



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

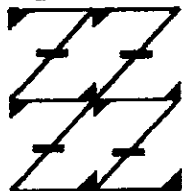
2e).
RECEIVED
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

IMPLEMENTACION Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO POR ESPECTROFOTOMETRIA PARA CUANTIFICAR FTALYL SULFATIAZOL EN LA FORMA FARMACEUTICA TABLETAS,

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: ANITA PEREZ SALDAÑA

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE

DE NUESTRA REFLEXIÓN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1998

264048



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.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|-------------------------------------|----|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| I. ANTECEDENTES TEORICOS..... | 3 |
| A. Ftalilsulfatiazol..... | 3 |
| B. Tabletas..... | 15 |
| C. Espectrofotometría..... | 18 |
| D. Validación..... | 33 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 44 |
| III. OBJETIVOS..... | 46 |
| IV. HIPOTESIS..... | 46 |
| V. METODOLOGIA..... | 47 |
| A. Materiales y Método..... | 47 |
| B. Evaluación del Sistema..... | 52 |
| C. Evaluación del Método..... | 53 |
| VI. RESULTADOS..... | 55 |
| A. Sistema..... | 55 |
| B. Método..... | 59 |
| VII. ANALISIS DE RESULTADOS..... | 70 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 72 |
| IX. BIBLIOGRAFIA..... | 73 |
| ANEXO..... | 76 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|---------------|--|----|
| Figura No 1. | Espectro de Absorción de IR de Ftalilsulfatiazol..... | 4 |
| Figura No 2. | Fórmula Estructural de Sulfanilamida..... | 6 |
| Figura No 3. | Formación de Ftalilsulfatiazol..... | 7 |
| Figura No 4. | Acciones de las Sulfonamidas..... | 8 |
| Figura No 5. | 5(a) y 5(b). Movimiento Ondulatorio de la Luz..... | 19 |
| Figura No 6. | El Espectro Electromagnético..... | 21 |
| Figura No 7. | Ley de Beer..... | 24 |
| Figura No 8. | Componentes de un Espectrofotómetro de un solo haz..... | 28 |
| Figura No 9. | Mecanismo de Reacción..... | 49 |
| Figura No 10. | Linealidad del Sistema..... | 57 |
| Figura No 11. | Espectro del Placebo, Placebo cargado y Estándar para Determinar La Especificidad del Método..... | 59 |
| Figura No 12. | Linealidad del Método..... | 63 |

INDICE DE TABLAS

| | | | |
|----------|------|---|----|
| Tabla No | I. | Colores Complementarios de la luz visible..... | 23 |
| Tabla No | II. | Determinaciones que se evaluan en diferentes tipos de Método... | 34 |
| Tabla No | III. | Valores del Coeficiente de Variación paraa la Precisión del Método..... | 39 |
| Tabla No | IV. | Valores del Por ciento Recuperado y el Coeficiente de Variación Para la Exactitud del Método..... | 42 |
| Tabla No | V. | Concentración de Ftalilsulfatiazol en cinco niveles para determinar La Linealidad del Sistema..... | 52 |

DEDICO ESTE TRABAJO A :

Mi Madre.

*Por haberme dado tanto amor
Motivarme y ayudarme en el
Transcurso de mi vida.*

*A todos y cada uno de mis
Queridos hermanos, en especial
A Felipe a quien tanto quiero.*

*Al Ing. Mario Cruz. por todo
Su amor, apoyo incondicional
Y confianza ; Gracias Negro!*

UN ENORME AGRADECIMIENTO AL JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Q.F.B. MAURO ARRIETA SANCHEZ.

VOCAL: Q.F.B. IDALIA LETICIA FLORES GOMEZ

SECRETARIO: Q.F.B. MA. DE LOURDES CERVANTES MARTINEZ

SUPLENTE: Q.F.B. CESAR ESCAMILLA FLORES.

SUPLENTE: Q.F.B. MARTHA UGALDE HERNANDEZ

*POR PERMITIRME REALIZAR UN OBJETIVO QUE TIEMPO ATRAS VEIA TAN
LEJANO.*

*EN ESPECIAL A Q.F.B. IDALIA L. FLORES GOMEZ POR SU AMISTAD Y
APOYO ¡GRACIAS!*

INTRODUCCION

La industria farmacéutica hoy día, pasa por momentos difíciles ya que los mercados no han tenido la misma tendencia de crecimiento anterior, esto como consecuencia de que los organismos internacionales y los propios gobiernos participan como importantes competidores (con abundancia de productos genéricos o equivalentes); aunado a esto también la presión social y gubernamental sobre el control de los precios y la calidad de los medicamentos (1).

Por todo esto los fabricantes de medicamentos están conscientes de su gran responsabilidad tanto moral como social y tratan de manejar sus productos dentro de las normas éticas y de calidad más estrictas.

El papel de la industria farmacéutica es proporcionar al paciente medicamentos que tengan la pureza, concentración, identidad, potencia e inocuidad requeridos para su uso y por ello se ha visto en la necesidad de contar con medios para asegurar que los produce (2).

Durante todo el proceso de fabricación, los productos farmacéuticos deben contar con un alto grado de calidad como ya se ha mencionado de manera tal que el producto final posea las características físicas, químicas y analíticas especificadas. Ante tales requerimientos, aumenta cada día la necesidad de desarrollar mejores métodos de análisis que nos permitan verificar dicha calidad.

El diseño de una formulación cuyo principio activo es Ftalitsulfatiazol hace necesario implementar la metodología que permita cuantificar a dicho activo, y a la vez establecer las mejores condiciones del análisis.

En el presente trabajo después de establecer, las óptimas condiciones de análisis, se procede a la validación del método cuyo uso es de control de calidad.

De manera general la validación de un método incluye una evaluación del Sistema, y del Método; así como la Estabilidad de la muestra; dichos parámetros fueron considerados para el Método en estudio, por lo que se estableció que la metodología analítica da resultados confiables y reproducibles.

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo en una nueva formulación y de la técnica de análisis en control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia en donde el químico se da cuenta si el estudio, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado **(3)**

I. ANTECEDENTES TEORICOS

A. Ftalilsulfatiazol

1. PROPIEDADES FÍSICAS

a. Descripción

Polvo cristalino con sabor ligeramente amargo.

b. Punto de Fusión

De 272 – 277 °C (descompone) cuando el punto de fusión es precalentado a 220 – 225 °C en un baño maria.

c. Color

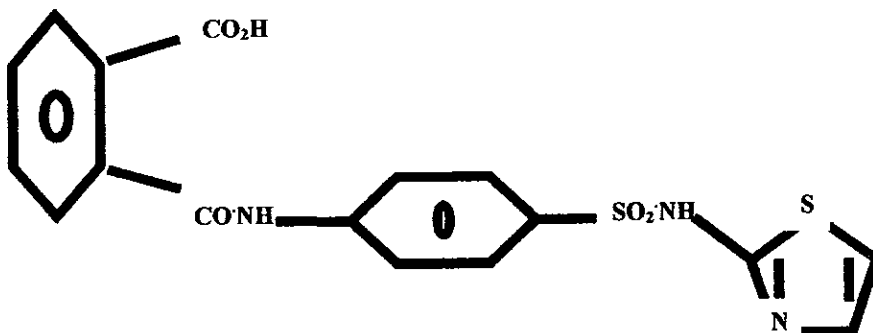
Blanco o ligeramente blanco amarillento.

2. PROPIEDADES QUÍMICAS

a. Fórmula mínima

$C_{17}H_{13}N_3O_5S_2$ Peso molecular 403.4

b. Fórmula estructural



c. Espectro de Absorción infrarroja

Los picos principales están a 1532, 1142, 1084, 1710, 1585 y 1560 nm. Fig. No. 1

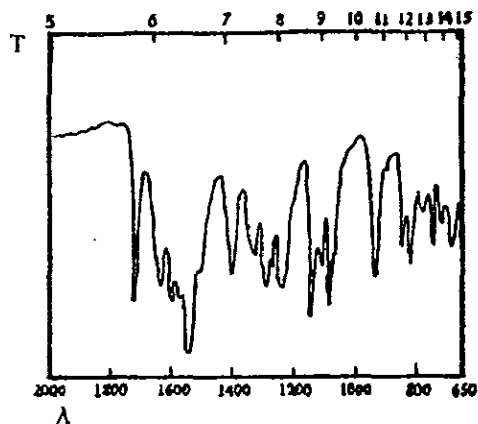


FIGURA No. 1. ESPECTRO DE ABSORCION IR DE FTALISULFATIAZOL (11).

3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

a. Solubilidad

Ligeramente soluble en etanol (96 %) y acetona.

Fácilmente soluble en dimetilformamida.

Fácilmente soluble en NaOH o KOH.

Fácilmente soluble en agua de amonio y HCL concentrado.

Prácticamente insoluble en cloroformo y agua.

Prácticamente insoluble en éter (4).

4. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS

a. Origen y química.

Klarer y Mietzsch en 1932 sintetizaron un colorante rojo, el Prontosil, el cual fue probado, pero se encontró ineficaz contra las bacterias *in vitro*. En 1935 Domagk demostró que esta sustancia era sorprendentemente activa contra las infecciones estreptocócicas hemolíticas y de algunos otros tipos. Esto era debido a la conversión en el organismo del Prontosil en sulfanilamida, la sustancia activa. Desde entonces, la molécula fue químicamente alterada uniéndole muchos radicales diferentes, por lo cual ha ocurrido una proliferación de compuestos activos, tal vez 150 sulfonamidas diferentes han sido puestas en el mercado en un tiempo o en otro, estando proyectadas las modificaciones principalmente para lograr mayor actividad antibacteriana, mayor solubilidad o acción más prolongada. El advenimiento de la penicilina primero y de otros antibióticos después disminuyó la utilidad de las sulfonamidas. Sin embargo la acción sinérgica de la sulfonamida con el trimetoprim ha provocado un enorme resurgimiento de éstas en todas partes del mundo, además de su bajo costo y su eficacia en enfermedades bacterianas comunes (5,6).

El término sulfonamida se emplea como un nombre genérico para los derivados de la sulfanilamida. Todas son polvos cristalinos blancos, en su mayor parte poco solubles en agua. Las sales sódicas solubles se preparan fácilmente. Los requerimientos químicos básicos y mínimos para la acción antibacteriana de una sulfa están contenidos en la sulfanilamida (Fig. No. 2).

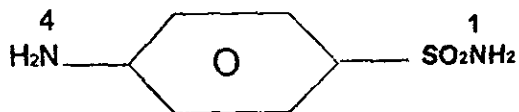
El grupo para-NH₂ es esencial para la actividad bacteriana máxima, y puede ser sustituido únicamente por los grupos químicos que el huésped transforme en grupos amino libre. Las sustituciones orto y meta - NH₂ prácticamente carecen de actividad antibacteriana. El grupo sulfamilo (-SO₂ NH₂) no es esencial para la actividad antibacteriana, en su forma original, pero el átomo de azufre sí lo es, y debe ligarse directamente con el anillo bencénico. El grupo sulfamilo es la fracción más importante de la sulfanilamida y, por esta razón, el nitrógeno de su NH₂ amidico es designado N¹, el nitrógeno de la fracción para -NH₂ recibe la designación de N⁴ (Fig. No. 2)



FIGURA No. 2. FORMULA ESTRUCTURAL DE SULFANILAMIDA (6).

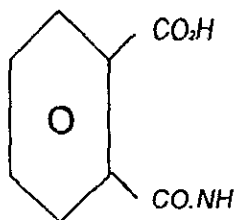
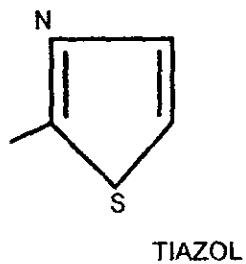
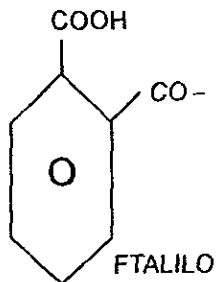
En esta forma, la sustitución a nivel de N¹ da lugar a sulfonamidas de potente actividad antimicrobiana, mientras que la sustitución a nivel de N⁴ y N¹ a la vez da lugar a drogas inactivas de por sí y que deben desdoblarse en el organismo para perder el grupo unido a N⁴ y resultar activas. Las sulfonamidas no absorbibles y que se utilizan para la quimioterapia intestinal derivan en general del sulfatiazol - sustitución en N¹ al que se añade un radical ácido carboxílico sustitución en N⁴ de manera que se origina el Ftalilsulfatiazol (Eftiazol), (6,7,8).

SULFANILAMIDA



SUSTITUCIÓN EN N⁴

SUSTITUCIÓN EN N⁵



FTALILSULFATIAZOL



FIGURA No. 3 FORMACION DE FTALILSULFATIAZOL (7).

b. Mecanismo de acción.

Las sulfonamidas son análogos estructurales y antagonistas competitivos del ácido para aminobenzoico (PABA) ver Fig. No. 4, evitando así la utilización bacteriana normal de PABA para la síntesis de ácido fólico. En forma más específica los microorganismos más sensibles requieren PABA extracelular para formar ácido fólico, un paso esencial en la producción de las purinas y el último término de la síntesis de ácidos nucleicos esencial para el crecimiento y multiplicación de las bacterias. Las sulfonamidas pueden entrar en la reacción en lugar del PABA, competir por la enzima dihidropteroato sintetasa y formar análogos no funcionales del ácido fólico (Fig No. 4), como resultado del crecimiento ulterior del microorganismo es impedido. Sin embargo, dicho crecimiento puede continuar cuando la sulfonamida es desplazada por un exceso de PABA, o cuando se disocia de la enzima, (5,6).

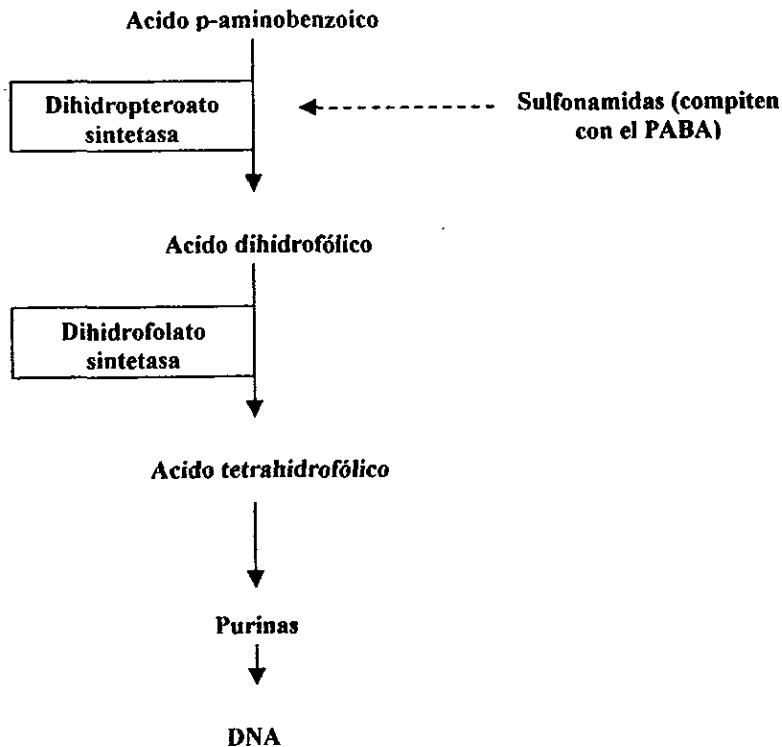


FIGURA No. 4. ACCIONES DE LAS SULFONAMIDAS (5).

Los mamíferos no sintetizan folatos, ya que son un constituyente indispensable de la dieta y se absorben en el intestino y de ahí pasan a las células, en parte por difusión y en parte por transporte activo. Sin embargo, algunas bacterias no pueden absorber folato del medio en que crecen, y tienen que sintetizarlo. Estas diferencias metabólicas entre los mamíferos y algunas bacterias rigen la toxicidad selectiva de las sulfonamidas.

Los microorganismos que no necesitan ácido fólico o que, como los mamíferos, utilizan el ácido fólico preformado, no son sensibles a las sulfonamidas. Las sulfonamidas no matan directamente a las bacterias sensibles más bien actúan como bacteriostáticos. Cuando se añaden a un cultivo de bacterias, se retrasan varias replicaciones celulares antes que se detenga la multiplicación. Este hecho se debe a que las bacterias utilizan primero sus depósitos de ácido fólico preformado.

Como ya se menciono las sulfonamidas, son principalmente agentes bacteriostáticos (Ftalilsulfatiazol actua como agente bacteriostático) y se necesitan en forma esencial para lograr mejoría clínica satisfactoria, que estén intactos los mecanismos de defensa celular y humoral del huésped.

Algunas sulfonamidas pueden alcanzar concentraciones bactericidas *in vivo*, como en vías urinarias después de la administración de sulfas solubles, y en tejidos oculares, después de la aplicación local de la sulfacetamida (7,9).

c. Espectro antibacteriano.

In vitro e in vivo las sulfonamidas son activas sobre.

a) Cocos grampositivos

Streptococcus pyogenes

Estreptococo hemolítico beta.

Streptococcus pneumoniae o neumococo.

Staphylococcus aureus.

Streptococcus viridans.

b) Bacilos grampositivos.

Bacillus anthracis.

El género Clostridium.

c) Cocos gramnegativos.

Neisseria meningitis ó meningococo.

Pocas cepas de la Neisseria gonorrhoeae ó gonococo.

d) Bacilos gramnegativos.

Escherichia coli ó colibacilo.

Haemophilus influenzae.

Haemophilus ducreyi-chancroide.

Proteus mirabilis.

Proteus vulgaris.

Yersinia pestis.

Shigella – disenteria bacilar.

Salmonellas.

Brucella.

Klebsiella pneumoniae.

Enterobacter aerogenes.

Pseudomonas aeruginosa

e) Actinomicetas.

Actinomyces israelii.

f) Clamidas.

Chlamydia psittaci.

Chlamydia trachomatis.

En cambio no actúan sobre las espiroquetas, rickettsias y protozoarios salvo los parásitos del paludismo y de la toxoplasmosis sobre los que tienen alguna acción *in vivo*, ni sobre los virus (8).

d. Absorción, destino y excreción.

Las sulfonamidas se absorben con rapidez en el tracto gastrointestinal, se absorbe alrededor del 70 al 100 % de una dosis oral y puede encontrarse sulfonamida en la orina 30 minutos después de su ingestión. Las sulfonamidas ingresan con rapidez en los líquidos pleural, peritoneal, sinovial ocular y fluidos orgánicos similares, pudiendo alcanzar ahí, un 50 a 80 % de las concentraciones sanguíneas determinadas en forma simultánea.

El intestino delgado es el sitio principal de absorción pero parte del fármaco se absorbe en el estómago. La absorción en otros lugares, como vagina, tracto respiratorio o piel erosionada es variable y poco confiable, pero puede ingresar una cantidad suficiente en el organismo como para causar reacciones tóxicas en las personas susceptibles o producir sensibilización.

No hay acuerdo general en cuanto a los niveles de sulfonamidas en suero, y la respuesta clínica, pero, en términos generales, los niveles que tienen eficacia en terapéutica están entre 5 a 15 mg/100 ml, se obtienen fácilmente con las dosis corrientes de saturación y sostén. Todas las sulfonamidas se unen en grados variados a las proteínas plasmáticas, en particular a la albúmina. Esto está determinado por la hidrofobicidad, de cada fármaco y su pKa; a pH fisiológico, los fármacos con un pKa elevado exhiben un bajo grado de unión con las proteínas y viceversa. Las sulfonamidas sufren alteraciones metabólicas *in vivo*, en especial en el hígado, la sulfonamida N⁴ acetilada es el derivado metabólico principal, cada agente sufre un grado diferente de acetilación; este proceso es desventajoso porque los productos resultantes no tienen actividad antibacteriana y retienen las potencialidades tóxicas de la sustancia de origen.

Parte de las sulfonamidas se excretan en forma inalterada y parte como productos metabólicos. Se eliminan fundamentalmente en orina, pero hay alguna pérdida por sudor, lágrimas, saliva, leche y heces, que puede tener importancia terapéutica.

Las sulfas son metabolizadas por el riñón en forma similar a la urea. El glomérulo filtra el fármaco libre y puede haber resorción parcial. El glomérulo filtra derivados acetilados, y dado que no hay resorción tubular, surge una concentración mayor del fármaco acetilado, en comparación con la forma libre, en túbulos renales, puede ser 15 a 25 veces de las que se observan simultáneamente en plasma, lo cuál explica la eficacia de las sulfas en algunas infecciones de vías urinarias (6,7).

Ftalilsulfatiazol es una sulfonamida altamente insoluble lo que permite que estos fármacos actúen localmente en la luz del intestino, también se utiliza en la preparación pre-operatoria y post-operatoria de pacientes que requieren intervención quirúrgica del tracto intestinal. En cuanto a su biotransformación Ftalilsulfatiazol a nivel del intestino sobre todo en el colón es hidrolizado por bacterias a sulfatiazol que es la sustancia antimicrobiana activa. La concentración hemática de esta sulfonamida raras veces excede de (15 ug/ml), sulfatiazol se metaboliza en el hígado y en el riñón, por conjugación esencialmente con el ácido acético, se acetilan a nivel del nitrógeno amínico N⁴ y dicha conjugación se produce por intermedio de la acetilasa que une a la acetilcoenzima A a la sulfonamida, la mayor cantidad de este fármaco es excretado en las heces y solamente el 5 % es eliminado por la orina (7,8).

e. Resistencia Bacteriana

La resistencia bacteriana a las sulfonamidas se origina por mutación y selección al azar o por transferencia de la resistencia mediante plásmidos. Una vez que está resistencia alcanza su máximo desarrollo suele ser persistente e irreversible, en especial cuando se produce *in vivo*. Así el uso terapéutico generalizado de las sulfonamidas contra gonococos y meningococos ha dado por resultado el surgimiento de cepas resistentes a las sulfonamidas en todo el mundo. El extenso uso de las sulfonamidas contra los estreptococos beta hemolíticos ayudo de manera semejante a la aparición de cepas resistentes.

Es probable que la resistencia a las sulfonamidas sea la consecuencia de una alteración de la constitución enzimática de la célula bacteriana; ella puede caracterizarse por:

- 1). Una alteración en la enzima que utiliza PABA, dihidropteroato sintetasa.
- 2). Un aumento de la capacidad para destruir o inactivar el fármaco.
- 3). Una vía metabólica alternativa para la síntesis de un metabolito esencial.
- 4). Un aumento en la producción de un metabolito esencial ó antagonista del fármaco.

Esto ultimo mencionado ha recibido mayor atención, ya que se ha observado por ejemplo, que algunos estafilococos resistentes pueden sintetizar 70 veces mas PABA que las cepas originales sensibles. A pesar de ello, el aumento en la producción de PABA no es un hallazgo constante en las bacterias que son resistentes a las sulfonamidas (5,6).

f. Toxicidad

Las sulfonamidas pueden producir una extensa variedad de efectos adversos que en parte se deben a la alergia y en parte a toxicidad directa.

Los efectos adversos más comunes son fiebre; erupciones cutáneas, fotosensibilidad, urticaria, náusea, vómito, diarrea y dificultades referibles al aparato urinario. Otros incluyen estomatitis, conjuntivitis, artritis, transtornos hemopoyéticos, hepatitis, dermatitis exfoliativa poliarteritis nodular, síndrome de Stevens-Johnson, psicosis y muchos más.

A. Transtornos del aparato urinario: Las sulfonamidas pueden precipitar en la orina, a pH neutro o ácido produciendo cristaluria hematuria o aún obstrucción. También se piensa que las sulfonamidas causan varios tipos de nefrosis y nefritis alérgica, así como deterioro de la función renal.

B. Transtornos hematopoyéticos. Las sulfonamidas pueden producir anemia (hemolítica o aplásica), granulocitopenia, trombocitopenia o reacciones leucemoides.

Las sulfonamidas causan reacciones hemolíticas especialmente en pacientes cuyos eritrocitos son deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenada. Las sulfonamidas tomadas cerca del fin del embarazo, aumentan el riesgo de kernicterus en los recién nacidos (5).

g. Administración o dosificación.

1. VÍA BUCAL. Es el método más fácil, inocuo y económico para administrar sulfonamidas. Los fármacos se absorben en forma rápida y casi total y en término de dos a cuatro horas surgen los niveles sanguíneos máximos. La administración bucal de las sulfonamidas de poca absorción como es el caso de Ftalilsulfatiazol permite que estos fármacos actúen localmente en la luz del intestino. La dosis de Ftalilsulfatiazol para tratamiento pre-operatorio y post-operatorio inicialmente es de 125 mg/Kg. de peso corporal, después 125 mg/Kg. diariamente en 3, o 4 o 6 dosis. La dosis diaria no debe exceder de 8 gramos. Para colitis ulcerativa: la dosis usual es de 50 a 100 mg/Kg. de peso corporal diariamente dividida en 3 a 6 dosis. El curso inicial de 2 a 4 semanas es seguido por un periodo de 5 a 10 días. Ftalilsulfatiazol se expende en tabletas de 500 mg y de 1 g

2. ADMINISTRACION PARENTERAL. Si no es posible la administración bucal, cabe inyectar por vía parenteral las sales sódicas solubles de las sulfonamidas. Se prefiere el goteo intravenoso lento a la inyección subcutánea intramuscular, porque las sulfonamidas sódicas son muy irritantes para los ojos. Por sus propiedades irritantes las sulfas nunca deben ser inyectadas por vía intrarraquídea

3. APLICACIÓN TOPICA La aplicación local de las cremas y pomadas a base de sulfas y otros preparados deben reservarse para el saco conjuntival, conducto auditivo y la vagina. Se evitará la aplicación de los productos en otros sitios, dado que su empleo conlleva considerable riesgo de generar reacciones de sensibilidad (7,8,10).

A. Tabletas

1. DEFINICION

La tableta es una forma farmacéutica sólida, de dosificación unitaria. Se obtiene por comprensión a partir de polvos secos, cristales o granulados y, en la mayoría de las veces con adición de coadyuvantes (12).

2. COMPONENTES

a. Diluyentes

Un diluyente es una sustancia inerte para aumentar el volumen de una tableta, cuando la dosis única del principio activo es muy pequeña y de esta manera tenga un tamaño práctico para comprimirla. Algunos diluyentes son: lactosa, almidón, manitol, sorbitol, celulosa microcristalina, sacarosa, etc. (12, 13).

b. Aglutinantes

Son excipientes que imparten cohesividad a los polvos, aglutinándolos para la formación de gránulos. Los aglutinantes o cohesivos dan a la formulación de la tableta una cohesividad que asegura que la tableta se mantenga intacta después de comprimirla y mejora las cualidades de fluidez mediante la formulación de gránulos de la dureza y tamaño que se desea. Los materiales que se suelen usar como cohesivos son: almidón, gelatina y azúcares como sacarosa, glucosa, dextrosa, melaza y lactosa (13).

c. Desintegrantes

Es toda sustancia o mezcla de sustancias que se añade a una tableta para facilitar su disgregación ó desintegración después de administrarla. Existen tres teorías principales que explican el mecanismo de desintegración.

1). Hinchamiento de gránulos

- 2). Acción capilar y porosidad.
- 3). Deformación de gránulos bajo presión **(13,17)**.

d. Lubricantes

Los lubricantes tienen 3 funciones y se describen a continuación.

- 1). Función lubricante. Reduce la fricción entre el granulado y la pared de la matriz durante la compresión y la eyección facilitando el juego mecánico entre punzón y matriz evitando posibles desgastes de éstos.
- 2). Función antiadherente. Previene que el material se pegue a los punzones y a la pared de la matriz.
- 3). Función deslizante. Optimiza las características del flujo del granulado.

Algunos lubricantes son: estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, ácido bórico, carbowxr 4000 y 6000, cloruro de sodio y lauril sulfato de sodio, almidón de maíz, sílica coloidal y ceras de alto punto de fusión **(13,17)**.

e. Agentes colorantes

Son sustancias que confieren color a las tabletas haciendo su presentación más agradable. Los colores disponibles en el mercado para la manufactura de tabletas se regulan por las autoridades de cada país, que son las que determinan que colorantes pueden emplearse y recomiendan los límites para algunos de ellos **(13)**.

f. Saborizantes y edulcorantes

En la manufactura de tabletas comprimidas los saborizantes se agregan para impartir sabor a las tabletas masticables, los edulcorantes son saborizantes que imparten sabor dulce a la formulación. Se agregan a tabletas masticables cuando los vehículos que comúnmente se usan como manitol, lactosa, sacarosa y dextrosa no tienen el poder suficiente de enmascarar sabores objetables. Algunos edulcorantes son: manitol, sacarina, glicirrizinato de amonio, ácido cítrico monohidratado, etc **(13)**.

3. CARACTERISTICAS FISICAS

Una tableta presenta las siguientes características físicas: Forma, Color, Dureza, Espesor, Peso, Friabilidad, Uniformidad de contenido, Disolución, y Desintegración (14,15).

C. Espectrofotometría.

1. DEFINICION.

La espectrofotometría de absorción, con frecuencia llamada simplemente espectrofotometría, se basa en la absorción de la luz visible o de otro tipo de energía radiante por una solución. La cantidad de energía radiante absorbida es proporcional a la concentración del material en la solución que realiza la absorción midiendo la absorción de la luz o de otro tipo de energía radiante es posible determinar cuantitativamente la cantidad de sustancia absorbente presente. El análisis colorimétrico, es la determinación cuantitativa de una sustancia colorida basándose en su capacidad para absorber la luz.

En los métodos fotométricos se mide la radiación de los rayos de luz incidente y luz transmitida u otro tipo de energía radiante, empleando un detector, del tipo de las fotoceldas. Cuando esta relación se mide a una longitud de onda determinada, el método analítico se denomina espectrofotométrico

Los métodos espectrofotométricos no se limitan al uso de la luz visible, sino que también incluyen a aquellos que emplean energía radiante de otras regiones del espectro electromagnético con el ultravioleta o el infrarrojo (18).

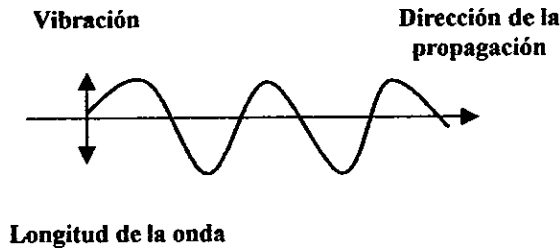
2. ABSORCION DE LA ENERGIA RADIANTE.

a. Propiedades de la radiación electromagnética

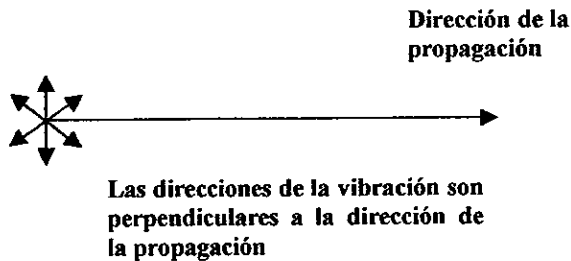
La radiación electromagnética es un tipo de energía que se transmite por el espacio a enormes velocidades. Adopta muchas formas, siendo las más fácilmente reconocibles la luz y el calor radiante. Otros tipos de luz son los rayos X, luz ultravioleta, microondas y radiaciones de radio. A muchas de las propiedades de la radiación electromagnética, se les adscribe una naturaleza ondulatoria a su propagación y se describen estas ondas con parámetros como velocidad, frecuencia, longitud de onda y amplitud.

El modelo ondulatorio para la realización no explica completamente los fenómenos asociados con la absorción o la emisión de energía radiante, para estos procesos es necesario considerar la radiación electromagnética como partículas discretas de energía y llamadas fotones. La refracción y la difracción y otros efectos ópticos de la radiación electromagnética se explican por la naturaleza ondulatoria de la luz. La energía radiante, al viajar por el espacio, se considera una perturbación periódica con componentes eléctricos y magnéticos que pueden interaccionar con la materia. En la figura 5a, se observa la variación del componente eléctrico vibrando y polarizado en el plano del papel.

En la Figura 5b, se observan las direcciones de vibración en un rayo de luz nopolarizado, formado por varias ondas. La combinación de la vibración y la propagación hace que la energía radiante tenga movimiento ondulatorio.



(a)



(b)

FIGURA No. 5 MOVIMIENTO ONDULATORIO DE LA LUZ (18).

Las ondas de energía radiante pueden describirse en términos de la longitud de onda o de la frecuencia, que es el número de ondas que pasan por un punto de la unidad de tiempo:

$$\lambda V = C$$

Donde:

λ : Es la longitud de onda en centímetros.

V: Es la frecuencia en Sec^{-1}

C: Es la velocidad de la luz 2.998×10^{10} cm/s.

Efecto fotoeléctrico. Es el desprendimiento de electrones en la superficie de un metal cuando choca contra ella alguna radiación electromagnética, también se explica en términos de la naturaleza de partículas de la energía radiante.

Un rayo de energía radiante se considera que esta constituido por varias partículas (fotones), y cada fotón tiene una energía igual a $h\nu$. La energía radiante se relaciona con la frecuencia mediante la siguiente ecuación:

$$E = h\nu$$

Donde:

E: Es la energía en ergios de una unidad de luz llamada fotón.

ν : Es la frecuencia en ciclos por segundo.

h: Es la constante de Planck 6.62×10^{-27} ergios -s.

En esta ecuación se observa que la energía de la luz es proporcional a la frecuencia. Por consiguiente, la longitud de onda es inversamente proporcional a la frecuencia, también es inversamente proporcional a la energía (18,19).

$$\begin{array}{c} \lambda \quad \text{aumenta} \\ \hline E \quad \text{disminuye} \end{array} \longrightarrow$$

b. El espectro electromagnético.

Los cuerpos luminosos, como el sol o una lampara eléctrica emiten un amplio espectro que comprende muchas longitudes de onda. Aquellas longitudes de onda que están asociadas con la luz visible son capaces de afectar la retina del ojo humano y con ello dan origen a las impresiones subjetivas de la visión. Pero gran parte de la radiación que emiten los cuerpos calientes cae fuera de la región donde el ojo es sensible: hablamos de las regiones de ultravioleta e infrarrojo que caen en ambos lados de la región visible. El espectro electromagnético completo esta clasificado como se muestra en la Figura No. 6.

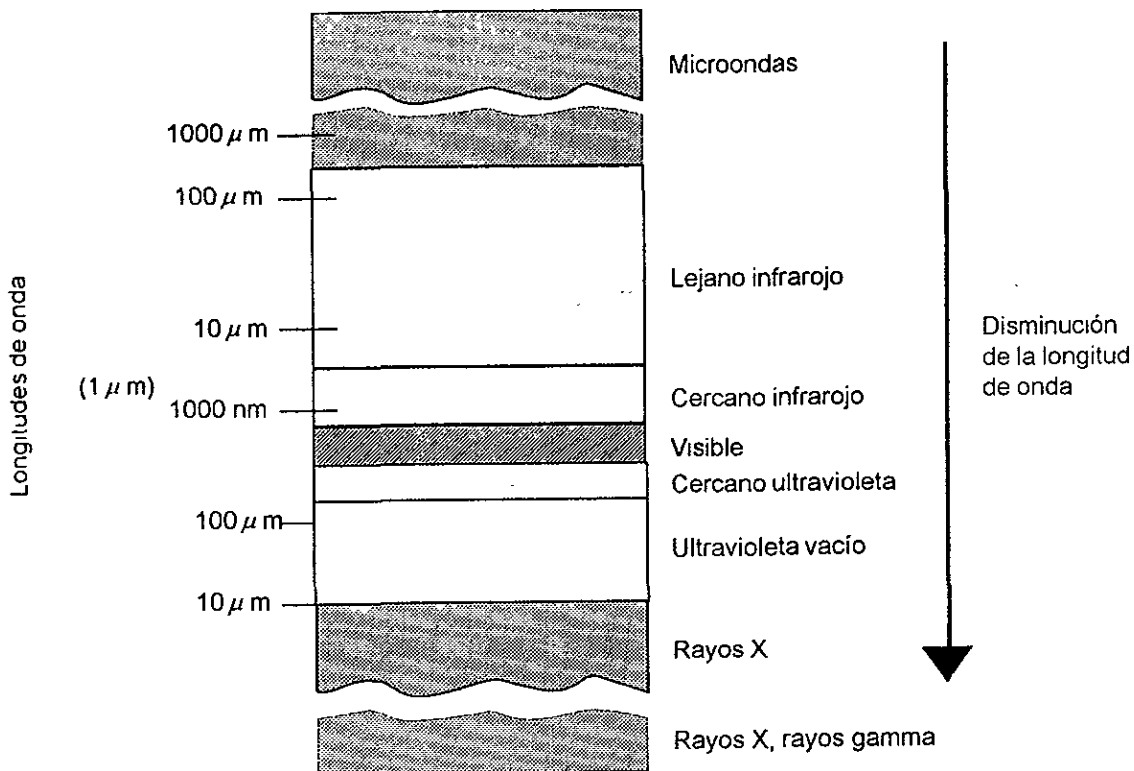


FIGURA No. 6 EL ESPECTRO ELECTROMAGNETICO (18).

La luz es la energía radiante en la región espectral visible para el ojo humano normal. El intervalo de longitud de onda de la luz es aproximadamente de 380 a 750 nm, como puede verse en la Figura No 6. Obsérvese que la luz visible ocupa solo una región muy pequeña del espectro electromagnético. La radiación ultravioleta abarca el intervalo espectral desde 10 hasta 380 nm aproximadamente, pero la región que se emplea en el análisis espectrofotométrico generalmente se limita al intervalo de 200 a 380 nm, la radiación infrarroja abarca el intervalo espectral de 0.75 a 300 μm aproximadamente, pero el que se emplea más comúnmente en el análisis es de 2.5 a 25 μm (18,20).

c. El proceso de absorción.

Una sustancia absorbe luz solo cuando la energía de dicha luz corresponde a la energía necesaria para ocasionar algún cambio en la molécula química. Por lo tanto, se absorberá luz de energía y longitud de onda determinada, y no se absorberá la luz de otras longitudes de onda. Los cambios en una molécula ocasionados por absorción de luz pueden ser electrónicos (la molécula posee energía electrónica, la cual es potencial asociado con la distribución de las cargas eléctricas negativas en los núcleos de los átomos con carga positiva), vibracionales, (los átomos se mueven periódicamente uno con respecto a otro, en sus posiciones de equilibrio) y rotacionales (la molécula puede rotar en varios ejes)

Se necesita una radiación de energía más alta para que se efectúen transiciones rotacionales o vibracionales. Por lo tanto las transiciones electrónicas son ocasionadas por absorción de la luz ultravioleta y visible, en tanto que los cambios rotacionales y vibracionales son ocasionados por la absorción de radiación infrarroja o de longitud de onda mayor.

Cuando se irradia una solución con luz policromática (luz de muchas longitudes de onda), se absorberá la luz de determinadas longitudes, mientras que la luz de otras longitudes pasará a través de la solución, con respecto al color de la solución (región visible), un color que corresponde a las longitudes de onda que la solución no absorbe

Dicho de otra forma, el color que vemos es el color complementario del color de la luz que se absorbe. Por ejemplo, si una solución absorbe luz de la región azul del espectro (a 475 nm aproximadamente), el color visible de la solución es el amarillo, que es el color complementario del azul (18). Las longitudes de onda aproximadas de los colores de la luz visible, son las siguientes:

| Longitud de Onda nm | Color que se Absorbe | Color que se Observa |
|---------------------|----------------------|----------------------|
| 400-435 | Violeta | Amarillo – Verde |
| 435-480 | Azul | Amarillo |
| 480-490 | Verde – Azul | Anaranjado |
| 490-500 | Azul – Verde | Rojo |
| 500-560 | Verde | Púrpura |
| 560-580 | Amarillo – Verde | Violeta |
| 580-595 | Amarillo | Azul |
| 595-610 | Anaranjado | Verde – Azul |
| 610-750 | Rojo | Azul – Verde |

TABLA No. 1 COLORES COMPLEMENTARIOS DE LA LUZ VISIBLE.

3. LEY DE BEER.

La ley fundamental en la que se basa el método espectrofotométrico es la de Bounger – Beer o Ley de Lambert y Beer, que a menudo suele llamarse Ley de Beer. Antes de describir esta ley, se tratara de presentar el flujo de fotones a través de la celda espectrofotométrica que contiene una solución. Para comenzar, en una celda espectrofotométrica se coloca una solución que contiene una sustancia química y se inserta en el, espectrofotómetro. Varias longitudes de onda de radiación se hacen incidir sobre la solución de la celda. En la Figura No. 7 se representa la forma en que los haces de fotones de dos diferentes longitudes de onda pasan a través de la solución. A una longitud de onda como la longitud de onda x la solución absorbe parte de los fotones que inciden sobre ella.

Como se muestra en la figura, aproximadamente se absorbe la mitad de los fotones y la mitad pasa a través de la solución. El número de fotones de un haz que pasa por un punto dado por unidad de tiempo recibe el nombre de poder radiante del haz. El poder radiante del haz que incide sobre la solución es P_0 , y el que transmite la solución es P , a la longitud de onda x P_0 es aproximadamente el doble de P . La solución no absorberá a otras longitudes de onda, tal como la longitud de onda y . Adviértase que P_0 es igual a P a esta longitud de onda (18,21).

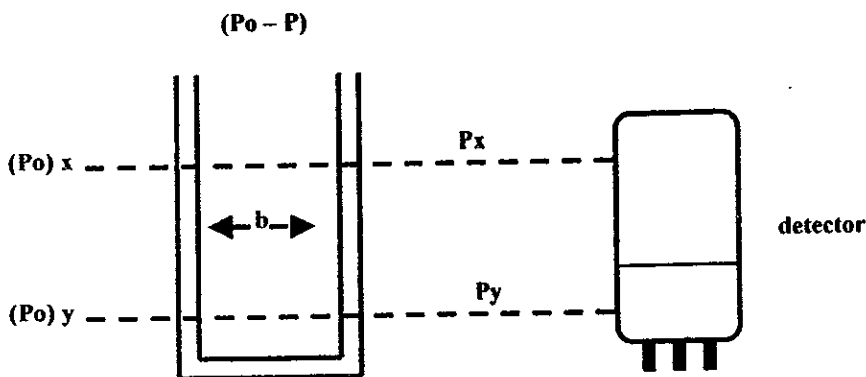


Figura 7. Diagrama esquemático de la celda de un espectrofotómetro la cual contiene una solución que absorbe radiación a la longitud de onda x , pero no a la longitud de onda y . b simboliza la longitud interna de la celda. El poder radiante de todo haz que incide sobre la solución es P_0 , el poder radiante de todo haz que transmite la solución (y que incide sobre el detector de válvula electrónica) es P , el poder radiante de la radiación absorbida es $(P_0 - P)$ (21).

Concretando la Ley de Beer establece que la cantidad de luz o energía ultravioleta o infrarroja absorbida o transmitida por una solución es una función exponencial de la concentración de sustancia absorbente presente y de la longitud de la trayectoria hacia la muestra. El símbolo que suele emplearse para representar la longitud de la trayectoria de una solución es b , como se muestra en la Figura No. 7, b es también la longitud interna de la celda. El símbolo habitual para la concentración es c .

Si la concentración c , de una solución esta dada en términos de molaridad, La Ley de Beer proporciona la relación entre A y c según:

$$A = \epsilon bc$$

Donde b se da en cm y ϵ es una constante de proporcionalidad que se conoce como absorptividad molar. Las dimensiones de ϵ son siempre $\text{cm}^{-1} \text{m}^{-1}$ o $1 \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Hipotéticamente hablando ϵ es la absorbencia de una solución 1 M en una celda de 1 cm . Si la concentración esta dada en otras unidades diferentes de la molaridad, la Ley de Beer se enuncia en la forma:

$$A = abc$$

Donde la constante de proporcionalidad se simboliza con la $\langle\langle a \rangle\rangle$ y recibe el nombre de absorptividad. Las unidades de a dependen de la unidad de concentración empleada. Si c esta en g/L , las dimensiones de a son $1 \cdot \text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (18,21).

Las formas más usuales de la Ley de Beer son:

$$\log \frac{P_0}{P} = abc$$

$$A = abc \quad (1)$$

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \text{absorbancia}$$

$$-\log \frac{P_0}{P} = abc$$

$$-\log T = abc \quad (2)$$

$$T = \frac{P}{P_0} = \text{transmitancia}$$

Donde:

P_0 : Energía radiante incidente.

P : Energía radiante transmitida.

a : absorptividad $1 \cdot \text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

b : Longitud interna de la celda cm .

c : Concentración de la solución g/L .

A : Absorbancia.

T : Transmitancia.

Si la concentración c , de una solución esta dada en términos de molaridad, la Ley de Beer se expresa:

$$A = Ebc$$

Donde:

A: Absorbancia

ϵ : Constante de proporcionalidad (absorptividad molar $l \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

b: Longitud interna de la celda en cm.

c: Concentración de la solución mol/litro.

La Transmitancia $T = \frac{P}{P_0}$, es sencillamente la fracción de la energía incidente que es transmitida por una muestra. El por ciento de Transmitancia, $\%T = (P / P_0) 100$, se utiliza mucho si $A = \log (P_0 / P)$ y $T = P / P_0$, entonces $A = \log (1/T)$.

Sabemos que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración, es claro que la transmitancia no lo es; para obtener una gráfica lineal debemos graficar $\log T$ contra c .

La Ley de Beer se aplica sólo para la radiación monocromática y en donde la naturaleza de la especie absorbente permanece constante en el rango de concentración en cuestión (20).

4. CLASIFICACION

a. Espectrofotometria ultravioleta.

Muchos iones y moléculas que tienen dobles ligaduras y que pueden presentarse como híbridos de resonancia de distintas estructuras, absorben radiaciones ultravioleta en la región de 200 – 400 nm

Aunque algunas sustancias inorgánicas absorben radiaciones ultravioleta, la principal aplicación de la espectrofotometría del ultravioleta es la determinación de compuestos aromáticos (compuestos que contienen un benceno y otro anillo aromático) y de compuestos que tienen dobles ligaduras conjugadas.

Ejemplos de compuestos con dobles ligaduras conjugadas son el butadieno y las cetonas α , β , insaturadas, mediante la espectrofotometría ultravioleta se pueden determinar cantidades extremadamente pequeñas de dichas sustancias. Los espectros del ultravioleta al igual que los del visible pueden ser muy sencillos. Con frecuencia un espectro del ultravioleta tendrá solamente uno o dos picos de absorción anchos, en la región de 200 a 400 nm (18).

b. Espectrofotometría visible.

La espectrofotometría visible es una importante técnica para determinar compuestos orgánicos de muchas clases y para la mayoría de los elementos. Abarca el intervalo de longitud de onda de la luz de 380 a 750 nm, la luz visible ocupa solo una región muy pequeña del espectro electromagnético. Los métodos que se basan en la absorción de la luz visible sirven para determinar constituyentes de las muestras; desde cantidades mínimas hasta cantidades del 1% aproximadamente. Una forma de analizar en espectrofotometría es empleando el color natural del compuesto, por ejemplo sustancias como el permanganato, el dicromato, etc., son muy coloridas y se pueden determinar con facilidad. Los iones o moléculas que presentan poco o ningún color natural pueden determinarse después de hacerlas reaccionar con un reactivo apropiado que las convierta en un compuesto colorido. La concentración del ion o compuesto se determina midiendo la absorción de la luz (18).

5. MEDICION DE LA ABSORCION DE ENERGIA RADIANTE

Un espectrófotometro es un instrumento para medir la Transmitancia o la absorbancia de una muestra en función de una longitud de onda determinada; también se puede realizar las mediciones de una serie de muestras de una sola longitud de onda

Los componentes esenciales de un espectrofotómetro se presentan de manera esquemática en la Figura 8, y son las siguientes:

- 1) Una fuente de energía radiante continua que cubre la región del espectro en la cual opera el instrumento.
- 2) Un monocromador, que es una parte del instrumento que aísla una banda angosta de longitud de onda de todo el espectro emitido por la fuente (no alcanza a obtener una estricta monocromación).
- 3) Un recipiente para la muestra.
- 4) Un detector; que es un transductor que convierte la energía radiante en una señal eléctrica.
- 5) Un amplificador y un circuito asociado que traduce la señal eléctrica a la lectura apropiada.
- 6) Un sistema de lectura de la medición que pone de manifiesto la magnitud de la señal eléctrica (20).

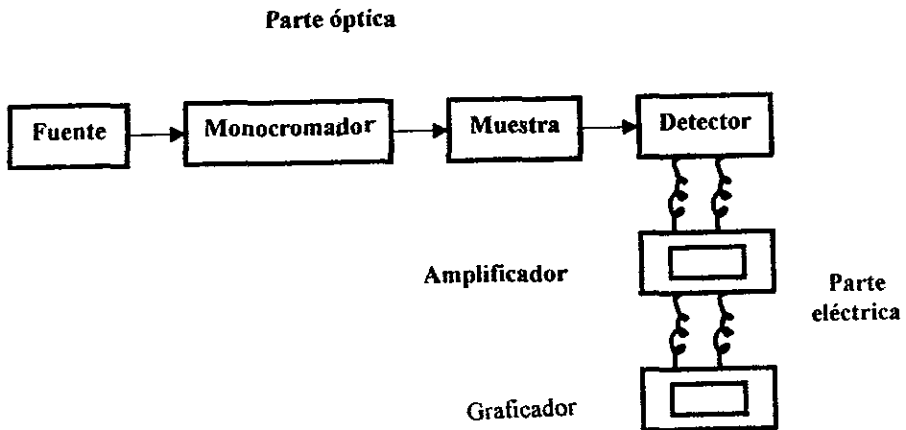


FIGURA No. 8. COMPONENTES DE UN ESPECTROFOTOMETRO (20).

FUENTE: La fuente de energía radiante para la región visible del espectro, así como para el infrarrojo cercano y el ultravioleta cercano, es una lámpara incandescente con un filamento de tungsteno el cuál es útil en el rango de 325 o 350 nm a 3 μ m. Por debajo de los 350 nm, la potencia de una lámpara de tungsteno es inadecuada para los espectrofotómetros y se debe de emplear una fuente diferente. La más común es un tubo de descarga de hidrógeno (o deuterio) el cuál se utiliza de 175 a 375 ó 400 nm. La cubierta es de vidrio, pero para que pase la radiación ultravioleta esta provista de una ventana de cuarzo.

MONOCROMADOR: Luego de su paso a través de la abertura de entrada la cual sirve para definir su trayectoria, la radiación de la fuente entra a algún tipo de monocromador. Se emplea para seleccionar la(s) longitud(es) de onda deseada(s) del amplio intervalo de onda que emite la fuente en las mediciones de absorción. Se emplean prismas o rejillas de difracción.

PRISMA: Funciona como cromador por medio de la refracción de la luz. Las diferentes longitudes de la luz se desvían a diferentes grados conforme viajan a través de un prisma. El prisma es un monocromador adecuado y es posible utilizarlo en un espectrofotómetro para obtener un espectro de absorción. Los espectrofotómetros que abarcan principalmente la región visible del espectro tienen prismas de vidrio, mientras que el cuarzo es el material del prisma de los instrumentos que abarcan el ultravioleta y el infrarrojo cercano, así como el visible.

REJILLA DE DIFRACCION: Una rejilla de difracción (reflexión) se hace trazando un gran número de líneas paralelas sobre la superficie pulida de un metal como el aluminio, cuando esta superficie refleja la luz, la que chocó con las rayas se dispersa, mientras que la que llega a las porciones sin rayas se refleja en forma normal y actúan como fuentes individuales de luz cuando se superponen las ondas de estas fuentes se establece un patrón de referencia que da como resultado la dispersión de la luz reflejada en las longitudes de onda que la componen. La rejilla es un buen monocromador.

La longitud de onda se obtiene fijandola en el cuadrante. Su anchura de banda es constante en todo el intervalo de longitud de onda. En casi todos los espectros se emplean rejillas.

CELDA: Para la región ultravioleta y visible la celda es de tipo rectangular con una longitud y una anchura de 1.00 cm, de modo que la longitud interior de la celda siempre es 1.00 cm. Las celdas que se emplean en la región visible pueden estar hechas de vidrio borosilicato de calidad óptica. Las celdas para la región ultravioleta están hechas de sílice fundido común que da transparencias de 100 – 220 nm. El cuarzo puro o el sílice sintético pueden utilizarse por debajo de 180 nm para esta región.

DETECTOR: Luego de que la radiación no absorbida ha pasado a través de la celda de la muestra, incide sobre algún tipo de detector. El detector convierte la energía radiante en corriente eléctrica o voltaje la cual puede medirse con facilidad.

Hay 5 tipos de detectores: 1). La válvula fotoelectrónica, 2). El fotodiodo de silicio, 3). La válvula multiplicadora fotoeléctrica, 4). El bolómetro y 5). El termopar.

- 1). La válvula fotoelectrónica. Es una válvula con una cubierta de vidrio o cuarzo que contiene un cátodo y un ánodo. Se utiliza en la región visible y ultravioleta.
- 2). El fotodiodo de silicio. Es un detector de estado sólido (transistorizado), produce un potencial en lugar de una corriente. Los fotodiodos sensibles al ultravioleta abarcan de 200 – 1100 nm
- 3) La válvula fotoelectrónica multiplicadora. Incorpora a varias etapas de la amplificación directamente dentro de la válvula por medio de dinodos. Es más costoso que la válvula fotoelectrónica y se utiliza en espectros más caros.
- 4). El bolómetro es un detector térmico, es decir un resistor sensible a la temperatura que consta de 2 hojas metálicas delgadas o resistencias térmicas. Se utiliza en el infrarrojo.

5). Termopar. Es un detector térmico que convierte el calor a una señal eléctrica. Se utiliza en el infrarrojo.

GRAFICADOR. El indicador de señal de la mayor parte de los instrumentos para mediciones de absorción posee una escala lineal que abarca de 0 a 100 unidades . Pueden obtenerse lecturas directas de porcentaje de transmitancia ajustando primero el indicador para leer 0 cuando se bloquea la radiación del detector por un interruptor. Se lleva entonces el indicador a 100, haciendo pasar el haz por el disolvente e incidiendo en el detector , este ajuste se logra haciendo variar la intensidad de la fuente. Sin duda, puede escribirse una escala logarítmica en el indicador para hacer lecturas directas de absorbancia. La naturaleza y la complejidad de los distintos componentes de los instrumentos de absorción varían según la región de longitud de onda, pero cualquiera que sea el grado de complejidad la función del componente es la misma (19).

6. DESVIACIONES DE LA LEY DE BEER.

Cada especie absorbente tendrá su propia constante de absorptividad molar ϵ a cualquier longitud de onda determinada, y en general ésta será diferente de la de cualquier otra especie absorbente. Por ejemplo, los iones dicromato y cromato, ambos de los cuales son formas de cromo (IV) tienen absorptividades molares distintas, a cualquier longitud de onda. Se obtendrá una curva de calibración lineal cuando toda la sustancia absorbente esté presente en la misma forma química o cuando la proporción relativa de dos o más especies químicas no varíe con la concentración. Se producen desviaciones de la linealidad cuando la proporción de especies absorbentes distintas varía con la concentración

Pueden haber desviaciones de la Ley de Beer cuando existen atracciones intermoleculares, disociaciones y asociaciones dependientes de la concentración reacciones con el disolvente o con iones de hidrógeno, o formación de iones complejos con número variable de ligandos.

La Ley de Beer describe bien el comportamiento de absorción de soluciones diluidas solamente ; en este sentido es una Ley limitativa . En altas concentraciones la distancia media entre las especies que causan la absorción disminuye hasta el punto en que cada una afecta a la distribución de carga de las moléculas adyacentes. Esta interacción a su vez, puede alterar su capacidad para absorber una longitud de radiación dada Puesto que el grado de interacción depende de la concentración , la ocurrencia de este fenómeno causa desviaciones de la relación lineal entre absorbancia y concentración **(18,19)**.

Hay sistemas que tienen un “buen comportamiento químico” y pueden presentar desviaciones de la Ley de Beer debido a las características de los instrumentos que se utilizan para medir los valores de absorbancia. Algunas desviaciones eran el resultado de efectos de fatiga de los detectores, falta de linealidad de los amplificadores y de los instrumentos en donde se realizaba la lectura de la medición y también de la inestabilidad de las fuentes de energía radiante. Estos problemas se han resuelto en gran parte con el uso de instrumentos más modernos.

Como se sabe la Ley de Beer exige la radiación monocromática, debido a que los valores de ϵ (absorptividad molar) dependen de la longitud de onda, los valores medidos de la absorbancia reflejan la distribución de la longitud de onda de la radiación, la cual en un espectrofotómetro en la práctica nunca es estrictamente monocromática. Pensemos en una solución dividida en una serie de capas imaginarias de igual espesor. Ahora, si una radiación policromática pasa a través de la primera capa, las longitudes de onda que se absorben más son sustraídos del haz en mayor grado que los demás.

Por esto la radiación que choca con la segunda capa contiene mayor cantidad de las longitudes de onda menos absorbidas y esta segunda capa no absorberá la misma fracción de radiación incidente que absorbió la primera capa. Puesto que la Ley de Beer establece que cada una de las capas abosorberá una fracción igual, en esta situación resulta una clara desviación de esta Ley **(20)**.

D. Validación.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, mediante estudios experimentales que su capacidad satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Esta capacidad se expresa en términos de parámetros analíticos.

Considerando la variedad de métodos, existen diferentes esquemas de validación.

1. **Métodos analíticos de control de calidad** para cuantificar los componentes principales de sustancias a granel o principios activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.
2. **Métodos analíticos indicadores de estabilidad** para determinar impurezas en sustancias a granel o compuestos de degradación en productos farmacéuticos terminados.
3. **Métodos analíticos para biodisponibilidad**, en donde se determina las características físicas por ejemplo, disolución y liberación del principio activo.
4. **Revalidación de métodos.** Una variación en el método actual de uso deberá documentarse y sujetarse a una validación adecuada (22).

Los parámetros a evaluar dependiendo de la aplicación del método se muestran en la siguiente tabla.

| Parámetro | Control De Calidad | Indicadores de Estabilidad | | Biodisponibilidad | Revalidación del Método | |
|------------------------------------|--------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------|--|--|
| | | Bajas Concentraciones | Altas Concentraciones | | Sin cambio en condiciones de operación | Con cambio en condiciones de operación |
| Linealidad y precisión del sistema | X | X | X | X | X | X |
| Límite de Detección | | X | | X | | |
| Límite de cuantificación | | X | | X | | |
| Exactitud y Repetibilidad Al 100% | X | X | X | X | X | X |
| Linealidad Del método | X | X | X | X | X | X |
| Precisión Reproducibilidad | X | X | X | X | | X |
| Especificidad (control de calidad) | X | X | X | X | X | X |
| Especificidad (Estabilidad) | | X | X | | | |
| Tolerancia Del sistema | | X | X | X | | X |
| Estabilidad De la muestra | X | X | X | X | | |

TABLA II. DETERMINACIONES QUE SE EVALUAN EN DIFERENTES TIPOS DE METODO (22).

1. DEFINICIONES.

a. Linealidad.

Es la habilidad que tiene el sistema, equipo, reactivos, etc., o el método para asegurar que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado (3).

b. Precisión.

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Se refiere a la semejanza de análisis sobre una misma muestra.

Se expresa comúnmente en términos de desviación estándar de una serie de resultados sobre una misma muestra 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 (3)

c. Especificidad o interferencias

Es la habilidad de un método analítico para obtener respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra. Idealmente, para que un compuesto se pueda medir no debe haber interferencia de materiales: sobre todo de excipientes. Indica el grado de interferencia o la ausencia de ésta cuando se analizan mezclas complejas (3).

d. Exactitud.

Es la concordancia que existe entre los datos obtenidos por el método, y el valor real esperado (100%), se expresa como el % de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del principio activo (placebos cargados) (3).

e. Estabilidad de la muestra.

Es la propiedad de la muestra preparada para su cuantificación de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas (3).

2. DETERMINACIONES.

a. Linealidad del sistema.

Se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución estándar utilizando cuando menos cinco niveles y haciendo análisis por triplicado para cada uno de los niveles establecidos, el nivel central debe de corresponder al 100% de la concentración esperada (3).

De los resultados obtenidos calcular los siguientes parámetros.

| | |
|------------------------------------|-----------|
| Media | \bar{X} |
| Desviación Estándar | s |
| Coefficiente de variación | CV |
| Pendiente | B |
| Ordenada al origen | A |
| Coefficiente de correlación lineal | R |
| Coefficiente de determinación | R^2 |

Criterio de aceptación

$$CV \leq 1.5\%$$

$$R \geq 0.99$$

$$R^2 \geq 0.98$$

$$A \approx 0.00$$

$$B \approx 1.00$$

b. Precisión del sistema.

Se determina por el análisis mínimo de seis muestras obtenidas de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema, con los datos obtenidos se calcula (3).

| | |
|---------------------------|-----------|
| Media | \bar{X} |
| Desviación estándar | s |
| Coefficiente de variación | CV |

Criterio de aceptación.

$$CV \leq 1.5\%$$

c. Linealidad del método.

Se determina con placebos adicionales al principio activo (placebos cargados) cada uno de manera independiente, se realiza con cinco niveles de concentración que corresponden al 80, 90, 100, 110, y 120 % del valor esperado, haciendo análisis por triplicado para cada uno de los niveles establecidos.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto las concentraciones en las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo para la linealidad del sistema incluyendo siempre la correspondiente al 100%. La amplitud de este estudio dependerá del uso y aplicación del método, por ejemplo., control de calidad, estudios de estabilidad, etc y se llevará a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación (3).

De los resultados obtenidos calcular los siguientes parámetros:

| | |
|------------------------------------|-----------|
| Media | \bar{X} |
| Desviación estándar | s |
| Coefficiente de Variación | CV |
| Pendiente | B |
| Ordenada al origen | A |
| Coefficiente de correlación lineal | R |
| Coefficiente de determinación | R^2 |

Criterio de aceptación.

$$R \geq 0.99$$

$$R^2 \geq 0.98$$

$$A \approx 0.00$$

$$B \approx 1.00$$

CV para métodos espectrofotométricos es del 3%.

d. Precisión del método.

1) Reproducibilidad.

Se determina de una muestra homogénea del producto al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado (3).

2) Repetibilidad.

Este parámetro se cuantifica con los datos obtenidos en la exactitud del método.

De los resultados obtenidos calcular los siguientes parámetros:

| | |
|---------------------------|-----------|
| Media | \bar{X} |
| Coefficiente de variación | CV |
| Desviación estándar | s |
| F de cálculo | |

Criterio de aceptación.

El coeficiente de variación total debe de cumplir con los siguientes criterios:

| METODO | CV. |
|----------------------|------------|
| Cromatográficos | $\leq 2\%$ |
| Químicos | $\leq 3\%$ |
| Espectrofotométricos | $\leq 3\%$ |
| Microbiológicos | $\leq 5\%$ |

TABLA III. VALORES DE CV PARA LA PRECISION DEL METODO (3).

Para la F de cálculo obtenida de la tabla de ANADEVVA.

$$F_{\text{análisis}} \leq F_{\text{tablas}} \quad F_{\text{gla, gld; 0.05}}$$

$$F_{\text{día}} \leq F_{\text{tablas}} \quad F_{\text{gld, gle; 0.05}}$$

e. Especificidad.

El parámetro de especificidad se realiza dependiendo de el tipo de método ya sea para control de calidad ó indicativo de estabilidad.

1) Especificidad para métodos de control de calidad.

El método se enfrenta a:

- Analizar placebos del producto.
- Identificar las respuestas del (los) activo (s), y si procede, de los expedientes y/o de otras sustancias presentes.

Criterio de aceptación.

Confirmar que el método propuesto sea capaz de separar la sustancia de interés de cualquier interferencia presente.

En caso de contar con los posibles productos de degradación preparar muestras con placebo “añadido” de éstos y la sustancia de interés y analizar con el método propuesto.

2) Especificidad para métodos indicadores de estabilidad.

Hay varios métodos para degradar la sustancia; el analista que realice el estudio deberá escoger aquel que, de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto, sea el más adecuado. La degradación debe ser tal que la concentración de la sustancia en estudio esté disminuido por lo menos en un 25 % con respecto a la original.

- a) Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto en un horno a 70 °C – 120 °C ó a 20 °C por abajo del punto de fusión de la sustancia de interés durante un período de 2 a 4 semanas
- b) Exponer la sustancia de interés, el placebo y muestras de lote del producto a la luz UV ó a la luz fluorescente y/o humedad.

- c) En el caso de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas pueden degradarse por oxidación con peróxido de hidrógeno y permanecer de 2 a 4 semanas a temperatura ambiente, o por hidrólisis ajustando el P^H a 1--2 y/o 10--12 colocando las muestras a 60 °C -- 80 °C durante un período de 2 a 4 semanas.

Criterio de Aceptación

Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de las sustancias de interés utilizando el método desarrollado. Ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución (3)

f. Exactitud.

Se determina por el análisis de cuando menos seis placebos adicionados con el 100 % del principio activo, de manera independiente por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

Con los datos obtenidos calcular:

| | |
|----------------------------|-----------|
| Media. | \bar{X} |
| Desviación Estándar. | s |
| Coefficiente de variación. | CV |

Criterio de aceptación.

El coeficiente de variación expresa la relación que existe entre una y otra muestra expresado en por ciento. En la siguiente tabla se muestran los valores del por ciento recuperado y el CV para la evaluación de la exactitud, dependiendo del método de cuantificación (3).

| METODO | PROMEDIO DE RECOBRO | CV |
|----------------------|----------------------------|-----------|
| Cromatográficos | 98 – 102% | 2 % |
| Titrimétricos | 98 – 102% | 2 % |
| Químicos | 97 – 103% | 3 % |
| Espectrofotométricos | 97 – 103% | 3 % |
| Microbiológicos | 95 – 105% | 5 % |

TABLA IV. VALORES DEL PORCIENTO RECUPERADO Y EL CV PARA LA EXACTITUD DEL METODO (3).

g. Estabilidad de la muestra analítica.

Se determina mediante la comparación de resultados de los análisis iniciales en 3 muestras con los obtenidos en esas mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado a diferentes condiciones.

Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones (Por ejemplo, temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc), durante un tiempo determinado por el analista lo cual depende de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación utilizando una solución patrón recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación se llevará a cabo por el mismo analista (3).

Con los resultados obtenidos calcular: T_D

Factor S_i/i , y estadígrafo de contraste “ t ” de Dunnet.

Donde:

$$Si/i = \frac{\bar{X} Si}{\bar{X}}$$

$\bar{X} Si$ = Es la media de los valores que se obtienen después del tratamiento

\bar{X} = Es la media de los valores iniciales.

Criterio de aceptación.

Si Si/i es aproximadamente igual a uno, se considera estable la muestra.

Para $T_D < t(\text{gle}, r, 0.975)$ la muestra es estable

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La determinación de Ftalilsulfatiazol en tabletas como producto terminado por medio de Espectrofotometría se realizó haciendo algunas modificaciones al método cuya aplicación es en control de calidad y el cuál fue desarrollado en el Laboratorio.

En un principio se comenzó la validación ya que un estudio teórico reveló que la metodología era adecuada para cuantificar a Ftalilsulfatiazol. Al obtener resultados no homogéneos (algunos recobros eran buenos y otros no), se procederá a hacer una revisión del método para establecer las posibles fuentes que causan esta variabilidad de resultados.

Se observa que algunas muestras después del reflujo no se disuelven completamente, hay gránulos de la muestra en el matraz se procederá a variar la proporción de ácido clorhídrico diluido ya que en este paso se lleva a cabo la hidrólisis, y puede ser que falte reactivo para completar esta reacción.

También se incluirá agitación a todas las muestras mediante una barra magnética y perlas de ebullición.

Las muestras no presentan un calentamiento homogéneo al ponerlas a reflujar porque se tiene que trabajar hasta con 4 muestras en una sola parrilla por falta de equipo, se utilizará un baño de petrolato controlando la temperatura de éste.

Al desarrollar el compuesto colorido en algunas muestras se obtiene un color café rojizo o morado oscuro en vez del color esperado violeta brillante, se variarán los tiempos en el desarrollo del color, ya que probablemente los reactivos no tienen el tiempo adecuado para formar el compuesto colorido.

Es importante evaluar el efecto del pH en la formación del compuesto colorido. La velocidad de formación del compuesto azo y la absorbancia de éste se ve afectada por el pH. Un $\text{pH} \leq 2.0$ es el requerido para producir la máxima intensidad de color y por lo tanto la máxima absorbancia (23). Se establecerá el pH final de la muestra. Una vez ya optimizado el método se procederá a la validación.

El principal objetivo de validar un método, es con el fin de obtener un producto farmacéutico con calidad, y la importancia de la calidad de los medicamentos es un punto que no se pone a discusión.

Actualmente es un requisito indispensable que el desarrollo y/o optimización de un método analítico independientemente de sus características sea validado.

La validación de cualquier tipo de método permite evaluar su reproducibilidad con lo cual se puede garantizar la cuantificación del principio activo y su uniformidad en la forma farmacéutica.

III. OBJETIVOS

1. Implementación de un método analítico para la cuantificación del principio activo Ftalilsulfatiazol en tabletas.
2. Validar el método cubriendo los siguientes criterios:

SISTEMA

Linealidad

Precisión

METODO

Especificidad

Exactitud

Linealidad

Precisión (Reproducibilidad y Repetibilidad)

Estabilidad de la muestra

IV. HIPOTESIS.

El fundamento en que esta basado el método es la formación de una amina aromática primaria, después esta amina se somete a una reacción de diazoación y posterior acoplamiento del diazocompuesto. Esperando que se lleve a cabo esta reacción, podremos cuantificar por espectrofotometría y sin interferencia de sus excipientes al principio activo Ftalilsulfatiazol, y validar el método analítico el cuál se espera que sea Lineal, Preciso, Exacto y Especifico, además de Estable.

III. OBJETIVOS

1. Implementación de un método analítico para la cuantificación del principio activo Ftalilsulfatiazol en tabletas.
2. Validar el método cubriendo los siguientes criterios:

SISTEMA

Linealidad

Precisión

METODO

Especificidad

Exactitud

Linealidad

Precisión (Reproducibilidad y Repetibilidad)

Estabilidad de la muestra

IV. HIPOTESIS.

El fundamento en que esta basado el método es la formación de una amina aromática primaria, después esta amina se somete a una reacción de diazoación y posterior acoplamiento del diazocompuesto. Esperando que se lleve a cabo esta reacción, podremos cuantificar por espectrofotometría y sin interferencia de sus excipientes al principio activo Ftalilsulfatiazol, y validar el método analítico el cuál se espera que sea Lineal, Preciso, Exacto y Especifico, además de Estable

V. METODOLOGIA

A. Materiales y Método.

1. MATERIAL

Matraces volumétricos de 50 ml, 100 ml y 500 ml.

Soportes Universal c/anillo.

Termómetros con escala de 10 a 150 °C.

Pinzas de tres dedos.

Probeta de 100 ml.

Barras magnéticas.

Matraces bola de 250 ml.

Refrigerantes con juntas 24/40.

Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml.

Pipetas graduadas de 5 ml.

Vasos de precipitados de 50 ml.

Embudos de filtración rápida.

Papel filtro Whatman No. 41.

2. REACTIVOS

Acido clorhídrico R.A Marca Baker.

Nitrito de sodio R.A J.T Baker.

Sulfamato de amonio R.A Sigma de México S.A

N-I-Naftil-etiendiamina dihidro clorhidrato al 0.1% R.A. E Merck.

Ftalilsulfatiazol STD secundario Aldrich. Lote A 80304.

3 EQUIPO

Balanza analítica Mettler A.M. 100

Parrilla de calentamiento c/agitación marca CORNING 350

Baño de petrolato líquido.

Espectrofotómetro UV-VIS marca Beckman, modelo DU 7500.

4. METODO

a. Modificaciones al método original.

--Se modifica la proporción de ácido clorhídrico diluido, se usa 50:50 (50 ml de ácido clorhídrico diluido concentrado + 50 ml de agua destilada) en vez de 30.70 que es la concentración indicada en método original.

--Adición de perlas de ebullición y una barra magnética.

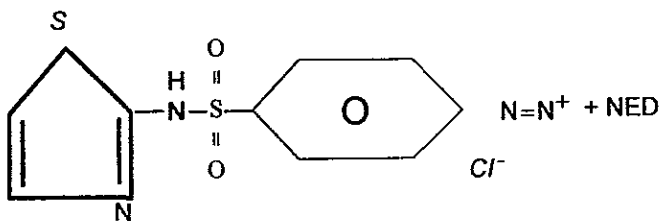
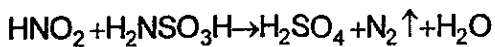
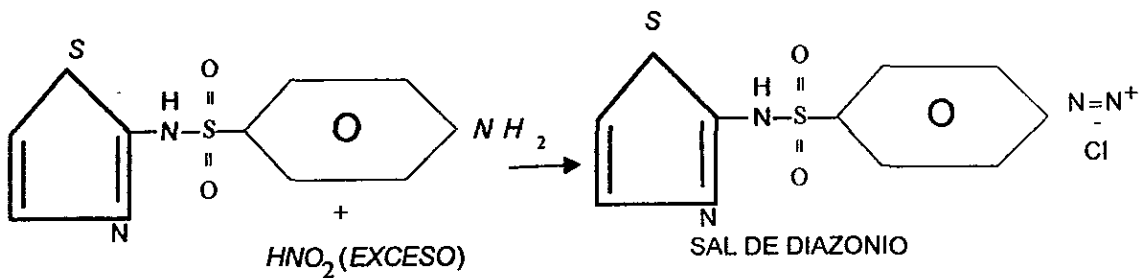
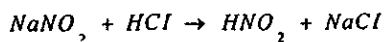
--Uso de un baño de petrolato controlando la temperatura a 114 – 116 °C

--Variación en los tiempos de desarrollo de color.

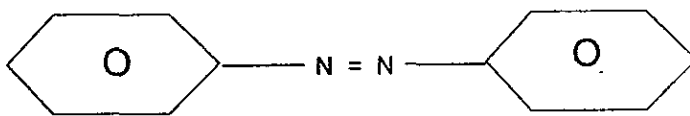
--En la parte que dice, se agrega la solución C y se deja reposar por 3 minutos en técnica original se menciona que la solución C se agrega junto con la solución D y se deja reposar por 3 minutos.

b. Mecanismo de reacción

La técnica analítica para Ftalilsulfatiazol esta basada en una hidrólisis ácida del principio activo. El producto de hidrólisis es el ácido ftálico y una amina primaria aromática que es con la que se lleva a cabo la diazoación y después la copulación obteniéndose un producto colorido que se lee a 545 nm en un espectrofotómetro adecuado, (ver mecanismos de reacción en la Figura No 9)



COPULACIÓN



NED: Ñ - (1 - Naftil) Etilendiamina

FIGURA No. 9 MECANISMO DE REACCION (27).

c. Preparación del Estándar.

Pesar con exactitud 150 mg de Ftalilsulfatiazol estándar de referencia previamente seco a 105 C x 4 horas, colocar el estándar pesado en un matraz balón de 250 ml y poner a reflujar con agitación, agregando 100 ml de ácido clorhídrico diluido (50 ml de HCL concentrado + 50 ml de agua destilada) durante media hora se debe usar un baño de petrolato controlando la temperatura a 114 – 116 °C, para que las muestras tengan uniformidad de calentamiento durante el reflujo.

d. Preparación de la muestra.

Moler un mínimo de 20 tabletas, hasta obtener un polvo fino pesar una porción del polvo equivalente a 150 mg de Ftalilsulfatiazol (271.43 mg) adicionar 100 ml de solución de HCL diluido (50-50) y reflujar durante 30 minutos con agitación constante, en baño de petrolato y controlando la temperatura a 114 – 116 C.

El material de vidrio que se usa debe de estar perfectamente limpio y seco

e. Procedimiento.

Proceder igual para la solución estándar y para la solución de la muestra. Después de reflujar pasar la solución a un matraz volumétrico de 500 ml enjuagando el matraz de reflujo con agua destilada diluir a la marca, mezclar, filtrar por papel Whatman 41 desechando los primeros 50 ml. Tomar una alícuota de 10 ml y aforar a 100 ml con agua destilada.

PREPARACION DE SOLUCIONES.

- A. Acido clorhídrico. Diluir 2 ml de HCL concentrado a 50 ml con agua destilada.
- B. Nítrito de sodio al 0.1%. Disolver 50 mg de Nítrito de sodio y llevar a un volumen de 50 ml con agua destilada (prepárese en el momento de usarse).

- C.** Sulfamato de amonio al 0.5%. Disolver 250 mg de sulfamato de amonio llevar a un volumen de 50 ml con agua destilada (prepárese en el momento de usarse).
- D.** N-I-Naftil-etiendiamina dihidroclorhidrato al 0.1%. Disolver 50 mg de N-I-Naftil-etiendiamina dihidroclorhidrato y llevar a un volumen de 50 ml con agua destilada (prepárese en el momento de usarse).

Desarrollo de color.

En matraces volumétricos de 50 ml adicionar:

| | <u>1</u> | ESTANDAR | <u>2</u> | MUESTRA | <u>3</u> |
|-------------|----------|----------|----------|---------|----------|
| BLANCO | 5 ml | | 5 ml | | 5 ml |
| Solución A. | 5 ml | | 5 ml | | 5 ml |
| Solución B. | 5 ml | | 5 ml | | 5 ml |

Mezclar y dejar reposar 3 minutos.

| | | | | | |
|-------------|------|--|------|--|------|
| Solución C. | 5 ml | | 5 ml | | 5 ml |
|-------------|------|--|------|--|------|

Mezclar y dejar reposar 3 minutos.

| | | | | | |
|-------------|------|--|------|--|------|
| Solución D. | 5 ml | | 5 ml | | 5 ml |
|-------------|------|--|------|--|------|

Mezclar, aforar, reposar en la oscuridad por 15 minutos y leer a 545 nm en un espectrofotómetro adecuado usando el matraz No. 1 como blanco.

Las soluciones A, B, C y D son las arriba mencionadas

Determinar el pH de varias muestras para evaluar el efecto de éste en la formación del compuesto colorido.

B. Evaluación del sistema

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se prepara una solución patrón partiendo de 1.5 gr de Ftalilsulfatiazol y diluyendo a 100 ml. De aquí se toman las alícuotas correspondientes, cada nivel es analizado por triplicado.

| ml Alícuota | Concentración de la Alícuota mgs/100 ml. | Nivel % |
|------------------------|---|----------------|
| 8 | 120 | 80 |
| 9 | 135 | 90 |
| 10 | 150 | 100 |
| 11 | 165 | 110 |
| 12 | 180 | 120 |

TABLA No. V. CONCENTRACION DE FTALILSULFATIAZOL EN CINCO NIVELES PARA DETERMINAR LA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

2. PRECISION DEL SISTEMA.

Se determina este parámetro preparando 6 muestras de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

C. Evaluación del método.

1. ESPECIFICIDAD.

Se analizaron por duplicado muestras estándar de Ftalilsulfatiazol, placebos cargados y placebos con cantidad equivalente al 100% de principio activo bajo las mismas condiciones analíticas.

2. EXACTITUD.

Se pesaron 6 muestras de estándar de principio activo equivalente al 100 % de la cantidad necesaria para llevar a cabo el análisis. A cada una de las muestras se agregó la cantidad correspondiente de placebo y se analizaron de acuerdo al método.

3. LINEALIDAD.

Para la linealidad del método se prepararon placebos cargados a cinco niveles de concentración 80%, 90%, 100%, 110% y 120% del principio activo y adicionando a cada una de las muestras el placebo correspondiente, cada nivel se realiza por triplicado.

4. PRECISION.

a. Repetibilidad

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

b. Reproducibilidad.

Para la determinación de la Reproducibilidad del método se realizó con dos analistas de la siguiente manera:

- 1) En el primer día cada analista prepara tres placebos cargados a una misma concentración (100%), y se analizan con el método propuesto.
- 2) En el segundo día se prepararon otros tres placebos cargados por analistas y se analizan con el método propuesto

5. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Se prepararon placebos cargados por duplicado que contenían el equivalente al 100% del principio activo, se analizaron inmediatamente y se sometieron a las siguientes condiciones: oscuridad, luz clara y refrigeración por un periodo de 2 horas, se analizaron transcurrido ese tiempo.

VI. RESULTADOS

A Sistema

1. LINEALIDAD.

| CANTIDAD ADICIONADA (X) MG | PROPIEDAD MEDIDA (Y) ABS |
|----------------------------|--------------------------|
| 120 | 0.304, 0.304, 0.305 |
| 135 | 0.344, 0.346, 0.347 |
| 150 | 0.380, 0.380, 0.381 |
| 165 | 0.423, 0.418, 0.418 |
| 180 | 0.454, 0.454, 0.456 |

$$\Sigma x = 2250$$

$$\Sigma y = 5.701$$

$$\Sigma x^2 = 344250$$

$$\Sigma y^2 = 220922$$

$$\Sigma xy = 872.085$$

Para calcular la ordenada al origen, pendiente, coeficiente de determinación y coeficiente de correlación se emplean las fórmulas del Anexo 1.

$$A = 0.00373$$

$$B = 0.00250$$

$$R = 1.00033$$

$$R^2 = 1.00066$$

Criterios de Aceptación:

Coefficiente de Determinación $1.00066 \geq 0.98$.

Coefficiente de Correlación $1.00033 \geq 0.99$.

Análisis de Varianza.

Módulo Estadístico

$$Y_i = \beta + \beta_i + \Sigma_i$$

Hipótesis Planteada

Ho: x no depende y

Ha: x si depende y

TABLA DE ANADEVA.

| FV | GL | SC | MC | Fcal | Ftab |
|-------------------------------|----|-----------------------|------------------------|---------|------|
| Regresión (r) | 1 | 0.04246 | 0.04246 | 3407.70 | 9.07 |
| Error de re - gresión (er) | 13 | 1.62×10^{-4} | 1.246×10^{-5} | | |

Criterio

$F_{cal} > F_{tab} (1,13, 0.95)$

$3407.70 > 9.07$

Por lo tanto el modelo de regresión lineal simple es correcto para describir la relación entre la cantidad adicionada (X) y la cantidad recuperada (Y).

LINEALIDAD DEL SISTEMA FTALISULFATIAZOL

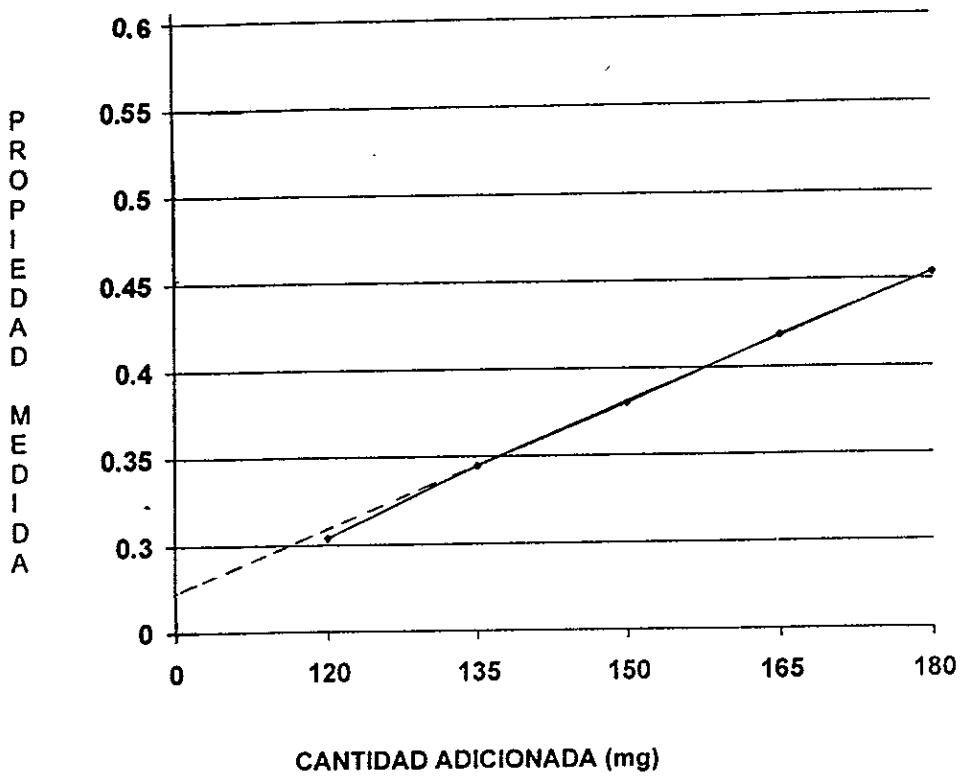


FIGURA No. 10 LINEALIDAD DEL SISTEMA.

2. PRECISION

| Cantidad Adicionada Mgr/ml | Cantidad Recuperada Mgr/ml |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 150 | 150.00000 |
| 150 | 148.42104 |
| 150 | 150.00000 |
| 150 | 147.63158 |
| 150 | 148.81578 |
| 150 | 148.81578 |

CRITERIO: CV Menor que 1.5

$$\bar{Y} = 99.29824$$

$$S = 0.61535$$

$$CV = 0.61969 \%$$

Por lo tanto el sistema se considera preciso.

B. Método.

1. ESPECIFICIDAD.

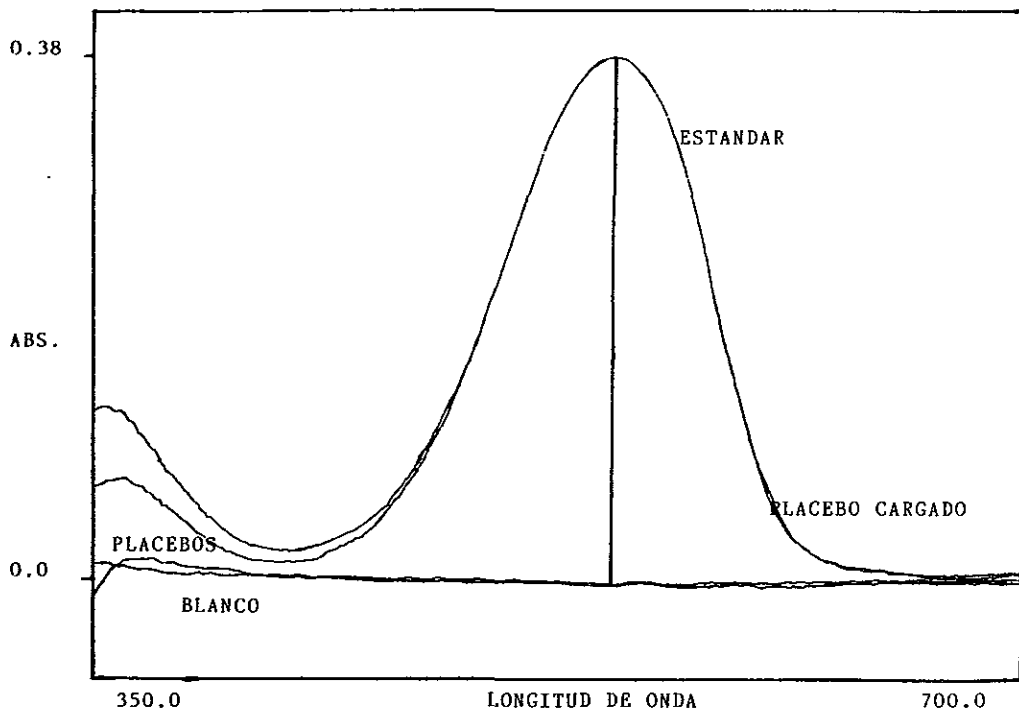


FIGURA No. 11. ESPECTRO DEL PLACEBO, PLACEBO CARGADO Y ESTANDAR PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DEL METODO PARA FTALISULFATIAZOL EN TABLETAS. RANGO DE 350-700 nm, ESCALA 1A, VELOCIDAD 20 X 5 nm/mín, VELOCIDAD DE PAPEL 2 X 5 in/mín.

2. LINEALIDAD.

| Cantidad Adicionada mgr/ml. | Cantidad Recobrada mgr/ml. |
|-----------------------------|----------------------------|
| 119.271 | 119.325 |
| 119.271 | 120.105 |
| 119.370 | 118.155 |
| 134.167 | 131.173 |
| 133.770 | 130.392 |
| 134.167 | 132.343 |
| 148.965 | 147.421 |
| 148.965 | 147.033 |
| 148.965 | 146.642 |
| 163.861 | 161.322 |
| 163.762 | 161.772 |
| 164.159 | 163.278 |
| 178.857 | 177.999 |
| 178.758 | 177.953 |
| 178.758 | 177.558 |

$$\Sigma x = 2235.0660$$

$$\Sigma y = 2212.4710$$

$$\Sigma x^2 = 339683.29$$

$$\Sigma y^2 = 332935.32$$

$$\Sigma xy = 336283.61$$

$$A = 0.03990$$

$$B = 0.98973$$

$$R = 1.00004$$

$$R^2 = 1.00008$$

a. Evaluación de la ordenada al origen

Hipótesis Planteada

$$H_0: A = 0$$

$$H_a: A \neq 0$$

$$S_{y/x} = 1.14564$$

$$S_{y/x} = 1.23061$$

$$S(X_i - \bar{X})^2 = 51.396396$$

$$t_{cal} = 1.54464 \times 10^{-3}$$

$$t_{tab} = t_{0.975}(13 \text{ g.l.}) = 2.16$$

CRITERIO:

$$t_{cal} \leq t_{tab}$$

$$1.5446 \times 10^{-3} < 2.16$$

Por lo tanto se considera que el método posee una ordenada al origen igual a 0.

b. Evaluación de la pendiente.

Hipótesis planteada

$$H_0: B = 1$$

$$H_a: B \neq 1$$

$$t_{\text{cal}} = -0.03577$$

$$t_{\text{lab}} = t_{0.975}(13 \text{ g.l.}) = 2.16$$

CRITERIO:

$$t_{\text{cal}} \leq t_{\text{lab}}$$

$$-0.03577 < 2.16$$

Por lo tanto se considera que el método posee una pendiente igual a 1.

LINEALIDAD DEL METODO FTALILSULFATIAZOL

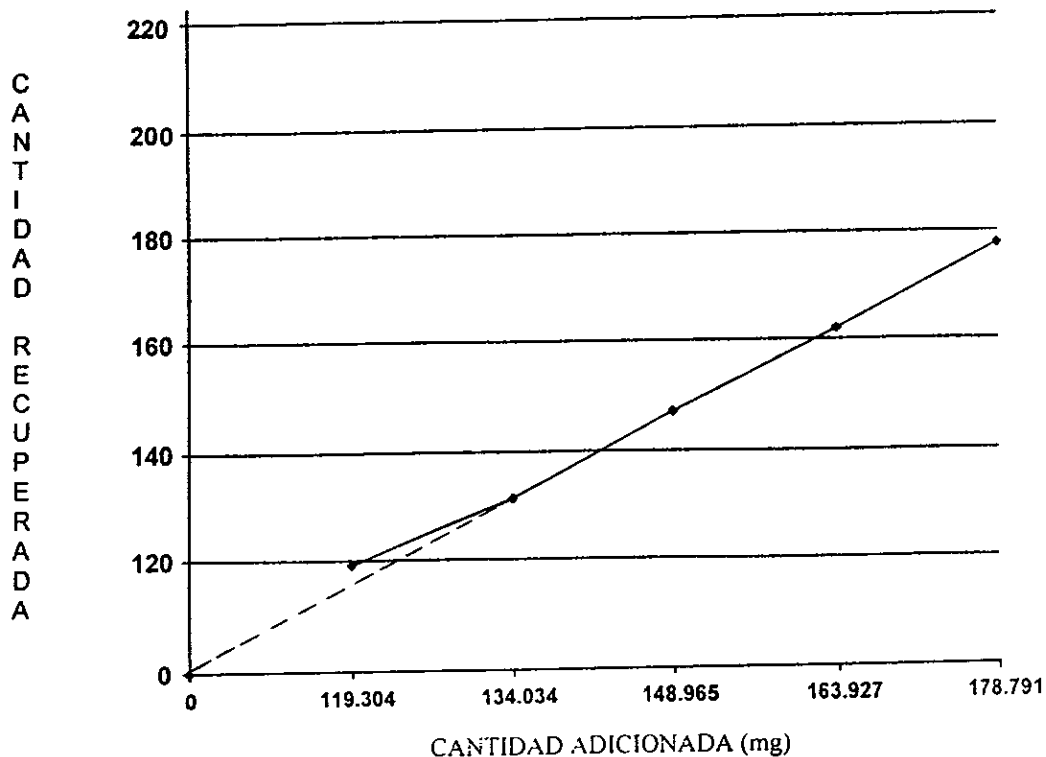


FIGURA No. 12 LINEALIDAD DEL METODO

3. EXACTITUD

| Cantidad Adicionada % (x) | Cantidad Recuperada % (y) |
|------------------------------|------------------------------|
| 100.000 | 102.95997 |
| 100.000 | 100.52937 |
| 100.000 | 98.79986 |
| 100.000 | 100.25943 |
| 100.000 | 98.93940 |
| 100.000 | 100.00000 |
| 100.000 | 100.00000 |
| 100.000 | 98.67997 |
| 100.000 | 99.46970 |
| 100.000 | 99.46970 |

Con los datos anteriores y fórmula de ANEXO 1 determinar el coeficiente de variación.

$$\bar{Y} = 99.910740$$

$$S = 0.81348$$

$$CV = 0.81421 \%$$

CRITERIO: C.V menor que 3.0%

Evaluando la exactitud a través del estadígrafo de contraste “t” de student.

Hipótesis

Ho: $\mu = 100\%$

Ha: $\mu \neq 100\%$

$$t_{cal} = -0.02271$$

$$t_{tab} = t(0.975, 5) = 2.571$$

CRITERIO:

$$t_{cal} \leq t_{tab}$$

$$-0.02271 < 2.571$$

Como t_{cal} es menor que t_{tab} podemos considerar al método exacto.

4. PRECISION.

a. Repetibilidad.

$$CV = 0.81421\%$$

Para métodos espectrofotométricos el $CV < 3\%$ por lo tanto el método si cumple con este criterio.

b. Reproducibilidad.

Modelo estadístico

$$Y_{ijk} = \mu + A_j + Dj(i) + Ek (ij)$$

Hipótesis planteada

Analista
Ho: $M_1 = M_2$
Ha: $M_1 \neq M_2$

Día
Ho: $M_1 = M_2$
Ha: $M_1 \neq M_2$

ANALISTA

| | | 1 | 2 |
|----------|--|---------------|--------------|
| 1 | | 99.87 | 99.08 |
| | | 97.77 | 99.08 |
| | | 98.30 | 99.34 |
| 2 | | 100.39 | 99.09 |
| | | 98.58 | 98.24 |
| | | 98.32 | 98.37 |

1) Tabla de Totales.

| | | <u>ANALISTA</u> | | |
|------------|---|-----------------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | |
| <u>DIA</u> | 1 | 295.94 | 297.5 | 593.44 |
| | 2 | 297.29 | 295.7 | 592.99 |
| | | 593.23 | 593.20 | 1186.4 |

2) Tabla de análisis de varianza

| FV | GL | SC | MC | Fcal | Ftab |
|----------|----|------|--------|--------|-------|
| Analista | 1 | 0 | 0 | 0 | 38.51 |
| Día | 2 | 0.84 | 0.4200 | 0.6233 | 6.06 |
| Error | 8 | 5.39 | 0.6737 | | |

EFFECTO POR ANALISTA

$$F_{cal} < F_{tab}$$

$$0 < 38.51$$

Por lo tanto no existe diferencia significativa entre analistas.

EFFECTO POR DIA

$$F_{cal} \leq F_{tab}$$

$$0.6233 < 6.06$$

Por lo tanto no existe diferencia significativa entre los días de análisis.

5. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Tiempo Condición

| Inicio | Oscuridad 2 horas | Luz clara 2 horas | Refrigeración 2 horas |
|---------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|
| 99.6034 | 98.3034 | 97.5173 | 99.6034 |
| 99.6048 | 98.2838 | 97.5111 | 99.3388 |
| 99.8690 | 98.6122 | 96.7433 | 99.6690 |

$$Si/i = \bar{X} \quad Si/\bar{X}$$

$\bar{X} Si$ = Media de los valores que se obtienen después del tratamiento.

\bar{X} = Es la media de los valores iniciales.

| | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|---|---------|
| Oscuridad 2 horas | $S_i/i = \frac{98.3998}{99.6924}$ | = | 0.98703 |
| Luz clara 2 horas | $S_i/i = \frac{97.2572}{99.6924}$ | = | 0.97557 |
| Refrigeración 2 horas | $S_i/i = \frac{99.5370}{99.6964}$ | = | 0.99844 |

Criterio sí S_i/i es aproximadamente 1 se considera la muestra estable.

Evaluación de la estabilidad de la muestra a través del Estdadígrafo “t de Dunnet” (T_D).

Con los resultados obtenidos y aplicando las fórmulas correspondientes del anexo, se calculan los diferentes valores de (T_D), para las diferentes condiciones.

$$T_D, (\text{Luz clara 2 horas}) = -0.01603$$

$$T_D, (\text{Oscuridad 2 horas}) = -0.0302$$

$$T_D, (\text{Refrigeración 2 horas}) = -0.00192$$

$$T_D, \text{ tab} = t(8,3,0.975) = 2.88$$

CRITERIO: Si T_D de cal. < T_D tab (gle, m, 0.975) la muestra es estable.

Donde:

gle = Grados de libertad del error

m = Número de comparaciones contra el control

Como T_D calculada para luz clara, oscuridad y refrigeración es menor que la T_D de tablas podemos concluir que la muestra es estable.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La proporción de ácido clorhídrico diluido, así como la agitación y calentamiento de las muestras son variables que se tienen que controlar para que se lleve a cabo al 100 % la reacción de hidrólisis.

Al determinar el pH de algunas muestras el cuál es de 1 corroboramos que es el adecuado para la formación del compuesto colorido

Al establecer los mejores tiempos para la formación del compuesto colorido damos tiempo a que los reactivos interactúen adecuadamente y eliminamos cualquier posibilidad de que la muestra no de respuesta adecuada.

El sistema es lineal, ya que existe una relación lineal en cuanto a los diferentes niveles de concentración en la región de trabajo (80%, 90%, 100%, 110%, 120%) y además se muestra el resultado del coeficiente de correlación que nos indica la linealidad del sistema a los diferentes niveles de concentración empleados. La Figura No. 10 presenta el comportamiento del sistema.

La precisión del sistema determinado al 100%, presenta una dispersión mínima de los valores cuantificados por la desviación, por lo cual al ser menor de lo establecido (1.5), éste último parámetro indica que el sistema es preciso.

Se determinó la especificidad frente a excipientes observando que el placebo no genera alguna respuesta, ver Figura No. 11.

Se continua con la linealidad del método trabajando con los mismo niveles indicados para la linealidad del sistema. Los resultados muestran que existe una relación lineal de los mg adicionados contra los mg recuperados, y se encuentra que los valores de la distribución T de student, para evaluar la ordenada y la pendiente indican que estadísticamente la ordenada es igual a cero y la pendiente a uno.

La exactitud se evaluó con 6 muestras al 100%, determinando que el valor del coeficiente de variación (0.814) es menor al 3.0% establecido para métodos espectrofotométricos por lo que el método analítico es exacto, además de que el valor de la distribución t calculada (-0.022) es menor al de la t de tablas (2.571).

Para la determinación de la precisión del método se emplearon los datos de exactitud, determinando que el coeficiente de variación es menor al 3.0%, de esta forma se establece que el método es preciso.

La reproducibilidad de la muestra fué diseñada para evaluarse mediante un análisis de varianza, considerando dos días y dos analistas, encontrándose que los valores de la distribución F para el día y el analista son menores a las de las tablas. Por lo anterior el método es reproducible a las condiciones dadas.

En cuanto a la estabilidad de la muestra, esta se mantiene estable al menos 2 horas tanto en la oscuridad como en la luz clara y refrigeración.

VIII. CONCLUSIONES

Se implemento el método proporcionado por el Laboratorio estableciendo las mejores condiciones para el análisis del principio activo Ftalilsulfatiazol.

Una vez concluido el análisis de los resultados de la validación, se determinó que el sistema es lineal y preciso y que el método analítico es lineal en el intervalo de la concentración estudiada, además de ser exacto, preciso y reproducible.

Se considera que el método analítico es específico frente a excipientes, debido a que no presentan respuesta.

Se encontró que las muestras analizadas son estables a las condiciones a las que fueron sometidas oscuridad, luz clara y refrigeración por lo menos 2 horas.

El método propuesto es específico para pruebas de rutina (control de calidad).

Sin duda alguna un excelente producto farmacéutico es aquel en el cual, desde su diseño se controlan todos los atributos de calidad de tal manera que el Laboratorio brinde al paciente un producto que cumpla con la pureza o concentración marcada en marbete y ejerza el mejor efecto terapéutico. Para obtener esta calidad se vale de un arma muy importante: la validación de sus métodos analíticos tanto a nivel de producto en fase de granel como producto terminado.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. D. Roman fernando., Innovación y Desarrollo Farmacéutico. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C., México D.F. p. 20-22, (1990).
2. Material de Apoyo del Curso Impartido en el Laboratorio Sanofi de México. Planta Coyoacán "Buenas Practicas de Manufactura", Méxicco D.F. (1990).
3. Guía Oficial de Validación de Métodos Analíticos de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. "Métodos Analíticos, Validación". México, (1991).
4. British Pharmacopoeia. Vol London Her Majesty's Stationery Office, p 514,(1993).
5. Bertram G. Katzung MD. Phd. Farmacología Basica y Clínica. 4 ed Manual Moderno. México,D.F. p. 592-595 (1993)
6. Goodman y Guilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica 8 ed. Medica Panamericana, S.A. México, D.F. p. 1018-1024
7. John A. Bevan. et al Fundamentos de Farmacología. 2 ed. Harla. México, D.F. p. 609-620 (19829).
8. Little, M. Farmacología Experimental y Clínica. 4 ed. El Ateneo. P. 749-756 (1988).
9. Bowman, W.C. Farmacología, Bases Bioquímicas y Patológicas. 2 ed Nueva Editorial Interamericana. México, D.F. p. 34.17 34.21 (1984)

10. Arthur J. Lewis, M.D. Modern Drug Encyclopedia. 12 th ed. New York p. 696-697 (1973).
11. Clarke's. Isolation and Identification of Drugs. 2 th ed. The Pharmaceutical Press. London. P. 900 (1986).
12. Lieberman, H.A. et al (edits). "Pharmaceutical Dosage Forms: Compressed Tablets". Vol I Marcel Dekker. Inc. New York. (1980)
13. Remington, Farmacia. 17 ed. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Vol 2. p. 2179-2188 (1987)
14. United States Pharmacopoeia. Twenty three Rev. Marck Publishing Company, Easton, Pa p. 1838-1839, 1790-1792 (1995).
15. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. 5 ed México, D F p. 104-105, 122-129, 286-287 (1988).
16. Barbara, Mc. Van, R.N. Referencias Farmacéuticas, Manual de Consulta para los Profesores de la Salud. P.32-33 (1988)
17. Banker, G.S. an Rhodes, C.T. Modern Pharmaceutics. Marcel Dekker, Inc. New York (1990).
18. Fritz, J.S. and Schenk, H.G Química Analítica Cuantitativa 3 ed. Limusa. México, D.F. p. 93-126 (1989).
19. Skoog, D.A y West, D.M. Análisis Instrumental. Interamericana México, D.F. p.27-37 (1983).

20. Day, R.A. y Underwood, A.L. Química Analítica Cuantitativa 5 ed. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. México, D.F. p. 459-462, 469-476 (1989).
21. Schenk, H.G. y Hahn, B.R. Química Analítica Cuantitativa. Continental México, D.F. p. 307-329, 487-492 (1984).
22. Comité de Redacción de Guías Generales de Validación. México, D.F (1991).
23. Carl, E.D. "Effect of pH on absorbance of azo dye formed by reaction between Nitrite and Sulfanilamide N-(1-Naphthylethylenediamine) in Residual Nitrite Methods for Foods". J. Assoc. Off Anal. Chem. 68 (3), 485-487 (1985)
24. The Merck Index. II th ed. Merck Co. Inc. Rahway, N.J. USA. (1989)
25. Willian Horwitz. "Review of Analytical Methods for Sulfonamides". J Assoc. Of Chem. 64 (1), 104-128 (1981).
26. Curso de estadística Aplicada a la Validación de Métodos Analíticos Instituto de Capacitación de la Industria farmacéutica. (1987).
27. K.A. Connors. Curso de Análisis Farmacéutico Reverte. España, p 246-248, 574 – 575 (1981).

ANEXO

A. Fórmulas para la linealidad.

Cálculo de la ordenada al origen.

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

Cálculo de la pendiente.

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

Cálculo del error típico de estimación modificado.

$$S_{Y|X} = \sqrt{\frac{(\Sigma Y^2) - b(\Sigma Y) - m(\Sigma XY)}{n-2}}$$
$$\hat{S}_{Y|X} = S_{Y|X} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-2}}$$

Cálculo del coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2).

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

$$r = \frac{nt(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[nt(\sum X^2) - (\sum X)^2][nt(\sum Y^2) - (\sum Y)^2]}}$$

Evaluación de la ordenada al origen A (a) con la “t” de student.

$$t_{cal} = \frac{a - A_0}{S_{r1X} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}}$$

Criterio de aceptación $t_{cal} \leq t(0.975, n-2)$ el método se acepta y podemos decir que tiene una ordenada al origen considerada como “cero”.

Evaluación de la pendiente B (b).

$$\frac{(b - B_0) S_x \sqrt{n-1}}{S_{YIX}}$$

Criterio de aceptación $t_{cal} \leq t(0.975, n-2)$ el método se acepta y podemos decir que tiene una pendiente considerada como "uno".

Tabla de ANADEVa para la linealidad.

| F.V | GI | SC | MC | F _{cal} |
|--------------------|-----|------|------|--------------------------|
| Regresión | n-1 | SCr | MCr | |
| Error de regresión | n-2 | Scer | Mcer | $f_r = \frac{MCr}{Mcer}$ |

Suma de cuadrados para la regresión.

$$SCr = b(\sum xy) + a(\sum Y) - \frac{(\sum Y)^2}{n}$$

Donde:

F.V = Fuente de variabilidad.

gl = Grados de libertad.

SC = Suma de cuadrados.

MC = Media de cuadrados.

F_{cal} = F calculada.

SCr = Suma de cuadrados de la regresión.

SCer = Suma de cuadrados de el error de regresion.

MCr = Media de cuadrados de regresión.

MCer = Media de cuadrados de el error de regresión.

Suma de cuadrados del error de regresión.

$$SCer = \Sigma Y^2 - b (\Sigma XY) - a (\Sigma Y)$$

Media de cuadrados para la regresión.

$$MCr = \frac{SCr}{glr}$$

Media de cuadrados para el error de regresión

$$MCer = \frac{SCer}{gler}$$

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

F de cálculo para la regresión.

$$F_{cal} = \frac{MCr}{MCer}$$

Si $F_{cal} > F(1.13, 0.95)$. Por lo tanto el modelo de regresión lineal simple es correcto para describir la relación entre la cantidad adicionada (x) y la cantidad recuperada (y).

B. Fórmulas para la precisión del sistema.

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

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

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

C. Formulas para la exactitud.

Con "t" de student.

$$t_{cal} = \frac{\bar{X}\% - \mu}{S\% \sqrt{n}}$$

Criterio t_{cal} debe ser menor que t_{tab} .

D. Fórmulas de cálculo para la precisión del método.

1. REPETIBILIDAD

Se evalúa con C.V

2. REPRODUCIBILIDAD

Se utiliza un modelo anidado, de efectos aleatorios de dos factores (A: analista, D. día), el cual se presenta con la siguiente ecuación.

$$Y_{ijk} = \mu + Ai + Dj(i) + Ek(ij)$$

Donde:

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

μ = Cantidad de principio activo en la muestra.

A_i = Efecto del analista en el porcentaje cuantificado

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

$E_k(ij)$ = Error experimental.

Los resultados se tabulan de la siguiente manera:

| | |
|-------|-------|
| Y 111 | Y 211 |
| Y 112 | Y 212 |
| Y 113 | Y 213 |
| | |
| Y121 | Y221 |
| Y122 | Y222 |
| Y123 | Y223 |

$$\Sigma Y^2 \dots = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{122} + Y_{123} + \dots + Y_{223})^2$$

$$\Sigma Y^2_{ijk} = (Y^2_{111} + Y^2_{112} + Y^2_{113} + Y^2_{121} + Y^2_{122} + Y^2_{123} + \dots + Y^2_{223})$$

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

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

$$\Sigma Y^2_{i..} = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{121} + Y_{123} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

Donde:

a = Número de analistas

d = Número de días

r = Número de repeticiones por día y por analista.

Y = Porcentaje del principio activo cuantificado.

$\Sigma Y^2_{.}$ = Suma total de los porcentajes cuantificados por los analistas al cuadrado

ΣY^2_{ijk} = Suma total de los cuadrados de los porcentajes cuantificados por los analistas.

$\Sigma Y^2_{.j.}$ = Suma total de los porcentajes cuantificados en un día.

$\Sigma Y^2_{ij.}$ = Suma total de los cuadrados de los porcentajes cuantificados por un analista en un día.

$\Sigma Y^2_{i..}$ = Suma total de los cuadrados de los porcentajes cuantificados por un analista.

| FUENTE DE VARIACION | GRADOS DE LIBERTAD | SUMA DE CUADRADOS | MEDIA DE CUADRADOS | F CALC |
|---------------------|--------------------|--|-----------------------------------|------------------------|
| ANALISTA | $a - 1$ | $\sum Ca = \frac{\sum Y^2_{i..}}{dr} - \frac{\sum Y^2_{...}}{adr}$ | $MCa = \frac{\sum Ca}{a - 1}$ | $Fa = \frac{MCa}{MCd}$ |
| DIA | $a(d - 1)$ | $\sum Cd = \frac{\sum Y^2_{.j.}}{r} - \frac{\sum Y^2_{...}}{dr}$ | $MCd = \frac{\sum Cd}{a(d - 1)}$ | $Fd = \frac{MCd}{MCE}$ |
| ERROR | $ad(r - 1)$ | $\sum Ce = \sum Y^2_{ijk} - \frac{\sum Y^2_{ij.}}{r}$ | $MCE = \frac{\sum Ce}{ad(r - 1)}$ | |

Criterio de aceptación.

$$F_{calc} \leq F_{tablas}$$

$$F_{dcalc} \leq F_{dtablas}$$

E. Fórmula para evaluar la estabilidad de la muestra.

1. Con Si/i

$$Si/i = \frac{\bar{X}_{Si}}{\bar{X}}$$

Donde:

\bar{X}_{Si} = Es la media de los valores que se obtienen después del tratamiento.

\bar{X} = Es la media de los valores iniciales.

Criterio: Si Si/i es aproximadamente igual a 1 se considera la muestra estable.

2. Con el estadígrafo de contraste “t de Dunnet” (t_d).

Suma de cuadrados de la propiedad medida.

$$\sum Y_{ij}^2$$

Suma de cuadrados del total de la combinación tiempo condición.

$$\sum Y_i^2$$

Suma de cuadrados del error (SCe).

$$SCe = \sum Y_{ij}^2 - \sum Y_i^2$$

Media de cuadrados del error (Mce).

$$MCe = \frac{SCe}{t(r-1)}$$

Donde:

r es el número de replicas.

t es el número de tratamientos.

Ecuación de la "td", para cada una de las combinaciones tiempo-condición.

$$td = \frac{Yc - Yi}{\sqrt{MC(2/r)}}$$

Donde:

Yc es la media de las combinaciones.

Yi es la media de los valores obtenidos inicialmente.