396,08193		

SULFAMETOXAZOL 120%

F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	F
A	1	769,46003	769,46003	1,8720024
D	2	822,07164	411,03582	72,271946
E	20	113,74699	5,6873496	
TOTAL		1705,2787		

TABLA 20. Análisis de Variancia para determinar la reproducibilidad entre analistas y días en la etapa de precisión y exactitud del método empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

Valores de $F_{95\%}(1,2) = 18.51$ y $F_{95\%}(2,20) = 3.49$

TRIMETOPRIM 80%

<i>F.V.</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>M.C.</i>	<i>F</i>
A	1	1,7068148	1,7068148	0,2021839
D	2	16,883784	8,4418922	20,5
E	20	8,2428758	0,4121438	
TOTAL		26,833475		

TRIMETOPRIM 100%

<i>F.V.</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>M.C.</i>	<i>F</i>
A	1	2,9550735	2,9550735	0,2826068
D	2	20,912971	10,456486	26,697398
E	20	7,8333371	0,3916669	
TOTAL		31,701382		

TRIMETOPRIM 120%

<i>F.V.</i>	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>M.C.</i>	<i>F</i>
A	1	3,6537082	3,6537082	0,3523916
D	2	20,736638	10,368319	10,531911
E	20	19,68934	0,984467	
TOTAL		44,079686		

Los resultados de las tablas 21 - 24 muestran la prueba de exactitud para los métodos utilizados. Se observa que en todos los casos la t calculada es mayor que la de t de tablas lo que indica que con los métodos no se cuantifica todo lo que realmente contiene la muestra.

TABLA 21. Prueba de exactitud del sistema para el Método de Razones de Absorbancia.

T 95%= 2.02

SULFAMETOXAZOL

%SMX	VALOR DE t exp			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DIA 1	DIA 2	DIA1	DIA 2
80	-0,3516	7,0990	2,7361	3,1484
100	0,7087	12,9934	1,7986	8,9932
120	-10,6978	-16,6233	-7,8344	-6,7612

TRIMETOPRIM

%TMP	VALOR DE t exp			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DIA 1	DIA 2	DIA1	DIA 2
80	2,6618	-8,2090	3,6240	-2,2394
100	4,8571	-2,3795	7,1608	-3,1712
120	0,7437	2,7078	0,6183	-6,3200

TABLA 22 Prueba de exactitud del sistema para el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

T 95%= 2.02

SULFAMETOXAZOL

%SMX	VALOR DE t exp			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DIA 1	DIA 2	DIA1	DIA 2
80	-15,66481	-13,33179	-9,985189	-0,035342
100	-5,125578	-6,600282	-9,34412	5,8668532
120	-7,418691	-9,404762	-6,198663	-0,460007

TRIMETOPRIM

%TMP	VALOR DE t exp			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DIA 1	DIA 2	DIA1	DIA 2
80	-1,017011	-23,49069	0,2409292	-7,186134
100	0,0707846	-6,80581	6,8782052	-6,853447
120	2,4956054	1,4128599	2,5274966	-6,122568

TABLA 23. Prueba de exactitud del método para el Método de Razones de Absorbancia.

T 95%= 2.02

SULFAMETOXAZOL

%SMX	VALOR DE t exp			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DIA 1	DIA 2	DIA1	DIA 2
80	-46,05333	-47,9947	-46,89508	-133,1298
100	-190,1631	-167,2806	-136,5662	-106,9885
120	-405,5386	-93,98699	-263,511	-39,76601

TRIMETOPRIM

%TMP	VALOR DE t exp			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DIA 1	DIA 2	DIA1	DIA 2
80	-4,670112	-5,212091	6,6075135	-8,582933
100	-14,60301	-20,56545	-3,828654	-9,682959
120	-2,055899	-4,766269	-3,866078	3,8396514

TABLA 24. Prueba de exactitud del método para el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

T 95%= 2.02

SULFAMETOXAZOL

%SMX	VALOR DE t _{exp}			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DIA 1	DIA 2	DIA1	DIA 2
80	-9,431343	-29,35701	-24,80486	-21,20143
100	2,0138327	-21,91067	-16,01818	-9,450352
120	-13,3431	-0,571511	-3,270865	13,615744

TRIMETOPRIM

%TMP	VALOR DE t _{exp}			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DIA 1	DIA 2	DIA1	DIA 2
80	-14,00284	-25,99317	-8,479979	-15,37965
100	-30,67296	-26,96031	-19,54689	-19,61153
120	-13,65314	-11,01909	-18,52691	-12,32013

- Precisión y Exactitud del Sistema.

Las tablas 37 - 44 muestran los resultados de precisión del sistema, realizado por sextuplicado, obteniendo un Coeficiente de Variación (C. V.) en el intervalo de 0.11-1.88 %, lo que indica que el método es preciso y repetible, considerando que para un método espectrofotométrico la variación permitida es menor o igual al 2%.

De acuerdo al porcentaje de recobro mostrado en las tablas 37 - 44 (95.0 - 102 %), para los dos métodos, respaldado con los resultados de las tablas 21 y 22 de prueba t y los datos obtenidos para pendiente en las tablas 29 - 32 (que es aproximadamente 1) el sistema es exacto.

- Linealidad del Método

En las figuras 12 - 15 se muestra que el método es lineal para ambos métodos de análisis, esto se demuestra con el Análisis de Variancia (tablas 9 - 12) y el Análisis de Regresión (tablas 33 - 36) en donde se obtuvieron coeficientes de determinación mayores de 0.99.

- Precisión y Exactitud del Método.

El Coeficiente de Variación (C.V.) obtenido en las tablas 45 - 52, que va de 0.03 - 1.36% nos demuestra que el método es repetible, pues, como se mencionó antes, para un método espectrofotométrico la variación permitida debe ser menor o igual a 2%

De acuerdo a los resultados de las tablas (17 - 20) se demuestra que el método es reproducible entre analistas pero no entre días, pues observando las tablas 45 - 52 no se recupera la misma proporción de cada sustancia de un día a otro.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) El determinar erróneamente el punto de isoabsorción utilizado en el Método de Razones de Absorbancia producirá diferencias considerables en las respuestas obtenidas.
- 2) La concentración y el día son factores que influyen en la cuantificación de cada sustancia por cualquiera de los métodos analíticos usados en este trabajo.
- 3) No existe interferencia ni interacción entre el Sulfametoxazol y el trimetoprim que influya en su determinación.

En base a lo expuesto, se demuestra que el sistema es lineal, exacto y que hay reproducibilidad entre analistas pero no entre días.

El método es lineal, reproducible entre analistas pero no entre días y **no es exacto**.

- 4) Se encontró la técnica analítica para determinar SMX y TMP (descrita en el apéndice 3). Las condiciones espectrofotométricas son: disolver en mezcla metanol-NaOH 0.1 N 1.1 y leer a las siguientes longitudes de onda:

Método de Razones de Absorbancia: 247 y 240.5 nm.

Método de M.C.P. : 300, 287.5, 279, 272, 266, 257, 247 y 240.5 nm.

- 5) De acuerdo con los resultados que muestran que ésta técnica es muy precisa pero no exacta, se hace necesario la optimización de la misma para mejorar el porcentaje de recobro.

APÉNDICE 1

VALIDACION

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la Validación de métodos analíticos debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados.

La Validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis en donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado. Las razones para evaluar los métodos analíticos en la industria farmacéutica son:

- El método analítico es parte integral del sistema de control de calidad del producto.
- El sistema de Buenas prácticas de manufactura, así lo requiere.
- Existe una gran variedad de razones basadas en la confiabilidad del análisis, algunas de las más importantes son para seleccionar un proveedor, costo de adquisición, etc.

Ya que el método de valoración es parte integral de los estándares de calidad y control de fabricación de medicamentos los conceptos que justifican un programa de aseguramiento de calidad son aplicables a la justificación de la validación.

Definición de Validación. La Validación del método analítico, puede definirse como un proceso documental por medio del cual se establece que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en estos casos, en términos analíticos que proporcionan un panorama del comportamiento del método.

El proceso de Validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y se optimiza para propósitos prácticos de medición.

La estimación de los parámetros estadísticos, relacionados con la validación, permite conocer exactamente la confiabilidad que puede proporcionar el método analítico para ser usado en análisis de rutina de un producto (granel y/o terminado), o bien en estudios de estabilidad.

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

La Validación generalmente incluye una evaluación de lo siguiente de uno o varias características de los métodos.

1. Exactitud
2. Precisión Reproducibilidad
 Repetibilidad
3. Linealidad Sistema
 Método
4. Especificidad
5. Tolerancia
6. Límite de detección
- 7 Límite de cuantificación.

EXACTITUD. Grado de concordancia que hay entre el conjunto de resultados con respecto a un valor de referencia

Se determina cuando menos a 6 placebos por triplicado cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. Analizar las muestras de manera independiente por el mismo analista y en el mismo equipo. Pueden emplearse los resultados de porcentajes recuperados en linealidad del método, pero siempre calculados en base a la cantidad adicionada.

PRECISIÓN Grado de concordancia que hay entre el conjunto de resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Generalmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

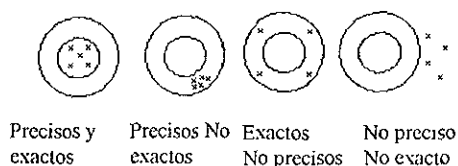
La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

Repetibilidad. Grado de concordancia de los datos entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones (Día, analista, instrumentos, laboratorio etc.).

Reproducibilidad. Grado de concordancia de los datos entre determinaciones independientes realizadas en diferentes condiciones (Día, analista, instrumentos, laboratono etc.).

La precisión y exactitud se puede representar en la figura 14 .

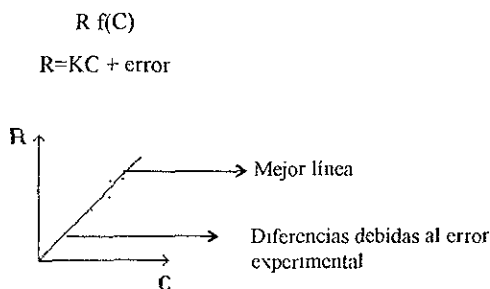
FIGURA 16. Esquematización de conceptos de precisión y exactitud con una analogía de tiro al blanco.



LINEALIDAD.

La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. Es decir, mide el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo $y = mx + b$ al trabajar a diferentes concentraciones.

SISTEMA. Es la capacidad del medio de medición para garantizar que los datos analíticos son proporcionales a la concentración de la sustancia en un intervalo determinado.



Para determinar la linealidad del sistema se realiza una curva de calibración con ensayos por triplicado, trabajando por lo menos 5 concentraciones las cuales deben ser preparadas con la misma solución Stock.

Generalmente hay distribución de tipo normal en donde la media de estos puntos, corresponde a la pendiente.

Criterios para indicar que el Sistema es lineal.

1. $r \geq 0.99$
2. $r^2 \geq 0.98$
3. C.V = Coeficiente de variación $\leq 1.5\%$

$$C.V = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

$S =$ Desviación estándar.

\bar{X}

Se trabaja con datos normalizados, es decir, dividir la respuesta entre la concentración.

$$A = \epsilon I C$$

$$\epsilon I = A / C$$

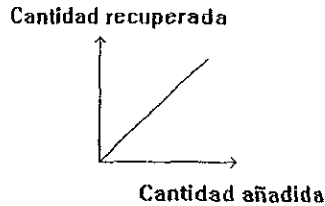
$$\text{Si } I = 1$$

$$\epsilon = A / C$$

4. ANADEVIA F calculada $< F$ tablas para que no haya significancia.
5. Intercepto t calculada $< t$ tablas para considerar intercepto cero.

LINEALIDAD DEL MÉTODO. Es la habilidad del método para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia en un intervalo determinado. Es decir mide el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo $Y = mx + b$ al trabajar a diferentes concentraciones.

Se determina adicionando cantidades conocidas de la sustancia de interés a un placebo. Se pretende demostrar la cantidad que se recupera de la cantidad añadida.



El método analítico se considera válido únicamente para la formulación específica y dentro del intervalo de concentración de interés, incluyendo siempre la correspondiente al 100%. Se debe analizar cada muestra y solución de referencia siguiendo el método propuesto.

Criterios para indicar que el Método es lineal.

- 1 $r \geq 0.99$
- 2 $r^2 \geq 0.98$
- 3 $m \cong 1.00$ Prueba de pendiente Intervalo de confianza
Prueba de t
4. $b \cong$ Intercepto

$$\% \text{ recobro} = \text{cantidad recuperada/cantidad añadida} \times 100$$

Para conocer que cantidad de sustancia a analizar se va a adicionar al placebo se debe tomar en cuenta la cantidad que contiene la muestra y se adicionarán al placebo cantidades por arriba y por abajo de ese peso. Por ejemplo.

Tableta	600 mg	adicionar	480 mg	y	720 mg
	(100 %)		(80%)		(120 %)

3 Especificidad. Consiste en evaluar la susceptibilidad de la técnica analítica, para medir sustancias interferentes como excipientes y/o productos de degradación. Es de especial importancia en técnicas para control de calidad e indicadores de estabilidad. Un método específico discrimina precursores de síntesis, contaminantes de proceso y productos de

degradación, de la sustancia de interés; el método que cumple con estas características es útil como indicativo de estabilidad.

Selectividad. Un método es selectivo cuando la respuesta obtenida se debe a más de una sustancia, pero ese grupo de sustancias tienen propiedades semejantes.

Si un método es específico es siempre selectivo

Si un método es selectivo no necesariamente es específico.

Tolerancia Capacidad de la técnica analítica para aceptar variaciones, en las condiciones establecidas para el análisis, sin que los resultados pierdan exactitud y confiabilidad. Ejemplo, si una técnica requiere de utilizar un amortiguador a un pH determinado, su tolerancia será el rango de pH que pueda ser utilizado sin que se afecten las determinaciones por la técnica analítica.

El estudio de la tolerancia del método analítico permite conocer la robustez del método validado sometido a diferentes condiciones de pH, fuerza iónica, porcentaje de modificador orgánico aplicable cuando el sistema de respuesta sea cromatográfico.

Límite de detección. es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

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

APÉNDICE 2

TABLA 25. Concentraciones estimadas en la etapa de linealidad del sistema
empleando el Método de Razones de Absorbancia

SULFAMETOXAZOL

ANALISTA 1				ANALISTA 2			
DIA 1		DIA 2		DIA 1		DIA 2	
C.AD.	C.EST.	C.AD.	C.EST.	C.AD.	C.EST.	C.AD.	C.EST.
15,0264	15,0957	15,8136	15,8685	14,9952	15,0872	14,9928	15,0018
15,0264	15,1354	15,8136	15,8782	14,9952	15,0512	14,9928	14,8202
15,0264	15,2166	15,8136	15,9396	14,9952	15,0884	14,9928	14,8801
15,0264	15,0159	15,8136	15,8689	14,9952	15,0368	14,9928	14,9445
15,0264	15,1131	15,8136	15,8759	14,9952	15,0946	14,9928	14,9434
15,0264	15,1255	15,8136	15,9196	14,9952	15,0865	14,9928	15,0984
20,0352	20,1617	21,0848	21,2463	19,9936	20,8270	19,9904	20,8377
20,0352	20,1082	21,0848	21,2314	19,9936	20,0407	19,9904	20,3234
20,0352	20,0814	21,0848	21,2178	19,9936	20,0501	19,9904	20,1678
20,0352	20,1892	21,0848	21,1563	19,9936	20,1176	19,9904	20,0830
20,0352	20,2770	21,0848	21,2275	19,9936	20,1611	19,9904	20,2235
20,0352	20,2157	21,0848	21,3417	19,9936	20,1059	19,9904	20,2110
25,044	24,5866	26,356	25,9672	24,992	24,4025	24,988	24,4860
25,044	24,6094	26,356	25,9452	24,992	24,5838	24,988	24,5798
25,044	24,6781	26,356	25,9603	24,992	24,5525	24,988	24,5292
25,044	24,8142	26,356	26,2186	24,992	24,6593	24,988	24,8442
25,044	24,8763	26,356	26,0389	24,992	24,7190	24,988	24,6946
25,044	24,7679	26,356	26,0857	24,992	24,5716	24,988	24,8656

TRIMETOPRIM

ANALISTA 1				ANALISTA 2			
DIA 1		DIA 2		DIA 1		DIA 2	
C.AD.	C.EST.	C.AD.	C.EST.	C.AD.	C.EST.	C.AD.	C.EST.
3,0168	3,0083	3,0528	3,0514	3,0336	3,1056	3,0072	2,9355
3,0168	3,0149	3,0528	2,9859	3,0336	3,0743	3,0072	2,9357
4,0224	4,0432	4,0704	4,1203	4,0448	4,2797	4,0096	4,0892
4,0224	4,1071	4,0704	4,0937	4,0448	4,1252	4,0096	4,0539
5,028	5,1194	5,088	5,1212	5,056	4,9820	5,012	5,0328
5,028	5,0312	5,088	5,1334	5,056	5,0006	5,012	4,9466
3,0168	2,9552	3,0528	2,9803	3,0336	3,0236	3,0072	2,9765
3,0168	2,9876	3,0528	3,0656	3,0336	3,0656	3,0072	3,1365
4,0224	4,1113	4,0704	4,1675	4,0448	4,0212	4,0096	4,1510
4,0224	3,9804	4,0704	4,1400	4,0448	4,0210	4,0096	4,0648
5,028	5,0379	5,088	5,0576	5,056	5,0288	5,012	5,0876
5,028	5,0318	5,088	5,0531	5,056	5,0902	5,012	4,9563
3,0168	3,0252	3,0528	3,0510	3,0336	3,0770	3,0072	3,0141
3,0168	2,9898	3,0528	3,0254	3,0336	2,8683	3,0072	2,9432
4,0224	4,0221	4,0704	4,0344	4,0448	3,9908	4,0096	3,9966
4,0224	4,0440	4,0704	3,9933	4,0448	3,9492	4,0096	3,9360
5,028	4,9630	5,088	5,1537	5,056	4,9197	5,012	4,9654
5,028	4,9829	5,088	5,1151	5,056	5,1154	5,012	4,9569

TABLA 26. Concentraciones estimadas en la etapa de linealidad del sistema
empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

SULFAMETOXAZOL

ANALISTA 1				ANALISTA 2			
DIA 1		DIA 2		DIA 1		DIA 2	
C. AD.	C. EST.	C. AD.	C. EST.	C. AD.	C. EST.	C. AD.	C. EST.
15,0264	14,9807	15,8136	15,7014	14,9952	14,9406	14,9928	14,7841
15,0264	15,0951	15,8136	15,8541	14,9952	14,8265	14,9928	14,7684
15,0264	15,0817	15,8136	15,7409	14,9952	15,0636	14,9928	14,9705
15,0264	14,9843	15,8136	15,7460	14,9952	14,8543	14,9928	14,9809
15,0264	14,9539	15,8136	15,8495	14,9952	14,9020	14,9928	14,9668
15,0264	14,8148	15,8136	15,8071	14,9952	15,2580	14,9928	15,1737
20,0352	20,1638	21,0848	21,2153	19,9936	20,3979	19,9904	20,5900
20,0352	20,1614	21,0848	21,1840	19,9936	20,1870	19,9904	20,0334
20,0352	20,1547	21,0848	21,0013	19,9936	19,8642	19,9904	20,0883
20,0352	19,9533	21,0848	21,2283	19,9936	19,8717	19,9904	19,8782
20,0352	20,2018	21,0848	21,1758	19,9936	19,9996	19,9904	19,7663
20,0352	20,1127	21,0848	21,0902	19,9936	19,9886	19,9904	20,3671
25,0440	24,8935	26,3560	26,2328	24,9920	24,7273	24,9880	24,7999
25,0440	24,9517	26,3560	26,3426	24,9920	25,0567	24,9880	24,9766
25,0440	24,9140	26,3560	26,3561	24,9920	24,9148	24,9880	24,9801
25,0440	25,0424	26,3560	26,3735	24,9920	25,0098	24,9880	25,0103
25,0440	25,1283	26,3560	26,3286	24,9920	25,0970	24,9880	24,8367
25,0440	25,0454	26,3560	26,2991	24,9920	24,9252	24,9880	24,8558

TRIMETOPRIM

ANALISTA 1				ANALISTA 2			
DIA 1		DIA 2		DIA 1		DIA 2	
C. AD.	C. EST.	C. AD.	C. EST.	C. AD.	C. EST.	C. AD.	C. EST.
3,0168	3,0252	3,0528	3,0488	3,0336	3,0168	3,0072	3,0054
3,0168	3,0197	3,0528	3,0469	3,0336	3,0179	3,0072	2,9909
4,0224	4,0192	4,0704	4,1048	4,0448	4,1294	4,0096	4,0266
4,0224	4,0268	4,0704	4,0750	4,0448	4,0974	4,0096	4,0313
5,0280	5,0350	5,0880	5,0801	5,0560	5,0036	5,0120	5,0224
5,0280	5,0262	5,0880	5,0966	5,0560	5,0208	5,0120	4,9837
3,0168	2,9764	3,0528	3,0184	3,0336	3,0320	3,0072	3,0066
3,0168	3,0067	3,0528	3,0347	3,0336	2,9858	3,0072	2,9782
4,0224	4,0165	4,0704	4,0955	4,0448	4,0324	4,0096	4,0147
4,0224	4,0199	4,0704	4,0686	4,0448	4,1053	4,0096	4,0275
5,0280	5,0338	5,0880	5,0805	5,0560	5,0232	5,0120	5,0300
5,0280	5,0437	5,0880	5,0615	5,0560	5,0530	5,0120	4,9924
3,0168	3,0229	3,0528	3,1003	3,0336	3,0615	3,0072	3,0108
3,0168	3,0329	3,0528	3,0393	3,0336	2,9853	3,0072	3,0149
4,0224	4,0346	4,0704	4,0699	4,0448	4,0910	4,0096	4,0013
4,0224	4,0574	4,0704	4,0726	4,0448	4,0453	4,0096	4,0345
5,0280	5,0234	5,0880	5,0709	5,0560	5,0731	5,0120	5,0160
5,0280	4,9829	5,0880	5,1029	5,0560	5,0325	5,0120	4,9857

TABLA 27. Concentraciones estimadas en la etapa de linealidad del método empleando el Método de Razones de Absorbancia.

SULFAMETOXAZOL

ANALISTA 1				ANALISTA 2			
DÍA 1		DÍA 2		DÍA 1		DÍA 2	
CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD SMX (mg)	CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD SMX (mg)	CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD SMX (mg)	CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD SMX (mg)
75.86	48.9994	75.26	48.8169	75.23	48.2740	75.24	47.6473
75.41	49.8970	75.21	47.9493	75.24	46.7051	75.23	48.9126
75.44	49.5000	75.33	48.9355	75.25	47.8859	75.25	48.3454
85.15	56.2031	94.13	60.0006	84.66	53.4601	94.12	60.6391
84.98	55.7264	94.11	59.9413	84.67	53.3746	94.15	61.2208
85.05	56.7256	94.08	59.8473	84.68	53.7895	94.16	60.7756
94.98	61.7048	112.84	72.2982	94.08	59.6703	112.85	71.7346
95.04	62.3792	112.85	72.1288	94.09	59.1651	112.85	72.3594
94.86	61.8288	112.83	71.9134	94.08	57.4424	112.82	71.3559
103.58	67.3158			103.49	64.9068		
103.54	66.6931			103.46	64.6740		
103.49	67.2364			103.41	65.3453		
112.89	72.5865			112.87	70.6269		
112.9	73.6976			112.82	71.2706		
112.99	72.8285			112.89	71.0957		

TRIMETOPRIM

ANALISTA 1				ANALISTA 2			
DÍA 1		DÍA 2		DÍA 1		DÍA 2	
CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD TMP (mg)	CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD TMP (mg)	CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD TMP (mg)	CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD TMP (mg)
75.86	9.24892579	75.26	9.49794483	75.23	8.69268483	75.24	9.25687471
75.41	9.32636674	75.21	9.33683078	75.24	8.68755424	75.23	9.497935914
75.44	9.36395309	75.33	9.46296929	75.25	8.71542339	75.25	9.258369636
85.15	10.1702801	94.13	11.5733765	84.66	10.2910532	94.12	11.70254444
84.98	10.4675523	94.11	11.5908643	84.67	9.84972535	94.15	11.78635154
85.05	10.5318977	94.08	11.5101652	84.68	10.0499327	94.16	11.78744169
94.98	11.4587152	112.84	13.9299701	94.08	10.9967908	112.85	13.96765482
95.04	11.686361	112.86	13.8256908	94.09	10.9602184	112.85	13.82001425
94.86	11.660736	112.83	14.0555218	94.08	11.3008759	112.82	13.68469098
103.58	12.4353654			103.49	12.1836181		
103.54	12.5756318			103.46	12.0573021		
103.49	12.5768869			103.41	12.1267915		
112.89	13.5894843			112.87	13.6249555		
112.9	13.8545955			112.82	13.3298758		
112.99	13.7880035			112.89	13.2803187		

TABLA 28 Concentraciones estimadas en la etapa de linealidad del método empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

SULFAMETOXAZOL

ANALISTA 1				ANALISTA 2			
DÍA 1		DÍA 2		DÍA 1		DÍA 2	
CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD SMX (mg)	CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD SMX (mg)	CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD SMX (mg)	CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD SMX (mg)
75.86	46.8824	75.26	48.3610	75.23	45.2750	75.24	46.9556
75.41	47.8528	75.21	47.1661	75.24	46.1452	75.23	48.3719
75.44	48.2533	75.33	48.5051	75.25	47.2911	75.25	48.1654
85.15	53.8363	94.13	59.7244	84.66	53.3330	94.12	60.4972
84.98	53.7932	94.11	60.2579	84.67	52.3907	94.15	60.0775
85.05	54.5633	94.08	60.2189	84.68	53.4633	94.16	60.2270
94.98	59.3016	112.84	72.2813	94.08	58.0801	112.85	71.6069
95.04	60.7498	112.86	70.1349	94.09	58.1537	112.85	72.3682
94.86	59.4325	112.83	72.0855	94.08	57.5031	112.82	71.0840
103.58	64.5354			103.49	64.7089		
103.54	64.1929			103.46	63.9578		
103.49	64.8861			103.41	64.0209		
112.89	70.0912			112.87	70.5099		
112.9	72.4347			112.82	70.3826		
112.99	72.6042			112.89	70.8127		

TRIMETOPRIM

ANALISTA 1				ANALISTA 2			
DÍA 1		DÍA 2		DÍA 1		DÍA 2	
CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD TMP (mg)	CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD TMP (mg)	CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD TMP (mg)	CANTIDAD POLVO (mg)	CANTIDAD TMP (mg)
75.86	9.74169863	75.26	9.41894684	75.23	9.11421573	75.24	9.0216307
75.41	9.65418783	75.21	9.26391581	75.24	8.7453482	75.23	9.2250284
75.44	9.68624459	75.33	9.27708359	75.25	8.79557902	75.25	8.89091825
85.15	10.7190165	94.13	11.5782379	84.66	10.0714473	94.12	11.4495683
84.98	10.8613238	94.11	11.4804367	84.67	10.085128	94.15	11.6404215
85.05	10.8439108	94.08	11.4171248	84.68	10.2337472	94.16	11.5872249
94.98	11.9034428	112.84	14.130503	94.08	11.5500676	112.85	13.9282008
95.04	11.8899913	112.86	13.4925043	94.09	11.3916987	112.85	13.8632504
94.86	12.0804816	112.83	13.8852015	94.08	11.5953579	112.82	13.6328996
103.58	13.0105056			103.49	12.4022227		
103.54	13.1498299			103.46	12.24775		
103.49	12.9929462			103.41	12.6729786		
112.89	14.3411416			112.87	14.028934		
112.9	14.3126243			112.82	13.8204854		
112.99	14.3675326			112.89	13.5726133		

TABLA 29. Análisis de regresión para la etapa de linealidad del sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia

SULFAMETOXAZOL

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2
PENDIENTE	0.958812	0.962228	0.951035	0.972313
DESV. STD PENDIENTE	0.008769	0.008388	0.015311	0.017968
INTERCEPTO	0.793768	0.766479	0.942921	0.537192
DESV. STD INTERCEPTO	0.179318	0.180506	0.312427	0.366594
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN R	0.999331	0.999393	0.997933	0.997279
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN R ²	0.998663	0.998786	0.995870	0.994566

INTERVALOS DE CONFIANZA

VALOR DE t PARA 16 GRADOS DE LIBERTAD 95% 2.120

ANALISTA	DÍA	INTERCEPTO		PENDIENTE	
		LÍM INF	LÍM SUP	LÍM.INF.	LÍM.SUP
1	1	0.413614	1.173922	0.940221	0.977403
	2	0.383807	1.149152	0.944446	0.980011
2	1	0.280577	1.605266	0.918576	0.983494
	2	0.239988	1.314371	0.934221	1.010405

TABLA 30. Análisis de regresión para la etapa de linealidad del sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia

TRIMETOPRIM

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2
PENDIENTE	1.009786	1.021567	0.982529	0.997945
DESV. STD PENDIENTE	0.013745	0.014089	0.026757	0.021308
INTERCEPTO	-0.036481	-0.083582	0.066876	0.008547
DESV. STD INTERCEPTO	0.056429	0.058530	0.110458	0.087199
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN R	0.998521	0.998482	0.994119	0.996373
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN R ²	0.997044	0.996966	0.988273	0.992758

INTERVALOS DE CONFIANZA

VALOR DE t PARA 16 GRADOS DE LIBERTAD 95% 2.120

ANALISTA	DÍA	INTERCEPTO		PENDIENTE	
		LÍM.INF.	LÍM.SUP	LÍM.INF.	LÍM.SUP
1	1	-0.156111	0.083149	0.980646	1.038926
	2	-0.207667	0.040502	0.991698	1.051435
2	1	-0.167295	0.301048	0.925804	1.039253
	2	-0.176315	0.193408	0.952772	1.043119

TABLA 31. Análisis de regresión para la etapa de linealidad del sistema empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

SULFAMETOXAZOL

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2
PENDIENTE	0.999320	0.999670	0.998421	0.997393
STD PENDIENTE	0.006531	0.004507	0.009795	0.012763
INTERCEPTO	0.013619	0.006945	0.031558	0.052113
STD INTERCEPTO	0.133539	0.096980	0.199868	0.260401
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN R	0.999659	0.999837	0.999231	0.998693
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN R ²	0.999317	0.999675	0.998463	0.997387

INTERVALOS DE CONFIANZA

VALOR DE t PARA 16 GRADOS DE LIBERTAD 95% 2.120

ANALISTA	DÍA	INTERCEPTO		PENDIENTE	
		LÍM.INF.	LÍM SUP	LÍM.INF.	LÍM.SUP
1	1	0.269484	0.296722	0.985475	1.013165
	2	-0.198652	0.212542	0.990116	1.009224
2	1	-0.392162	0.455279	0.977657	1.019186
	2	-0.499937	0.604163	0.970335	1.024451

TABLA 32. Análisis de regresión para la etapa de linealidad del sistema empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

TRIMETOPRIM

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2
PENDIENTE	0.999506	0.999413	0.997737	0.999560
STD PENDIENTE	0.005521	0.006042	0.011886	0.005260
INTERCEPTO	0.001990	0.002387	0.009152	0.001762
STD INTERCEPTO	0.022664	0.025102	0.049070	0.021527
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN R	0.999756	0.999708	0.998866	0.999779
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN R ²	0.999512	0.999415	0.997734	0.999557

INTERVALOS DE CONFIANZA

VALOR DE t PARA 16 GRADOS DE LIBERTAD 95% 2.120

ANALISTA	DÍA	INTERCEPTO		PENDIENTE	
		LÍM.INF.	LÍM.SUP	LÍM.INF.	LÍM.SUP
1	1	-0.046057	0.050037	0.987802	1.011209
	2	-0.050829	0.055604	0.986603	1.012223
2	1	-0.094875	0.113180	0.972538	1.022936
	2	-0.043875	0.047399	0.988408	1.010712

TABLA 33 Análisis de regresión para la etapa de linealidad del método empleando el Método de Razones de Absorbancia

SULFAMETOXAZOL

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2
PENDIENTE	0.622780	0.626644	0.618856	0.625396
STD PENDIENTE	0.010054	0.008114	0.012562	0.013280
INTERCEPTO	2.745031	1.252676	0.968064	1.497093
STD INTERCEPTO	0.954461	0.772844	1.192551	1.264813
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN R	0.998310	0.999414	0.997333	0.998426
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN R ²	0.996624	0.998828	0.994672	0.996854

INTERVALO DE CONFIANZA

VALOR DE t PARA 13 GRADOS DE LIBERTAD 95% 2.160

VALOR DE t PARA 7 GRADOS DE LIBERTAD 95% 2.365

ANALISTA	DÍA	INTERCEPTO		PENDIENTE	
		LÍM INF	LÍM.SUP	LÍM.INF.	LÍM.SUP
1	1	0.683395	4.806666	0.601064	0.644497
	2	-0.575099	3.080452	0.607454	0.645834
2	1	-1.607846	3.543974	0.591723	0.645989
	2	-1.494189	4.488376	0.593990	0.656802

TABLA 34. Análisis de regresión para la etapa de linealidad del método empleando el Método de Razones de Absorbancia.

TRIMETOPRIM

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2
PENDIENTE	0.118094	0.119879	0.122153	0.119320
STD PENDIENTE	0.002408	0.002302	0.003204	0.003034
INTERCEPTO	0.364654	0.365003	-0.413132	0.414887
STD INTERCEPTO	0.228643	0.219276	0.304138	0.288987
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN R	0.997307	0.998712	0.995559	0.997745
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN R ²	0.994622	0.997425	0.991138	0.995494

INTERVALO DE CONFIANZA

VALOR DE t PARA 13 GRADOS DE LIBERTAD 95% 2.160

VALOR DE t PARA 7 GRADOS DE LIBERTAD 95% 2.365

ANALISTA	DÍA	INTERCEPTO		PENDIENTE	
		LÍM.INF.	LÍM.SUP	LÍM.INF.	LÍM.SUP
1	1	-0.129215	0.858522	0.112892	0.123296
	2	-0.153584	0.883590	0.114435	0.125324
2	1	-1.070069	0.243806	0.115233	0.129073
	2	-0.268568	1.098342	0.112144	0.126496

TABLA 35. Análisis de regresión para la etapa de linealidad del método empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

SULFAMETOXAZOL

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2
PENDIENTE	0.628480	0.625140	0.636326	0.634449
STD PENDIENTE	0.017045	0.016782	0.012778	0.012911
INTERCEPTO	0.224507	1.050245	-1.450944	0.242468
STD INTERCEPTO	1.618134	1.598420	1.213042	1.229747
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN R	0.995253	0.997487	0.997389	0.998554
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN R ²	0.990529	0.994981	0.994786	0.997109

INTERVALO DE CONFIANZA

VALOR DE t PARA 13 GRADOS DE LIBERTAD 95% 2.160

VALOR DE t PARA 7 GRADOS DE LIBERTAD 95% 2.365

ANALISTA	DÍA	INTERCEPTO		PENDIENTE	
		LÍM INF.	LÍM SUP	LÍM.INF.	LÍM.SUP
1	1	-3.270662	3.719676	0.591664	0.665297
	2	-2.730018	4.830508	0.585450	0.664829
2	1	-4.071114	1.169227	0.608727	0.663926
	2	-2.665883	3.150820	0.603913	0.664984

TABLA 36 Análisis de regresión para la etapa de linealidad del método empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

TRIMETOPRIM

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2
PENDIENTE	0.123829	0.120187	0.129351	0.126652
STD PENDIENTE	0.001811	0.004127	0.003617	0.003194
INTERCEPTO	0.278411	0.242879	-0.812597	-0.443396
STD INTERCEPTO	0.171922	0.393105	0.343367	0.304185
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN R	0.998613	0.995898	0.994956	0.997782
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN R ²	0.997227	0.991813	0.989938	0.995569

INTERVALO DE CONFIANZA

VALOR DE t PARA 13 GRADOS DE LIBERTAD 95% 2.160

VALOR DE t PARA 7 GRADOS DE LIBERTAD 95% 2.365

ANALISTA	DÍA	INTERCEPTO		PENDIENTE	
		LÍM.INF.	LÍM.SUP	LÍM.INF.	LÍM.SUP
1	1	-0.092940	0.649761	0.119917	0.127740
	2	-0.686816	1.172573	0.110426	0.129948
2	1	-1.554271	-0.070924	0.121539	0.137164
	2	-1.162794	0.276002	0.119099	0.134205

TABLA 37. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia.

SULFAMETOXAZOL

ANALISTA 1					
DÍA 1			DÍA 2		
CAD	C EST	%REC	CAD	C EST	%REC
15,0048	14,9790	99,8283	15,0072	15,1004	100,6212
15,0048	14,9648	99,7336	15,0072	15,0397	100,2166
15,0048	14,9691	99,7618	15,0072	15,0470	100,2650
15,0048	14,8490	98,9615	15,0072	15,0649	100,3842
15,0048	15,0898	100,5654	15,0072	15,0780	100,4716
15,0048	15,1035	100,6575	15,0072	15,0612	100,3597

MEDIA	99,9182	100,3864
D.S	0,6243	0,1460
C.V.	0,62%	0,15%

20,0064	20,0494	100,2149	20,0096	20,1194	100,5486
20,0064	20,0300	100,1178	20,0096	20,1491	100,6970
20,0064	20,0265	100,1005	20,0096	20,1711	100,8070
20,0064	20,0221	100,0783	20,0096	20,1259	100,5811
20,0064	19,9486	99,7112	20,0096	20,1251	100,5773
20,0064	20,0167	100,0517	20,0096	20,1885	100,8943

MEDIA	100,0457	100,6842
D.S.	0,1731	0,1413
C.V.	0,17%	0,14%

25,0080	24,8862	99,5129	25,0120	24,8495	99,3504
25,0080	24,8391	99,3247	25,0120	24,8336	99,2867
25,0080	24,8914	99,5338	25,0120	24,8219	99,2399
25,0080	24,8641	99,4245	25,0120	24,8561	99,3768
25,0080	24,9269	99,6756	25,0120	24,8062	99,1770
25,0080	24,9047	99,5871	25,0120	24,8839	99,4878

MEDIA	99,5098	99,3198
D.S	0,1230	0,1098
C.V.	0,12%	0,11%

TABLA 29. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia

SULFAMETOXAZOL

ANALISTA 2					
DÍA 1			DÍA 2		
CAD	CEST	%REC	CAD	CEST	%REC
15,0048	15,0813	100,5101	15,0072	15,0844	100,5143
15,0048	15,0319	100,1803	15,0072	15,0266	100,1296
15,0048	15,0266	100,1451	15,0072	15,1013	100,6272
15,0048	15,0222	100,1156	15,0072	15,0187	100,0764
15,0048	15,1131	100,7220	15,0072	15,0115	100,0284
15,0048	15,0060	100,0079	15,0072	15,0649	100,3843

MEDIA	100,2802	100,2934
D.S.	0,2748	0,2501
C.V	0,27%	0,25%

20,0064	19,9775	99,8558	20,0096	20,2065	100,9841
20,0064	20,1514	100,7249	20,0096	20,3368	101,6353
20,0064	20,0333	100,1343	20,0096	20,2015	100,9592
20,0064	20,0077	100,0066	20,0096	20,3133	101,5179
20,0064	20,0223	100,0794	20,0096	20,1692	100,7975
20,0064	20,1220	100,5778	20,0096	20,2072	100,9874

MEDIA		100,2298			101,1469
D S.		0,3428			0,3422
C V.		0,34%			0,34%

25,0080	24,7495	98,9662	25,0120	24,8455	99,3344
25,0080	24,6591	98,6049	25,0120	24,8363	99,2976
25,0080	24,9109	99,6119	25,0120	24,8926	99,5227
25,0080	24,6587	98,6032	25,0120	24,9291	99,6684
25,0080	24,6818	98,6955	25,0120	24,9427	99,7229
25,0080	24,6923	98,7377	25,0120	24,9304	99,6738

MEDIA		98,8699			99,5366
D S.		0,3871			0,1839
C V.		0,39%			0,18%

TABLA 39. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia.

TRIMETOPRIM

ANALISTA 1					
DÍA 1			DÍA 2		
CAD	C EST	%REC	C AD	C EST	%REC
3,0144	3,0512	101,2219	3,0120	2,9818	98,9972
3,0144	3,0068	99,7473	3,0120	2,9588	98,2322
3,0144	3,0214	100,2325	3,0120	2,9745	98,7557
3,0144	3,0409	100,8799	3,0120	2,9336	97,3972
3,0144	3,0976	102,7604	3,0120	2,9603	98,2825
3,0144	3,1028	102,9325	3,0120	2,9582	98,2147

MEDIA	101,2957	98,3133
D.S.	1,3062	0,5513
C.V.	1,29%	0,56%

4,0192	4,0210	100,0448	4,0160	3,9847	99,2199
4,0192	4,0614	101,0491	4,0160	3,9613	98,6367
4,0192	4,0774	101,4482	4,0160	4,0000	99,6006
4,0192	4,0714	101,2982	4,0160	3,9698	98,8494
4,0192	4,0652	101,1446	4,0160	3,9999	99,5982
4,0192	4,0997	102,0038	4,0160	4,0369	100,5215

MEDIA	101,1648	99,4044
D.S.	0,6435	0,6716
C.V.	0,64%	0,68%

5,024	5,011	99,7335	5,020	5,017	99,9345
5,024	5,053	100,5871	5,020	5,041	100,4188
5,024	4,987	99,2546	5,020	5,019	99,9847
5,024	5,037	100,2574	5,020	5,058	100,7620
5,024	5,039	100,3000	5,020	5,035	100,2978
5,024	5,065	100,8238	5,020	5,051	100,6263

MEDIA	100,1594	100,3373
D.S.	0,5751	0,3343
C.V.	0,57%	0,33%

TABLA 40. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del sistema empleando el Método de Razones de Absorbancia

TRIMETOPRIM

ANALISTA 2					
DÍA 1			DÍA 2		
CAD	C EST	%REC	CAD	C EST	%REC
3,0144	3,0634	101,6246	3,0120	3,0633	101,7038
3,0144	3,0317	100,5724	3,0120	2,9506	97,9610
3,0144	3,0598	101,5073	3,0120	2,9080	96,5474
3,0144	3,0538	101,3086	3,0120	2,9564	98,1548
3,0144	3,0108	99,8790	3,0120	2,9315	97,3282
3,0144	3,0908	102,5356	3,0120	2,9252	97,1182

MEDIA	101,2379	98,1356
D.S.	0,9166	1,8424
C.V.	0,91%	1,88%

4,0192	4,1196	102,4985	4,0160	3,9237	97,7005
4,0192	4,0519	100,8144	4,0160	3,9731	98,9320
4,0192	4,0847	101,6300	4,0160	3,9351	97,9845
4,0192	4,0707	101,2814	4,0160	3,8489	95,8401
4,0192	4,0978	101,9553	4,0160	3,9760	99,0032
4,0192	4,0709	101,2875	4,0160	4,0214	100,1351

MEDIA 101,5779 98,2659
D.S. 0,5913 1,4673
C.V. **0,58%** **1,49%**

5,0240	5,0295	100,1097	5,0200	4,9796	99,1946
5,0240	5,0470	100,4573	5,0200	4,9716	99,0367
5,0240	5,1512	102,5314	5,0200	4,9132	97,8729
5,0240	5,0037	99,5956	5,0200	4,9581	98,7666
5,0240	4,9952	99,4266	5,0200	4,9145	97,8983
5,0240	4,9992	99,5064	5,0200	4,9675	98,9533

MEDIA 100,2711 98,6204
D S 1,1768 0,5857
C.V. **1,17%** **0,59%**

TABLA 41. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del sistema empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales

SULFAMETOXAZOL

ANALISTA 1					
DÍA 1			DÍA 2		
CAD	C EST	%REC	CAD	C EST	%REC
15,0048	14,6715	97,7787	15,0072	14,6992	97,9476
15,0048	14,6487	97,6265	15,0072	14,6278	97,4721
15,0048	14,4857	96,5402	15,0072	14,6821	97,8336
15,0048	14,5493	96,9642	15,0072	14,4968	96,5987
15,0048	14,5647	97,0672	15,0072	14,6366	97,5303
15,0048	14,5112	96,7102	15,0072	14,5439	96,9128

MEDIA	97,1145	97,3825
D.S	0,49427	0,52682
C.V.	0,51%	0,54%

20,0064	19,6691	98,3142	20,0096	19,9170	99,5402
20,0064	19,5661	97,7993	20,0096	19,8215	99,0598
20,0064	19,6819	98,3781	20,0096	19,9333	99,6188
20,0064	19,5647	97,7922	20,0096	19,8301	99,1028
20,0064	19,9876	99,906	20,0096	19,8304	99,1045
20,0064	19,7635	98,786	20,0096	19,7588	98,7464

MEDIA	98,496	99,1954
D.S	0,78738	0,3271
C.V.	0,80%	0,33%

25,008	24,5995	98,3666	25,012	24,7945	99,1306
25,008	24,5398	98,1277	25,012	24,6177	98,4236
25,008	24,703	98,7805	25,012	24,5161	98,0172
25,008	24,8295	99,2861	25,012	24,7483	98,9458
25,008	24,657	98,5963	25,012	24,6371	98,5012
25,008	24,8112	99,2129	25,012	24,6756	98,6552

MEDIA	98,7283	98,6122
D.S.	0,45995	0,39594
C.V	0,47%	0,40%

TABLA 42. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del sistema empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

SULFAMETOXAZOL

ANALISTA 2					
DÍA 1			DÍA 2		
CAD	CEST	%REC	CAD	CEST	%REC
15,0048	14,7744	98,4644	15,0072	15,2582	101,673
15,0048	14,5501	96,9698	15,0072	15,1229	100,771
15,0048	14,6038	97,3274	15,0072	14,9862	99,8599
15,0048	14,4402	96,237	15,0072	14,9409	99,5584
15,0048	14,5221	96,7829	15,0072	14,8374	98,8686
15,0048	14,4737	96,4607	15,0072	14,8851	99,1863

MEDIA	97,0404	99,9861
D S	0,79533	1,05335
C.V.	0,82%	1,05%

20,0064	19,659	98,2637	20,0096	20,2502	101,202
20,0064	19,507	97,5037	20,0096	20,1854	100,878
20,0064	19,7994	98,9655	20,0096	20,5632	102,767
20,0064	19,6004	97,9707	20,0096	20,2903	101,403
20,0064	19,7184	98,5603	20,0096	20,2744	101,323
20,0064	19,6676	98,3065	20,0096	20,2432	101,167

MEDIA		98,2617			101,457
D.S.		0,49917			0,66629
C.V.		0,51%			0,66%

25,008	24,0846	96,3076	25,012	24,5807	98,2756
25,008	24,5783	98,2818	25,012	24,7895	99,1106
25,008	24,7695	99,0462	25,012	24,9815	99,8781
25,008	24,5806	98,2908	25,012	25,1436	100,526
25,008	24,3506	97,3713	25,012	25,1254	100,453
25,008	24,3989	97,5645	25,012	25,2024	100,761

MEDIA		97,8104			99,8342
D.S.		0,94785			0,96711
C.V.		0,97%			0,97%

TABLA 43. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del sistema empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

TRIMETOPRIM

ANALISTA 1					
DÍA 1			DÍA 2		
CAD	CEST	%REC	CAD	CEST	%REC
3,0144	3,00733	99,7655	3,012	2,89358	96,0683
3,0144	2,93279	97,2927	3,012	2,89051	95,9666
3,0144	2,98894	99,1555	3,012	2,90514	96,4523
3,0144	2,9381	97,4687	3,012	2,90186	96,3434
3,0144	3,01853	100,137	3,012	2,89824	96,223
3,0144	3,07757	102,095	3,012	2,90706	96,516

MEDIA		99,3192			96,2616
D.S.		1,7963			0,21619
C.V.		1,81%			0,22%

4,0192	4,02136	100,054	4,016	3,87617	96,5182
4,0192	4,0585	100,978	4,016	3,92547	97,7458
4,0192	4,0612	101,045	4,016	3,96229	98,6626
4,0192	3,95178	98,3227	4,016	3,90525	97,2423
4,0192	3,95971	98,5199	4,016	3,96675	98,7737
4,0192	4,07104	101,29	4,016	3,93547	97,9948

MEDIA		100,035			97,8229
D.S.		1,31996			0,85836
C.V.		1,32%			0,88%

5,024	5,10525	101,617	5,02	5,03089	100,217
5,024	5,07798	101,075	5,02	5,00044	99,6103
5,024	5,01203	99,7617	5,02	5,03925	100,383
5,024	5,0311	100,141	5,02	5,07763	101,148
5,024	5,0664	100,844	5,02	5,00157	99,6328
5,024	5,04114	100,341	5,02	5,08346	101,264

MEDIA	100,63	100,376
D.S.	0,67736	0,71399
C.V.	0,67%	0,71%

TABLA 44 Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del sistema empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

TRIMETOPRIM

ANALISTA 2					
DÍA 1			DÍA 2		
CAD	C EST	%REC	CAD	C EST	%REC
3,0144	3,06234	101,59	3,012	2,97406	98,7403
3,0144	2,9463	97,7407	3,012	2,90273	96,3722
3,0144	2,97549	98,7093	3,012	2,86904	95,2537
3,0144	3,05315	101,285	3,012	2,86112	94,9909
3,0144	3,02857	100,47	3,012	2,90889	96,5766
3,0144	3,04587	101,044	3,012	2,89376	96,0742

MEDIA	100,14	96,3346
D.S.	1,55849	1,33334
C.V	1,56%	1,38%

4,0192	4,11243	102,32	4,016	3,8534	95,9512
4,0192	4,05834	100,974	4,016	3,93298	97,9327
4,0192	4,09276	101,83	4,016	3,87385	96,4603
4,0192	4,0906	101,776	4,016	3,90631	97,2686
4,0192	4,07339	101,348	4,016	3,8791	96,5911
4,0192	4,04952	100,754	4,016	3,97346	98,9407

MEDIA 101,5 97,1908
D.S 0,58535 1,09987
C.V **0,58%** **1,13%**

5,024	5,1492	102,492	5,02	4,85573	96,7277
5,024	5,10975	101,707	5,02	4,91144	97,8374
5,024	5,06383	100,793	5,02	4,97246	99,0529
5,024	5,01986	99,9177	5,02	4,87542	97,12
5,024	5,03879	100,294	5,02	4,78448	95,3083
5,024	5,04157	100,35	5,02	4,86789	96,9699

MEDIA 100,926 97,1694
D.S. 0,98261 1,24056
C.V. **0,97%** **1,28%**

TABLA 45. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del método empleando el Razones de Absorbancia.

SULFAMETOXAZOL

ANALISTA 1				
DÍA 1			DÍA 2	
CAD	C EST	%REC	C EST	%REC
317,088	307,961	97,121	312,234	98,469
317,088	308,698	97,354	311,482	98,232
317,088	309,296	97,542	311,755	98,318
317,088	308,537	97,303	311,407	98,208
317,088	309,134	97,492	311,845	98,346
317,088	308,997	97,448	311,859	98,351

MEDIA 97,377 98,321
D.S. 0,153 0,094
C V 0,16% 0,10%

397,569	377,369	94,919	379,330	95,412
397,569	377,179	94,871	379,306	95,407
397,569	377,537	94,962	379,251	95,393
397,569	377,159	94,866	378,693	95,252
397,569	377,499	94,952	378,691	95,252
397,569	377,928	95,060	379,075	95,348

MEDIA 94,938 95,344
D.S 0,071 0,075
C V. 0,08% 0,08%

465,911	445,879	95,700	455,691	97,806
465,911	445,918	95,709	455,776	97,825
465,911	446,199	95,769	455,753	97,820
465,911	445,839	95,692	455,578	97,782
465,911	446,033	95,734	454,985	97,655
465,911	445,921	95,709	455,467	97,758

MEDIA	95,719	97,774
D.S.	0,028	0,064
C.V.	0,03%	0,06%

TABLA 46. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del método empleando el Método de Razones de Absorbancia.

SULFAMETOXAZOL

CAD	ANALISTA 2			
	DÍA 1		DÍA 2	
	C EST	%REC	C EST	%REC
317,088	310,359	97,878	305,328	96,291
317,088	310,097	97,795	305,059	96,206
317,088	310,921	98,055	305,249	96,266
317,088	310,503	97,923	305,616	96,382
317,088	310,065	97,785	305,636	96,388
317,088	310,913	98,053	305,577	96,370

MEDIA	97,9149	96,3173
D.S.	0,11931	0,07423
C.V	0,12%	0,08%

397,569	378,41	95,181	381,115	95,862
397,569	377,543	94,963	381,214	95,886
397,569	378,06	95,093	381,847	96,046
397,569	378,082	95,099	380,998	95,832
397,569	378,652	95,242	381,014	95,836
397,569	378,323	95,159	381,871	96,051

MEDIA 95,1228 95,9189
 D.S. 0,09583 0,10236
 C.V. **0,10%** **0,11%**

465,911	451,714	96,953	462,966	99,368
465,911	451,608	96,930	463,09	99,394
465,911	451,307	96,865	462,9	99,354
465,911	451,69	96,948	462,609	99,291
465,911	451,618	96,932	463,107	99,398
465,911	451,567	96,921	463,14	99,405

MEDIA 96,9248 99,3684
 D.S. 0,03131 0,04262
 C.V. **0,03%** **0,04%**

TABLA 47. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del método empleando el Método de Razones de Absorbancia.

TRIMETOPRIM

ANALISTA 1				
DÍA 1			DÍA 2	
CAD	C EST	%REC	C EST	%REC
63,9054	63,7313	99,728	62,9677	98,533
63,9054	63,2474	98,970	63,455	99,295
63,9054	62,7815	98,241	63,3931	99,198
63,9054	63,6563	99,610	63,7316	99,728
63,9054	62,9815	98,554	63,5111	99,383
63,9054	63,0753	98,701	63,4569	99,298

MEDIA		98,9674		99,2392
D.S.		0,59327		0,39166
C.V.		0,60%		0,39%

79,1635	77,1778	97,492	75,6507	95,563
79,1635	77,5805	98,000	76,1025	96,133
79,1635	77,3655	97,729	75,8475	95,811
79,1635	77,6833	98,130	75,8783	95,850
79,1635	77,1473	97,453	76,5644	96,717
79,1635	76,7224	96,916	76,6138	96,779

MEDIA		97,6201		96,1422
D.S.		0,43731		0,50335
C.V.		0,45%		0,52%

93,9079	93,5685	99,639	91,9311	97,895
93,9079	93,7439	99,825	94,0227	100,122
93,9079	93,899	99,991	91,2676	97,188
93,9079	93,7164	99,796	91,6299	97,574
93,9079	93,6614	99,738	92,2728	98,259
93,9079	94,0538	100,155	91,228	97,146

MEDIA	99,8573	98,0308
D.S.	0,18631	1,10859
C.V	0,19%	1,13%

TABLA 48. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del método empleando el Método de Razones de Absorbancia.

TRIMETOPRIM

ANALISTA 2					
		DÍA 1		DÍA 2	
CAD	CEST	%REC	CEST	%REC	
63,905	63,444	99,279	62,9174	98,454	
63,905	63,164	98,839	63,3503	99,131	
63,905	64,798	101,397	63,2799	99,021	
63,905	63,554	99,451	63,1186	98,769	
63,905	63,248	98,971	62,6484	98,033	
63,905	63,680	99,647	63,1601	98,834	

MEDIA	99,5973	98,707
D.S.	0,93056	0,40423
C.V	0,93%	0,41%

79,164	78,242	98,835	78,0461	98,588
79,164	79,291	100,161	77,8927	98,395
79,164	78,465	99,117	77,6574	98,098
79,164	78,088	98,642	78,1778	98,755
79,164	78,438	99,083	78,4078	99,045
79,164	78,772	99,506	78,4058	99,043

MEDIA 99,224 98,6539
 D.S. 0,54372 0,37302
 C.V. 0,55% 0,38%

93,908	93,170	99,214	93,0369	99,072
93,908	93,257	99,307	92,9411	98,970
93,908	94,054	100,156	92,9775	99,009
93,908	92,990	99,022	93,1872	99,233
93,908	92,776	98,794	93,8857	99,976
93,908	93,403	99,462	93,1121	99,153

MEDIA 99,326 99,2356
 D.S. 0,46789 0,37518
 C.V. 0,47% 0,38%

TABLA 49. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del método empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales

SULFAMETOXAZOL

ANALISTA 1				
DÍA 1			DÍA 2	
CAD	C EST	%REC	C EST	%REC
317,088	309,991	97,7618	307,226	96,8898
317,088	308,697	97,3537	308,867	97,4072
317,088	304,773	96,1162	308,206	97,1988
317,088	311,711	98,3041	309,56	97,6258
317,088	308,538	97,3035	308,746	97,3691
317,088	309,768	97,6915	308,681	97,3487

MEDIA	97,4218	97,3066
D.S.	0,73352	0,24618
C.V.	0,75%	0,25%

397,569	383,004	96,3366	381,656	95,9974
397,569	385,116	96,8678	383,588	96,4835
397,569	386,661	97,2563	380,236	95,6404
397,569	384,626	96,7446	378,831	95,287
397,569	384,517	96,7172	380,32	95,6616
397,569	383,484	96,4574	383,773	96,53

MEDIA	96,73	95,9333
D.S.	0,32418	0,49803
C.V	0,34%	0,52%

465,911	456,283	97,9335	468,559	100,568
465,911	455,179	97,6964	462,854	99,3438
465,911	458,268	98,3595	463,801	99,5469
465,911	455,453	97,7553	464,219	99,6367
465,911	457,096	98,1079	468,431	100,541
465,911	459,853	98,6997	464,449	99,6862

MEDIA	98,0921	99,8871
D.S	0,38369	0,53012
C.V.	0,39%	0,53%

TABLA 50. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del método empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

SULFAMETOXAZOL

ANALISTA 2				
DÍA 1			DÍA 2	
CAD	C EST	%REC	C EST	%REC
317,088	309,872	97,7242	306,892	96,7844
317,088	309,142	97,494	306,562	96,6803
317,088	307,294	96,9113	309,38	97,5691
317,088	309,419	97,5813	308,022	97,1409
317,088	308,529	97,3007	305,859	96,4587
317,088	308,707	97,3567	307,191	96,8786

MEDIA	97,3947	96,9187
D.S.	0,28183	0,38998
C.V.	0,29%	0,40%

397,569	381,913	96,0622	389,19	97,8925
397,569	385,757	97,0291	387,099	97,3666
397,569	380,732	95,7651	389,266	97,9118
397,569	379,699	95,5053	392,19	98,6472
397,569	378,054	95,0916	392,036	98,6084
397,569	382,962	96,3261	391,833	98,5573

MEDIA		95,9632		98,164
D.S.		0,67622		0,52132
C.V.		0,70%		0,53%

465,911	463,651	99,5148	480,795	103,195
465,911	462,639	99,2976	483,442	103,763
465,911	465,713	99,9575	478,396	102,68
465,911	461,028	98,9519	480,277	103,083
465,911	461,535	99,0607	475,282	102,011
465,911	465,86	99,989	479,835	102,988

MEDIA		99,4619		102,953
D.S.		0,44143		0,582
C.V		0,44%		0,57%

TABLA 51. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del método empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

TRIMETOPRIM

ANALISTA 1				
DÍA 1			DÍA 2	
CAD	C EST	%REC	C EST	%REC
63,9054	62,1361	97,2313	60,6192	94,8577
63,9054	61,5685	96,3431	59,6543	93,3478
63,9054	61,7506	96,6281	60,4759	94,6335
63,9054	61,6618	96,4892	59,7531	93,5024
63,9054	61,7078	96,5611	60,1298	94,0919
63,9054	60,7959	95,1342	60,2913	94,3446

MEDIA 96,3978 94,1296
D.S 0,69026 0,606
C.V. 0,72% 0,64%

79,1635	76,1016	96,1321	72,2088	91,2148
79,1635	75,673	95,5907	72,5662	91,6662
79,1635	75,2245	95,0241	73,4507	92,7835
79,1635	75,9574	95,9499	73,3009	92,5942
79,1635	75,7508	95,6891	73,8447	93,2812
79,1635	75,7344	95,6683	73,2484	92,528

MEDIA 95,6757 92,3446
D.S 0,37829 0,76192
C.V. 0,40% 0,83%

93,9079	91,4158	97,3463	88,359	94,0912
93,9079	91,3371	97,2625	91,0272	96,9324
93,9079	91,2172	97,1348	88,3136	94,0428
93,9079	92,361	98,3528	89,2098	94,9971
93,9079	90,9476	96,8477	89,2604	95,051
93,9079	91,2111	97,1282	87,5136	93,1909

MEDIA	97,3454	94,7176
D S.	0,52172	1,28633
C V.	0,54%	1,36%

TABLA 52. Estimación de concentraciones hechas para la etapa de precisión y exactitud del método empleando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales

TRIMETOPRIM

CAD	ANALISTA 2			
	DÍA 1		DÍA 2	
	CEST	%REC	CEST	%REC
63,9054	60,9202	95,3287	59,3182	92,8219
63,9054	60,4795	94,6391	59,691	93,4052
63,9054	61,5519	96,3171	59,6587	93,3548
63,9054	61,9163	96,8874	59,581	93,2331
63,9054	62,4563	97,7324	57,9319	90,6526
63,9054	60,3818	94,4863	60,2571	94,2912

MEDIA	95,8985	92,9598
D S.	1,29782	1,2283
C V.	1,35%	1,32%

79,1635	73,2286	92,503	73,3687	92,6799
79,1635	74,8393	94,5376	73,4204	92,7452
79,1635	74,0604	93,5537	72,883	92,0664
79,1635	72,8768	92,0586	73,7533	93,1657
79,1635	74,2982	93,854	73,4165	92,7404
79,1635	73,4108	92,7331	75,0838	94,8465

MEDIA	93,2067	93,0407
D.S	0,93255	0,95219
C.V.	1,00%	1,02%

93,9079	86,3834	91,9874	89,8734	95,7038
93,9079	88,4552	94,1936	90,0445	95,886
93,9079	88,726	94,4819	91,1079	97,0184
93,9079	88,3365	94,0671	90,1901	96,041
93,9079	87,5384	93,2173	89,4833	95,2884
93,9079	87,2666	92,9279	88,4264	94,1629

MEDIA	93,4792	95,6834
D.S.	0,94442	0,94014
C.V.	1,01%	0,98%

APÉNDICE 3

MATERIALES Y REACTIVOS

REACTIVOS

- 1 - Metanol (grado reactivo).
- 2 - Estándar secundario de sulfametoxazol.
- 3.- Estándar secundario de trimetoprim.
- 4.- Hidróxido de sodio anhidro.
- 5.- Agua desionizada.

MATERIALES

- 1 - Matraces volumétricos de 10, 25, 50, 100 y 2000 ml
- 2.- Tubos de fermentación con tapón y tubos de ensaye.
- 3.- Vasos de precipitado de 100 y 250 ml.
- 4.- Embudos de vidrio.
- 5.- Papel filtro Watman No. 1 ó 40.
- 6.- Papel filtro poro ancho
- 7.- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4 y 5 ml

EQUIPO

- 1 - Vortex Genie. K-550-G
- 2 - Espectrofotómetro Varian Cary13e.
- 3 - Microbalanza. Ohaus. AP 250D-O

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución de Hidróxido de sodio 0.1 N

- 1 - Pesar en papel encerado aproximadamente exacto 8 g de hidróxido de sodio.
- 2.- Transferirlo a un matraz volumétrico de 2000 ml que contenga 1000 ml de agua desionizada.
- 3 -Colocar tapón y agitar hasta disolver completamente .
- 4.- Llevar a volumen de aforo con agua desionizada.
- 5 - Mezclar.
- 6 - Filtrar (filtro poro ancho).
- 7 - Almacenar en frasco ámbar bien cerrado.

Solución de Hidróxido de sodio-Metanol 1:1

- 1.- En una probeta verter 150 ml de metanol
- 2.- Verter a matraz erlenmeyer de 500 ml
- 3 - Agregar 150 ml de NaOH 0.1 N en una probeta.
- 4.- Verter a matraz erlenmeyer que contiene el metanol.
- 5.- Mezclar.

Solución estándar de sulfametoxazol 50 mcg-ml.

- 1.- Pesar en papel encerado exactamente 62.5 mg de sulfametoxazol estándar.
- 2 - Transferir polvo a matraz volumétrico de 50 ml
- 3.- Agregar 20 ml de NaOH 0.1N.
- 4 - Disolver el polvo.
- 5 - Llevar al volumen de aforo con NaOH 0.1N
- 6 - Mezclar.
- 7 - Tomar 4 ml y colocarlos en un matraz volumétrico de 100 ml.
- 8 - Llevar al volumen de aforo con NaOH 0 1N

Solución estándar de trimetoprim 10 mcg/ml

- 1.- Pesar en papel encerado aproximadamente exacto 12.5 mg de trimetoprim estándar.
- 2.- Transferir polvo a matraz volumétrico de 50 ml.
- 3 - Agregar 20 ml de metanol.
- 4.- Disolver polvo.
- 5.- Llevar al volumen de aforo con metanol.
- 6.- Mezclar.
- 7.- Tomar 4 ml y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml.
- 8.- Llevar a volumen de aforo con NaOH 0.1N.
- 9 - Mezclar.

ENSAYO

a) Mezcla estándar.

- 1.- Tomar 4 ml de solución de sulfametoxazol 50 mcg/ml.
- 2 - Verter en matraz volumétrico de 10 ml.
- 3 - Tomar 4 ml de solución de trimetoprim 10 mcg/ml
- 4 - Verter en matraz volumétrico que contiene el sulfametoxazol 50 mcg/ml.
- 5.- Llevar al volumen de aforo con NaOH 0.1N

b) Preparación de la muestra.

- 1.- Pesar individualmente 20 comprimidos.
- 2.- Determinar el peso promedio
- 3.- Pulverizarlos.
- 4 - Pesar en microbalanza aproximadamente exacto 94 mg de polvo en papel encerado.
- 5.- Colocar en tubo de fermentación .
- 6.- Agregar 40 ml de solución metanol-NaOH 0.1 N 1:1
- 7.- Agitar durante 3 minutos en vórtex a velocidad núm. 6.

- 8.- Filtrar con papel whatman número 1 o 40 y verter en matraz volumétrico de 50 ml.
- 9.- Lavar 4 veces el papel filtro con 2 ml de solución Metanol-NaOH 0.1 N 1:1.
- 10.- Llevar a volumen de aforo.
- 11.- Tomar 2 ml y llevarlos a un volumen de aforo de 25 ml con NaOH 0.1 N
- 12.- Tomar 2 ml y llevarlos a un volumen de aforo de 10 ml con NaOH 0.1 N.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1- Beebe, K.; Kowalski, B. "An introduction to multivariate calibration and analysis". Analytical Chemistry Vol. 59, No. 17 September 1, 1987. pp. 1007A - 1017A.
- 2.- "Clarke's Isolation and Identification of Drugs". 2ª Edición, The Pharmaceutical Press; Inglaterra, 1986. pp. 221, 988-989, 1049-1050. RS 421/C53. 1986.
- 3- Connors, K.A: "Curso de análisis farmacéutico", Edición española de la 2da. Edición inglesa. Reverte México. 1980. pp 623-632.
- 4.- Dahlan, R. "Solubilities and intrinsic dissolution rates of sulphamethoxazole and trimethoprim". Journal of pharmacy and pharmacology; 39(6). 1987. pp. 246-251.
- 5.- Despagne, F.; Masart, D. "Optimization of partial-least-squares calibration models by simulation of instrumental perturbations". Analytical Chemistry . 69(16) . 1997 pp 3391.
- 6.- "Diccionario de Especialidades Farmacéuticas". Trigésima edición 1984. pp 87. RS 141.24/D5 1974
- 7.- Foye, W O. "Principios de química farmacéutica". Reverte; España. 1984. pp 751, 765, 766, 839 RS 403/F6818.
- 8.- Garrido F., A.; Martínez G., M.; Martínez V., J. L.; Gil G , M. D. "Partial least-squares and principal component regression of multi-analyte high-performance liquid chromatography with diode-array detection". Journal of Chromatography A. 727 (1996). pp 27-38.
- 9.- Geraldi, P.; Kowalski, B "Partial least - squares regression: a tutorial" Analitica Chimica Acta. 185(1986).pp 1-17.
- 10.- Haaland M;D.; Thomas, E.V."Partial least - squares methods for spectral analysis:1.relation to other quantitative calibration methods and the extraction of quantitative information". Analytical Chemistry. Vol. 60. No 11. June, 1988. pp. 1193 - 1202.

- 11- Islas J , P. "Desarrollo y validación de técnicas analíticas para el control de calidad de buflomedil-hcl un vasodilatador periférico" Cuautitlán Izcalli Edo. de Méx 1990 pp 16-19.
- 12.- Jimena G , J. A.; Giménez P., J., Cano P., J. M. "Determination of active components in insecticide formulations by liquid chromatography and resolution of overlapped peaks by multivariate analysis and derivative spectrophotometry" *Analytica Chymica Acta.* 321(1996).pp 273-278.
- 13.- . Jobson J. D "Applied multivariate data analysis". Vol 2. Categorical and multivariate methods. Springer - Verlag. 1992. pp. 1-3
- 14.- Litter, M. "Compendio de farmacología" El ateneo. 4ª. Edición Argentina 1988.pp. 749-759. QP 905/L52.
- 15.- López de Alba, P. L., López M., L ; Amador H., J "Métodos de calibración multivariante". Sociedad Química de México, A.C.41 (1).1996.pp 34-44.
- 16.- Manius, G J. "Analytical profiles of drug substances: trimethoprim" Edited by Florey, K. Vol. 7. Academic Press, USA. 1978. pp. 445-475.
- 17.- Martin A., Swarbrick J. and Cammarata A. "Physical pharmacy" , 3ª. Edición. Lea- Fabirger; USA. 1983. pp. 119-120.
- 18 - Monson; J. W. "Pharmaceutical analysis modern methods part b". Drugs and the pharmaceutical Sciences;.. vol.11; Marcel Dekker Inc., USA. 1984. pp. 456-459.
- 19.- Pernarowski, M., Knevel, A M., Christian, J E "Application of absorbancy ratios to the analysis of pharmaceuticals I". (Theory and analysis of binary mixtures). *Journal of Pharmaceutical sciences*, 50. 1961.pp. 943-946
- 20.- Pernarowski, M ; Knevel, A. M ; Chrystian, J E."Aplication of absosorbancy ratios to the analysis of pharmaceuticals II". (Practical Aspects of the Anallysis of binary Mixtures); *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 50(1961). pp 946-53

- 21.- Fernarowski, M.; Yokoyama, F. "Application of absorbandancy ratios to the analysis of pharmaceuticals III". (Simultaneous Analysis of Aminophilline an Phenobarbital). Journal of Pharmaceutical Sciences. 50(1961). pp 953-957.
- 22.- Ramírez G., L. "Validación del método analítico para validación del diclofenaco sódico en grageas deliberación prolongada y materia prima".. Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx. 1992.pp 19-23.
- 23.-Remington "Farmacia". 2ª. Reimpresión. 17ª. Edición. Panamericana Argentina 1990. Vol pp. 851. Vol. 2 pp. 1512,1595.
- 24.- Romero C., J.J."Aplicación del método razones de absorbancia en la determinación de los componentes en mezclas binarias: aspirina/salicilato y sulfametoxazol/trimetoprim". Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx. 1995. pp 23-30.
- 25.- Rudy, B.C. and Bernard Z. Senkowski. "Analytical profiles of drug substances sulphametoxazole". Edited by Florey, K; vol 2. Academic Press. USA 1973.pp 467-486.
- 26.- "The Merck Index", Merck - Co., Inc., Eleventh Edition, Centennial Edition, Rahway N J., USA 1989. pp 8626, 8892.
- 27.-"The United States Pharmacopeia" XXII edición. United States Pharmacopeial Convention Inc. 22 Revision. USA .1989 pp. 1291, 1292, 1421