



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**



**Departamento de  
Exámenes Profesionales**

**DESARROLLO DE UN METODO ESPECTROFOTOMETRICO  
U.V. PARA LA OBTENCION DEL PERFIL DE DISOLUCION DE  
UNA FORMA FARMACEUTICA QUE CONTENGA  
TRIMETROPRIMA Y SULFAMETOXASOL**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TITULO DE :**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**JOSE ALEJANDRO ISLAS HERNANDEZ**

**ASESOR DE LA TESIS**

**QFB JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS**

**MEXICO, D. F.**

**2003**



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.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recesional.

NOMBRE: José Alejandro  
Lola Hernández

FECHA: 11 / Febrero / 2004

FIRMA: 



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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

ATN: Q. Ma. del Carmen Garcia Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

Desarrollo de un método espectrofotométrico U.V. para la obtención del perfil  
de disolución de una forma farmacéutica que contenga Trimetoprima y  
Sulfametoxazol.

que presenta el pasante: José Alejandro Islas Hernández  
con número de cuenta: 9754453-5 para obtener el título de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de Enero de 2003

PRESIDENTE M. en C. Guillermo A. Rodríguez Romo

VOCAL D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez

SECRETARIO Q.F.B. José Antonio Garduño Rosas

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Elia Granados Enriquez

SEGUNDO SUPLENTE Q. Sonia Rincón Arce

## REALIZA TUS SUEÑOS

Un pequeño gusanito caminaba un día en dirección al sol muy cerca del camino se encontraba un chapulín:

-¿Hacia dónde te diriges?, Le preguntó.

Sin dejar de caminar, la oruga contestó:

-Tuve un sueño anoche; soñé que desde la punta de la gran montaña yo miraba todo el valle. Me gustó lo que vi en mi sueño y he decidido realizarlo.

Sorprendido, el chapulín dijo, mientras su amiga se alejaba:

-¡Debes estar loco!, ¿Cómo podrías llegar hasta aquel lugar?

-¡Tu, una simple oruga!. Una piedra será para ti una montaña, un pequeño charco un mar y cualquier tronco una barrera infranqueable pero la oruga ya estaba lejos y no lo escuchó sus diminutos pies no dejaron de moverse.

La oruga continuó su camino habiendo avanzado ya unos cuantos centímetros del mismo modo, la araña, el topo y la rana aconsejaron a nuestro amigo a desistir de su sueño.

-¡No lo lograrás jamás!- le dijeron-, pero en su interior había un impulso que lo obligaba a seguir.

Ya agotado, sin fuerzas y a punto de desistir, decidió parar a descansar y construir con su último esfuerzo un lugar donde pernoctar. Estaré mejor, fue lo último que dijo, y murió.

Todos los animales del valle por días fueron a mirar sus restos. Ahí estaba el animal más loco del pueblo había construido con su tumba un monumento a la insensatez. Ahí estaba un duro refugio, digno de uno que murió "por querer realizar un sueño irrealizable".

Una mañana cuando el sol brillaba de una manera especial, todos los animales se congregaron en torno a aquello que había convertido en una advertencia para los atrevidos. De pronto quedaron atónitos aquella concha dura comenzó a quebrarse y con asombro vieron unos ojos y una antena que no podía ser la de la oruga que creían muerta. Poco a poco, como para darles tiempo de reponerse del impacto, fueron saliendo las hermosas alas de aquel impresionante ser que tenían frente a ellos: una mariposa. No hubo nada que decir, todos sabían lo que haría se iría volando hasta la gran montaña y realizar su sueño; el sueño por el que había vivido, por el que había muerto y por el que había vuelto a vivir. “Todos se habían equivocado”.

Dios no nos hubiera dado la posibilidad de soñar, si no nos hubiera dado la oportunidad de hacer realidad nuestros sueños. Si tienes un sueño, vive por el, intenta alcanzarlo, pon la vida en ello y si te das cuenta que no puedes, quizás necesites hacer un alto en el camino y experimentar un cambio radical en tu vida y entonces, con otro aspecto, con otras posibilidades y circunstancias distintas: **!!LO LOGRARAS!!**

El éxito en la vida no se mide por lo que has logrado, sino por los obstáculos que has tenido que superar en el camino. Lucha con todas tus fuerzas por lo que deseas y alcanzaras tus sueños no importa las veces que lo intentes sigue hasta el final.

## DEDICATORIAS

### **Dedico este trabajo a:**

#### **Mis padres:**

Carlos Islas y Rosa Hernández, por haberme brindado todo su apoyo, comprensión, paciencia y por haber confiado en mí, gracias a su esfuerzo y sacrificio y sobre todo gracias por dejarme esta herencia tan valiosa. Los quiero mucho.

#### **Mis Hermanos:**

Carlos y Claudia con quienes he compartido gran parte de mi vida, por los momentos felices y tristes que hemos vivido y por el cariño que nos une.

#### **Mis padrinos:**

Luis Huerta y Estela Bravo, por haber sido coparticipes en todos mis logros académicos, por estar cerca de mí cuando los necesito, por todo el apoyo brindado gracias.

## AGRADECIMIENTOS

### **Agradezco a:**

#### **A Zaida Morlan:**

Por su valiosa cooperación durante el desarrollo experimental de este trabajo, por su gran amistad y por enseñarme a no ser conformista.

#### **A mis grandes amigos:**

Marcos Maya, Celso Vázquez, Miguel A. Avila y Daniel Garcia por apoyarme en los momentos mas difíciles de mi existencia, por estar con migo en las buenas y en las malas, por sus consejos, por alentarme siempre para salir adelante, por esa hermandad que nos une mil gracias.

#### **A mis compañeros y amigos:**

De la generación 24<sup>a</sup> especialmente a aquellos que hicieron algo inolvidable de mi estancia en esta facultad: Daniela, Dulce, Elizabeth, Nora, Selene, Vianey, Nadia, Zaida, Israel, Alejandro, Toño, Héctor, Memo, Cesar, Jaime. Por ese compañerismo y amistad, mil gracias.



**A la UNAM:**

Por brindarme la oportunidad de pertenecer a esta institución, de lo cual me siento orgulloso, gracias por formarme como persona y como profesionista.

**A Importadora y Manufacturera Bruluart:**

Por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

**Con especial agradecimiento a mi director de tesis QFB José Antonio Garduño Rosas:**

Por la oportunidad brindada al desarrollar esta tesis, por sus valiosos consejo, por su paciencia y ayuda, por su amistad desinteresada y sobre todo por desarrollar en mi capacidades que por mi mismo nunca hubiera podido ni siquiera descubrir. Muchas gracias.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice general.....	I.
Abreviaturas.....	IV.
Índice de tablas.....	VI.
Índice de figuras.....	X.
INTRODUCCIÓN.....	1.
OBJETIVOS.....	3.
CAPÍTULO 1	
GENERALIDADES	
1.1 Modelos matemáticos de calibración multivariante.....	5.
1.1.1 Fundamentos de los Modelos matemáticos de análisis multicomponente.....	6.
1.1.2 Algoritmo del modelo de mínimos cuadrados parciales.....	9.
1.1.3 Optimización del modelo matemático de Mínimos Cuadrados Parciales.....	12.
1.1.3.1 Selección de la región espectral.....	13.
1.1.3.2 Curva de calibración.....	14.
1.1.3.3 Número de repeticiones óptimo de los cálculos del algoritmo de Mínimos Cuadrados Parciales.....	15.
1.1.3.4 Determinación de muestras desechables.....	17.
1.2 Razones de absorbancia.....	18.
1.3 Características del Trimetoprim y Sulfametoxazol.....	24.
1.3.1 Propiedades terapéuticas.....	24.
1.3.2 Mecanismo de acción.....	25.
1.3.3 Aplicaciones terapéuticas.....	26.
1.3.4 Características fisicoquímicas del Trimetoprim.....	27.

1.3.5	Características fisicoquímicas del Sulfametoxazol.....	29.
1.4.	Especificaciones para validar un método analítico.....	31.
1.4.1	Linealidad.....	31.
1.4.2	Precisión.....	32.
1.4.3	Exactitud.....	32.
1.4.4	Repetibilidad entre días.....	33.
1.4.5	Reproducibilidad.....	33.
1.4.6	Límite de detección.....	33.
1.4.7	Límite de cuantificación.....	34.
1.4.8	Sensitividad.....	34.
1.4.9	Estabilidad de la muestra analítica.....	35.
1.4.10	Especificidad.....	35.

## CAPÍTULO 2

### DESARROLLO DEL MÉTODO

2.1	Diagrama de flujo de la metodología a seguir.....	37.
2.2	Equipo, material, reactivos y soluciones.....	38.
2.3	Procedimientos analíticos realizados para el desarrollo del método analítico.....	39.
2.3.1	Aditividad, interferencias e interacciones.....	40.
2.3.2	Elección de la región espectral.....	41.
2.3.3	Puntos de isoabsorción.....	42.
2.3.4	Elección del número de repeticiones óptimo de los cálculos del algoritmo de Mínimos Cuadrados Parciales.....	42.
2.3.5	Elección de estándares.....	44.
2.4	Condiciones finales para el análisis.....	45.
2.5	Ensayo analítico.....	45.
2.5.1	Preparación de estándares.....	46.
2.5.2	Lectura y estimación.....	48.

## CAPÍTULO 3

### VALIDACIÓN DEL MÉTODO

3. Criterios de aceptación.....	50.
3.1 Resultados y discusiones de la validación del sistema .....	51.
3.1.1 Linealidad del sistema. ....	51.
3.1.2 Precisión y exactitud del sistema.....	57.
3.2 Resultados y discusión de la validación del método.....	61.
3.2.1 Linealidad del método.....	61.
3.2.2 Precisión y exactitud del método.....	68.
3.2.3 Repetibilidad y reproducibilidad.....	72.
3.2.4 Límite de detección y límite de cuantificación.....	80.
3.2.5 Sensitividad.....	89.
3.2.6 Estabilidad de la muestras procesadas .....	93.
3.3 CONCLUSIONES.....	97
ANEXO.....	99.
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	77

## ABREVIATURAS

µg.	microgramos.
A	absorbancia.
AT	absorbancia total.
b	ordenada al origen (intercepto).
C.V.	coeficiente de variación.
C	concentración.
DMS	diferencia mínima significativa.
DNA	ácido desoxirribonucleico.
E	error.
F	fracción.
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos vigente.
Fig.	figura.
gl.	Grados de libertad.
Ha	hipótesis alterna.
Ho	hipótesis nula.
IS	isoabsorción.
K	coeficiente de absortividad.
LIC	limite inferior de confianza.
LSC	limite superior de confianza.
m.	pendiente.
MCC	minimos cuadrados clásicos.
MCI	minimos cuadrados inversos.
MCP	minimos cuadrados parciales.
mg	miligramos
ml	mililitros.
N	normalidad.
nm.	nanómetros.
NOM	norma oficial mexicana.
PABA	ácido p-amino benzoico.

Pag.	paginas.
PRESS	suma de cuadrados de los errores residuales.
Qo	razones de absorbancias.
r	coeficiente de determinación.
r <sup>2</sup>	coeficiente de determinación.
RCP	región del componente principal.
SMX	Sulfametoxazol.
SSA	secretaria de salud.
TMP	Trimetoprim.
U.V.	ultravioleta.
XC	límite de cuantificación.
XD	límite de detección.
$\lambda$	longitud de onda.

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 2.5.** Soluciones estándares de TMP y SMX utilizadas para minimizar los errores causados por los instrumentos analíticos dentro de nuestro ensayo.
- Tabla 3.1.** Especificaciones para la validación del método analítico.
- Tabla 3.1.1** Tabla que muestra las concentraciones utilizadas de TMP y SMX así como sus respectivas respuestas analíticas obtenidas con el modelo matemático de MCP. (anexo)
- Tabla 3.1.2** Tabla que muestra las concentraciones utilizadas de TMP y SMX así como sus respectivas respuestas analíticas obtenidas con el modelo matemático de Qo. (anexo)
- Tabla 3.1.3.** Parámetros estadísticos estimados para la linealidad del sistema.
- Tabla 3.1.4** Análisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de TMP y la concentración estimada de TMP, utilizando el modelo matemático de MCP
- Tabla 3.1.5** Análisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de SMX y la concentración estimada de SMX, utilizando el modelo matemático de MCP
- Tabla 3.1.6** Análisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de TMP y la concentración estimada de TMP, utilizando el modelo matemático de Qo.
- Tabla 3.1.7** Análisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de SMX y la concentración estimada de SMX, utilizando el modelo matemático de Qo.
- Tabla 3.1.8** Pruebas del intercepto de las cuatro rectas de regresión obtenidas a partir de los datos de la calibración del sistema.
- Tabla 3.1.9** Resultados obtenidos para determinar la precisión y exactitud del sistema.
- Tabla 3.1.10** Parámetros estadísticos determinados para evaluar la precisión del sistema para el TMP
- Tabla 3.1.11** Parámetros estadísticos determinados para evaluar la precisión del sistema para el SMX
- Tabla 3.1.12** Resultados obtenidos para determinar la exactitud del sistema para el TMP
- Tabla 3.1.13** Resultados obtenidos para determinar la exactitud del sistema para el SMX.
- Tabla 3.2.1.** Tabla que muestra las concentraciones utilizadas de TMP y SMX así como sus respectivas concentraciones estimadas obtenidas con el modelo matemático de MCP (anexo)

**Tabla 3.2.2.** Tabla que muestra las concentraciones utilizadas de TMP y SMX así como sus respectivas concentraciones estimadas obtenidas con el modelo matemático de  $Q_0$  (anexo)

**Tabla 3.2.3.** Parámetros estadísticos estimados para la linealidad del método

**Tabla 3.2.4.** Análisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de TMP y la concentración determinada de TMP, utilizando el modelo matemático de MCP.

**Tabla 3.2.5.** Análisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de SMX y la concentración determinada de SMX, utilizando el modelo matemático de MCP

**Tabla 3.2.6.** Análisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de TMP y la concentración determinada de TMP, utilizando el modelo matemático de  $Q_0$ .

**Tabla 3.2.7.** Análisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de SMX y la concentración determinada de SMX, utilizando el modelo matemático de  $Q_0$

**Tabla 3.2.8.** Pruebas del intercepto de las cuatro rectas de regresión obtenidas a partir de los datos de calibración del método.

**Tabla 3.2.9.** Resultados obtenidos para determinar la precisión y exactitud del método

**Tabla 3.2.10.** Parámetros estadísticos determinados para evaluar la precisión del método para el TMP.

**Tabla 3.2.11.** Parámetros estadísticos determinados para evaluar la precisión del método para el SMX.

**Tabla 3.2.12.** Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método para el TMP

**Tabla 3.2.13.** Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método para el SMX

**Tabla 3.2.14.** Resultados de porcentaje determinado de TMP para determinar la repetibilidad y reproducibilidad del método utilizando los modelos matemáticos de MCP y  $Q_0$ .

**Tabla 3.2.15.** Resultados de porcentaje determinado de SMX para determinar la repetibilidad y reproducibilidad del método utilizando los  $m$  modelos matemáticos de MCP y  $Q_0$ .



- Tabla 3.2.16.** Análisis de variancia para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad del método a diferentes concentraciones de TMP utilizando el modelo matemático de MCP.
- Tabla 3.2.17.** Análisis de variancia para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad del método a diferentes concentraciones de TMP utilizando el modelo matemático de Qo.
- Tabla 3.2.18.** Análisis de variancia para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad del método a diferentes concentraciones de SMX utilizando el modelo matemático de MCP.
- Tabla 3.2.19.** Análisis de variancia para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad del método a diferentes concentraciones de SMX utilizando el modelo matemático de Qo.
- Tabla 3.2.20.** Coeficientes de variación (%) calculados por día, analista y global para determinar la repetibilidad y reproducibilidad del método.
- Tabla 3.2.21.** Valores del límite de detección calculados gráficamente y matemáticamente.
- Tabla 3.2.22.** Valores del límite de cuantificación calculados gráficamente y matemáticamente.
- Tabla 3.2.23.** Parámetros estadísticos para evaluar la precisión del límite de cuantificación utilizando los modelos matemáticos de MCP y Qo.
- Tabla 3.2.24.** Parámetros estadísticos para determinar la exactitud del límite de cuantificación utilizando los modelos matemáticos de MCP y Qo.
- Tabla 3.2.25.** Resultados obtenidos para determinar la sensibilidad del método utilizando los modelos matemáticos de MCP y Qo.
- Tabla 3.2.26.** Promedio de las concentraciones estimadas de ambos analitos utilizando los modelos matemáticos de MCP y Qo.
- Tabla 3.2.27.** Cálculo de las diferencias entre cada promedio para el caso de TMP utilizando el modelo matemático de MCP.
- Tabla 3.2.28.** Cálculo de las diferencias entre cada promedio para el caso de SMX utilizando el modelo matemático de MCP.
- Tabla 3.2.29.** Cálculo de las diferencias entre cada promedio para el caso de TMP utilizando el modelo matemático de Qo.

**Tabla 3.2.30.** Cálculo de las diferencias entre cada promedio para el caso de SMX utilizando el modelo matemático de Qo.

**Tabla 3.2.31.** Resultados obtenidos para determinar la estabilidad de las muestras procesadas utilizando el modelo matemático de MCP.

**Tabla 3.2.32.** Resultados obtenidos para determinar la estabilidad de las muestras procesadas utilizando el modelo matemático de Qo.

**Tabla 3.2.33.** Parámetros estadísticos determinados para evaluar la estabilidad de las muestras para el TMP.

**Tabla 3.2.34.** Parámetros estadísticos determinados para evaluar la estabilidad de las muestras para el SMX.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.1.** Gráfico del PRESS.

**Figura 1.2.** Mecanismo de acción del Trimetoprim y el sulfametoxazol.

**Figura 1.3.** Espectro ultravioleta de TMP en solución ácida (—) en solución alcalina (- - -)

**Figura 1.4.** Espectro ultravioleta de SMX en solución ácida (—) en solución alcalina (- - -).

**Figura 1.5.** Gráfico representativo de la determinación del límite de detección (XD) y el límite de cuantificación (XC) con ayuda de los intervalos de confianza (LSC, LIC).

**Figura 2.1.** Gráfico que muestra los espectros obtenidos de las soluciones de TMP, SMX y TMP-SMX, cuyas concentraciones fueron de 25,25 y 25-25  $\mu\text{g/ml}$ , así como de la solución placebo.

**Figura 2.2.** Gráfico que muestra el análisis de PRESS del TMP y SMX, utilizando el modelo matemático de MCP.

**Figura 3.1.1.** Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la concentración real de TMP y la concentración estimada de TMP, utilizando el modelo matemático de MCP.

**Figura 3.1.2.** Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la concentración real de SMX y la concentración estimada de SMX, utilizando el modelo matemático de MCP.

**Figura 3.1.3.** Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la concentración real de TMP y la concentración estimada de TMP, utilizando el modelo matemático de  $Q_0$ .

**Figura 3.1.4.** Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la concentración real de SMX y la concentración estimada de SMX, utilizando el modelo matemático de  $Q_0$ .

**Figura 3.2.1** Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la concentración real de TMP y la concentración determinada de TMP, utilizando el modelo matemático de MCP

**Figura 3.2.2.** Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la concentración real de SMX y la concentración determinada de SMX, utilizando el modelo matemático de MCP.

**Figura 3.2.3.** Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la concentración real de TMP y la concentración determinada de TMP, utilizando el modelo matemático de Qo.

**Figura 3.2.4.** Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la concentración real de SMX y la concentración determinada de SMX, utilizando el modelo matemático de Qo.

**Figura 3.2.5.** Gráfico de los intervalos de confianza de la concentración estimada de TMP en función de la concentración adicionada de TMP, utilizando el modelo matemático de MCP.

**Figura 3.2.6.** Gráfico de los intervalos de confianza de la concentración estimada de TMP en función de la concentración adicionada de TMP, utilizando el modelo matemático de Qo.

**Figura 3.2.7.** Gráfico de los intervalos de confianza de la concentración estimada de SMX en función de la concentración adicionada de SMX, utilizando el modelo matemático de MCP.

**Figura 3.2.8.** Gráfico de los intervalos de confianza de la concentración estimada de SMX en función de la concentración adicionada de SMX, utilizando el modelo matemático de Qo.

## INTRODUCCIÓN

Es indispensable para el análisis de medicamentos contar con métodos analíticos confiables para la cuantificación del (o los) principio (s) activo (s) que contienen. Estos métodos deben demostrar su confiabilidad antes de su uso en análisis rutinarios. Para poder demostrar que el método es confiable, debe de cumplir principalmente con los criterios de precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y especificidad.

Por otro lado las formas de dosificación farmacéuticas día con día son más complejas, es decir, dentro de su formulación además de los excipientes necesarios para su fabricación, buen funcionamiento y conservación estos pueden contener más de un principio activo. Esto nos lleva a tener que aplicar primero un método de separación para luego poder llevar a cabo una determinación de los principios activos en forma individual, lo que trae como consecuencia, por la complejidad del método, un gasto mayor de recursos y una inversión de tiempo considerable.

Por lo anterior, en los últimos años se ha observado un mayor auge en la optimización y simplificación de métodos analíticos y se han reportado análisis de mezclas de dos o más componentes sin necesidad de su separación aplicando modelos matemáticos de análisis multicomponente por espectroscopia.<sup>(1,2,3)</sup> Este análisis se realiza ocupando dos o más longitudes de onda en la lectura de la muestra analítica y ha demostrado ser un método accesible, sencillo y de bajo costo. Por lo que la calibración multivariante es una herramienta matemática que puede ser aplicada en el análisis de medicamentos.

En el presente trabajo se muestra la obtención de dos métodos basados en el modelo matemático de análisis multicomponente por espectrofotometría confiables para la cuantificación de Sulfametoxazol (SMX) y Trimetoprim (TMP) liberados durante el estudio de disolución "in Vitro" de tabletas que los contienen en su formulación, sin tener que aplicar antes un método de separación en la muestra analítica, con la ventaja de disminuir el tiempo y el costo del ensayo analítico.

En el capítulo 1 se da un panorama general sobre las características de TMP y SMX así como de los modelos de calibración multivariante por espectroscopia que se reportan útiles en la cuantificación de dos o más componentes sin necesidad de separarlos, también se menciona las pruebas necesarias que se deben de realizar para evaluar la confiabilidad de un método analítico.

En el capítulo 2 se muestra los análisis espectrofotométricos que permitieron determinar las condiciones espectrofotométricas para la cuantificación de una mezcla que contenga TMP y SMX, también gracias a estos análisis espectrofotométricos se estableció el ensayo analítico.

En el capítulo 3 se muestran los análisis espectrofotométricos y pruebas realizadas para evaluar la confiabilidad del método establecido. Al final de este capítulo se señalan las conclusiones a las que se llegaron a través del presente trabajo

**OBJETIVO GENERAL:**

Desarrollar un Método analítico para cuantificar Trimetoprim (TMP) y Sulfametoxazol (SMX), liberados durante el proceso de disolución “in vitro”, mediante el empleo de los modelos matemáticos de Mínimos Cuadrados Parciales y Razones de Absorbancia.

**OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Optimizar las condiciones espectrofotométricas para cuantificar TMP y SMX, en una mezcla de ambos y de manera simultanea, aplicando los modelos matemáticos de Mínimos Cuadrados Parciales y Razones de Absorbancia.
- Establecer un ensayo confiable que permita determinar la cantidad de TMP y SMX liberados durante el proceso de disolución “in vitro”.
- Validar el método espectrofotométrico establecido.

***CAPÍTULO 1***  
***GENERALIDADES***



### 1.1. MODELOS MATEMÁTICOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE.

La calibración multivariante (un modelo matemático de análisis multicomponente) es una herramienta de reconocida selectividad y confiabilidad en el análisis cuantitativo aplicable en distintos métodos de análisis,<sup>(2)</sup> tales como:

- Resonancia magnética nuclear.
- Espectroscopia de masas.
- Espectrometría acústica.
- Electroforesis.
- Cromatografía.
- Espectroscopia de UV-visible.
- Espectroscopia de absorción en infrarrojo.

Entre las principales ventajas que ofrece los modelo matemáticos de análisis multicomponente tenemos:

- Que es posible cuantificar, en forma confiable, varios componentes presentes en una muestra analítica.
- En los casos en los que dentro de la muestra analítica se encuentran sustancias químicas que interfieran con la respuesta analítica del (o los) analito (s) de interés y si no existe otra manera en el que puedan ser determinados selectivamente, tradicionalmente se recurría a procesos de separación de las sustancias interferentes. La calibración multivariante permite analizar en forma espectrofotométrica sistemas con interferencias químicas, aunque no sean definidas, sin necesidad de manipular excesivamente la muestra.

- Es posible eliminar fácilmente los errores que pudieran presentarse en las mediciones, ocasionadas por variaciones de temperatura en diversos instrumentos como espectrofotómetros, monocromadores mal ajustados, errores de procedimiento en el manejo de las muestras analíticas, etc.<sup>(2,3)</sup>

### 1.1.1. FUNDAMENTOS DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS DE ANÁLISIS MULTICOMPONENTE.

En el análisis cuantitativo se busca alguna relación lineal entre la medición y la concentración de un componente en particular. En espectroscopia, la ley de Beer define la relación entre la absorbancia y la concentración de la siguiente manera

$$A = E b C$$

Donde A es la absorbancia a cierta longitud de onda, C es la concentración, E es el coeficiente de absorptividad del componente a una longitud de onda dada y b es la longitud del paso óptico. Como la longitud del paso óptico es constante también se puede escribir como:

$$A = K C \quad (1)$$

Donde el coeficiente de absorptividad y la longitud del paso óptico se combinan en una sola constante, K. Como se observa la ecuación puede resolverse estudiando una sola muestra; sin embargo, ante la limitación por ruido, error instrumental, error en la manipulación de las soluciones, etc., se recomienda analizar cierto número de muestras de distinta concentración, graficar los resultados y localizar la línea recta que mejor comprenda los puntos mediante lo que se conoce matemáticamente como ajuste de mínimos cuadrados, el cual encuentra simplemente la ecuación de recta donde el error total entre las absorbancias sea mínimo.

Si la muestra contiene dos componentes y si se determinan sus absorbancias en dos longitudes de onda diferentes, es posible establecer dos ecuaciones

$$A_1 = C_1K_1 + E_1 \quad (2)$$

$$A_2 = C_2K_2 + E_2 \quad (3)$$

Donde  $A_1$  y  $A_2$  son las absorbancias a dos longitudes de onda diferentes,  $K_1$  y  $K_2$  los coeficientes de absorptividad de los dos componentes a esas longitudes de onda,  $E_1$  y  $E_2$  los errores residuales obtenidos a partir de la línea ajustada por mínimos cuadrados y las absorbancias reales.

Nuevamente es factible dar solución a cada ecuación de manera independiente mientras la absorbancia de un componente no interfiera con la absorbancia del otro (bandas bien resueltas). Partiendo de que la ley de Beer es aditiva, también es posible resolver las ecuaciones simultáneamente y así manejar el caso donde la absorbancia de un componente interfiere con la absorbancia del otro (bandas solapadas).

Así pues, al determinar la absorbancia, a dos longitudes de onda diferentes, de una muestra analítica que contiene dos componentes en donde la absorbancia de un componente interfiere con la absorbancia del otro componente, es posible establecer las siguientes ecuaciones:

$$A_1 = C_1K_{11} + C_2K_{21} + E_1 \quad (4)$$

$$A_2 = C_1K_{12} + C_2K_{22} + E_2 \quad (5)$$

Donde  $C_1$  es la concentración del compuesto 1,  $C_2$  es la concentración del compuesto 2.  $K_{11}$  es el coeficiente de absorptividad del  $C_1$  y  $K_{21}$  es el coeficiente de absorptividad del  $C_2$  a una longitud de onda 1 ( $\lambda_1$ ).  $K_{12}$  es el coeficiente de absorptividad del

$C_1$  y  $K_{21}$  es el coeficiente de absortividad del  $C_2$  a una longitud de onda 2 ( $\lambda_2$ ).  $A_1$  es la absorbancia dada por los dos componentes a una  $\lambda_1$ ,  $A_2$  es la absorbancia dada por los dos componentes a una  $\lambda_2$ .

Sin embargo, solucionar ecuaciones simultaneas manualmente se convierte en algo tedioso cuando se trata de más de dos componentes. A demás conceptualmente es factible medir la absorbancia a más de una longitud de onda para cada componente y resolver las ecuaciones respectivas.

Un camino parcialmente eficiente para resolver ecuaciones simultaneas es utilizar métodos matriciales, pues si bien implican numerosos cálculos, estos pueden efectuarse por computadora. En términos matriciales, las ecuaciones anteriores se expresarian así:

$$A_{(n,p)} = C_{(n,m)}K_{(m,p)} + E_{(n,p)} \quad (6)$$

Siendo  $n$  el número de disoluciones patrón,  $p$  el número de valores de longitud de onda y  $m$  el número de componentes. Utilizando álgebra matricial es fácil encontrar la solución de estas expresiones por computadora y plantear la matriz de calibración (o matriz de coeficientes de absortividad), que proporciona la línea (o líneas) que se ajustan mejor a los datos por mínimos cuadrados parciales.<sup>(1)</sup>

Para resolver de manera práctica y confiable ecuaciones simultaneas utilizando algebra matricial, se hallan reportados en la literatura algunos modelos matemáticos, tales como: <sup>(2,3,4,5,6,7,9)</sup>

- Mínimos cuadrados clásicos (MCC).
- Mínimos cuadrados inversos (MCI).
- Mínimos cuadrados parciales (MCP).
- Regresión del componente principal (RCP).

Sin embargo el modelo matemático de MCP es el más utilizado en la actualidad debido a que utiliza realmente la información de la concentración durante el proceso de descomposición espectral. A demás se puede utilizar para mezclas muy complejas puesto que solamente se requiere el conocimiento de los componentes de interés.<sup>(2)</sup>

### 1.1.2. ALGORITMO DEL MODELO DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES.

#### CALIBRACIÓN:

##### PASO 1:

La media del espectro de calibración es sustraída a cada valor del espectro (A) y la media de calibración de las concentraciones es sustraída de cada concentración (C). Donde "A" es la matriz  $m \times n$  del espectro de calibración, "C" es la matriz  $m \times l$  de las absorbancias del componente, "m" es el número de las soluciones estándar, "n" son el número de longitudes de onda utilizadas, "l" el número de los componentes químicos. Con letras mayúsculas se designa a las matrices, con una comilla a una matriz o vector transpuesto y los vectores se representan con letras minúsculas.

##### PASO 2.

Formación del vector de peso ( $W_h$ ):

$$A = c w_h' + E_A$$

$$w_h = (A' c) / c' c$$

Este paso de MCP se ejecuta asumiendo que se conoce la concentración de uno de los componentes de muestra analítica. Una vez obtenidos los valores de  $W_h$  se normalizan dividiendo cada uno de los  $W_h$  obtenidos entre  $W_1$ .

PASO 3:

Formación del vector marcador o variable latente ( $t_h$ )

$$A = t_h w_h' + E_A$$

$$t_h = A w_h$$

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

PASO 4

Relacionando el vector marcador y las concentraciones

$$c = v_h t_h + e_c$$

$$v_h = (t_h' c) / t_h' t_h$$

El vector marcador puede ser relacionado con las concentraciones usando una regresión de mínimos cuadrados lineal

PASO 5

Formación del vector cargador ( $b_h$ ) para A

$$A = t_h b_h' + E_A$$

$$b_h = A' t_h / t_h' t_h$$

El vector  $b_1$  no explica la máxima variancia en el espectro de calibración.

PASO 6:

Cálculo de residuales en A y c:

Espectros residuales:  $E_A = A - t_h b_h'$

Concentraciones residuales:  $e_c = c - v_h t_h$

El producto del vector marcador y el vector de carga es una aproximación del modelo de MCP para el espectro de calibración. El producto de los vectores  $v_h t_h$  representa la concentración estimada por el modelo de MCP basado en el espectro.

PASO 7:

Incrementar h (número de repeticiones de los cálculos del algoritmo), sustituyendo  $E_A$  para A y  $e_c$  para c en el paso 2 y continuar para obtener tantas repeticiones como sea necesario para optimizar el modelo.

PREDICCIÓN:

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

PASO 1:

Centra "a" usando los datos de la calibración, es decir, sustraer la media de la calibración a cada uno de los valores espectrales.

PASO 2:

Cálculo de la variable latente:

$$t_h = a w_h'$$

**PASO 3:**

Cálculo de la concentración:

$$C_h = C_{n-1} + v_h t_h$$

**PASO 4:**

Cálculo de residuales:

$$e_h = e_{n-1} - b_h t_h$$

**PASO 5:**

Incrementar  $h$ ; sustituir  $e_h$  por "a" y repetir el paso 2 hasta completar el número de  $h$  utilizadas en la calibración. <sup>(3,9)</sup>

Para fines prácticos y debido a la gran cantidad de cálculos que se deben realizar al aplicar este modelo matemático se decidió utilizar el software de ISHEJA INC. versión 1.0.0 soportado en ambiente Windows 98, este programa esta basado en el algoritmo de MCP anteriormente descrito.

### **1.1.3. OPTIMIZACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES.**

Una de las tareas más difíciles en la aplicación del modelo matemático de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP) es la de establecer las condiciones que llevan a obtener el modelo más robusto para las muestra bajo análisis. <sup>(1,6,4)</sup> Estas condiciones son:

- Selección de la región espectral.
- Curva de calibración.
- Elección del número de repeticiones óptimo de los cálculos del algoritmo de MCP
- Muestras desechables



### 1.1.3.1. SELECCIÓN DE LA REGIÓN ESPECTRAL.

Una de las ventajas de utilizar el modelo matemático de MCP es que se puede utilizar todo el espectro entero para construir modelos con poco o ningún conocimiento a priori de los espectros de los componentes de interés. Sin embargo, el desempeño de la calibración normalmente puede mejorarse eliminando inteligentemente las regiones espectrales que son evidentemente inútiles. Mientras se reduzca el número de regiones espectrales usadas en los datos reducirá el tiempo en realizar los cálculos de la calibración.

Otra cosa importante para considerar es la contribución global de cada longitud de onda a los espectros de los componentes individuales. Si hay regiones del espectro en donde ninguno de los componentes absorba no hay que molestarse en incluir esas longitudes de ondas en la calibración; incluir estas longitudes de ondas no debe tener ningún beneficio a la predicción, por que estas longitudes de onda no contienen ninguna información sobre los componentes de interés. Pero al incluirlas podríamos estar contribuyendo con ruido a la calibración debido a que la señal puede estar por debajo de la sensibilidad del detector y las absorbancias obtenidas en estas longitudes de onda pueden ser meramente al azar.

Finalmente si las bandas espectrales de las impurezas no aparecen en las regiones espectrales utilizadas para la calibración, entonces no hay ningún indicativo para que los valores constitutivos predichos sean potencialmente incorrectos. Esta información junto con el conocimiento químico de las muestras debe ser consideradas al seleccionar las regiones espectrales para su inclusión en la calibración.<sup>(4,6)</sup>

### 1.1.3.2. CURVA DE CALIBRACIÓN.

Un aspecto importante es el diseño del conjunto de soluciones patrón. Por ello, las buenas prácticas de laboratorio, muestras representativas y métodos de muestreo apropiado son críticos en la obtención de resultados exactos. Además, debe haber por lo menos tantas muestras como componentes de interés, (generalmente muchas más que estos) ya que a mayor número de datos, mayor confianza en los análisis y en la estadística. Otra razón para usar un mayor número de soluciones patrón es la de incluir más variaciones en el modelo.

Uno de los puntos más importantes es la de evitar que las concentraciones de las soluciones patrón sean colineales, es decir, que las cantidades relativas de los componentes de la muestra de calibración son una constante a lo largo de todas las muestras de calibración. Recuerde que este modelo no calibra creando una relación directa entre los datos constitutivos y la absorbancia. En cambio intentan poner en correlación el cambio en la concentración a algunos cambios correspondientes en los espectros.

Para dar un ejemplo simple, considere el caso de crear las “normas” artificiales para la calibración. Una práctica típica es hacer una mezcla en concentraciones altas de todos los componentes de interés y entonces hacer diluciones múltiples de esas mezclas para crear las muestras restantes, al aplicar el modelo matemático de MCP fallaría completamente. El problema principal es que no hay ninguna variación en los datos, la descomposición espectral no puede identificar diferencia entre los componentes a lo largo de la calibración y entonces los modela como un factor simple, al igual que la matriz con una sola longitud de onda, este hecho puede arrojar calibraciones erróneas y consecuentemente predicciones falsas <sup>(1,4)</sup>

### **1.1.3.3. NÚMERO DE REPETICIONES ÓPTIMO DE LOS CÁLCULOS DEL ...ALGORITMO DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES.**

Una de las tareas más difíciles en la aplicación del modelo matemático de MCP es la determinación del número de repeticiones óptimo de los cálculos del algoritmo de MCP para modelar los datos. Si se utilizan muy pocas repeticiones de los cálculos, las predicciones de las concentraciones son pobres al no analizar todas las variaciones espectrales importantes. Conforme se incorporan mayor número de repeticiones de los cálculos se incorporan más vectores al estudio, estos se ordenan en grado de importancia para el modelo de MCP. Eventualmente al aumentar el número de repeticiones de los cálculos se comenzará a modelar el ruido del sistema y el error comenzará a incrementarse. La descomposición espectral con el modelo matemático de MCP y la correcta selección de número de repeticiones de los cálculos del algoritmo de MCP es un camino muy efectivo para eliminar el ruido del sistema (variaciones en las lecturas de las absorbancias de cada longitud de onda debidas al ruido instrumental).

La manera más efectiva para establecer el número de repeticiones de los cálculos del algoritmo de MCP es la aplicación del PRESS (suma de cuadrados de los errores residuales). Los valores del PRESS son un indicador de que tan bien se están evaluando las concentraciones de las soluciones patrón con cada número de repeticiones de los cálculos del algoritmo de MCP. En una grafica típica del PRESS en función del número de repeticiones de los cálculos del algoritmo de MCP se puede observar que conforme aumenta el número de repeticiones de los cálculos del algoritmo de MCP disminuye el error de la predicción (ver figura 1.1.), alcanza un mínimo en un punto determinado y comienza a ascender nuevamente al integrar el ruido del sistema.

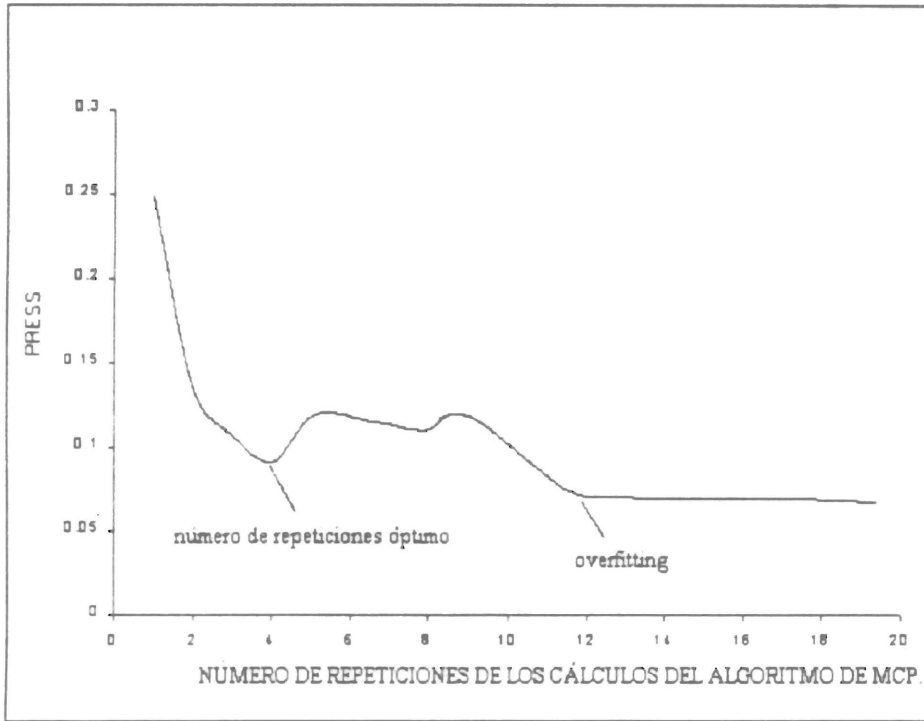


Figura 1.1. Gráfico del PRESS

El incluir el ruido del sistema en la matriz de calibración se conoce como sobre ajuste (overfitting) Por eso es recomendable elegir el número de repeticiones donde el PRESS alcance el mínimo. Sin embargo, mientras esta puede ser la mejor elección en la determinación del numero de repeticiones de los calculos del algoritmo de MCP que modelaran un numero finito de soluciones patrón no siempre será lo óptimo en la predicción de concentraciones reales ya que en algunas ocasiones el mínimo valor de PRESS esta sobre ajustado <sup>(1,6)</sup>

#### 1.1.3.4. DETERMINACIÓN DE MUESTRAS DESECHABLES.

Las muestras desechables son soluciones patrón que no pertenecen a la calibración, es decir, soluciones patrón que presentan una diferencia considerable entre el valor de la concentración estimada y su respectiva concentración esperada (residuos de la concentración) en comparación con las demás soluciones patrón pertenecientes a la calibración. Una o varias de las soluciones patrón pueden presentar un error significativamente considerable en el residuo de la concentración con respecto a las demás soluciones patrón debido a: errores en los instrumentos analíticos, errores de procedimiento en el manejo de las muestras analíticas, errores causados por el medio ambiente (temperatura y humedad), errores de transcripción de los datos espectrales, etc

Una herramienta poderosa para descubrir las muestras desechables es el método de dejar una muestra fuera de la calibración, es decir, separamos los datos espectrales de una determinada solución patrón, con los datos espectrales de las soluciones restantes obtenemos una calibración la cual utilizamos para estimar la concentración de la solución que quedo fuera, posteriormente separamos los datos espectrales de otra solución patrón e incorporamos al grupo los datos espectrales de la solución que se había excluido anteriormente y repetimos el procedimiento. Tras aplicar este procedimiento a todas y cada una de las soluciones patrón, se comparan las diferencias entre las concentraciones calculadas y la concentraciones esperadas, el error de la predicción de la mayoría de las muestras debe ser aproximadamente el mismo, muestras que tienen los residuos de la concentración significativamente más grande que el resto de la calibración es considerada una muestra desechable la cual pueden ser excluidas de la calibración para así poder tener predicciones más confiables en muestras reales.<sup>(1,2)</sup>

Dividiendo la ecuación 1 entre la 2 obtenemos la razón de absorbancias (QO)

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{K_1 \cancel{C_X}}{K_2 \cancel{C_X}} = \frac{K_1}{K_2} = Q \quad \text{para una } \lambda_2 \text{ y } \lambda_1 \quad (3)$$

Como podemos observar en la ecuación 3 la razón de absorbancias es una constante debido a que este valor es obtenido a partir de la razón de el coeficiente de absorptividad a una  $\lambda_1$  ( $K_1$ ) y el coeficiente de absorptividad a una  $\lambda_2$  ( $K_2$ ) que también son constantes

Por otro lado, en el caso de dos componentes (X y Y), asumiendo que existe aditividad entre los espectros de los dos componentes, la absorbancia total (AT) va a ser igual a la suma de las dos ecuaciones de la ley Beer de cada uno de los componentes a una  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$ .

La ecuación correspondiente para la  $\lambda_1$  es:

$$AT_1 = K_{1X} C_X + K_{1Y} C_Y \quad (4)$$

La ecuación correspondiente para la  $\lambda_2$  es:

$$AT_2 = K_{2X} C_X + K_{2Y} C_Y \quad (5)$$

Al dividir la ecuación 4 entre la ecuación 5, tenemos como resultado la razón de la absorbancias (QO).

$$\frac{AT_1}{AT_2} = \frac{K_{1X} C_X + K_{1Y} C_Y}{K_{2X} C_X + K_{2Y} C_Y} \quad (6)$$

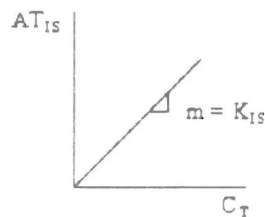
La ecuación 6 puede simplificarse si una de las longitudes de onda es una longitud de onda de isoabsorción, es decir, una longitud de onda en donde los dos componentes de la mezcla tienen la misma absorptividad ( $K_{IS}$ ) por que se comportan como uno solo, en este caso si asumimos que la longitud de isoabsorción es la  $\lambda_2$ , tenemos:

$$\frac{AT_1}{AT_{IS}} = \frac{K_{1X} C_X + K_{1Y} C_Y}{K_{IS} (C_X + C_Y)} \quad (7)$$

Como podemos observar en la ecuación 7 el divisor se asemeja a una ecuación de la línea recta donde  $AT_{IS}$  es la variable dependiente,  $K_{IS}$  es la pendiente,  $(C_X + C_Y)$  es la variable independiente y con un intercepto igual al origen. Pero como  $C_X + C_Y = C_T$  entonces la ecuación de la línea recta queda de la siguiente forma

$$AT_{IS} = K_{IS} C_T \quad (8)$$

Y su gráfico tiene el aspecto siguiente:



Por otro lado la ecuación 7 la podemos agrupar de la siguiente forma:

$$Q_0 = \frac{K_{1X} C_X}{K_{IS} C_T} + \frac{K_{1Y} C_Y}{K_{IS} C_T} \quad (9)$$

Expresando la concentración en términos fraccionarios tenemos

$$Q_0 = \frac{K_{1X}}{K_{1S}} F_X + \frac{K_{1Y}}{K_{1S}} F_Y \quad (10)$$

En donde la  $F_X = \frac{C_X}{C_T}$  y la  $F_Y = \frac{C_Y}{C_T}$

Como la suma de  $F_X + F_Y = 1$ , entonces  $F_Y = 1 - F_X$ . Sustituimos este termino en la ecuación 10 y obtenemos a la razón de absorbancias en función de la fracción de uno de los componentes de la mezcla binaria:

$$Q_0 = \frac{K_{1X}}{K_{1S}} F_X + \frac{K_{1Y}}{K_{1S}} (1 - F_X) \quad (11)$$

La ecuación 11 también se puede expresar de la siguiente forma:

$$Q_0 = \frac{K_{1X}}{K_{1S}} F_X + \frac{K_{1Y}}{K_{1S}} - \frac{K_{1Y}}{K_{1S}} F_X \quad (12)$$

Factorizamos términos y obtenemos la siguiente ecuación:

$$Q_0 = \left[ \frac{K_{1X}}{K_{1S}} - \frac{K_{1Y}}{K_{1S}} \right] F_X + \frac{K_{1Y}}{K_{1S}} \quad (13)$$



Como  $K_{1X} / K_{1S}$  corresponde a la razón de absortividades para el compuesto X, entonces tenemos:

$$Q_X = \frac{K_{1X}}{K_{1S}} \quad (14)$$

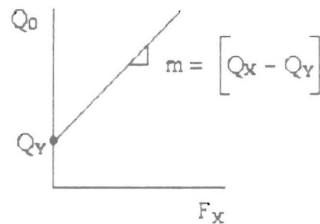
Como  $K_{1Y} / K_{1S}$  corresponde a la razón de absortividades para el compuesto Y, entonces tenemos:

$$Q_Y = \frac{K_{1Y}}{K_{1S}} \quad (15)$$

Sustituyendo las ecuaciones 14 y 15 en la 13 obtenemos:

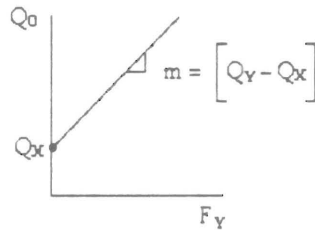
$$Q_0 = [Q_X - Q_Y] F_X + Q_Y \quad (16)$$

Como podemos observar la ecuación 16 se asemeja a una ecuación de la línea recta donde  $Q_0$  es la variable dependiente,  $(Q_X - Q_Y)$  es la pendiente,  $F_X$  es la variable independiente y  $Q_Y$  es el intercepto, el gráfico de esta ecuación tiene el siguiente aspecto:



Para poder obtener la fracción del otro componente, sustituimos  $F_X = 1 - F_Y$  en la ecuación 10 y realizamos los mismos pasos que utilizamos para obtener  $F_X$ , la ecuación y el gráfico que se obtienen son:

$$Q_0 = [Q_Y - Q_X] F_Y + Q_X \quad (17)$$



Para poder obtener una ecuación en función de la concentración absoluta de X o de Y, despejamos  $F_X$  y  $F_Y$  de las ecuaciones 16 y 17 respectivamente.

$$F_Y = \frac{Q_0 - Q_X}{Q_Y - Q_X} \quad (18)$$

$$F_X = \frac{Q_0 - Q_Y}{Q_X - Q_Y} \quad (19)$$

Expresando las ecuaciones en concentraciones en lugar de fracciones obtenemos:

$$\frac{C_Y}{C_T} = \frac{Q_0 - Q_X}{Q_Y - Q_X} \quad (20)$$

$$\frac{C_X}{C_T} = \frac{Q_0 - Q_Y}{Q_X - Q_Y} \quad (21)$$

Despejamos  $C_T$  de la ecuación 8 la sustituimos en la 20 y 21, ordenamos términos y obtenemos las siguientes ecuaciones:

$$C_Y = \left[ \frac{Q_O - Q_X}{Q_Y - Q_X} \right] \left[ \frac{AT_{IS}}{K_{IS}} \right] \quad (22)$$

$$C_X = \left[ \frac{Q_O - Q_Y}{Q_X - Q_Y} \right] \left[ \frac{AT_{IS}}{K_{IS}} \right] \quad (23)$$

A partir de estas ecuaciones se puede estimar la concentración del compuesto (x) o del compuesto (y) en una mezcla de ambos componentes, observe que  $Q_Y$ ,  $Q_X$  y  $K_{IS}$  son valores constantes, y solo se sustituyen los valores de  $Q_O$  y de  $AT_{IS}$  para obtener la concentración del analito deseado.<sup>(8,9)</sup>

### 1.3. CARACTERÍSTICAS DE TRIMETROPIM Y SULFAMETOXAZOL.

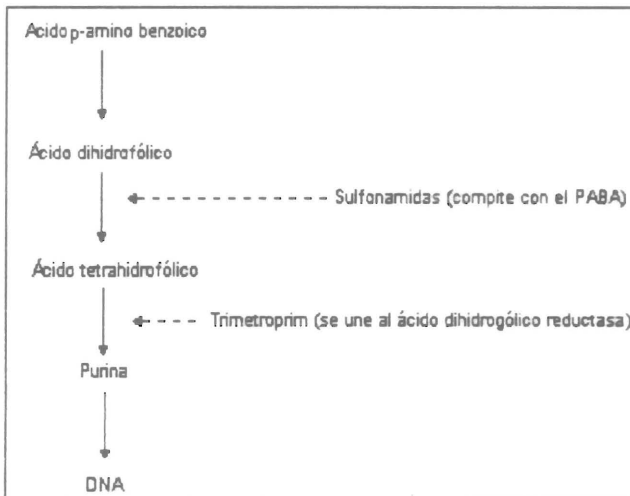
#### 1.3.1. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS.

Las sulfonamidas se hallan entre los agentes antimicrobianos más extensamente usados en el mundo actual, principalmente a causa de su bajo costo y su relativa eficacia en algunas enfermedades bacterianas comunes. La acción sinérgica de la sulfonamida con el Trimetoprim ha provocado un enorme resurgimiento en el uso de la sulfonamida.<sup>(10)</sup>

La introducción del Trimetoprim en combinación con el sulfametoxazol constituyó un progreso importante en la obtención de antimicrobianos clínicamente eficaces y represento la aplicación práctica de una consideración teórica, es decir, si dos fármacos actúan en fases seriadas en la vía de una reacción enzimática obligada en bacterias el resultado de la combinación sería la sinergia<sup>(11)</sup>

### 1.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN.

La actividad antimicrobiana de la combinación de Trimetoprim-sulfametoxazol es consecuencia de su acción en dos fases de la vía enzimática en la síntesis del ácido tetrahidrofólico.



**Figura 1.2.** Mecanismo de acción del Trimetoprim y el sulfametoxazol

Las sulfonamidas son análogas estructurales del ácido p-amino benzoico (PABA). La acción de las sulfonamidas es bacteriostática y reversible. El modo de acción de las sulfonamidas es un buen ejemplo de inhibición competitiva. 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. Las sulfonamidas pueden entrar en la reacción en lugar del PABA, competir por la enzima involucrada y formar análogos no funcionales del ácido fólico.

El Trimetoprim, una trimetoxibencilpirimidina, inhibe a la reductasa del ácido dihidrofólico de las bacterias con una efectividad aproximadamente 50,000 veces mayor a la misma enzima en las células animales. Las reductasas del ácido dihidrofólico son enzimas que transforman el ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico, un paso que lleva a la síntesis de purina y por último a la de DNA. El Trimetoprim administrado junto con las sulfonamidas, producen un bloqueo en esta vía metabólica, lo que provoca un notable aumento (sinergismo) de la actividad de las sulfonamidas (Fig.1.2). Como resultado de esto, el crecimiento del microorganismo es impedido.

Esta combinación se distribuye comercialmente en una proporción de 1:5, por medio de tabletas o ampollitas de 5ml que contienen 80 mg. de Trimetoprim y 400 mg. de sulfametoxazol o el doble de la cantidad de cada medicamento. De este modo, se administra una parte de Trimetoprim por 5 de sulfametoxazol, para que alcance aproximadamente una concentración "in vivo" de sulfametoxazol 20 veces mayor que el Trimetoprim. Esta proporción "in vivo" es la más eficaz para el mayor número de microorganismos.<sup>(10, 11)</sup>

### 1.3.3. APLICACIONES TERAPÉUTICAS.

**Infecciones de vías urinarias.** La combinación de Trimetoprim-sulfametoxazol se utiliza en el tratamiento de infecciones crónicas y recurrentes de las vías urinarias superiores e inferiores. También puede ser eficaz contra la prostatitis bacteriana.

**Infecciones bacterianas de vías respiratorias.** El Trimetoprim-sulfametoxazol es eficaz en exacerbaciones agudas de bronquitis crónica, otitis media aguda en niños y sinusitis maxilar superior a aguda en adultos, causadas por *H. Influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*.

**Infecciones de tubo digestivo.** Puede administrarse Trimetoprim-sulfametoxazol para combatir la Shigelosis. También es un fármaco de segunda elección contra la tifoidea.

**Infecciones diversas.** La combinación de altas dosis de Trimetoprim (20mg/Kg. de peso/día) y sulfametoxazol (100mg/Kg. de peso/día) es eficaz contra la infección grave por pneumocystis Canii. También se considera que puede ser un sustitutivo eficaz en el tratamiento de brucelosis. <sup>(10,11)</sup>

### 1.3.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL TRIMETOPRIM. <sup>(12,13,14)</sup>

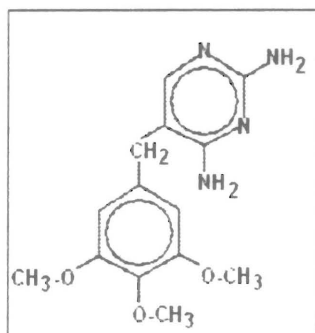
**Fórmula condensada:**



**Peso molecular:**

290.3 g/mol

**Estructura química:**



**Descripción:**

Cristales inodoros o polvo cristalino de color blanco o crema

**Solubilidad:**

Muy ligeramente soluble en agua, soluble en alcohol bencílico. Poco soluble en cloroformo y en metanol, ligeramente soluble en etanol y acetona, prácticamente insoluble en éter y tetracloruro de carbono

**Rango de fusión:**

199-203°C.

**Naturaleza química y constante de disociación:**

Base, con un pKa de 7.2.

**Espectro ultravioleta:**

El Trimetoprim en solución acuosa ácida muestra un pico a 271 nm ( $\epsilon_1=218$ );  
En solución acuosa alcalina muestra un pico a 287 nm ( $\epsilon_1=250$ ) Fig. 1.3.

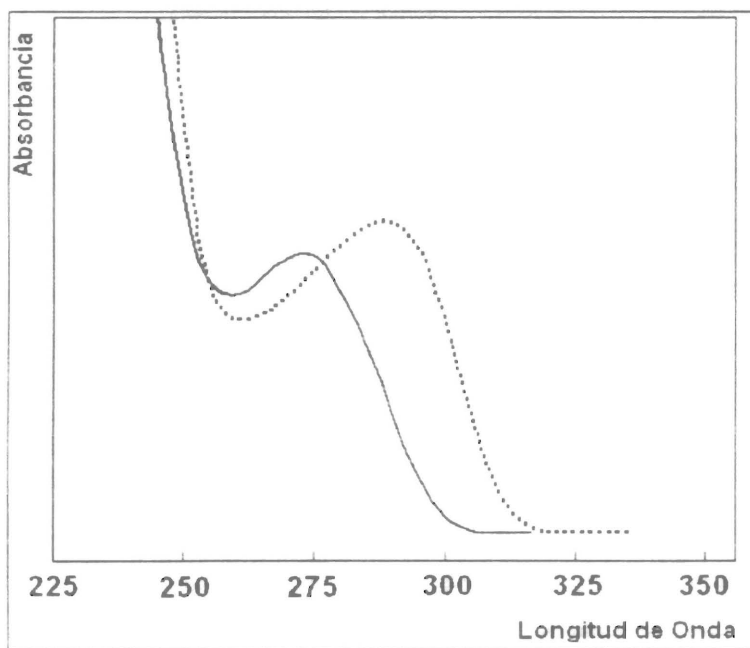


Figura 1.3. Espectro ultravioleta de TMP en solución ácida (—) en solución alcalina (- - - -)

### 1.3.5. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL SULFAMETOXAZOL.<sup>(12,13,14)</sup>

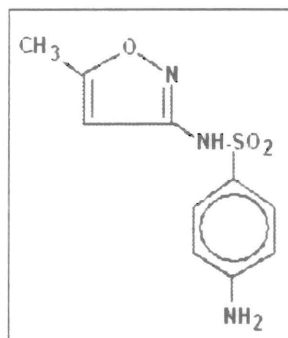
**Fórmula condensada:**



**Peso molecular:**

290.3 g/mol.

**Estructura química:**



**Descripción:**

Es un polvo cristalino, blanco o amarillo claro, inodoro

**Solubilidad:**

Fácilmente soluble en acetona y soluciones diluidas de hidróxidos, poco soluble en metanol, prácticamente insoluble en agua, éter y cloroformo.

**Rango de fusión:**

168-172<sup>0</sup>C.

**Naturaleza química y constante de disociación:**

Anfólito con pKas de 1.6 y 5.6 (25<sup>0</sup>C).



**Espectro ultravioleta:**

El Sulfametoxazol en solución acuosa ácida muestra un pico a 265 nm ( $\epsilon_i=175$ );  
En solución acuosa alcalina muestra un pico a 256 nm ( $\epsilon_i=673$ ) Fig 1 4

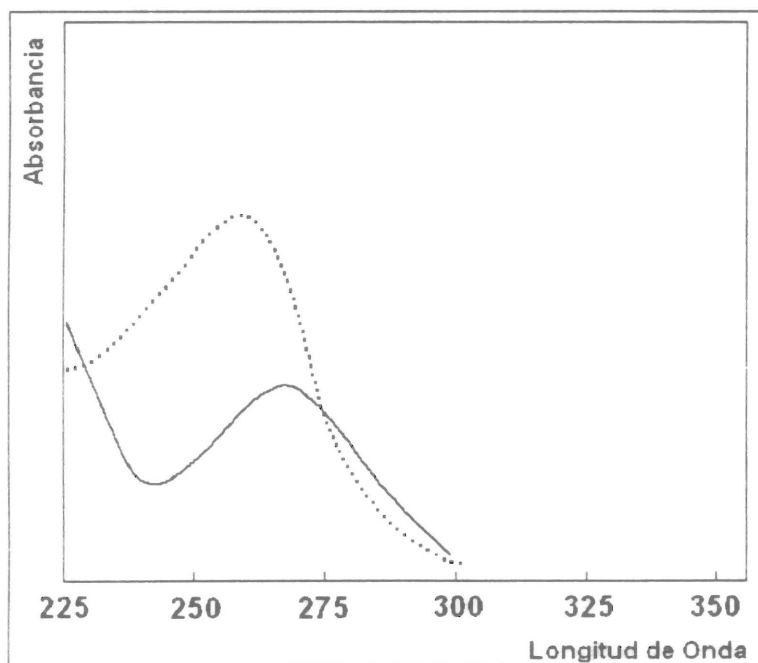


Figura 1.4. Espectro ultravioleta de SMX en solución ácida (—) en solución alcalina (- - - -)

#### 1.4. ESPECIFICACIONES PARA VALIDAR UN MÉTODO ANALÍTICO.

La ciencia farmacéutica es una disciplina dinámica, en que todos los días hay nuevas reglas para corregir los problemas del ayer. Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad.

La validación de métodos analíticos puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por medio de estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en todos los casos, en términos de propiedades analíticas, que proporcionan una medida del comportamiento del método analítico.

La evaluación de estas propiedades permite conocer exactamente la confiabilidad que puede proporcionar el método analítico, para ser usado en análisis de rutina. Las propiedades a determinar en la validación de un método analítico son: linealidad, precisión, exactitud, especificidad, repetibilidad, reproducibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y sensibilidad. <sup>(15,16,17,18)</sup>

##### 1.4.1. LINEALIDAD.

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

Para evaluar esta propiedad se considera el coeficiente de correlación ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), ordenada al origen ( $b$ ) y el coeficiente de variación global (C.V).<sup>(15,18)</sup>

Las curvas patrón que se elaboran para evaluar la linealidad deben de contener al menos seis niveles de concentración diferentes y el intervalo de concentraciones empleadas, debe de incluir a la concentración máxima esperada, así como el nivel más bajo el cual debe estar dentro del límite de cuantificación.<sup>(19)</sup>

#### 1.4.2. PRECISIÓN.

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor promedio y corresponde al grado de concordancia mutua entre los resultados analíticos individuales que se han obtenido dentro de una serie de mediciones efectuadas en una muestra homogénea bajo las mismas condiciones de análisis. La precisión mide el error aleatorio, o indeterminado, de un análisis y generalmente se expresa en términos de desviación estándar o coeficiente de variación.<sup>(15,20,21,22)</sup>

Para documentar la precisión del sistema y método se recomienda realizar la determinación de tres concentraciones, con seis ensayos cada una.<sup>(19)</sup>

#### 1.4.3. EXACTITUD.

La exactitud de un método analítico es el grado de concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del analito de interés, en general, se requiere que el valor medido no difiera significativamente con el valor de referencia.<sup>(15,20,21,22)</sup>

Para documentar la exactitud del sistema y método se recomienda realizar la determinación de tres concentraciones, con seis ensayos cada una <sup>(19)</sup>

#### **1.4.4. REPETIBILIDAD ENTRE DÍAS.**

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones de análisis (analista, instrumentos, laboratorio) pero diferente día <sup>(15,18)</sup>

#### **1.4.5. REPRODUCIBILIDAD.**

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones de análisis (diferentes analista, diferentes instrumentos, diferente laboratorio, etc ) <sup>(15,18)</sup>

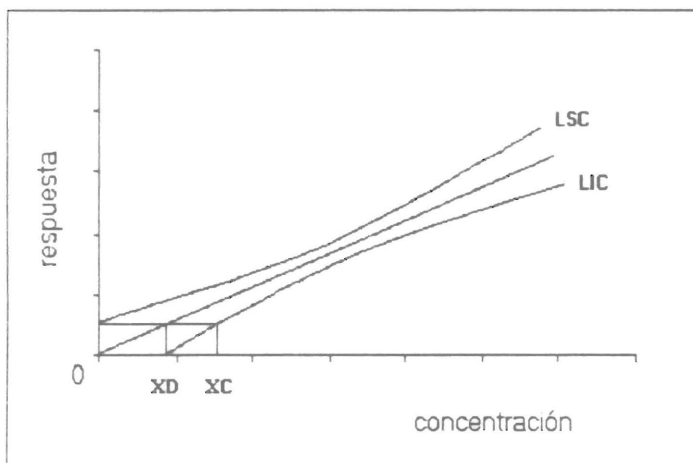
#### **1.4.6. LÍMITE DE DETECCIÓN.**

Es la cantidad mínima de un analito contenido en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de análisis establecidas. En otras palabras el límite de detección es la concentración más baja del analito en cuestión que se puede diferenciar realmente del nivel de ruido del instrumento de medición (ver figura 1.5). <sup>(19)</sup>

### 1.4.7. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Es la cantidad mínima de un analito contenido en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de análisis establecidas.<sup>(15,19)</sup>

En el siguiente grafico se muestra un ejemplo que ilustra la manera de determinar el limite de determinación y cuantificación:



**Figura 1.5.** Grafico representativo de la determinación del límite de detección (XD) y el límite de cuantificación (XC) con ayuda de los intervalos de confianza (LSC, LIC).

### 1.4.8. SENSITIVIDAD.

Es la magnitud de la concentración del analito contenido en una muestra que da una diferencia significativa en las respuestas analíticas o resultados analíticos, bajo condiciones de analisis establecidas.<sup>(19)</sup>

#### **1.4.9. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADAS.**

Es la propiedad de una muestra procesada de conservar la concentración del analito o analitos de interés, es decir, sin que el resultado analítico sufra diferencias significativas, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas

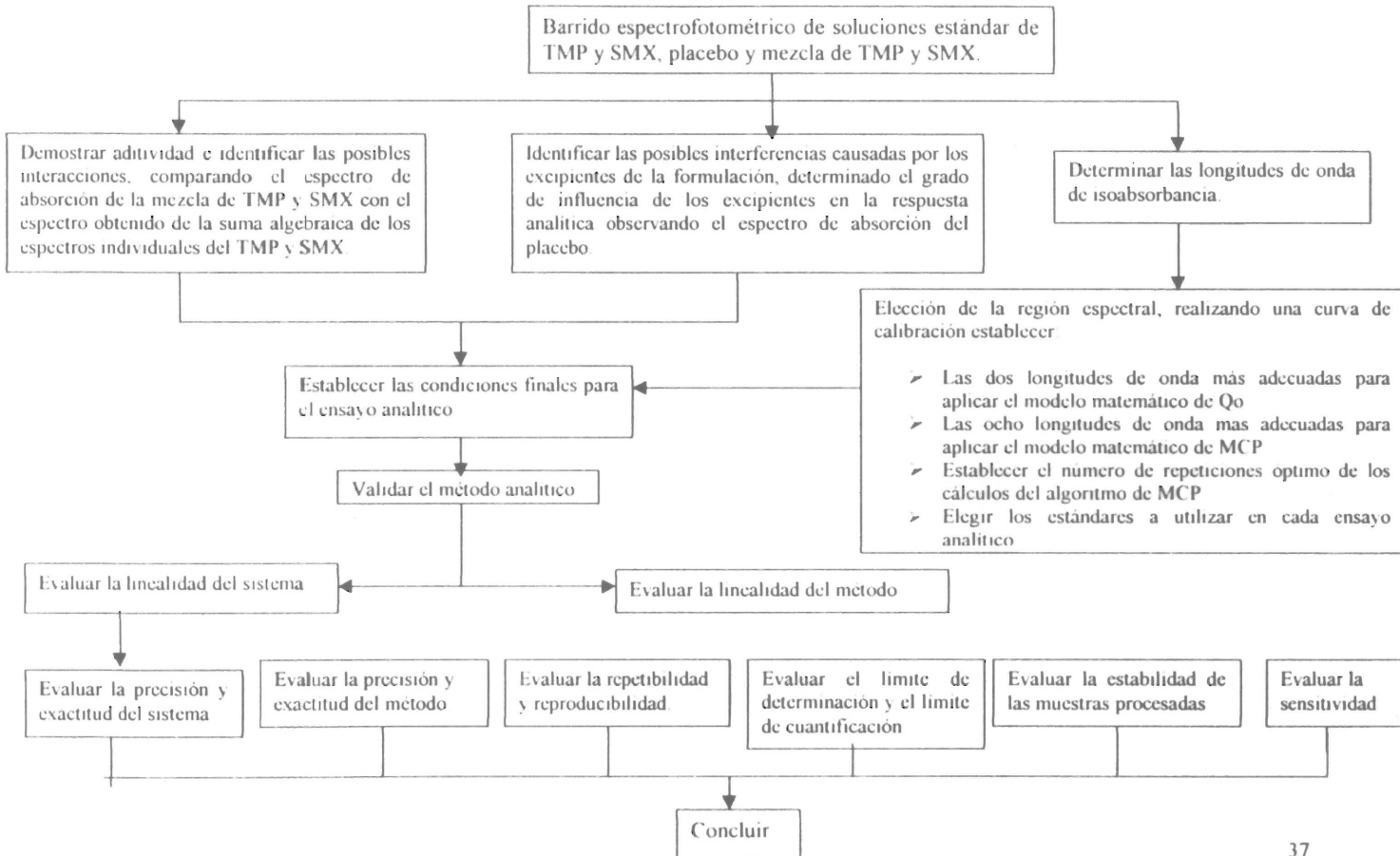
Se determina mediante la comparación de los resultados de análisis iniciales de muestras procesadas con los obtenidos de las mismas muestras procesadas después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones de almacenamiento tales como temperatura ambiente, refrigeración, congelación, protegidos de la luz, etc. durante un tiempo preestablecido por el analista. Se analizan bajo las mismas condiciones de análisis, se utiliza una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por el mismo analista.<sup>(15,18)</sup>

#### **1.4.10. ESPECIFICIDAD.**

Es la capacidad del método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes que estén presentes en la muestra. Sin embargo en los modelos matemáticos de calibración multivariada se habla de especificidad considerando al resultado analítico y no a la respuesta analítica, debido a que en los modelos matemáticos de calibración multivariada la respuesta analítica es debida a uno o más analitos de interés y por medio de una transformación matemática de dicha respuesta se obtiene el resultado analítico correspondiente para cada analito.<sup>(15,18,19)</sup>

**CAPÍTULO 2**  
**desarrollo DEL**  
**MÉTODO**

2.1. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA A SEGUIR.





## 2.2. EQUIPO, MATERIAL, REACTIVOS Y SOLUCIONES.

### EQUIPO:

Balanza marca OHAUS mod. AP250D-0 N<sub>o</sub> de serie 1115481240

Disolutor marca Elecsa, modelo DIE 25-250 rpm.

Espectrofotómetro marca Varian, modelo Cary 13. e.

Equipo MiliQ marca waters.

### MATERIAL:

Matraces volumétricos de 200, 100, 50 y 25 ml.

Pipetas volumétricas de 1,2,3,4,5,6,7,8 y 10 ml.

Papel filtro de la marca Whatman, malla # 41, diámetro de poro 110.

Vasos depresitados de 250 ml.

### REACTIVOS:

Ácido clorhídrico UNAM 35.88% peso específico 1.178 g/ml.

Metanol absoluto grado espectrofotométrico, marca merck.

Hidróxido de sodio grado reactivo, marca merck.

Agua purificada, con el equipo MiliQ.

### SOLUCIONES:

#### NaOH 0.1 N

Pesar 10.8 g de NaOH grado reactivo, disolver con 10 ml de agua hervida fría (agua libre de hidróxido de carbono), posteriormente filtrar a través de un papel filtro resistente. Transferir 5.5 ml del filtrado claro a un matraz volumétrico de 1000 ml llevar al aforo con agua libre de hidróxido de carbono.

HCL 0.1 N.

Pasar 8.5 ml de ácido clorhídrico concentrado a agua suficiente para hacer 1000 ml.

**ESTANDARES:**

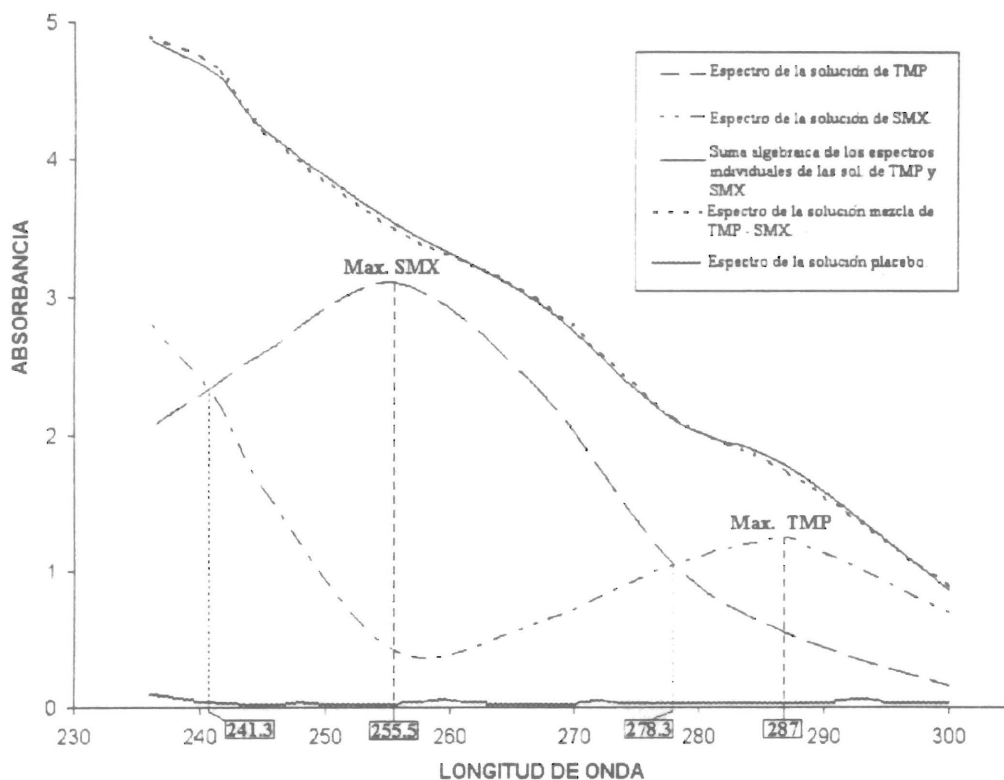
Estandar primario de Trimetoprim N<sup>o</sup> lote 200012031, proveedor Helm de México.

Estandar primario de Sulfametoxazol N<sup>o</sup> lote 17560900, proveedor Helm de México

**2.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS REALIZADOS PARA EL  
DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.**

Se determinó que el medio de trabajo adecuado para el análisis de TMP y SMX es el alcalino, debido a que en medio ácido se encuentran presentes dos especies de SMX y una de ellas precipita por lo tanto no se cuantifica en su totalidad.

Con el fin de establecer las condiciones espectrofotométricas adecuadas para poder aplicar los modelos matemáticos de MCP y Q<sub>0</sub> dentro de nuestro ensayo analítico se obtuvieron los espectros de absorción del TMP, SMX y mezcla de ambos cuyas concentraciones fueron de 25.25 y 25-25 µg/ml respectivamente en NaOH 0.1 N. Asimismo para identificar las posibles interferencias causadas por los excipientes de la formulación, se obtuvo el espectro de absorción de una solución de placebo (solución que contiene todos los componentes de la muestra analítica excepto los analitos de interés) <sup>(9)</sup>



**Figura 2.1.** Gráfico que muestra los espectros obtenidos de las soluciones de TMP, SMX y TMP-SMX, cuyas concentraciones fueron de 25,25 y 25-25  $\mu\text{g/ml}$ , así como de la solución placebo.

### 2.3.1. ADITIVIDAD, INTERFERENCIAS E INTERACCIONES.

Como se puede observar en la figura 2.1, los espectros de TMP y SMX al ser sumados presentan un espectro prácticamente igual al obtenido en la solución de la mezcla de TMP y SMX. Con esto se confirma que existe aditividad entre los espectros de TMP y SMX

Al demostrarse que existe aditividad entre el TMP y SMX, en toda la región del espectro U.V., también queda demostrado que no existe interacciones o interferencias entre ellos en dicha región del espectro ya que si hubiera existido interferencias o interacciones entre ellos el espectro de las mezclas de ambos analitos se hubiera deformado, es decir, hubiese sido diferente al que se obtuvo sumando los espectros del TMP y SMX.

Por otro lado podemos observar en la figura 2.1 que el espectro obtenido de la solución placebo se encuentra apenas arriba del cero relativo, por lo que se espera que su respuesta no sea significativa y no produzca interferencia en el análisis.

### 2.3.2. ELECCIÓN DE LA REGIÓN ESPECTRAL.

En base a los espectros se determinaron las longitudes de onda adecuadas para el análisis cuantitativo. Hay que recordar que en nuestro caso solo pueden elegirse 8 longitudes de onda debido a que el espectrofotómetro solo puede dar lectura de 8 longitudes de onda en una lectura. Por lo que se decidió utilizar las siguientes longitudes de onda:

- 287 nm longitud de onda en donde se encuentra el máximo del TMP
- 255.5 nm longitud de onda en donde se encuentra el máximo del SMX.
- 241.3, 278.3 nm longitudes de onda en los que se encuentran los puntos de isoabsorción
- 267, 245, 236 nm longitudes de onda en donde los espectros de absorción están separados claramente
- 300 nm longitud de onda en la cual se observa que no hay respuesta notable del SMX, por lo tanto la absorbancia obtenida será dada principalmente por el TMP

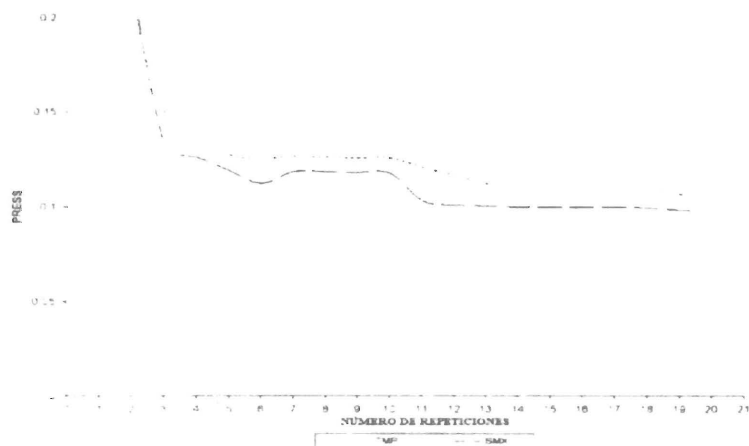
### **2.3.3. PUNTOS DE ISOABSORCIÓN.**

Como se observa en la figura 2.1 existen dos puntos en los que se cruzan los espectros de TMP y SMX (puntos de isoabsorción) los cuales son 241.3 y 278.3 nm. Al realizar una calibración pudimos establecer a través del análisis de suma de cuadrados que el punto de isoabsorción más adecuado para poder aplicar el modelo matemático de  $Q_0$  es la de 241.3 nm debido a que fue la longitud de onda en la que se observó menor variación en los resultados analíticos (concentración total).

Por otro lado a partir de dicha calibración también se estableció que la longitud de onda de 267 nm es la más adecuada para aplicar el modelo matemático de  $Q_0$ , debido a que es la longitud de onda que tuvo el menor coeficiente de variación en los resultados analíticos (concentración determinada) de entre las 6 longitudes de onda previamente seleccionadas

### **2.3.4. ELECCIÓN DEL NÚMERO DE REPETICIONES ÓPTIMO DE LOS CÁLCULOS DEL ALGORITMO DE MCP.**

Como se menciona en el capítulo 1, una parte importante en los modelos matemáticos de calibración multivariante es la elección del número de repeticiones óptimo de los cálculos del algoritmo de MCP. Para establecer el número de repeticiones que debemos utilizar en nuestro ensayo se construyó una calibración y se obtuvieron las absorbancias a las longitudes de onda previamente seleccionadas, se realizó el análisis de PRESS y se obtuvo el siguiente gráfico:



**Figura 2.2.** Grafico que muestra el análisis de PRESS del TMP y SMX, utilizando el modelo matemático de MCP

Como podemos observar, el menor valor de PRESS se presenta a partir de la repetición 11 en ambos analitos, sin embargo al realizar la predicción de muestras de placebo cargado (solución que contiene todos los componentes de la muestra analítica en concentraciones conocidas) no se obtiene una buena precisión ni exactitud, esto indica que al repetir 11 veces el calculo del algoritmo de MCP este comienza a modelar el ruido del sistema trayendo como consecuencia una mala predicción de muestras reales, esto se conoce como sobre ajuste (*overfitting*). Por este motivo se utilizaron 6 repeticiones en los calculos del algoritmo de MCP en la predicción de muestras de placebo cargado, observandose una buena precisión y exactitud, estableciéndose así que el número de repeticiones del calculo del algoritmo de MCP óptimo para este metodo es el de 6 repeticiones

### 2.3.5. ELECCIÓN DE ESTANDARES.

¿A cuantos de nosotros no nos a pasado que cuando realizamos una calibración de nuestro método este prediga muy bien las muestras analítica en los primeros dias despues de haber realizado la calibración y después de algunos días o semanas esta calibración sea inútil para poder obtener resultados analíticos confiables? En la práctica es muy comun que a consecuencia del uso continuo de los instrumentos analiticos estos sufran deterioros o pequeños desajustes que pueden ocasionar desviaciones en los resultados analiticos obtenidos, por ello hay que estar calibrando continuamente los instrumentos Sin embargo no siempre es posible o conveniente estar recalibrando los instrumentos continuamente y esto implica el estar realizando calibraciones de nuestro método a menudo para que los resultados analiticos sean confiables.

Con el fin de minimizar los posibles errores que pudieran presentarse entre cada ensayo debidos al instrumento analitico y que pudieran afectar a la predicción de las muestras analiticas se establecieron, a partir de una curva de calibración, 5 soluciones estándares (estándares externos) que se prepararán en cada ensayo con las muestras analiticas. Dichas soluciones fueron elegidas de tal modo que en ellas se represente la mayoría de las variaciones contenidas en una calibración para poder ser usadas en la predicción confiable de muestras analiticas en ensayos rutinarios. Para nuestro ensayo las soluciones que demostraron una buena capacidad predictiva son las siguientes

1. 4  $\mu\text{g/ml}$  de TMP y 18  $\mu\text{g/ml}$  de SMX.
2. 5  $\mu\text{g/ml}$  de TMP y 24  $\mu\text{g/ml}$  de SMX.
3. 6  $\mu\text{g/ml}$  de TMP y 28  $\mu\text{g/ml}$  de SMX.
4. 7  $\mu\text{g/ml}$  de TMP y 32  $\mu\text{g/ml}$  de SMX.
5. 8  $\mu\text{g/ml}$  de TMP y 36  $\mu\text{g/ml}$  de SMX.

#### 2.4. CONDICIONES FINALES PARA EL ANÁLISIS.

- Las muestras de análisis deben de estar en NaOH 0.1N
- Las muestras de análisis deben leerse a 300, 287, 278.3, 267, 255.5, 245, 241.5 y 236 nm en caso de utilizar el modelo matemático de MCP
- Las muestras de análisis deben leerse a 267 y 241.5 nm en caso de utilizar el modelo matemático de  $Q_0$
- El número de repeticiones que se realizarán al algoritmo de MCP, para determinar las concentraciones de muestras analíticas utilizando el modelo matemático de MCP, es de 6 repeticiones.
- En cada calibración debe de realizarse el método de dejar una muestra fuera de la calibración para poder identificar las posibles muestras desechables.
- En cada ensayo deben de prepararse 5 soluciones estándar con las concentraciones que se presentan en la tabla 2.3, esto con el fin de minimizar posibles errores provocados por los instrumentos utilizados dentro del ensayo.

#### 2.5. ENSAYO ANALÍTICO.

- 1 Con una pipeta volumétrica tomar 5 ml de la muestra analítica
- 2 Los 5 ml de la muestra analítica se hacen pasar a través de un papel filtro, recolectar el filtrado en un tubo de ensayo
- 3 Con una pipeta volumétrica tomar 2 ml del filtrado y verter este volumen en un matraz volumétrico de 25 ml
- 4 Llevar al aforo con una solución de NaOH 0.1 N



### 2.5.1. PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES.

1. Pesar 62,5 mg de estándar secundario de TMP en un papel encerado utilizando para ello una balanza analítica, verter el estándar en un matraz volumétrico de 50 ml y llevar al aforo con una solución de NaOH 0.1 N (solución A)
2. Pesar 62,5 mg de estándar secundario de SMX en un papel encerado utilizando para ello una balanza analítica, verter el estándar en un matraz volumétrico de 25 ml y llevar al aforo con una solución de NaOH 0.1 N (solución B)
3. Con una pipeta volumétrica tomar 5 ml de la solución A y verter la solución en un matraz volumétrico de 250 ml, llevar al aforo con una solución de NaOH 0.1 N (solución C).
4. Con una pipeta volumétrica tomar 4 ml de la solución B y verter la solución en un matraz volumétrico de 25 ml, llevar al aforo con una solución de NaOH 0.1 N (solución D).
5. Con una pipeta volumétrica tomar 6 ml de la solución B y verter la solución en un matraz volumétrico de 25 ml, llevar al aforo con una solución de NaOH 0.1 N (solución E).
6. Con una pipeta volumétrica tomar 4ml de la solución C y verter la solución en un matraz volumétrico de 25 ml, con otra pipeta volumétrica tomar 3 ml de la solución E y verter la solución en el mismo matraz de 25 ml, llevar al aforo con una solución de NaOH 0.1 N (solución estándar 1).
7. Con una pipeta volumétrica tomar 5 ml de la solución C y verter la solución en un matraz volumétrico de 25 ml, con otra pipeta volumétrica tomar 6ml de la solución D y verter la solución en el mismo matraz de 25 ml, llevar al aforo con una solución de NaOH 0.1 N (solución estándar 2)

### 2.5.2. LECTURA Y ESTIMACIÓN.

11. Calibrar el espectrofotómetro, con NaOH 0.1 N y leer cada solución a las siguientes longitudes de onda: 236, 240.5, 247, 256.5, 265, 272, 279.5 y 289 nm
  
12. A partir de las absorbancias obtenidas en los estándares y con ayuda de los modelos matemático de Mínimos Cuadrado Parciales y Razones de Absorbancia estimar la concentración (mg/ml) de TMP y SMX en cada una de las soluciones que se leyeron en el espectrofotómetro.

**CAPÍTULO 3**  
**VALIDACIÓN DEL**  
**MÉTODO**

### 3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

Los criterios especificados para que el método analítico sea confiable se muestran en la siguiente tabla

CARACTERÍSTICAS A EVALUAR	CRITERIO DE EVALUACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Linealidad del sistema.	Coficiente de variación. (C.V.)	C.V. $\leq$ 2%
	Coficiente de determinación. ( $r^2$ )	$r^2 \geq 0.999$
	Coficiente de correlación. (r)	$r \geq 0.999$
	Intercepto (b)	$b = 0$
Precisión del sistema.	C.V.	C.V. $\leq$ 2%
Exactitud del sistema.	Prueba de t de Student.	t cal. < t crítica ( $\alpha = 0.05, 5$ gl)
Linealidad del método.	Coficiente de variación. (C.V.)	C.V. $\leq$ 2%
	Coficiente de determinación. ( $r^2$ )	$r^2 \geq 0.999$
	Coficiente de correlación. (r)	$r \geq 0.999$
	Intercepto (b)	$b = 0$
Precisión del método.	C.V.	C.V. $\leq$ 2%
Exactitud del método.	Prueba de t de Student.	t cal. < t crítica ( $\alpha = 0.05, 5$ gl)
Reproducibilidad y repetibilidad del método.	Modelo factorial jerárquico.	Analista: F cal. < f crítica ( $\alpha = 0.05, 5$ gl) Día: F cal. < f crítica ( $\alpha = 0.05, 5$ gl)

Tabla 3.1. Especificaciones para la validación del método analítico.

### 3.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA.

#### 3.1.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

La linealidad del sistema se determinó construyendo una calibración con 19 mezclas de TMP y SMX en concentraciones conocidas, preparadas por dilución a partir de una solución patrón de TMP y otra de SMX

Las soluciones de la calibración fueron preparadas por duplicado. En las tablas 3.1.1 y 3.1.2 (ver anexo Pág. 73 y 74) se muestran las concentraciones reales (concentración calculada en base al peso del estándar y a las diluciones realizadas en su preparación) de SMX y TMP con sus respectivas respuestas analíticas (concentraciones estimadas) obtenidas con los modelos matemáticos de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP) y Razones de Absorbancia ( $Q_0$ ) respectivamente.

También se determinó el modelo que explica la variación de la concentración en función de la respuesta analítica por medio de un análisis de regresión. En las figuras 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 y 3.1.4 se muestra la relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica de cada analito utilizando los modelos matemáticos de MCP y  $Q_0$ .

Los parámetros estadísticos estimados para dicha calibración son los siguientes:

Parámetro estadístico	Modelo matemático de MCP		Modelo matemático de $Q_0$	
	TMP	SMX	TMP	SMX
Coefficiente de correlación ( $r$ )	0.99940706	0.99997797	0.99852699	0.99996067
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.99881447	0.99995594	0.99705614	0.99992134
Intercepto ( $b$ )	0.0066369	0.00112877	-0.0946352	0.07793875
Pendiente ( $m$ )	0.99882046	0.99995565	1.01874223	0.99642741
C.V. (%)	0.94528445	0.22822185	1.69444233	0.3748519

Tabla 3.1.3. Parámetros estadísticos estimados para la linealidad del sistema

De acuerdo a los datos de regresión obtenidos observamos que el 99.8% y 99.7% de la variación de la respuesta analítica está explicada por los cambios en la concentración de TMP, utilizando los modelos matemáticos de MCP y Qo respectivamente. En el caso del SMX observamos que el 99.9% de la variación de la respuesta analítica está explicada por los cambios en la concentración de SMX, utilizando ambos modelos matemáticos.

También se estableció una hipótesis para determinar, mediante un análisis de variancia (ver tablas 3.1.4, 3.1.5, 3.1.6, y 3.1.7), si la relación existente entre la concentración real y la concentración estimada es lineal.

**Hipótesis:**

**Ho:** No existe una relación lineal entre la concentración real del analito de interés y la concentración estimada, con el modelo matemático de cuantificación empleado.

**Ha:** Existe una relación lineal entre la concentración real del analito de interés y la concentración estimada, con el modelo matemático de cuantificación empleado.

**Criterio de aceptación:** si  $f_{cal} \geq f_{critica}$  se rechaza  $H_0$ , y por lo tanto existe relación lineal entre la concentración real del analito de interés y la concentración estimada, con el modelo matemático de cuantificación empleado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	2669.66979	2669.66979	457602.804	4.10
Residuos	36	0.21002518	0.00583403		
Total	37	2669.87982			

**Tabla 3.1.7** Análisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de SMX y la concentración estimada de SMX, utilizando el modelo matemático de  $Q_0$

De acuerdo a la hipótesis establecida y a los resultados obtenidos en los análisis de variancia se determinó que existe evidencia estadística, con un 95% de confianza, de que hay relación lineal entre la concentración reales de TMP y SMX con sus respectivas concentraciones estimadas, utilizando los modelos matemáticos de MCP y  $Q_0$ .

Por otro lado se puede observar que existen diferentes valores de intercepto por lo que se evaluó si estos valores son significativamente diferentes a cero. Para ello se estableció una hipótesis para ser evaluada por medio de la prueba de  $t$  de student

**Hipótesis:**

**H<sub>0</sub>:** La ordenada al origen es igual a cero

**H<sub>a</sub>:** La ordenada al origen no es igual a cero

**Criterio de aceptación:** si  $t_{cal} \leq t_{critica}$  no se rechaza  $H_0$ , y por lo tanto la ordenada al origen es igual a cero

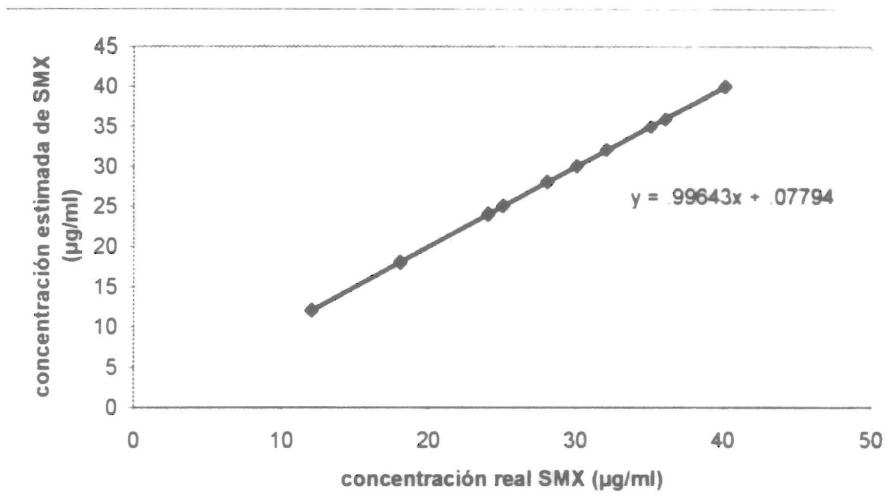


Figura 3.1.2. Representación grafica que muestra la relación lineal entre la concentración real de SMX y la concentración estimada de SMX, utilizando el modelo matemático de MCP

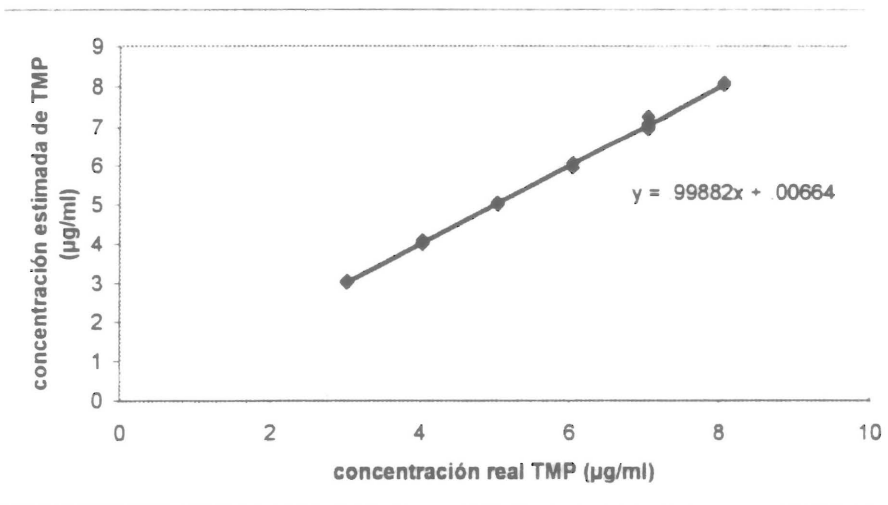
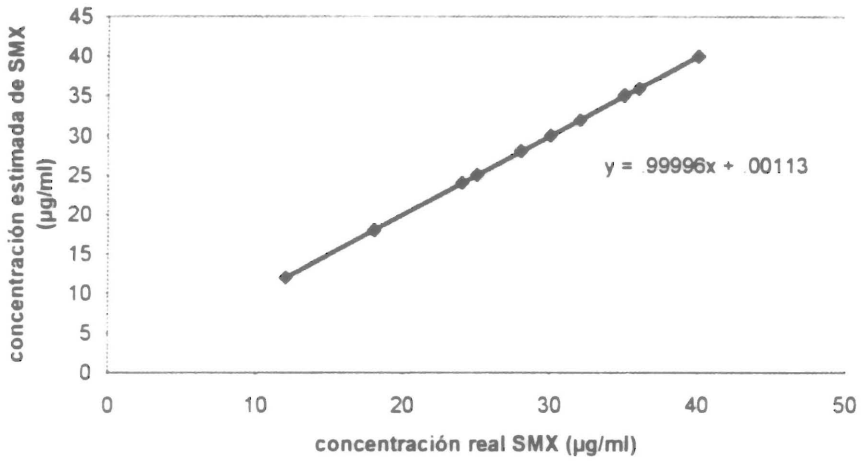


Figura 3.1.3. Representación grafica que muestra la relación lineal entre la concentración real de TMP y la concentración estimada de TMP, utilizando el modelo matemático de Qo





**Figura 3.1.4.** Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la concentración real de SMX y la concentración estimada de SMX, utilizando el modelo matemático de Qo

### 3.1.2. PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL SISTEMA.

La precisión y exactitud del sistema se determinó con el análisis por sextuplicado de tres soluciones que contenían TMP y SMX a diferentes concentraciones.

La tabla 3 1 9 muestra las concentraciones utilizadas de TMP y SMX en cada solución así como sus respectivos porcentajes determinados, obtenidos con los modelos matemáticos de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP) y Razones de Absorbancia (Qo)

Concentraciones		Modelo matemático de MCP		Modelo matemático de Qo	
TMP (µg/ml)	SMX (µg/ml)	Porcentaje Determinado de TMP	Porcentaje Determinado de SMX	Porcentaje Determinado de TMP	Porcentaje Determinado de SMX
4.06848	20.592	100.494534	100.488539	97.2878596	100.644937
		101.733325	100.2331	98.7979655	100.533728
		99.9070906	100.631313	97.8595456	101.024489
		101.052482	99.6634615	98.1547512	100.119058
		102.500197	100.583236	100.232045	100.900492
		101.403964	100.553127	98.9387184	100.880221
6.10272	25.74	99.1934744	100.005828	99.9059866	99.9521685
		99.7260238	99.6674437	99.8117603	99.7381073
		101.154895	99.993784	99.7134647	100.131774
		99.9062713	100.084693	99.7626371	99.9309951
		99.9947564	100.247475	99.8086446	100.203769
		100.235633	100.346931	100.383145	100.12272
7.11984	37.0656	99.1735769	99.4442286	100.751607	99.1892203
		100.517708	99.3338837	100.996919	99.7911279
		99.9151666	99.5988194	101.28342	99.0033305
		100.382874	99.6624903	99.6026419	99.3316592
		99.4418414	99.3856838	100.792145	99.527837
		98.8617722	99.8737374	100.583932	99.5754737

**Tabla 3.1.9** Resultados obtenidos para determinar la precisión y exactitud del sistema.

Los parámetros estadísticos calculados para determinar la precisión del sistema, en ambos modelos matemáticos de cuantificación, fueron la desviación estándar, el promedio y el coeficiente de desviación (ver tablas 3.10 y 3.11).

Concentraciones de TMP (µg/ml)	Modelo matemático de MCP			Modelo matemático de Qo		
	Promedio (%)	Desviación estándar	C.V. (%)	Promedio (%)	Desviación estándar	C.V. (%)
4.06848	101.182	0.91772	0.907	98.5451475	1.02641807	1.0415714
6.10272	100.0352	0.65069	0.65046	99.8976063	0.24626252	0.24651494
7.11984	99.7154	0.66749	0.66939	100.668444	0.57469745	0.57088143

**Tabla 3.1.10** Parámetros estadísticos determinados para evaluar la precisión del sistema para el TMP

Concentraciones de SMX (µg/ml)	Modelo matemático de MCP			Modelo matemático de Qo		
	Promedio (%)	Desviación estándar	C.V. (%)	Promedio (%)	Desviación estándar	C.V. (%)
20.592	100.3587	0.3684	0.36708	100.683821	0.3300214	0.32777997
25.74	100.0577	0.23638	0.23624	100.013256	0.17235401	0.17233116
37.0656	99.5498	0.20235	0.20327	99.4031081	0.28513211	0.28684426

**Tabla 3.1.11** Parámetros estadísticos determinados para evaluar la precisión del sistema para el SMX.

Se puede observar en las tablas 3.10 y 3.11 que el C.V. determinado para el TMP y SMX, utilizando los modelos matemáticos de MCP y Qo, son menores al establecido como criterio de aceptación para métodos espectrofotométricos ( $C.V. \leq 2$ ) por lo tanto el sistema es preciso.

Para poder demostrar que el sistema es exacto se realizó una prueba de t de student estableciéndose las siguientes hipótesis

**Hipótesis:**

**H<sub>0</sub>:** El sistema es exacto

**H<sub>a</sub>:** El sistema no es exacto

**Criterio de aceptación:** si  $t_{cal} \leq t_{critica}$  no se rechaza H<sub>0</sub>. y por lo tanto el sistema es exacto.

Concentraciones de TMP (µg/ml)	Modelo matemático de MCP				Modelo matemático de Qo			
	t cal	t crítica (α=0.05)	LIC al 95%	LSC al 95%	t cal	t crítica (α=0.05)	LIC al 95%	LSC al 95%
4.06848	1.287	2.571	98.82	103.54	-1.417	2.571	95.90	101.18
6.10272	0.054		98.36	101.70	-0.415		99.26	100.53
7.11984	-0.426		97.99	101.43	1.163		99.19	102.14

**Tabla 3.1.12** Resultados obtenidos para determinar la exactitud del sistema para el TMP

Concentraciones de SMX (µg/ml)	Modelo matemático de MCP				Modelo matemático de Qo			
	t cal	t crítica (α=0.05)	LIC al 95%	LSC al 95%	t cal	t crítica (α=0.05)	LIC al 95%	LSC al 95%
20.592	0.973	2.571	99.41	101.30	2.072	2.571	99.83	101.53
25.74	0.244		99.44	100.66	0.076		99.57	100.45
37.0656	-2.224		99.02	100.07	-2.093		98.67	100.13

**Tabla 3.1.13** Resultados obtenidos para determinar la exactitud del sistema para el SMX

Basados en los intervalos de confianza mostrados en las tablas 3.12 y 3.13 y debido a que no se rechaza  $H_0$ , por que la  $t$  calculada es menor a la  $t$  crítica, podemos establecer con un nivel de confianza del 95% que el sistema es exacto, en los tres niveles de concentraciones y con los dos modelos matemáticos de cuantificación empleados.

## **3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO**

### **3.2.1. LINEALIDAD DEL MÉTODO.**

Para determinar la linealidad del método se construyó una calibración de 17 muestras de placebos cargados que contenían TMP y SMX.

En las tablas 3.2.1 y 3.2.2 (ver anexo Pág. 75 y 76) se muestran las concentraciones utilizadas de SMX y TMP en cada placebo cargado, así como sus respectivas concentraciones estimadas, obtenidas con los modelos matemáticos de MCP y  $Q_0$  respectivamente.

Por otro lado se determinó el modelo que explica la variación de la concentración determinada en función de la concentración adicionada por medio de un análisis de regresión lineal. En las figuras 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 y 3.2.4 se observa la relación lineal entre la concentración estimada y la concentración adicionada de cada analito, con cada uno de los modelo matemático utilizados.

Los parámetros estadísticos evaluados para la curva de calibración del método son los siguientes:

Parámetro estadístico	Modelo matemático de MCP		Modelo matemático de Qo	
	TMP	SMX	TMP	SMX
Coefficiente de correlación (r)	0.99914363	0.99961445	0.99788271	0.99944112
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.99828799	0.99922905	0.99576991	0.99888254
Intercepto (b)	0.00947815	0.01866566	0.0087685	0.01581027
Pendiente (m)	0.99829291	0.99922933	0.99819561	0.9993988
C V. (%)	1.13640637	0.93554806	1.90191667	1.07151728

Tabla 3.2.3. Parámetros estadísticos estimados para la linealidad del método.

De acuerdo a los datos de regresión obtenidos con el modelo matemático MCP podemos observar que el 99.8 % de la variación de la concentración estimada de TMP es debida a los cambios de la concentración real de TMP, también podemos observar que el 99.9% de la variación de la concentración estimada de SMX es debida a los cambios de la concentración real de SMX.

De acuerdo a los datos de regresión obtenidos con el modelo matemático Qo podemos observar que el 99.5 % de la variación de la concentración estimada de TMP es debida a los cambios de la concentración real de TMP, también podemos observar que el 99.8% de la variación de la concentración estimada de SMX es debida a los cambios de la concentración real de SMX.

También se estableció una hipótesis para determinar, mediante un análisis de variancia (ver tablas 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6, y 3.2.7), si la relación existente entre la concentración real y concentración estimada es lineal.

**Hipótesis:**

**Ho:** No una relación lineal entre la concentración real del analito de interés y la concentración estimada, con el modelo matemático de cuantificación empleado existe

**Ha:** Existe una relación lineal entre la concentración real del analito de interés y la concentración estimada, con el modelo matemático de cuantificación empleado

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	76.78634882	76.7863488	18659.4767	4.17
Residuos	32	0.131684463	0.00411514		
Total	33	76.91803328			

**Tabla 3.2.4.** Analisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de TMP y la concentración determinada de TMP, utilizando el modelo matemático de MCP

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	2095.730561	2095.73056	41475.4195	4.17
Residuos	32	1.616942727	0.05052946		
Total	33	2097.347503			

**Tabla 3.2.5** Analisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de SMX y la concentración determinada de SMX, utilizando el modelo matemático de MCP

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	76.7713822	76.7713822	7532.85031	4 17
Residuos	32	0.32612944	0.01019154		
Total	33	77.0975117			

**Tabla 3.2.6.** Análisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de TMP y la concentración determinada de TMP, utilizando el modelo matemático de Qo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	2096.44149	2096.44149	28604.4594	4 17
Residuos	32	2.34530311	0.07329072		
Total	33	2098.78679			

**Tabla 3.2.7.** Análisis de variancia para evaluar la relación entre la concentración real de SMX y la concentración determinada de SMX, utilizando el modelo matemático de Qo

De acuerdo a la hipótesis establecida y a los resultados obtenidos en los análisis de variancia se determinó que existe evidencia estadística, con un 95% de confianza, de que hay relación lineal entre la concentración real y la concentración estimada de TMP y SMX, utilizando ambos modelos matemáticos de MCP y Qo.

Por otro lado, se puede observar en la tabla 3.2.3 que los valores de la ordenada al origen de TMP y SMX con ambos modelos matemáticos, son distintos a cero, por lo que se realizó una prueba de t de student para determinar si es significativamente diferente de cero para esto se estableció la siguiente hipótesis:



**Hipótesis:**

**Ho:** La ordenada al origen es igual a cero

**Ha:** La ordenada al origen no es igual a cero

**Criterio de aceptación:** si  $t_{cal} < t_{critica}$  no se rechaza Ho, y por lo tanto la ordenada al origen es igual a cero.

Modelo matemático de cuantificación.	Curva de regresión	Intercepto (b)	Error típico	t cal	t crítica ( $\alpha=0.05$ )	LIC al 95%	LSC al 95%
MCP	TMP	0.00947815	0.042027901	0.22552051	2.042	-0.144355	0.16331222
	SMX	0.01866566	0.124953102	0.14938131		-0.497216	0.53454737
Qo	TMP	0.0087685	0.06614019	0.13257454	2.042	-0.171326	0.20063251
	SMX	0.01581027	0.15048708	0.10506064		-0.605491	0.63711163

**Tabla 3.2.8.** Pruebas del intercepto de las cuatro rectas de regresión obtenidas a partir de los datos de calibración del método

Analizando esta hipótesis y los intervalos de confianza de la tabla 3.2.8, podemos establecer que existe evidencia estadística para considerar que el valor de la ordenada al origen de cada una de las rectas de regresión se puede considerar como cero con una probabilidad del 95%

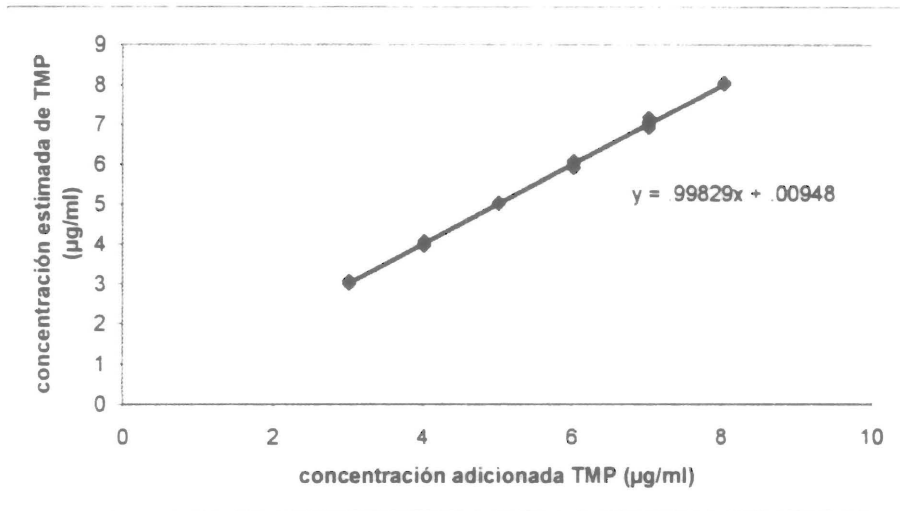


Figura 3.2.1. Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la concentración real de TMP y la concentración determinada de TMP, utilizando el modelo matemático de MCP

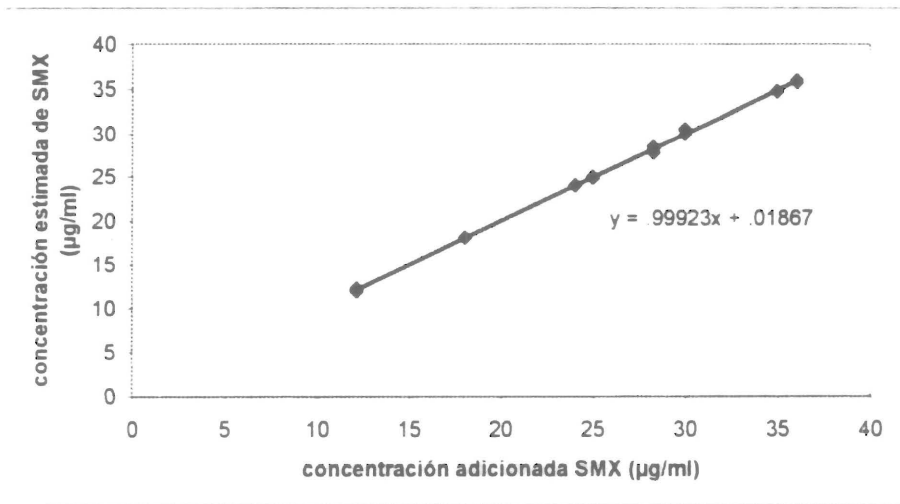
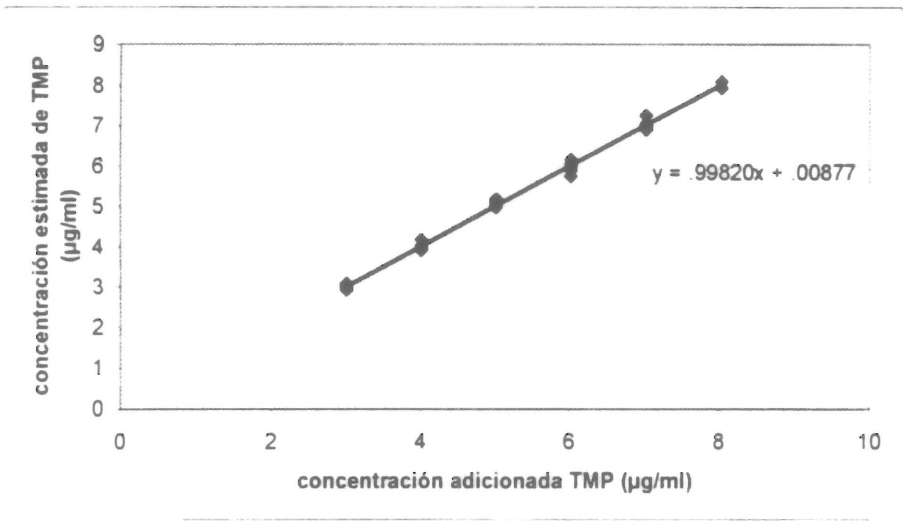
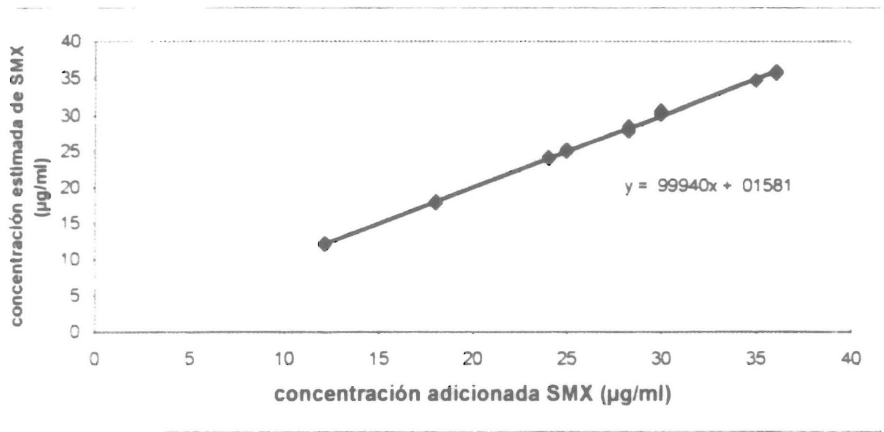


Figura 3.2.2. Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la concentración real de SMX y la concentración determinada de SMX, utilizando el modelo matemático de MCP



**Figura 3.2.3.** Representación grafica que muestra la relación lineal entre la concentración real de TMP y la concentración determinada de TMP, utilizando el modelo matemático de Qo



**Figura 3.2.4.** Representación grafica que muestra la relación lineal entre la concentración real de SMX y la concentración determinada de SMX, utilizando el modelo matemático de Qo

**3.2.2. PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO**

La precisión y exactitud del método se determinó mediante el análisis por sextuplicado de tres muestras de placebos cargados que contenían TMP y SMX en concentraciones conocidas. Estas soluciones fueron preparadas y analizadas por un mismo analista, en un mismo día y bajo las mismas condiciones de análisis

La tabla 3.2.9 muestra las concentraciones utilizadas de TMP y SMX en cada uno de los placebos cargados, así como su respectivos porcentajes determinados, obtenidos con los modelos matemáticos de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP) y Razones de Absorbancia (Qo).

Concentraciones		Modelo matemático de MCP		Modelo matemático de Qo	
TMP (µg/ml)	SMX (µg/ml)	Porcentaje Determinado de TMP	Porcentaje Determinado de SMX	Porcentaje Determinado de TMP	Porcentaje Determinado de SMX
3.8471	19.989	100.6578	99.6786	103.5591	101.0841
		100.5063	98.8809	99.8213	100.1698
		103.6688	100.5263	103.2370	101.3377
		104.0888	100.5541	103.5765	100.7480
		102.4827	98.7409	103.9334	101.3146
		100.5400	99.1488	100.0290	100.6341
5.7706	24.9854	99.7086	99.9266	99.3745	100.8549
		100.3382	99.1789	102.4781	100.4769
		100.7389	99.8639	102.3742	100.5009
		101.6932	98.8048	101.1590	100.0394
		100.0751	98.5967	102.1761	100.3208
		100.1179	98.8958	103.9102	100.6786
6.7324	35.8790	102.2891	100.5161	104.1317	100.8407
		99.4698	100.3367	100.7812	100.8515
		99.1498	100.5398	100.1527	100.2166
		100.9305	101.0351	102.6342	100.8184
		98.5816	100.8402	99.2628	100.3779
		98.5952	100.0956	101.0547	100.6765

**Tabla 3.2.9.** Resultados obtenidos para determinar la precisión y exactitud del método.

Los parámetros estadísticos estimados para determinar la precisión del método son los siguientes

Concentraciones de TMP (µg/ml)	Modelo matemático de MCP			Modelo matemático de Qo		
	Promedio (%)	Desviación estándar	C.V. (%)	Promedio (%)	Desviación estándar	C.V. (%)
3 8471	101.99079	1.645897	1.61377	102.359446	1.89951789	1.85573287
5 7706	100.445387	0.698856	0.695757	101.912061	1.52334152	1.49476078
6 7324	99.836056	1.47877	1.481198	101.336258	1.76560477	1.74232284

**Tabla 3.2.10.** Parámetros estadísticos determinados para evaluar la precisión del método para el TMP

Concentraciones de SMX (µg/ml)	Modelo matemático de MCP			Modelo matemático de Qo		
	Promedio (%)	Desviación estándar	C.V. (%)	Promedio (%)	Desviación estándar	C.V. (%)
19.989	99.588301	0.80404	0.807364	100.881417	0.45216262	0.44821201
24.9854	99.211142	0.562331	0.566802	100.478635	0.28281698	0.28146977
35.8790	100.560634	0.338261	0.336375	100.630322	0.27039463	0.26870094

**Tabla 3.2.11.** Parámetros estadísticos determinados para evaluar la precisión del método para el SMX.

Se puede observar en las tablas 3.2.10 y 3.2.11 que los valores de C.V. obtenidos para el TMP y SMX con los modelos matemáticos de MCP y Qo, son menores al especificado como criterio de aceptación para métodos espectrofotométricos ( $C.V. \leq 2$ ), por lo que se afirma que la dispersión de los datos es mínima y por lo tanto el método es preciso.

Con el fin de demostrar que el método es exacto se realizó una prueba de t de student estableciéndose las siguientes hipótesis:

**Hipótesis:**

**Ho:** El método es exacto

**Ha:** El método no es exacto

**Criterio de aceptación:** si  $t_{cal} < t_{critica}$  no se rechaza  $H_0$ , y por lo tanto el método es exacto.

Concentraciones de TMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	Modelo matemático de MCP				Modelo matemático de $Q_0$			
	t cal	t crítica ( $\alpha=0.05$ )	LIC al 95%	LSC al 95%	t cal	t crítica ( $\alpha=0.05$ )	LIC al 95%	LSC al 95%
3.8471	1.209	2.571	97.75	106.22	1.242	2.571	97.47	107.24
5.7706	0.637		98.64	102.24	1.255		97.99	105.82
6.7324	-0.110		96.03	103.63	0.756		96.79	105.87

Tabla 3.2.12. Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método para el TMP

Concentraciones de SMX ( $\mu\text{g/ml}$ )	Modelo matemático de MCP				Modelo matemático de $Q_0$			
	t cal	t crítica ( $\alpha=0.05$ )	LIC al 95%	LSC al 95%	t cal	t crítica ( $\alpha=0.05$ )	LIC al 95%	LSC al 95%
19.989	-0.512	2.571	97.52	101.65	1.949	2.571	99.71	102.04
24.9854	-1.402		97.76	100.65	1.692		99.75	101.20
35.8790	1.657		99.69	101.43	2.331		99.93	101.32

Tabla 3.2.13 Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método para el SMX

Analizando los intervalos de confianza que se muestran en las tablas 3.2.12 y 3.2.13 y debido a que en todos los casos  $H_0$  no se rechaza por que la  $t$  calculada es menor a la  $t$  crítica podemos establecer que el método es exacto, en los tres niveles de concentraciones y con los dos modelos matemáticos de cuantificación empleados, con un nivel de confianza del 95%.

**3.2.3. REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.**

La repetibilidad y reproducibilidad se determinó mediante el análisis de 3 muestras independientes de placebos cargados que contenían TMP y SMX. Cada placebo fue preparado por triplicado, analizados por dos diferentes analistas, en días diferentes y bajo las mismas condiciones de análisis.

En las tablas 3.2.14 y 3.2.15 se muestran las concentraciones utilizadas de SMX y TMP en cada placebo cargado, así como sus respectivos porcentajes determinados, obtenidos con los modelos matemáticos de MCP y Qo.

Concentraciones de TMP (µg/ml)	Modelo matemático de MCP				Modelo matemático de Qo			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2		ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	Porcentaje determinado de TMP		Porcentaje determinado de TMP		Porcentaje determinado de TMP		Porcentaje determinado de TMP	
	Día 1.....Día 2		Día 1.....Día 2		Día 1.....Día 2		Día 1.....Día 2	
4	102.1725	100.6578	102.2439	103.0868	100.0484	99.8213	98.9404	100.9352
	101.99	100.5063	101.0398	101.7794	100.4795	103.2370	99.3704	99.8596
	102.1325	100.5400	100.6121	100.7434	99.67761	100.0290	98.8510	99.3232
6	98.785	99.70862	99.2604	101.0566	101.4295	99.3745	99.4503	103.1229
	98.03	100.3382	99.3164	100.9448	102.6113	101.1590	98.8520	102.1109
	99.75	100.7389	100.7148	100.4893	99.7769	102.1761	99.8412	101.8200
7	99.8442	99.46988	100.2554	99.4934	99.7134	100.7812	99.6374	101.0603
	99.5028	99.14984	98.1578	100.9030	99.272	100.1527	99.5093	103.3405
	100.0142	100.9305	98.3323	100.1066	100.5502	99.262	101.8672	102.4053

**Tabla 3.2.14.** Resultados de porcentaje determinado de TMP para determinar la repetibilidad y reproducibilidad del método utilizando los modelos matemáticos de MCP y Qo



Concentraciones de SMX (µg/ml)	Modelo matemático de MCP				Modelo matemático de Qo			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2		ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	Porcentaje determinado de SMX Día 1.....Día 2		Porcentaje determinado de SMX Día 1.....Día 2		Porcentaje determinado de SMX Día 1.....Día 2		Porcentaje determinado de SMX Día 1.....Día 2	
20	99.0245	99.6786	100.4655	101.3998	99.6886	100.1698	101.0285	101.0327
	100.3445	98.8809	99.5874	101.0620	101.3775	101.3377	99.9245	100.7969
	100.3214	99.1488	99.4704	100.8774	101.5243	100.6341	99.8079	100.6434
25	100.3584	99.9266	99.9134	99.7878	99.6610	100.8549	100.2696	99.3442
	100.5020	99.1789	99.3010	100.5800	99.3333	100.0394	99.6369	100.309
	100.5744	99.8639	99.4855	99.9579	100.8298	100.3208	99.9440	99.7017
36	99.2288	100.3367	100.3925	100.6664	98.9906	100.8515	100.5709	99.7575
	99.9819	100.5398	100.6681	101.8421	99.9045	100.2166	100.4738	100.3406
	100.4280	101.0351	100.6891	101.2605	100.6341	100.3779	99.9646	100.4625

**Tabla 3.2.15.** Resultados de porcentaje determinado de SMX para determinar la repetibilidad y reproducibilidad del método utilizando los modelos matemáticos de MCP y Qo

Para determinar si existía diferencia significativa entre los resultados de los porcentajes determinados de TMP y SMX obtenidos con los modelos matemáticos de MCP y Qo, en días diferentes y con dos distintos analistas, se realizó un análisis de variancia anidado, o jerárquico, para cada nivel de concentración tomando en cuenta que el día está anidado en el analista, por lo que se establecieron las siguientes hipótesis

**Prueba de hipótesis para reproducibilidad entre analistas:**

**Ho:** No existe diferencia significativa entre los resultados analíticos obtenidos por dos distintos analistas

**Ha:** Existe diferencia significativa entre los resultados analíticos obtenidos por dos distintos analistas

**Criterio de aceptación:** si  $f_{cal} \leq f_{critica}$  no rechaza  $H_0$ , y por lo tanto el método es reproducible entre diferentes analistas.

**Prueba de hipótesis para repetibilidad entre días:**

**Ho:** No existe diferencia significativa entre los resultados analíticos obtenidos en dos días diferentes.

**Ha:** Existe diferencia significativa entre los resultados analíticos obtenidos en dos días diferentes.

**Criterio de aceptación:** si  $f_{cal} \leq f_{critica}$  no rechaza  $H_0$ , y por lo tanto el método es repetible entre diferentes días.

Primer nivel de concentración (4 µg/ml)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica (α=0.05)
Analista	1	0.18910827	0.18910827	0.09450939	18.51
Día	2	4.00189399	2.000947	3.79248645	4.46
Error	8	4.2208657	0.52760821		

Segundo nivel de concentración (6 µg/ml)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica (α=0.05)
Analista	1	1.63673163	1.63673163	0.70020148	18.51
Día	2	4.67503047	2.33751524	5.2458334	4.46
Error	8	3.5647571	0.44559464		

Tercer nivel de concentración (7 µg/ml)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica (α=0.05)
Analista	1	0.23043797	0.23043797	0.19535661	18.51
Día	2	2.35915194	1.17957597	1.67120798	4.46
Error	8	5.64657893	0.70582237		

**Tabla 3.2.16.** Analisis de variancia para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad del metodo a diferentes concentraciones de TMP utilizando el modelo matemático de MCP.

Primer nivel de concentración (4 µg/ml)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica (α=0.05)
Analista	1	3 01328368	3 01328368	2 12151807	18 51
Día	2	2.84068632	1 42034316	1 24076928	4 46
Error	8	9 15782287	1 14472786		

Segundo nivel de concentración (6 µg/ml)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica (α=0.05)
Analista	1	0 1474103	0.1474103	0 02194057	18 51
Día	2	13.4372326	6.71861631	5 65289195	4 46
Error	8	9.50821827	1 18852728		

Tercer nivel de concentración (7 µg/ml)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica (α=0.05)
Analista	1	5.44991164	5 44991164	1 92434929	18 51
Día	2	5 66416053	2 83208026	2 77997227	4 46
Error	8	8.14995257	1 01874407		

**Tabla 3.2.17.** Analisis de variancia para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad del metodo a diferentes concentraciones de TMP utilizando el modelo matemático de Qo

Primer nivel concentración (20 µg/ml)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica (α=0.05)
Analista	1	2 487825	2 487825	1 61450829	18 51
Día	2	3 08183614	1 54091807	5 59509519	4 46
Error	8	2 20324126	0 27540516		
Segundo nivel de concentración (25 µg/ml)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica (α=0.05)
Analista	1	0 15836989	0 15836989	0 21788445	18 51
Día	2	1 45370538	0 72685269	6 36550712	4 46
Error	8	0 91348912	0 11418614		
Tercer nivel de concentración (36 µg/ml)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica (α=0.05)
Analista	1	1 31231778	1 31231778	1 70361382	18 51
Día	2	1 54062824	0 77031412	3 5440458	4 46
Error	8	1 73883558	0 21735445		

**Tabla 3.2.18.** Analisis de variancia para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad del metodo a diferentes concentraciones de SMX utilizando el modelo matemático de MCP

Primer nivel de concentración (20 µg/ml)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica ( $\alpha=0.05$ )
Analista	1	0.18703908	0.18703908	0.71659357	18.51
Día	2	0.52202277	0.26101138	0.55578578	4.46
Error	8	3.75700701	0.46962588		

Segundo nivel de concentración (25 µg/ml)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica ( $\alpha=0.05$ )
Analista	1	0.28024006	0.28024006	1.54236729	18.51
Día	2	0.36338953	0.18169476	0.64410944	4.46
Error	8	2.2566943	0.28208679		

Tercer nivel de concentración (36 µg/ml)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica ( $\alpha=0.05$ )
Analista	1	0.02948091	0.02948091	0.09129131	18.51
Día	2	0.64586451	0.32293225	1.24799674	4.46
Error	8	2.07008396	0.25876049		

**Tabla 3.2.19.** Análisis de variancia para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad del método a diferentes concentraciones de SMX utilizando el modelo matemático de Qo.

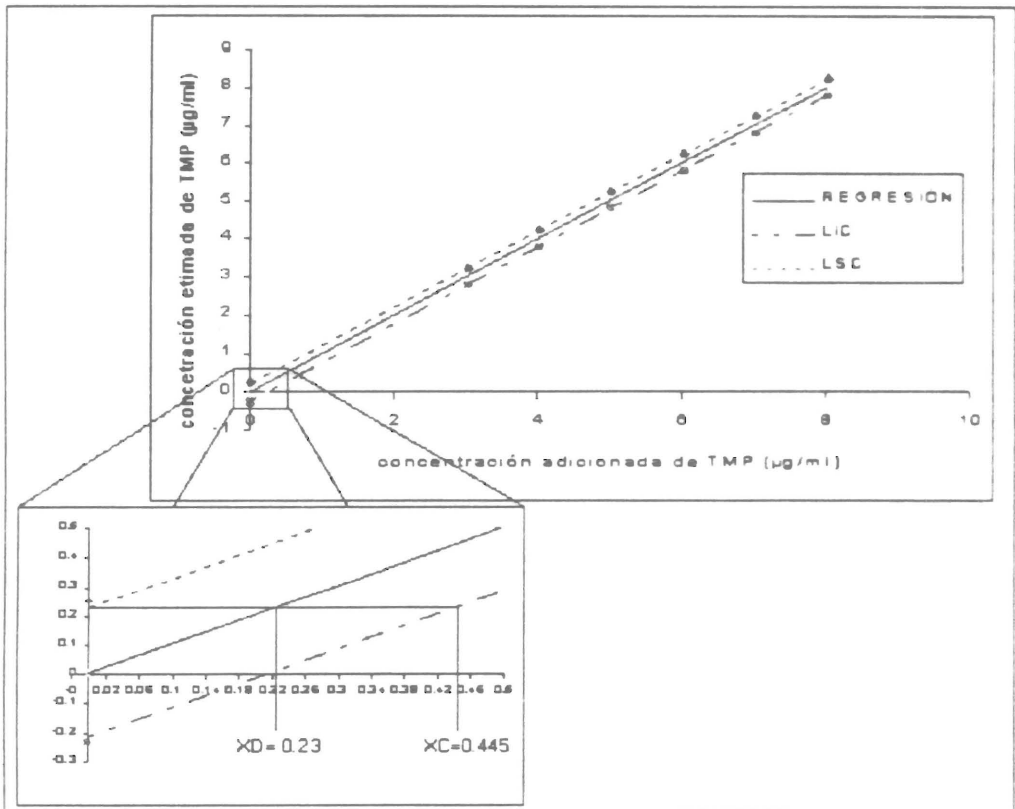


Figura 3.2.6. Gráfico de los intervalos de confianza de la concentración estimada de TMP en función de la concentración adicionada de TMP, utilizando el modelo matemático de  $Q_0$

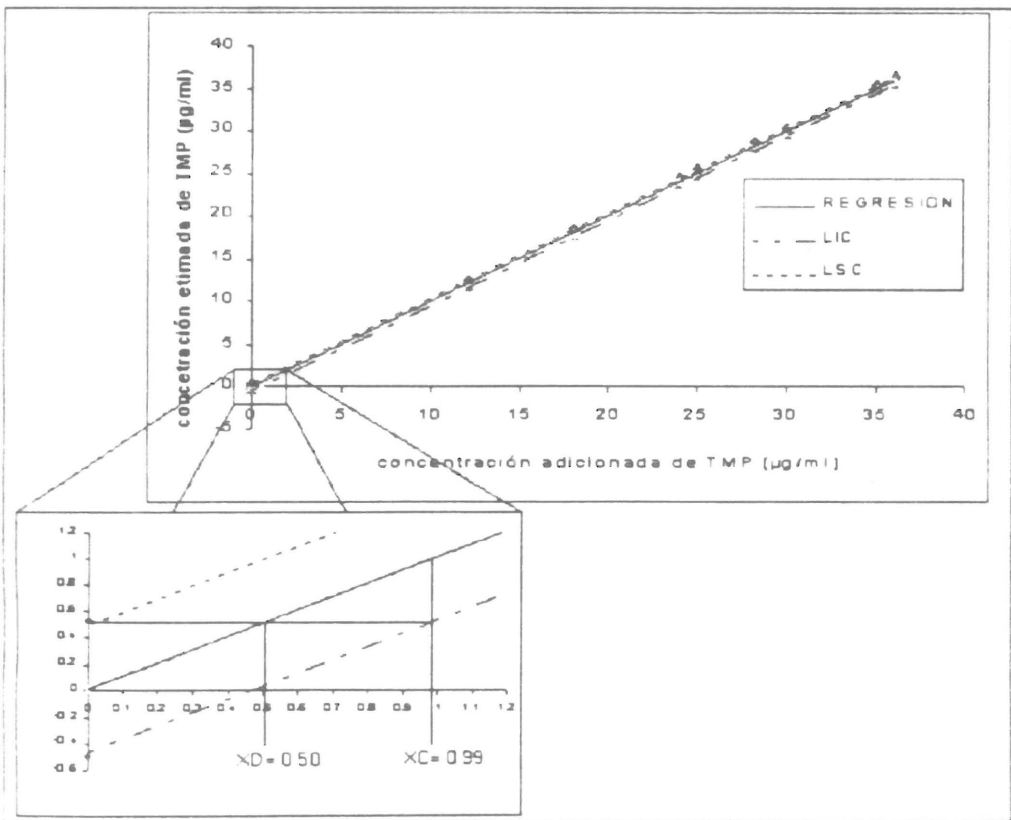


Figura 3.2.7. Gráfico de los intervalos de confianza de la concentración estimada de SMX en función de la concentración adicionada de SMX, utilizando el modelo matemático de MCP



	Modelo matemático de MCP		Modelo matemático de Qo	
	Valor Gráfico de XD	Valor Matemático de XD	Valor Gráfico de XD	Valor Matemático de XD
<b>TMP</b>	0.14	0.154	0.23	0.242
<b>SMX</b>	0.50	0.516	0.61	0.621

**Tabla 3.2.21.** Valores del límite de detección calculados gráficamente y matemáticamente.

En la tabla 3.2.21 podemos observar que los valores de límite de detección obtenidos gráficamente y matemáticamente son muy parecidos, por lo que podemos establecer que el límite de detección para el TMP es de 0.15  $\mu\text{g/ml}$ , utilizando el modelo matemático de MCP, y de 0.24  $\mu\text{g/ml}$ , utilizando el modelo matemático de Qo, y el límite de detección para el SMX es de 0.51  $\mu\text{g/ml}$ , utilizando el modelo matemático de MCP, y de 0.62  $\mu\text{g/ml}$ , utilizando el modelo matemático de Qo.

Por otro lado también se calculó matemáticamente el límite de cuantificación, obteniéndose los siguientes resultados:

	Modelo matemático de MCP		Modelo matemático de Qo	
	Valor Gráfico de XC	Valor Matemático de XC	Valor Gráfico de XC	Valor Matemático de XC
<b>TMP</b>	0.28	0.305	0.445	0.479
<b>SMX</b>	0.99	1.028	1.17	1.237

**Tabla 3.2.22.** Valores del límite de cuantificación calculados gráficamente y matemáticamente

Basados en que no existe una diferencia notable en los datos obtenidos en forma gráfica y en forma matemática, podemos establecer que el límite de cuantificación para el TMP es de 0.30  $\mu\text{g/ml}$ , utilizando el modelo matemático de MCP y de 0.48  $\mu\text{g/ml}$  utilizando el modelo matemático de Qo, y el límite de cuantificación para el SMX es de 1.028  $\mu\text{g/ml}$  utilizando el modelo matemático de MCP y de 1.23  $\mu\text{g/ml}$  utilizando el modelo matemático de Qo

En un análisis rutinario de un perfil de disolución de una tableta que contiene TMP y SMX, como principales componentes, es muy remota la posibilidad de que en los primeros 5 minutos (tiempo establecido por la FEUM en el que se toma la primera muestra) estos componentes se encuentren en concentraciones similares a las obtenidas como límite de cuantificación teóricos, por este motivo se considera que no tendría realmente sentido evaluar experimentalmente estos límites de cuantificación teóricos. Sin embargo se decidió evaluar un placebo cargado con características similares a una muestra real obtenida dentro de los primeros 5 minutos de una prueba de disolución de una tableta que contiene TMP y SMX

A partir de los datos de un perfil de disolución de una tableta que contenía TMP y SMX, obtenidos por cromatografía de líquidos de alta resolución, se determinó que las concentraciones aproximadas a las que se encuentran el TMP y SMX en los 5 primeros minutos de la disolución son de 2  $\mu\text{g/ml}$  y 10  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente

Ya establecidas las concentraciones a las que se encuentran dichos analitos en los primeros 5 minutos de la disolución. Se preparó por sextuplicado un placebo cargado a las mismas concentraciones establecidas, se estimó la concentración con ayuda de los dos modelos matemáticos de cuantificación y se determinó si este placebo podía ser estimado con precisión y exactitud

En la tabla 3.2.23 se muestran los porcentajes de determinación obtenidos con los modelos matemáticos de MCP y Qo, así como los parámetros estadísticos necesarios para evaluar experimentalmente el límite de cuantificación del método

Concentraciones		Modelo matemático de MCP		Modelo matemático de Qo	
TMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	SMX ( $\mu\text{g/ml}$ )	Porcentaje Determinado de TMP	Porcentaje Determinado de SMX	Porcentaje Determinado de TMP	Porcentaje Determinado de SMX
2 2017	9 865	99.353672	100.634012	96.989988	103.162931
		97.3313627	99.5893842	97.9143757	100.918084
		96.763697	99.4349609	97.2307663	101.212874
		98.2386142	99.8709796	98.964276	101.733787
		97.1985695	102.237289	97.3391199	103.71039
		97.0161055	100.320624	96.4505314	102.799165
Promedio (%)		97.6502	100.3486	97.4815096	102.256205
Desviación estándar		0.9739	1.02747	0.8687492	1.12992389
C.V. (%)		0.99733	1.0239	0.89119383	1.10499299

**Tabla 3.2.23.** Parámetros estadísticos para evaluar la precisión del límite de cuantificación utilizando los modelos matemáticos de MCP y Qo

Como se puede observar los valores de C.V. obtenidos son menores al especificado como criterio de aceptación para métodos espectrofotométricos ( $C.V. \leq 2$ ), por lo tanto podemos decir que una muestra que contiene 2  $\mu\text{g/ml}$  de TMP y 10  $\mu\text{g/ml}$  de SMX es determinado con precisión utilizando cualquiera de los dos modelos matemáticos de cuantificación (MCP y Qo).

Para poder establecer si la mezcla antes mencionada de los dos analito en cuestión puede ser determinada con exactitud se realizó una prueba de t de student estableciéndose la siguiente hipótesis

**Hipótesis:**

**Ho:** A partir de una mezcla de placebo cargado que contiene 2 µg/ml de TMP y 10 µg/ml de SMX, pueden ser determinadas con exactitud las concentraciones reales de dichos analitos

**Ha:** A partir de una mezcla de placebo cargado que contiene 2 µg/ml de TMP y 10 µg/ml de SMX, no pueden ser determinadas con exactitud las concentraciones reales de dichos analitos

**Criterio de aceptación:** si  $t_{cal} < t_{critica}$  no se rechaza Ho, y por lo tanto la determinación del placebo cargado a dichas concentraciones es exacta

ANALITO	Modelo matemático de MCP				Modelo matemático de Qo			
	t cal	t crítica ( $\alpha=0.05$ )	LIC al 95%	LSC al 95%	t cal	t crítica ( $\alpha=0.05$ )	LIC al 95%	LSC al 95%
TMP	-2.412	2.571	95.146	100.154	-2.898	2.571	95.247	99.715
SMX	0.339		97.706	102.990	1.996		99.351	105.161

**Tabla 3.2.24.** Parámetros estadísticos para determinar la exactitud del límite de cuantificación utilizando los modelos matemáticos de MCP y Qo

Como podemos observar en los resultados que nos muestra la tabla 3.2.24, en el caso de MCP, Ho no se rechaza en ninguno de los analitos debido a que las t calculadas son menores a las t críticas y el valor de 100% está dentro del intervalo de confianza de cada analito. Por lo que podemos establecer con un nivel de confianza del 95% que una mezcla que contiene 2 µg/ml de TMP y 10 µg/ml de SMX es determinada con exactitud utilizando el modelo matemático de MCP.

En el caso del modelo matemático de  $Q_0$  podemos observar, en los resultados mostrados en la tabla 3.2.24, que  $H_0$  no se rechaza en el caso de SMX debido a que la  $t$  calculada es menor a la  $t$  crítica y el valor de 100% está dentro del intervalo de confianza de este analito, también podemos observar que  $H_0$  si se rechaza debido a que la  $t$  calculada es mayor a la  $t$  crítica y el valor de 100% está fuera del intervalo de confianza de este analito. En base a estos resultados estadísticos podemos decir que una mezcla que contiene 2  $\mu\text{g/ml}$  de TMP y 10  $\mu\text{g/ml}$  de SMX no es determinada con exactitud utilizando el modelo matemático de  $Q_0$ . Sin embargo podemos observar en la tabla 3.2.23 que el promedio de los porcentajes determinados para el TMP y SMX utilizando el modelo matemático de  $Q_0$  están dentro de los valores que establece la NOM-177-SSA1-1998 para métodos espectrofotométricos (entre 97 y 103 de porcentaje recuperado) por lo que se puede establecer con un nivel de confianza del 95%, en base a este criterio, que una mezcla que contiene 2  $\mu\text{g/ml}$  de TMP y 10  $\mu\text{g/ml}$  de SMX es determinada con exactitud utilizando el modelo matemático  $Q_0$ .

### 3.2.5. SENSITIVIDAD

La sensibilidad se determinó mediante el análisis de 4 muestras independientes de placebos cargados que contenían TMP y SMX, cada placebo fue preparado y analizado por triplicado bajo las mismas condiciones de análisis.

En las tablas 3.2.25 se muestran las concentraciones utilizadas de SMX y TMP en cada placebo cargado, así como sus respectivas concentraciones estimadas, obtenidas con los modelos matemáticos de MCP y Qo.

Número de muestra	Concentraciones		Modelo matemático de MCP		Modelo matemático de Qo	
	TMP (µg/ml)	SMX (µg/ml)	Concentración estimada de TMP (µg/ml)	Concentración estimada de SMX (µg/ml)	Concentración estimada de TMP (µg/ml)	Concentración estimada de SMX (µg/ml)
1	4.4946	21.0676	4.1919	21 1851	4 1650	21 3432
			4.2546	21.2626	4 3464	21 3875
			4.278	20.9541	4 3272	21 0788
2	4.5948	22.0726	4.3783	21 7697	4 3248	21 9906
			4.3456	21 7586	4 2825	21 9963
			4.2137	21 9077	4 2390	22 1249
3	4.6949	23.0776	4.3156	22.7538	4 3911	23 0381
			4.3445	22 856	4 3470	23 1241
			4.2953	22 8119	4 3350	23 0903
4	4.7951	24.0825	4.4432	23 6847	4 5022	24 0256
			4.5183	24 0842	4 5466	24 4668
			4.5913	24 1929	4 6100	24 5547

**Tabla 3.2.25.** Resultados obtenidos para determinar la sensibilidad del método utilizando los modelos matemáticos de MCP y Qo

Para determinar la sensibilidad para cada analito en estudio se realizó una comparación de parejas de medias (o promedios) utilizando el método de la mínima diferencia significativa (DMS)<sup>23</sup>. En la tabla 3.2.26 se muestra el cálculo del promedio de las concentraciones estimadas de ambos analitos

Número de muestra	Modelo matemático de MCP		Modelo matemático de Qo	
	Promedio de las concentraciones estimadas de TMP (µg/ml)	Promedio de las concentraciones estimadas de TMP (µg/ml)	Promedio de las concentraciones estimadas de TMP (µg/ml)	Promedio de las concentraciones estimadas de TMP (µg/ml)
1	4.2415	21.1339	4.2796	21.2698
2	4.3125	21.812	4.2821	22.0372
3	4.3184	22.8072	4.3577	23.0842
4	4.5176	23.9872	4.5529	24.3490

**Tabla 3.2.26.** Promedio de las concentraciones estimadas de ambos analitos utilizando los modelos matemáticos de MCP y Qo.

Para usar el procedimiento de la DMS, simplemente se comparan las diferencias observadas entre cada par de promedio con el valor correspondiente de la DMS. En las tablas 3.2.27, 3.2.28, 3.2.29, y 3.2.30 se muestran los cálculos de las diferencias entre cada media así como el cálculo de su respectivo DMS.

Diferencias entre los promedios	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
Muestra 1	0	0.07103333	0.07696667	0.2761
Muestra 2	-0.07103333	0	0.00593333	0.20506667
Muestra 3	-0.07696667	-0.00593333	0	0.19913333
Muestra 4	-0.2761	-0.20506667	-0.19913333	0

DMS = 0.2178

Tabla 3.2.27. Cálculo de las diferencias entre cada promedio para el caso de TMP utilizando el modelo matemático de MCP

Diferencias entre los promedios	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
Muestra 1	0	0.67806667	1.6733	2.85333333
Muestra 2	-0.67806667	0	0.99523333	2.17526667
Muestra 3	-1.6733	-0.99523333	0	1.18003333
Muestra 4	-2.85333333	-2.17526667	-1.18003333	0

DMS = 0.3078

Tabla 3.2.28. Cálculo de las diferencias entre cada promedio para el caso de SMX utilizando el modelo matemático de MCP



Diferencias entre los promedios	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
Muestra 1	0	0.00255193	0.07816045	0.27336724
Muestra 2	-0.00255193	0	0.07560852	0.27081531
Muestra 3	-0.07816045	-0.07560852	0	0.19520679
Muestra 4	-0.27336724	-0.27081531	-0.19520679	0

DMS = 0.2175

Tabla 3.2.29. Cálculo de las diferencias entre cada promedio para el caso de TMP utilizando el modelo matemático de Qo

Diferencias entre los promedios	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
Muestra 1	0	0.76742025	1.81433931	3.07921506
Muestra 2	-0.76742025	0	1.04691906	2.31179481
Muestra 3	-1.81433931	-1.04691906	0	1.26487576
Muestra 4	-3.07921506	-2.31179481	-1.26487576	0

DMS = 0.3205

Tabla 3.2.30. Cálculo de las diferencias entre cada promedio para el caso de SMX utilizando el modelo matemático de Qo.

Como podemos observar en las tablas 3 2 28 y 3 2 30, ninguno de los valores calculados son menores a su respectivo DMS por lo que podemos establecer que los resultados obtenidos entre cada muestra son significativamente diferentes con un probabilidad de 95%. Y por lo tanto podemos decir que la magnitud en la que el SMX da una diferencia significativa en los resultados analíticos es de  $1\mu\text{g/ml}$  en ambos modelos matemáticos de cuantificación.

Por otro lado podemos observar en las tablas 3 2 27 y 3 2 29, que la diferencia entre la muestra 1 y 4 es la única que muestra un valor menor a su respectivo DMS por lo que podemos establecer, con una probabilidad de 95%, que los resultados entre la muestra 1 y 4 son significativamente diferentes. Y por lo tanto podemos decir que la magnitud en la que el TMP da una diferencia significativa en los resultados analíticos es de  $0.3\mu\text{g/ml}$  en ambos modelos matemáticos de cuantificación.

### 3.2.6. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADAS.

Con el fin de establecer si es confiable la cuantificación después de almacenar durante 5 días a temperatura ambiente las muestras procesadas, se analizaron 3 muestras independientes de placebos cargados que contenían TMP y SMX en concentraciones conocidas, cada placebo fue preparado y analizado por triplicado bajo las mismas condiciones de análisis.

En las tablas 3 2 31 y 3 2 32 se muestran las concentraciones utilizadas de SMX y TMP en cada placebo cargado, así como sus respectivos porcentajes determinados, obtenidos con los modelos matemáticos de MCP y Qo, en los días 0 y 5 de almacenamiento.

concentraciones		Día 0		Día 5	
TMP (µg/ml)	SMX (µg/ml)	Porcentaje Determinado de TMP	Porcentaje Determinado de SMX	Porcentaje Determinado de TMP	Porcentaje Determinado de SMX
4.054	19.9833	103.0868	101.3998	100.1119	101.2127
		101.7794	101.0620	99.6481	99.9301
		100.7434	100.8774	100.6817	100.3830
6.081	24.9792	101.0566	99.7878	100.1752	99.9891
		100.9448	100.5800	100.3643	100.8571
		100.4893	99.9579	98.9320	99.8774
7.0944	36.2265	99.4934	100.6664	98.4856	99.2164
		100.9030	101.8421	99.7669	101.3350
		100.1066	101.2605	100.5830	102.6100

Tabla 3.2.31. Resultados obtenidos para determinar la estabilidad de las muestras procesadas utilizando el modelo matemático de MCP

concentraciones		Día 0		Día 5	
TMP (µg/ml)	SMX (µg/ml)	Porcentaje Determinado de TMP	Porcentaje Determinado de SMX	Porcentaje Determinado de TMP	Porcentaje Determinado de SMX
4.054	19.9833	100.9352	101.0327	98.2508	101.0889
		99.8596	100.7969	98.1150	101.2172
		99.3232	100.6434	98.1501	100.4089
6.081	24.9792	103.1229	99.3442	100.6709	98.8847
		102.1109	100.309	101.2927	99.6390
		101.8200	99.7017	99.7357	99.3368
7.0944	36.2265	101.0603	99.7575	97.3191	99.7431
		103.3405	100.3406	100.6072	100.3038
		102.4053	100.4625	100.6545	100.7090

Tabla 3.2.32. Resultados obtenidos para determinar la estabilidad de las muestras procesadas utilizando el modelo matemático de Qo.

Mediante la prueba de t de student se determinó si los resultados analíticos obtenidos en el día 0 y el día 5 son exactos, por lo que se estableció la siguientes hipótesis

**Hipótesis:**

**Ho:** Los resultados analíticos son exactos

**Ha:** Los resultados analíticos no son exactos

**Criterio de aceptación:** si  $t_{cal} \leq t_{critica}$  no se rechaza Ho, y por lo tanto los resultados son exactos.

Concentraciones de TMP (µg/ml)	Modelo matemático de MCP				Modelo matemático de Qo				t crítica (α=0.05)
	Día 0		Día 5		Día 0		Día 5		
	Promedio	t cal	Promedio	t cal	Promedio	t cal	Promedio	t cal	
19.9833	101.8698	1.5923	100.1472	0.2845	100.0393	0.0479	98.9942	-0.714	
24.9792	100.8302	2.7628	99.8238	-0.226	102.3513	3.4380	100.5664	0.7227	
36.2265	100.1677	0.2373	99.6118	-0.367	102.2687	1.9793	99.5269	-0.247	4.303

Tabla 3.2.33. Parámetros estadísticos determinados para evaluar la estabilidad de las muestras procesadas, para el TMP

Concentraciones de SMX (µg/ml)	Modelo matemático de MCP				Modelo matemático de Qo				t crítica (α=0.05)
	Día 0		Día 5		Día 0		Día 5		
	Promedio	t cal	Promedio	t cal	Promedio	t cal	Promedio	t cal	
19 9833	101 1131	4.2015	100 5086	0 7819	100 8243	4 2036	100 9050	2 0835	
24 9792	100 1086	0.2604	100 2412	0 4499	99 78501	-0 440	99 2868	-1 878	
36.2265	101 2563	2.1372	101.0538	0 6147	100 1869	0 4961	100 2519	0.5195	4 303

**Tabla 3.2.34.** Parámetros estadísticos determinados para evaluar la estabilidad de las muestras procesadas para el SMX

Como se puede observar en las tablas 3 2 33 y 3 2 34, Ho no se rechaza en ninguno de los casos, debido a que las t calculadas son menores a las t críticas, por lo que podemos decir que la cuantificación de los placebos utilizados es exacta en los días 0 y 5, por lo anterior podemos establecer que las muestras pueden ser almacenadas durante 5 día a temperatura ambiente sin que sufran un cambio significativo en los resultados analíticos de TMP y SMX, utilizando ambos modelos matemáticos de cuantificación.

### 3.3. CONCLUSIONES

El método U.V. para la obtención del perfil de disolución en muestras diluidas con NaOH 0.1N procedentes de un perfil de disolución fue desarrollado y optimizado bajo las siguientes condiciones de análisis:

- Las longitudes de onda para utilizar el modelo matemático de Qo son 241.5 y 267nm.
- Las longitudes de onda para utilizar el modelo matemático de MCP son 300, 287, 278.3, 267, 255.5, 245, 241.5 y 236 nm.
- El número de repeticiones que se realizaran al algoritmo de MCP, para determinar las concentraciones de muestras analíticas, es de 6 repeticiones
- Las concentraciones de las soluciones utilizadas para la estandarización del método, en ambos modelos matemáticos de cuantificación, son las siguientes
  1. 4 µg/ml de TMP y 18 µg/ml de SMX.
  2. 5 µg/ml de TMP y 24 µg/ml de SMX.
  3. 6 µg/ml de TMP y 28 µg/ml de SMX.
  4. 7 µg/ml de TMP y 32 µg/ml de SMX.
  5. 8 µg/ml de TMP y 36 µg/ml de SMX.

El método espectrofotométrico U.V. desarrollado para la obtención del perfil de disolución de una forma farmacéutica que contenga TMP y SMX es

- Especifico para cuantificar TMP y/o SMX en forma simultánea
- Capaz de discriminar los excipientes disueltos contenidos en el medio de disolución.
- Es lineal con una intercepción igual a cero y un C.V. menor a 2% para ambos analitos utilizando ambos modelos de cuantificación
- Preciso con un coeficiente de variación menor a 2% en ambos modelos de cuantificación.

- Exacto en las mezclas de concentraciones de 4 y 20, 6 y 25, 7 y 36  $\mu\text{g/ml}$  de TMP y SMX respectivamente.
- Repetible entre días y reproducible entre analista
- Capaz de cuantificar en forma confiable una mezcla a concentraciones bajas de TMP y SMX por el orden de 2-10  $\mu\text{g/ml}$  de TMP y SMX respectivamente

La sensibilidad del método analítico, utilizando ambos modelos de cuantificación, es de 1  $\mu\text{g/ml}$  para el SMX y 0.3  $\mu\text{g/ml}$  para el TMP

Las muestras procesadas son estables durante 5 días de almacenaje a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

El método demostró ser confiable para estimar la concentración de TMP y SMX liberados durante el proceso de disolución, en forma sencilla, económica y en un tiempo de análisis reducido. Por lo que se recomienda el empleo del método analítico en los estudios de disolución de tabletas que contienen TMP y SMX

# **Anexo**



Conc. Reales		Conc. Estimadas		Conc. Estimadas / Conc. Reales	
TMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	SMX ( $\mu\text{g/ml}$ )	TMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	SMX ( $\mu\text{g/ml}$ )	TMP	SMX
3 02496	12 02688	3 0095	12 0038	0.99488919	0.99808097
3 02496	12 02688	3 0203	12 0493	0.99845948	1.00186416
3 02496	18 04032	3 0499	17 9963	1.00824474	0.99755991
3 02496	18 04032	3 0336	18 0584	1.00285624	1.0010022
3 02496	24 05376	3 0126	24 0618	0.995914	1.00033425
3 02496	24 05376	3 0643	24 0642	1.01300513	1.00043403
4 03328	12 02688	4 0474	12 0211	1.00350087	0.99951941
4 03328	12 02688	4 0991	12 0832	1.01631922	1.00468284
4 03328	18 04032	4 0437	18 0474	1.00258351	1.00039245
4 03328	18 04032	4 0184	17 9741	0.9963107	0.99632933
4 03328	24 05376	3 9918	24 0227	0.98971557	0.99870873
4 03328	24 05376	4 0539	24 1022	1.00511246	1.00201382
5 0416	12 02688	5 0452	12 0203	1.00071406	0.99945289
5 0416	12 02688	5 0421	11 9799	1.00009917	0.99609375
5 0416	18 04032	5 0754	17 9481	1.00670422	0.99488812
5 0416	18 04032	4 9995	18 0253	0.99164948	0.99916742
5 0416	24 05376	5 0141	24 0202	0.99454538	0.99860479
5 0416	24 05376	5 0755	24 0302	1.00672406	0.99902053
6 04992	28 06272	6 0808	28 1475	1.0051042	1.00302109
6 04992	28 06272	6 0733	28 1849	1.00386451	1.00435382
6 04992	30 0672	5 9378	30 0925	0.98146752	1.00084145
6 04992	30 0672	5 9568	30 0749	0.98460806	1.00025609
7 05824	25 056	7 0098	25 135	0.9931371	1.00315294
7 05824	25 056	6 9678	25 0934	0.98718661	1.00149266
7 05824	28 06272	7 0148	28 15	0.99384549	1.00311018
7 05824	28 06272	7 0593	28 0641	1.00015018	1.00004918
7 05824	30 0672	7 2835	30 1017	1.03191447	1.00114743
7 05824	30 0672	7 0509	30 045	0.99896008	0.99926165
7 05824	32 07168	6 9911	32 055	0.99048771	0.99947991
7 05824	32 07168	6 9528	32 058	0.98506143	0.99957346
7 05824	35 0784	7 066	35 0839	1.00109942	1.00015679
7 05824	35 0784	7 1128	35 1938	1.00772997	1.00328977
7 05824	36 08064	7 1085	36 0155	1.00712076	0.9981946
7 05824	36 08064	7 0816	36 0165	1.00330961	0.99822232
8 06656	36 08064	8 1181	35 996	1.00638934	0.99765414
8 06656	36 08064	8 0502	35 966	0.99797187	0.99682267
8 06656	40 0896	8 0476	40 1562	0.99764956	1.00166128
8 06656	40 0896	8 1041	40 021	1.00465378	0.99828883

**Tabla 3.1.1** Tabla que muestra las concentraciones utilizadas de TMP y SMX así como sus respectivas respuestas analíticas obtenidas con el modelo matemático de MCP

Conc. Reales		Conc. Estimadas		Conc. Estimadas / Conc. Reales	
TMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	SMX ( $\mu\text{g/ml}$ )	TMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	SMX ( $\mu\text{g/ml}$ )	TMP	SMX
3.02496	12.02688	2.94771298	12.0702665	0.97446346	1.00360746
3.02496	12.02688	3.05039672	12.0040926	1.00840894	0.99810529
3.02496	18.04032	3.04267282	17.9669753	1.00585555	0.9959344
3.02496	18.04032	2.96358064	18.0947472	0.97970903	1.00301698
3.02496	24.05376	3.04301979	23.9927784	1.00597026	0.99746478
3.02496	24.05376	2.94551758	24.1105639	0.9737377	1.00236154
4.03328	12.02688	3.9743538	12.0902408	0.98539001	1.00526826
4.03328	12.02688	4.01243798	12.1921109	0.99483249	1.01373847
4.03328	18.04032	4.02418309	18.0341084	0.99774454	0.99965568
4.03328	18.04032	3.98088946	17.9982974	0.98701044	0.99767063
4.03328	24.05376	3.92184569	24.0692931	0.97237129	1.00064576
4.03328	24.05376	3.96665417	24.1887788	0.98348098	1.00561321
5.0416	12.02688	5.11242327	11.9724182	1.01404778	0.99547166
5.0416	12.02688	5.0181276	12.0403457	0.99534426	1.00111963
5.0416	18.04032	5.06567572	18.0047494	1.00477541	0.99802827
5.0416	18.04032	4.93894559	18.0848281	0.97963852	1.00246714
5.0416	24.05376	5.09124184	23.9282571	1.00984645	0.9947824
5.0416	24.05376	5.11413501	23.9297038	1.0143873	0.99484254
6.04992	28.06272	6.07233301	28.1396749	1.00370468	1.00274225
6.04992	28.06272	6.18648337	28.1066575	1.02257276	1.00156569
6.04992	30.0672	5.96692691	30.0644875	0.98628195	0.99990979
6.04992	30.0672	5.94527326	30.0861412	0.98270279	1.00062996
7.05824	25.056	7.04895025	25.1205356	0.99868384	1.00257565
7.05824	25.056	7.0755207	24.992549	1.0024483	0.99746763
7.05824	28.06272	7.06662796	28.0926072	1.00118839	1.00106502
7.05824	28.06272	7.18119776	28.0409155	1.01742046	0.99922301
7.05824	30.0672	7.32631951	30.1391199	1.03798107	1.00239197
7.05824	30.0672	7.05196281	30.0220101	0.99911066	0.99849704
7.05824	32.07168	6.96617073	32.1381543	0.98695577	1.00207268
7.05824	32.07168	6.94319802	32.1165039	0.98370104	1.00139762
7.05824	35.0784	7.14517275	34.9610716	1.01231649	0.99665525
7.05824	35.0784	7.38299512	34.9808463	1.04601078	0.99721898
7.05824	36.08064	7.15032847	35.9680495	1.01304694	0.99687948
7.05824	36.08064	7.21049006	35.9301994	1.02157054	0.99583044
8.06656	36.08064	8.13105267	35.8879011	1.00799506	0.99465811
8.06656	36.08064	8.10414461	35.9633081	1.00465931	0.99120493
8.06656	40.0896	8.00059914	40.1074554	0.99182293	1.00044539
8.06656	40.0896	8.00455294	40.0385953	0.99231307	0.99872773

Tabla 3.1.2 Tabla que muestra las concentraciones utilizadas de TMP y SMX así como sus respectivas respuestas analíticas obtenidas con el modelo matemático de  $Q_0$ .

Concentraciones reales		Concentraciones estimadas		Concentraciones estimadas / Concentraciones reales	
TMP (µg/ml)	SMX (µg/ml)	TMP (µg/ml)	SMX (µg/ml)	TMP	SMX
3 011328	12 1104	3 0797	12 3201	1 02270493	1 0173157
3 011328	12 1104	3 0628	12 1927	1 01709279	1 00679581
3 011328	18 01536	2 9908	17 9746	0 99318307	0 99773749
3 011328	18 01536	3 0026	18 071	0 99710161	1 00308848
4 015104	12 1104	3 9533	12 0948	0 98460712	0 99871185
4 015104	12 1104	3 96	11 8808	0 98627582	0 98104109
4 015104	18 01536	4 0097	17 9937	0 99865408	0 99879769
4 015104	18 01536	4 0188	18 1143	1 00092052	1 00549198
4 015104	24 02048	4 0854	24 0047	1 01750789	0 99934306
4 015104	24 02048	3 9891	23 9964	0 99352346	0 99899752
5 01888	12 1104	5 0613	12 1007	1 00845208	0 99919904
5 01888	12 1104	5 0359	11 8505	1 00339119	0 97853911
5 01888	18 01536	5 0497	18 0753	1 00614081	1 00332716
5 01888	18 01536	5 0183	18 032	0 99988444	1 00092366
5 01888	24 02048	5 0262	24 1425	1 00145849	1 00507983
5 01888	24 02048	5 0352	24 1296	1 00325172	1 00454279
6 022656	24 9696	6 0159	25 0479	0 99887824	1 00313581
6 022656	24 9696	5 8955	24 8356	0 97888706	0 99463347
6 022656	28 2576	5 9303	27 7684	0 98466524	0 98268784
6 022656	28 2576	5 9261	27 8358	0 98396787	0 98507304
6 022656	29 96352	6 0834	30 4454	1 01008592	1 01608222
6 022656	29 96352	6 0958	29 9336	1 01214481	0 99900145
7 026432	24 9696	6 9283	24 8983	0 98603388	0 99714453
7 026432	24 9696	6 9963	25 1037	0 99571162	1 00537053
7 026432	28 2576	7 095	28 5721	1 00975858	1 01112975
7 026432	28 2576	7 0105	28 2161	0 99773256	0 99853137
7 026432	29 96352	7 2008	30 6538	1 02481601	1 02303735
7 026432	29 96352	7 0698	29 9415	1 00617212	0 99926511
7 026432	34 95744	7 0107	34 7703	0 99776103	0 99464663
7 026432	34 95744	6 9118	34 8581	0 9836856	0 99715826
7 026432	36 03072	7 0007	35 8199	0 99633783	0 99414888
7 026432	36 03072	7 054	36 0629	1 00392347	1 00089313
8 030208	36 03072	8 0802	36 0544	1 00622549	1 00065722
8 030208	36 03072	8 0261	35 8455	0 99948843	0 99485939

**Tabla 3.2.1.** Tabla que muestra las concentraciones utilizadas de TMP y SMX así como sus respectivas concentraciones estimadas obtenidas con el modelo matemático de MCP

Concentraciones reales		Concentraciones estimadas		Concentraciones estimadas / Concentraciones reales	
TMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	SMX ( $\mu\text{g/ml}$ )	TMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	SMX ( $\mu\text{g/ml}$ )	TMP	SMX
3.011328	12.1104	2.9881	12.0845	0.99228425	0.99786197
3.011328	12.1104	3.0355	12.0331	1.0080275	0.99361914
3.011328	18.01536	3.0919	17.6858	1.02675735	0.98170769
3.011328	18.01536	2.9266	18.0340	0.9718576	1.00103228
4.015104	12.1104	3.9264	11.9590	0.97789856	0.98749691
4.015104	12.1104	4.0288	11.8963	1.00340544	0.98232205
4.015104	18.01536	3.9183	18.0537	0.97588808	1.00212864
4.015104	18.01536	3.9529	18.1065	0.98451093	1.0050602
4.015104	24.02048	4.1721	23.9322	1.039112	0.99632545
4.015104	24.02048	3.9431	23.9327	0.9820688	0.99634675
5.01888	12.1104	5.0198	12.3082	1.00018519	1.01633402
5.01888	12.1104	5.0808	11.9571	1.01232851	0.98734486
5.01888	18.01536	5.0883	18.1554	1.01384162	1.00777501
5.01888	18.01536	5.1401	17.9188	1.0241618	0.99464171
5.01888	24.02048	4.9769	24.2443	0.99162707	1.00931712
5.01888	24.02048	5.1956	24.2362	1.03521056	1.00897982
6.022656	24.9696	6.0601	25.0826	1.00622068	1.00452534
6.022656	24.9696	5.8991	24.8899	0.97949041	0.99680691
6.022656	28.2576	5.9780	27.7202	0.99257786	0.98098361
6.022656	28.2576	5.7544	27.9319	0.9554541	0.988474
6.022656	29.96352	6.0158	30.4803	0.99886715	1.01724621
6.022656	29.96352	6.1647	30.1089	1.02357938	1.00485132
7.026432	24.9696	6.9053	25.0700	0.98276218	1.00402181
7.026432	24.9696	6.9543	25.2992	0.989736	1.01320099
7.026432	28.2576	7.0531	28.6561	1.00379862	1.0141015
7.026432	28.2576	7.0265	28.3290	1.00000968	1.00252618
7.026432	29.96352	7.2616	30.7288	1.0334729	1.02554117
7.026432	29.96352	7.0065	30.1275	0.9971672	1.0054713
7.026432	34.95744	7.0339	34.7500	1.00106484	0.99406632
7.026432	34.95744	7.0677	34.7023	1.00587633	0.9927013
7.026432	36.03072	6.9783	35.7833	0.99315161	0.99313295
7.026432	36.03072	6.9860	35.8630	0.99425266	0.99534491
8.030208	36.03072	8.0926	35.6427	1.00776789	0.98923162
8.030208	36.03072	7.9443	35.9759	0.98929614	0.99847754

**Tabla 3.2.2.** Tabla que muestra las concentraciones utilizadas de TMP y SMX así como sus respectivas concentraciones estimadas obtenidas con el modelo matemático de Qo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. López de Alba, P.L., López Martínez, L, Amador Hernández, J "Métodos de calibración Multivariante". Sociedad Química de México A C Vol 41 (1) 1996 Pág 34-41
2. P. Geladi and B. Kowalski, "Partial Least Squares Regression (PLS) a Tutorial", 1985 Educational Note, C.P.A.C. - University of Washington (1985) Pág 1-17
3. Haaland M. D., Thomas, E.V. "Parcial least-squares methods for spectral analysis 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of quantitative information", *Analytical Chemistry* vol 60 N°11 Hune, 1988, Pág 1993 - 1202.
4. I T Joliffe, *Principal Component Analysis*, Springer-Verlag, New York, 1986 Pág 1-9
5. C W Brown, P F Lynch, R J Obremski and D S Lavery, *Analytical Chemistry*, 54, 1472, (1982) Pág 1-4
6. E H Malinowski and D G Howery, *Factor Analysis in Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1980 Pág 1-13
7. C W Brown, P F Lynch, R J Obremski and D S Lavery, *Analytical Chemistry*, 54, 1472, (1982) Pág 8

8. Tesis de licenciatura, Romero C., JJ "Aplicacion del metodo de razones de absorbancia en la determinación de los componentes en mezclas binarias Aspirina / salicilatos y Sulfametoxazol / Trimetoprim" Cuautitlan Izcalli, Edo de México 1995. Pág. 23-30
9. Tesis de licenciatura, García Vega Rogelio, Resendiz Tapia Laura, "determinación espectrofotometrica de SMX y TMP por medio de los metodos de Razones de Absorbancia y Mínimos Cuadrados Parciales" Cuautitlan Izcalli, Edo de Mexico 1998. Pág. 37-39.
10. Bertramg, Katzung, farmacología básica y clinica, editorial el manual moderno 1984, Pág. 538-542.
11. Goodman y Gilman, las bases farmacológicas de la terapeutica, novena edicion, editorial panamericana, 1993, Pág. 1125-1132
12. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material 2ª edición, London the pharmaceutical press 1986  
Pág. 988,989,1049,1050.
13. USP 23, nf 18,1995. Pág. 1461, 1602, suplemento 5, Pág. 3439, suplemento 1  
Pág. 2512.
14. Feum, 6ta edición, México, 1994 Pág. 827,796,797
15. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998
16. USP-XXII, seventeenth edition, united states pharmacopeial convention, inc, united states, 1990. Pág. 918,1710-1712.

17. Requisitos mínimos para la validación de métodos analíticos Colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos México A C 1993
18. Tesis de licenciatura, Norma Angelica Espinosa Ortega "determinación espectrofotométrica por extracción líquido-líquido de diclofenaco sódico con una sal de cobre(II) como reactivo analítico", FESC-Cuautitlan, UNAM 1995  
Pág 28,29
19. Tesis de licenciatura, Norma Cortes Olivares validación de un método analítico para cuantificar naproxeno sódico en plasma por clar en una combinación de naproxeno sódico con clorhidrato de ambroxol, FESC-Cuautitlan, UNAM 1995 Pág 37-41
20. Judith F: Rubinson, Química analítica contemporánea, primera edición, editorial Pearson Educación, 2000, Pág. 35
21. Daniel C Harris, análisis químico cuantitativo, grupo editorial Iberoamérica, 1992,  
Pág. 40
22. Skoog, análisis instrumental, cuarta edición, editorial McGraw-Hill Pág 1994  
Pág 7-9,814
- 23 Douglas C Montgomery, diseño y análisis de experimentos, grupo editorial Iberoamérica, 1991 Pág 66-69