



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

APLICACION DE METODOS DE CALIBRACION  
MULTIVARIANTE EN LA CUANTIFICACION SIMULTANEA,  
POR ESPECTROFOTOMETRIA U.V., DE ACETAMINOFEN  
(APAP) Y NAPROXENO (NAP) PRESENTES EN UN MEDIO DE  
DISOLUCION

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A :  
**MAURICIO BARRERA GALICIA**

ASESOR: Q.F.B. JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García 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:

Aplicación de Métodos de Calibración Multivariante en la  
cuantificación simultánea, por espectrofotometría U. V., de  
Acetaminofén (APAP) y Naproxeno (NAP) presentes en un medio  
de disolución  
que presenta el pasante: Mauricio Barrera Galicia  
con número de cuenta: 9323589-7 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 14 de Enero de 2004.

PRESIDENTE	<u>MC. Ana Ma. Velázquez Sánchez</u>	
VOCAL	<u>MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u>	
SECRETARIO	<u>QFB. José A. Garduño Rosas</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Elia Granados Enriquez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Marina L. Morales Galicia</u>	

A mis padres:

*Marcelina Galicia Ramírez y Mario Barrera Muciño*

- Por demostrarme siempre su amor y cariño.
  - Porque a través de ellos aprendí a nunca darme por vencido y a dar siempre mi mejor esfuerzo.
  - Porque no importa cuantas palabras pueda yo escribir en estos momentos, nunca serán suficientes para agradecerles todo lo que me han dado.
-

## AGRADECIMIENTOS

- A mis hermanos:

Marcel, Mario y L. Miguel

Por sus golpes y regaños, pero sobre todo por su cariño y apoyo a lo largo de toda mi vida.

- A mis sobrinos:

Diego A. Gutiérrez Barrera  
Andrés Barrera Gonzáles

Porque siempre me recuerdan que nunca debo dejar de soñar.

- A todos mis Familiares:

En verdad, gracias por su apoyo.

- A Ma. de los Ángeles Mendioza Florencio:

Por permitirme ser parte de su vida y por darme su cariño y apoyo.

- A mi Asesor, QFB José Antonio Garduño Rosas:

No sólo por ser mi asesor, sino también por ser mi amigo.  
¿Blancas o Negras?

- A mis Amigos:

Yury, Consuelo, Dulce, Lucero, Marlene, Chucho, Alberto, Bere, Cecy, Memo, Juan Carlos (Blank), Cata chica, Edith, Lorena, Liz, Olga, Saúl, Edmundo y Miguel A. (Cosme): Por su amistad, compañerismo y porque gracias a la ayuda de todos ustedes pude llegar hasta aquí en la Carrera.

Fernando, Beto, América, Elisa, Oscar, Pepe, Amy, Arturo, Manuel, Octavio y Jovanna: Gracias por su amistad y por todos esos momentos de alegrías, fantasías y sueños que hemos vivido juntos.

---

➤ A mis Sinodales

MC Ana María Velásquez Sánchez  
MFC María Eugenia R. Posada Galarza  
QFB Elia Granados Enriquez  
MC Marina L. Morales Galicia

Gracias por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

➤ A mis profesores:

Desde la primaria hasta la universidad, gracias a todos por ser mis maestros dentro y fuera de los salones de clase.

➤ A la UNAM y a la FES Cuautitlán:

Por ser mi segunda casa.

➤ A la I. M. Bruluart S. A:

Por su ayuda en la realización de este trabajo.

➤ A todos los que directa o indirectamente colaboraron a la realización de este trabajo:

*¡Gracias por todo!*

---

---

---

***LA DIFERENCIA***  
*ENTRE QUIEN ERES Y QUIÉN*  
*QUIERES SER, SE ENCUENTRA*  
*EN LO QUE HACES.*

*Anónimo.*

---

---

---

---

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	V
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	VII
<b>OBJETIVOS</b> .....	VIII
<b>CAPÍTULO 1: GENERALIDADES</b> .....	1
1.1 Métodos de Calibración Multivariante .....	2
1.1.1 Fundamento de los Métodos de Análisis de Multicomponentes .....	3
1.1.2 Regresión del Componente Principal (RCP) .....	7
1.1.2.1 Análisis del Componente Principal (ACP) .....	7
1.1.2.2 El Algoritmo NIPALS para ACP .....	10
1.1.2.3 Ecuación de Regresión para RCP .....	12
1.1.3 Mínimos Cuadrados Parciales (MCP) .....	14
1.1.3.1 Algoritmo para MCP .....	16
1.1.4 Principales ventajas del método de MCP contra el método de RCP .....	22
1.1.5 Validación del Modelo de Calibración .....	23
1.1.5.1 Validación Cruzada .....	24
1.1.5.2 Selección del Número Óptimo de Factores: Análisis de SCERP .....	25
1.1.5.3 Curva de Calibración .....	28
1.1.5.4 Detección de muestras desechables .....	31
1.1.5.5 Selección de la región espectral .....	33
1.2 Características del Acetaminofén y del Naproxeno .....	36
1.2.1 Acetaminofén: Descripción y Propiedades Físicas .....	36
1.2.2 Naproxeno: Descripción y Propiedades Físicas .....	38

---

---

1.2.3 Indicaciones terapéuticas de la mezcla APAP-NAP .....	40
1.2.2 Farmacocinética y Farmacodinamia .....	40
1.2.5 Monografías de Perfil de Disolución .....	42
1.2.5.1 Tabletas de Acetaminofén .....	42
1.2.5.2 Tabletas de Naproxeno .....	43
1.3 Validación de Métodos Analíticos .....	43
1.3.1 Tipos de métodos analíticos a ser validados .....	44
1.3.2 Procedimiento analítico .....	45
1.3.3 Linealidad .....	
1.3.3.1 Linealidad del Sistema .....	45
1.3.3.2 Linealidad del Método .....	46
1.3.4 Precisión .....	46
1.3.5 Exactitud .....	47
1.3.6 Límite de Detección y Límite de Cuantificación .....	47
1.3.7 Repetibilidad entre días .....	49
1.3.8 Reproducibilidad .....	49
1.3.9 Sensitividad .....	49
1.3.10 Sensibilidad .....	50
1.3.11 Estabilidad de la muestra procesada .....	50
1.3.12 Selectividad .....	51
1.3.13 Especificidad .....	51
1.3.14 Tolerancia .....	51
1.3.15 Robustez .....	52
CAPÍTULO 2: DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO .....	53
2.1 Reactivos, Equipos y Softwares utilizados .....	54
2.1.1 Reactivos .....	54
2.1.2 Equipo .....	54
2.1.3 Softwares .....	55
2.2 Preparación de soluciones .....	56

---

---

---

---

2.2.1 Preparación de la solución de Hidróxido de Sodio 0.2 N .....	56
2.2.2 Preparación de la solución de fosfato monobásico de potasio 0.2 M .....	56
2.2.3 Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 .....	57
2.3 Procedimientos analíticos realizados para el desarrollo del Método Analítico .....	57
2.3.1 Aditividad, Interacción e Interferencia .....	58
2.3.2 Desarrollo y validación del modelo	
2.3.2.1 Selección de la región espectral .....	60
2.3.2.2 Selección del Número óptimo de factores .....	64
2.3.2.3 Curva de Calibración .....	67
2.3.2.3.1 Elección de las soluciones Estándar .....	67
2.3.2.3.2 Interpretación del modelo de MCP y RCP en el nuevo sistema de coordenadas .....	70
2.3.2.4 Detección de muestras Desechables .....	76
2.4 Condiciones finales para el Análisis .....	77
2.4.1 Ensayo Analítico .....	78
2.4.2 Preparación de las soluciones Estándar .....	78
2.4.3 Lectura y Estimación .....	81
CAPÍTULO 3: VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....	82
3.1 Criterios de Aceptación .....	83
3.2 Validación del Sistema .....	86
3.2.1 Linealidad del sistema .....	86
3.2.2 Precisión y exactitud del sistema .....	91
3.3 Validación del Método .....	93
3.3.1 Linealidad del método .....	93
3.3.2 Precisión y exactitud del método .....	101

---

---

---

---

3.3.3 Límite de cuantificación y límite de detección .....	104
3.3.4 Repetibilidad y reproducibilidad .....	108
3.3.5 Sensitividad .....	114
3.3.6 Estabilidad de la muestra procesada .....	117
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>123</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>125</b>
A.1 Reporte de análisis de estandarización del APAP y del NAP .....	126
A.2 Calibración del método .....	129
A.3 Placebo cargado realizado para el Límite de Cuantificación .....	130
A.4 Análisis de Variancia (Modelo Factorial Anidado) .....	131
A.5 Análisis de Variancia (Modelo Factorial Cruzado) .....	133
A.6 Análisis de Variancia (Modelo Factorial Anidado-Cruzado) .....	135
A.7 Sensitividad .....	138
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>140</b>

**ABREVIATURAS**

°C	Grados centígrados.
A	Absorbancia.
ACP	Análisis del Componente Principal.
APAP	Acetaminofén.
b	Ordenada al origen (intercepto).
c, C	Concentración.
Cal	Calculada.
CP	Componente Principal.
CV	Coefficiente de Variación.
Desv. Est	Desviación estándar.
DMS	Diferencia Mínima Significativa.
e, E	Error
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
g	Gramos.
k, K	Coefficiente de regresión.
$\lambda$	Longitud de onda.
LC	Límite de Cuantificación.
LIC	Límite Inferior de Confianza.
LSC	Límite superior de Confianza.
LX	Límite de Detección.
m	Pendiente.
M	Concentración Molar.
<i>m</i>	número de componentes.
MCC	Mínimos Cuadrados Clásicos.
mcg	Microgramos.
MCI	Mínimos Cuadrados Inversos.
MCP	Mínimos Cuadrados Parciales.
mg	Miligramos
mL	Mililitros.

---

n	Número de muestras.
N°	Número.
NAP	Naproxeno.
nm	Nanómetros.
r	Coefficiente de correlación.
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación.
RCP	Regresión del Componente Principal.
RLM	Regresión Lineal Múltiple.
rpm	Revoluciones por minuto.
SCERP	Suma de Cuadrados de los Errores Residuales de Predicción.
UV	Ultravioleta.
USP	Farmacopea de los Estados Unidos.

## INTRODUCCIÓN

La determinación de los perfiles de disolución, para formas farmacéuticas sólidas orales, se emplea cotidianamente para evaluar la calidad del producto farmacéutico y para el desarrollo de nuevas formulaciones. Por tal motivo, se deben contar con métodos analíticos confiables que nos permitan cuantificar los principios activos presentes en el medio de disolución de una manera rápida y sencilla.

Sin embargo, uno de los problemas fundamentales en este tipo de determinaciones cuando los productos farmacéuticos contienen dos o más principios activos en su formulación, es la cuantificación de todos ellos. Por esta razón, normalmente en estos tipos de ensayos se realiza previamente un proceso de separación y posteriormente se cuantifican los principios activos de forma individual, lo que ocasiona como consecuencia, un incremento en el costo y en el tiempo de análisis.

En años recientes, los métodos de calibración multivariante, como la Regresión del Componente Principal (RCP) y el análisis por Mínimos Cuadrados Parciales (MCP), han llegado a ser una importante herramienta en la cuantificación simultánea de analitos en mezcla. Estos métodos son utilizados cada vez más frecuentemente en el análisis de medicamentos dentro de la industria farmacéutica <sup>(2, 3, 8, 15, 18, 20)</sup>.

En este trabajo, los métodos de calibración multivariante de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP) y Regresión del Componente Principal (RCP) se aplicaron exitosamente en la cuantificación simultánea de Acetaminofén (APAP) y de Naproxeno (NAP) en muestras procedentes de un estudio de disolución. Así mismo se muestran las condiciones de análisis así como el ensayo analítico establecido para el desarrollo y validación del método espectrofotométrico UV.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer un método Espectrofotométrico UV aplicando técnicas de análisis multivariado para ser utilizado en la cuantificación de muestras procedentes de un estudio de disolución de Acetaminofén (APAP) y Naproxeno (NAP) en tabletas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar las condiciones espectrofotométricas óptimas que permitan la cuantificación simultánea de Acetaminofén y Naproxeno presentes en la misma muestra analítica.
- Establecer un ensayo analítico confiable que pueda ser utilizado en la cuantificación del Acetaminofén y del Naproxeno liberados durante un estudio de disolución.
- Validar el método Espectrofotométrico establecido.
- Comparar los resultados obtenidos por los métodos de Mínimos Cuadrados Parciales y Regresión del Componente Principal.
- Determinar cual de los dos métodos de calibración multivariante empleados es el más robusto.

# **CAPÍTULO 1**

# **GENERALIDADES**

## 1.1 MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE

La regresión es una valiosa técnica cuando se analiza la relación existente entre una variable dependiente (respuesta, variable Y) y varias variables independientes (predictoras, variables X). El análisis multivariante nos ayuda a determinar la dependencia de estas variables X con respecto a una o varias variables Y <sup>(18)</sup>.

De esta manera, la calibración multivariante es una herramienta de reconocida selectividad y confiabilidad en el análisis cuantitativo, aplicable en la determinación de macro y micro componentes con diversas características y bajo distintos métodos de análisis (resonancia magnética nuclear, espectroscopia de masas, espectrometría acústica, electroforesis, cromatografía, espectroscopia UV-visible, espectroscopia de absorción en Infrarrojo, etc.).

Existen muchas circunstancias o serie de problemas en los cuales los métodos de calibración multivariante pueden ser aplicados exitosamente. Así, entre las principales ventajas que ofrece esta herramienta matemática se tienen:

- Mejora la precisión y la exactitud para cualquiera de los métodos analíticos mencionados en comparación con la calibración univariante.
- Es posible cuantificar, en forma confiable y de manera simultánea, varios componentes presentes en una muestra analítica (Análisis de Multicomponentes) en donde se conocen los espectros de los componentes puros de interés.
- Se puede cuantificar solo uno o varios de los componentes de una mezcla aún cuando no se conozcan todos los componentes presentes en dicha mezcla. En muestras naturales (sangre, agua contaminada, extractos de plantas, etc.) pueden existir muchos componentes desconocidos, pero la calibración multivariante puede determinar solo uno o los componentes que sean de interés elaborando una correcta matriz de calibración.
- En los casos en los que están presentes interferencias en las mezclas con él (los) componente (s) de interés y no existe otro punto en el que puedan ser determinados

selectivamente, tradicionalmente se recurre a procesos de separación de las sustancias interferentes. La calibración multivariante permite analizar sistemas con interferencias químicas, aunque no sean definidas, sin necesidad de manipular excesivamente la muestra.

- La calibración multivariante facilita la detección de muestras desechables (muestras mal preparadas) presentes en la matriz de calibración. Las muestras que no fueron correctamente preparadas durante la calibración empobrecen la capacidad predictiva de la misma, por tal razón, con la calibración multivariante se pueden identificar dichas muestras para separarlas posteriormente de la matriz de calibración.
- Es posible eliminar fácilmente los problemas ocasionados por el manejo de las muestras que provocan ciertos errores en las mediciones, por ejemplo, variaciones de temperatura en diversos instrumentos como espectrofotómetros, monoacromadores mal ajustados, etc.

Con la calibración multivariante entonces se puede estimular el desarrollo de nuevos métodos analíticos, así como mejorar la capacidad predictiva y la confiabilidad de los métodos ya existentes. Sin embargo, el hecho de establecer las condiciones adecuadas para la realización de estos métodos, así como la comprensión de los mismos, hace que la aplicación de los métodos de calibración multivariante en algunas áreas de la ciencia sean mucho menos aplicados que en otras <sup>(2, 3, 17, 19, 20)</sup>.

### 1.1.1 FUNDAMENTO DE LOS METODOS DE ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES

En el análisis cuantitativo se busca una 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 a una longitud de onda ( $\lambda_1$ ) de la siguiente manera:

$$A_1 = k_1 c_1 \quad (1.1)$$

Donde  $A_1$  es la absorbancia a una  $\lambda_1$ ,  $c_1$  la concentración y  $k_1$  la absorptividad del componente. Esto implica que es posible conocer la concentración de cualquier muestra tras medir simplemente la absorbancia en una muestra de concentración conocida y deducir la absorptividad, utilizando esta misma en cualquier cálculo posterior. Como se observa, la ecuación puede resolverse estudiando una sola muestra; sin embargo, ante las limitaciones por ruido, error instrumental, error en la manipulación de las soluciones, etc., se recomienda analizar varias muestras de distinta concentración, realizar un gráfico de los resultados obtenidos y estimar la línea recta que mejor comprenda los puntos mediante lo que se conoce matemáticamente como ajuste por mínimos cuadrados, en donde el error total entre las absorbancias sea el mínimo.

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

$$A_1 = k_1 c_1 + e_1 \quad (1.2)$$

$$A_2 = k_2 c_2 + e_2 \quad (1.3)$$

Donde  $A_1$  y  $A_2$  son las absorbancias a dos longitudes de onda diferentes,  $k_1$  y  $k_2$  las absorptividades de los componentes a las respectivas 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 permisible resolver las ecuaciones simultáneamente y así manejar el caso donde existe interferencia entre las dos absorbancias dentro de un espectro (bandas solapadas):

$$A_1 = k_{11}c_1 + k_{21}c_2 + e_1 \quad (1.4)$$

$$A_2 = k_{12}c_1 + k_{22}c_2 + e_2 \quad (1.5)$$

Sin embargo, solucionar ecuaciones simultáneas manualmente se convierte en algo laborioso cuando se trata de más de dos componentes. Además, conceptualmente es factible medir la absorbancia a más de una longitud de onda para cada componente y resolver las ecuaciones respectivas, lo que suele ser conveniente en caso de datos reales con ruido, ya que estos se promedian y obtienen resultados más exactos.

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

$$A_{(n,j)} = K_{(m,j)}C_{(n,m)} + E_{(n,j)} \quad (1.6)$$

Siendo  $n$  el número de disoluciones patrón o número de muestras,  $j$  el número de valores de longitudes de onda y  $m$  el número de componentes. Por ejemplo, para dos muestras, dos componentes y dos longitudes de onda, las ecuaciones son:

Para el espectro 1:

$$A_{11} = k_{11}c_{11} + k_{21}c_{12} + e_{11} \quad (1.7)$$

$$A_{12} = k_{12}c_{11} + k_{22}c_{12} + e_{12} \quad (1.8)$$

Para el espectro 2:

$$A_{21} = k_{11}c_{21} + k_{21}c_{22} + e_{21} \quad (1.9)$$

$$A_{22} = k_{12}c_{21} + k_{22}c_{22} + e_{22} \quad (1.10)$$

O en notación matricial:

$$A = KC + E \quad (1.11)$$

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 proporcionan la línea (o líneas) que se ajustan mejor a los datos por mínimos cuadrados.

Para resolver de manera práctica y confiable ecuaciones simultáneas utilizando álgebra matricial, se encuentran reportados en la literatura algunos métodos tales como:

- Regresión Lineal Múltiple (Multiple Linear Regression) ó RLM.
- Mínimos Cuadrados Clásicos (Classical Least Squares) ó MCC.
- Mínimos Cuadrados Inversos (Inverse Least Squares) ó MCI.
- Análisis del Componente Principal (Principal Component Analysis) ó ACP.
- Regresión del Componente Principal (Principal Component Regresión) ó RCP.
- Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares) ó MCP.

El método de MCC aplicado a espectrofotometría es un método de espectro completo y proporciona una buena sensibilidad al promediar varios resultados; pero se requiere conocer la concentración de todos los componentes de la mezcla, algo que comúnmente no ocurre en la realidad. El método de MCI tolera esta situación, pero no permite utilizar muchos puntos de análisis, ya que se encuentra limitado por el número de frecuencias del espectro que pueden incluirse en el análisis al igual que el método de RLM<sup>(19)</sup>.

Por otra parte, RCP y MCP han sido los métodos de calibración multivariante más utilizados en el área de la química analítica y se aplican exitosamente en el análisis cuantitativo de datos provenientes de estudios en Ultravioleta, Infrarrojo, y cromatografía, entre otros. Así, ambos métodos utilizan los fundamentos y beneficios de la calibración inversa, donde es posible realizar una calibración para los componentes de interés, generando que estos sean métodos de análisis de espectro completo en los que no se requiere conocer todos los componentes de la mezcla para no tener que realizar un proceso de separación<sup>(2, 11)</sup>.

## 1.1.2 REGRESIÓN DEL COMPONENTE PRINCIPAL (RCP) <sup>(3, 20)</sup>

El método de RCP ha sido utilizado desde la década de los 70's y su nombre se debe al hecho de que es un método de calibración multivariante que consta de dos pasos: en el primer paso utiliza el método del Análisis del Componente Principal y como segundo paso realiza una regresión de la misma forma que se lleva a cabo en la Regresión Lineal Múltiple.

Sin embargo, en el caso de la Regresión Lineal Múltiple se tiene la desventaja de que deben ser conocidos todos los componentes presentes en la mezcla, mientras que al utilizar el método del ACP seguido de una regresión (RCP) no es necesario conocer todos los componentes, solo es necesario determinar cuantos componentes significativos caracterizan la mezcla, aunque no se conozcan sus identidades químicas.

### 1.1.2.1 ANÁLISIS DEL COMPONENTE PRINCIPAL (ACP) <sup>(2, 3, 8, 10, 20, 24)</sup>

La más frecuente aplicación del método de ACP es en los casos donde se espera que las variables de la matriz de Absorbancias sean colineales. La colinealidad significa que la matriz **A** tiene algunos tipos dominantes de variabilidad en donde existe una dependencia de tipo lineal entre las variables de **A** y **c**.

Así, el ACP es una manipulación matemática de los datos de una matriz donde el objetivo es representar la variación que se encuentra en muchas variables utilizando un pequeño número de "factores" ó Componentes Principales (CP), en donde el "factor" puede definirse como la transformación de los datos donde el objetivo es reducir el número de dimensiones de los mismos datos.

Para llevar esto a cabo y de acuerdo con la notación utilizada entre Brereton <sup>(3)</sup> y Haaland <sup>(15)</sup>, el ACP descompone la matriz de Absorbancias (matriz **A**) en dos pequeñas

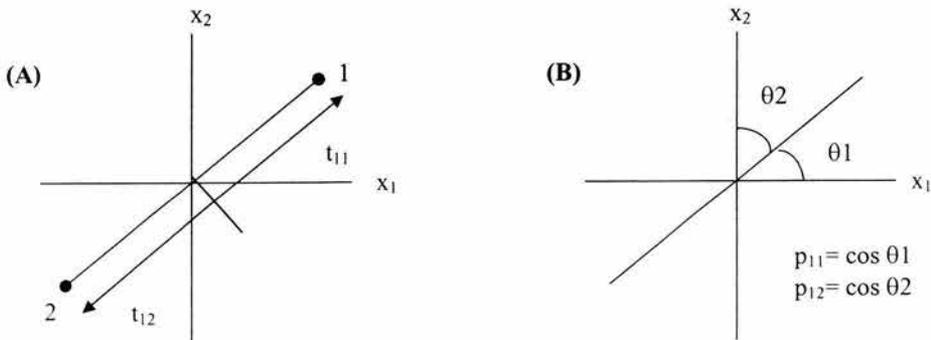
matrices, una llamada indicador ó “scores” (**T**) y la otra llamada de carga ó “loading” (**P**), las cuales a su vez, contienen uno o varios vectores  $t_h$  y  $p_h$ :

$$A = t_1 p_1' + t_2 p_2' + t_3 p_3' + \dots + t_h p_h' \quad (1.12)$$

o en notación matricial:

$$A = T P' \quad (1.13)$$

Cuando se utilizan más de tres longitudes de onda, no es fácil mostrar lo que significan los vectores  $t_h$  y  $p_h$ , así que para poder explicarlos se toma un ejemplo en donde solo hay dos longitudes de onda (dos variables), tal y como se muestra en la Figura 1.1. En esta figura, los Componentes Principales representan la mejor línea recta en la cual se encuentran los datos de la calibración, en donde los vectores  $t_h$  representan la distancia o proyección que existe entre los puntos a través de esta línea (figura 1.1 A), mientras que los vectores  $p_h$  representan la dirección (o el ángulo) de la línea recta (figura 1.1 B).



**Figura 1.1.** Gráfico que representa un CP en el caso de dos variables: (A) Los “scores” son la proyección de los puntos de las muestras (1-2) sobre la dirección del CP; (B) Los “loading” son el coseno del ángulo de la dirección del vector. Se debe hacer notar que los datos fueron centrados <sup>(10)</sup>.

Así, mientras más longitudes de onda se utilicen, los datos de la calibración quedarán comprendidos dentro de un espacio multidimensional en donde el número de dimensiones es igual al número de longitudes de onda (número de variables). Si solo existe un componente de interés, los espectros obtenidos a diferentes longitudes de onda formarán solo una línea recta, por el hecho de que la intensidad de cada espectro se encontrará directamente relacionada a la concentración de este componente. Si en la calibración se encuentran dos componentes, idealmente dos CP deben ser calculados y dos líneas rectas serán formadas y así sucesivamente.

La matriz indicador ó “score” (T) tiene las siguientes propiedades:

1. El número de filas debe ser igual al número de filas que tiene la matriz c, usualmente el número de muestras o disoluciones patrón de la calibración.
2. El número de columnas debe ser igual al número de factores significativos en los datos, y puede ser cualquier número igual o mayor a 1. Idealmente este valor debe ser igual al número de componentes presentes en las muestras de la calibración, pero, factores como el ruido y la posible semejanza entre los espectros, pueden cambiar e incluso aumentar este número. Cada columna corresponde a un Componente Principal.
3. La suma de cuadrados de los elementos de cada columna de la matriz T es igual a un número que se conoce con el nombre de “eigenvalue”.

La matriz de carga ó “loading” (P) tiene las siguientes propiedades:

1. El número de columnas debe ser igual al número de columnas presentes en la matriz de las absorbancias, usualmente el número de longitudes de onda.
2. El número de filas es igual al número de factores significativos para los datos. Cada fila corresponde a un Componente Principal.
3. La suma de cuadrados de los elementos de cada columna debe ser igual a 1.

Entonces, cada CP se caracteriza por: (1) tener un vector indicador ó “score”,  $t_h$ , (2) un vector de carga ó “loading”,  $p_h$ , y (3) un “eigenvalue”,  $g_h$ , el cual puede ser definido como:

$$g_h = \sum t_h^2 \quad (1.14)$$

Un aspecto importante que se debe hacer notar para poder obtener mejores resultados al utilizar el método de ACP que si se utilizara el método de RLM, es el hecho de que se deben utilizar por lo menos  $m + 1$  longitudes de onda (mientras que para RLM el número de longitudes de onda debe ser igual al número de componentes presentes en la mezcla, en ACP debe ser mayor el número de longitudes de onda que el número de componentes); o de lo contrario, los resultados obtenidos por el método de ACP serán los mismos que los obtenidos por el método de RLM (cuando se conocen todos los componentes presentes en la matriz de calibración).

### 1.1.2.2 EL ALGORITMO NIPALS PARA ACP

Un simple algoritmo que puede utilizarse para descomponer la matriz  $\mathbf{A}$  y así obtener las matrices  $\mathbf{T}$  y  $\mathbf{P}$ , es el algoritmo NIPALS descubierto por Wold en el año de 1966. Este algoritmo extrae solo un CP a la vez, en donde se obtiene el primer CP de los espectros en el orden de su contribución a la varianza presente en la calibración. Posteriormente de que el primer CP ha sido determinado, este se remueve de cada espectro de la calibración y el proceso se repite hasta el número óptimo de CP que deben ser calculados<sup>(15, 20)</sup>.

El algoritmo NIPALS<sup>(3, 10, 20)</sup> es el siguiente:

- PASO 1: Pretratamiento de los datos: Centrar  $\mathbf{A}$ . La media del espectro de calibración se sustrae a cada valor de la matriz  $\mathbf{A}$ .

- PASO 2: Tomar una columna de esta matriz (la columna que presente la mejor suma de cuadrados) y llamarla como  $t_h$  **inicial**.
- PASO 3: Calcular el vector de carga,  $p_h'$ :

$$\text{Modelo:} \quad A = t_h p_h' \quad (1.15)$$

$$\text{Solución:} \quad p_h' = t_h' A / \sum t_h'^2 \quad (1.16)$$

Idealmente se tiene que  $t_h p_h' = A$ , así que, multiplicando cada lado de la ecuación por  $t_h'$  se obtiene:  $t_h' t_h p_h' = t_h' A$ . Luego, reordenando se obtiene:  $\sum t_h'^2 p_h' = t_h' A$ .

- PASO 4: Normalizar  $p_h'$ :

$$p_h' \text{ nueva} = p_h' \text{ anterior} / \| p_h' \text{ anterior} \| \quad (1.17)$$

Al realizar esta operación se logra que la suma de cuadrados del vector de carga sea igual a 1.

- PASO 5: Calcular el vector indicador,  $t_h$ :

$$\text{Modelo:} \quad t_h p_h' = A \quad (1.18)$$

$$\text{Solución:} \quad t_h = A p_h / p_h' p_h \quad (1.19)$$

Pero, sabiendo que  $p_h' p_h = 1$ , entonces la solución es:

$$t_h = A p_h \quad (1.20)$$

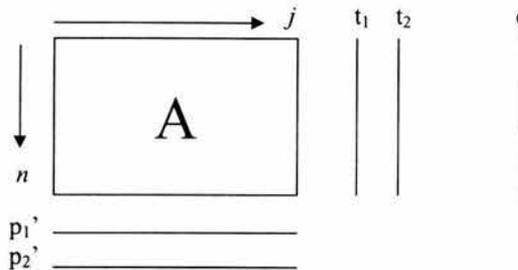
- PASO 6: Comparar la  $t_h$  inicial con la  $t_h$  obtenida en el paso 5 por medio de una suma de cuadrados:  $\sum (t_h \text{ inicial} - t_h \text{ nueva})^2$ . Si el valor resultante es muy pequeño, quiere decir que se ha extraído el primer CP.

- PASO 7: Restar el efecto del nuevo CP de la matriz de datos para obtener una matriz de residuales:

$$Ea = A - t_h p_h' \quad (1.21)$$

- PASO 8: Incrementar h, sustituyendo Ea por A en el paso 2 y continuar para obtener el próximo CP.

Los dos primeros CP pueden ser ilustrados gráficamente tal y como se muestra en la Figura 1.2:



**Figura 1.2:** Representación gráfica de los dos primeros Componentes Principales obtenidos por el método de ACP. En este método, la matriz  $T = [ t_1 | t_2 ]$ , además se debe cumplir la propiedad de la ortogonalidad, esto quiere decir que:  $t_1' t_2 = 0$  y  $p_1' p_2 = 0$ .

### 1.1.2.3 ECUACIÓN DE REGRESIÓN PARA RCP <sup>(3, 20, 24)</sup>

Los Componentes Principales algunas veces son llamados factores abstractos y son fundamentalmente entidades matemáticas. El objetivo de la calibración multivariante es convertir estas entidades matemáticas a la concentración del o los componentes de interés. En RCP, se utiliza un paso de regresión (algunas veces llamado transformación o rotación) para convertir los vectores  $t_h$  obtenidos en el método de ACP, a concentraciones. Este proceso es a menudo llamado por algunos autores como “análisis del factor” (factor analysis).

Si  $c$  es un vector el cual contiene la concentración conocida de un compuesto de interés, entonces el modelo para relacionar  $c$  y los vectores  $t_h$  se puede establecer utilizando algunos CP cuidadosamente seleccionados como variables predictoras:

$$c = q_0 + q_1 t_1 + q_2 t_2 + q_3 t_3 + \dots + q_h t_h \quad (1.22)$$

o en notación matricial:

$$c = T q \quad (1.23)$$

donde  $q$  es un vector que tiene el número de filas igual al número de CP calculados y es algunas veces llamado como “vector de transformación ó de rotación”. A su vez, el vector  $q$  se determina resolviendo el sistema de ecuaciones basándose en el modelo:

$$c = T q + e_c \quad (1.24)$$

dando como resultado:

$$q = (T' T)^{-1} T' c \quad (1.25)$$

Sin embargo, si se conoce la concentración de más de un componente presente en la calibración, el modelo de RCP sustituye el vector  $c$  utilizado en la ecuación 1.23 por una matriz  $C$ , en donde cada columna corresponde a un componente presente en la mezcla:

$$C = T Q \quad (1.26)$$

y por lo tanto, el vector  $q$  puede ser sustituido por la matriz  $Q$  en la ecuación 1.25:

$$Q = (T' T)^{-1} T' C \quad (1.27)$$

Para que el método de RCP pueda predecir una muestra de concentración desconocida del o los componentes de interés (muestra problema), realiza un paso de

paso de regresión similar al utilizado en la Regresión Lineal Múltiple, de acuerdo con el siguiente modelo:

$$c_{\text{est}} = \mathbf{a}\mathbf{K} + \mathbf{e}_c \quad (1.28)$$

donde:

$c_{\text{est}}$  = La concentración estimada del o los componentes de interés.

$\mathbf{a}$  = El vector no centrado del espectro obtenido de la muestra problema.

$\mathbf{e}_c$  = El vector de residuales.

$\mathbf{K}$  = El coeficiente de regresión final para RCP.

cuya solución es:

$$\mathbf{K} = \mathbf{P} \mathbf{Q} \quad (1.29)$$

De esta manera, la ecuación 1.28 permite el cálculo inmediato de la concentración del o los componentes de interés en las muestras problema, sin más que sustituir los correspondientes valores en  $\mathbf{a}$  y determinar tanto  $\mathbf{K}$  como  $\mathbf{e}_c$ .

### 1.1.3 MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (MCP)

El método de Mínimos Cuadrados Parciales es comúnmente denominado como “la mayor técnica de regresión para datos multivariantes” y puede utilizarse en diversas áreas de la Química como la química analítica, control de procesos industriales y en la elaboración de formulaciones para productos farmacéuticos, entre otras<sup>(3, 8, 10, 18, 20)</sup>.

Aunque el MCP fue aplicado originalmente en el campo de la econometría por H. Wold, posteriormente su uso para aplicaciones químicas se estableció por S. Wold y H. Martens, como un algoritmo para encontrar una solución para el coeficiente de regresión  $B_f$

en el modelo lineal  $Y = X B_f + E$ , en donde se conocen los datos de las matrices  $X$  y  $Y$  <sup>(10, 20)</sup>.

En el método de MCP, se desea conocer la relación lineal que pueda existir entre las absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda y la concentración del componente de interés, de acuerdo al modelo lineal utilizado en la calibración inversa <sup>(3)</sup>:

$$c = Ak + E \quad (1.30)$$

en donde, los espectros de la calibración pueden a su vez ser representados por el modelo:

$$A = TB + E_A \quad (1.31)$$

y la concentración del componente del interés puede ser representada por el modelo:

$$c = Tv + e_c \quad (1.32)$$

De esta forma, se pueden enunciar algunas características importantes del método de MCP en comparación con el método de RCP <sup>(3, 8, 10, 20, 24)</sup>:

- Es posible obtener la matriz de  $T$  a partir de los datos de  $c$  y  $A$ .
- En MCP, se utiliza el término “factor” en lugar del término “CP” utilizado para ACP.
- La suma de cuadrados de los vectores  $t_h$  para cada factor es también llamado, como en ACP, un “eigenvalue” pero su valor no es el mismo que el obtenido en ACP, porque en MCP este valor depende tanto de  $c$  como de  $A$ .
- El vector  $v_h$  obtenido en la ecuación 1.32 para la concentración del componente de interés, es análogo al vector de carga  $b_h$  que se obtiene para la formación de la matriz de la ecuación 1.31, pero  $v_h$  no es normalizado.
- El cálculo de la matriz de carga  $B$  para MCP, es más complejo que el cálculo de la correspondiente matriz  $P$  para ACP, puesto que, entre otras operaciones, es necesario calcular la matriz de los “cargadores de peso”  $W$ .

### 1.1.3.1 ALGORITMO PARA MCP

El algoritmo para MCP utilizado en este trabajo, es una modificación del algoritmo NIPALS utilizado para ACP, pero en donde ahora el principal objetivo es utilizar la información que pueda proporcionar la concentración del componente de interés para la descomposición de los datos de la matriz  $A$ .

Así, en el algoritmo de MCP establecido por Haaland <sup>(15, 16)</sup>, se realiza el análisis de la calibración y la predicción para solo un componente a la vez. Esto significa que solo se emplea la concentración de un solo componente de interés en los datos de la calibración, mientras que las concentraciones de los demás componentes no se incluyen en el análisis. Sin embargo, si se desea conocer la concentración de algún otro componente presente en la mezcla, lo único que se debe hacer es realizar el análisis en donde solo se incluya este componente en los datos de la calibración.

El algoritmo de MCP consta de dos etapas:

- Etapa de Calibración.
- Etapa de Predicción.

#### A) ETAPA DE CALIBRACIÓN.

En esta etapa, la relación entre las absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda y la concentración del componente de interés se estima a partir de un conjunto de soluciones de referencia que presentan las posibles combinaciones de los componentes de la mezcla. Así, se obtienen dos expresiones matriciales compuestas por valores de absorbancias a diferentes longitudes de onda, matriz  $A$ , y el número de soluciones, vector  $c$ .

Posteriormente, la elaboración del modelo establecido para MCP se logra resolviendo los datos de las matrices conforme al siguiente algoritmo:

- PASO 1: Pretratamiento de los datos. Centrar  $A$  y  $c$ . La media del espectro de calibración se sustrae a cada valor de la matriz ( $A$ ) y la media de calibración de las concentraciones se resta de cada concentración ( $c$ ).
- PASO 2: Formación del vector cargador de peso o “weight loading vector”,  $w_h$ :

$$\text{Modelo:} \quad A = c w_h' + E_A \quad (1.33)$$

$$\text{Solución:} \quad w_h = A'c / c'c \quad (1.34)$$

Este paso del algoritmo de MCP es en realidad una calibración de Mínimos Cuadrados Clásicos (MCC) en la cual los análisis se ejecutan sabiendo que se conoce la concentración de uno de los componentes de las muestras de calibración. Una vez obtenido los valores de  $w_h$ , estos deben ser normalizados. Este paso es similar al realizado por el modelo de ACP en la ecuación 1.17, pero en MCP, esto se realiza para que la información de la concentración sea posteriormente introducida directamente en el cálculo de los vectores de carga.

- PASO 3: Formación del vector indicador o “score” (variable latente),  $t_h$ :

$$\text{Modelo:} \quad A = t_h w_h' + E_A \quad (1.35)$$

$$\text{Solución:} \quad t_h = A w_h \quad (1.36)$$

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

El vector  $t_1$  representa la intensidad o cantidad del primer vector de carga (loading) en las muestras de calibración para el sistema coordinado de MCP. En MCP, cada vector  $t_h$  está relacionado tanto por  $A$  como por  $c$  y no solamente por  $A$  como en el método de ACP.

También,  $w_1$  y  $t_1$  son los datos normalizados del espectro puro y la concentración centrada del componente de interés en el nuevo sistema de coordenadas, respectivamente.

- PASO 4: Relación del vector indicador con las concentraciones:

$$\text{Modelo:} \quad c = v_h t_h + e_c \quad (1.37)$$

$$\text{Solución:} \quad v_h = t_h' c / t_h' t_h \quad (1.38)$$

El vector indicador,  $t_h$ , representa las intensidades en el nuevo sistema de coordenadas que están relacionados a la concentración usando una regresión de mínimos cuadrados lineal, así como las intensidades son relacionadas a la concentración en el análisis por MCI ó como los “scores” son relacionados a la concentración en RCP.

- PASO 5: Formación del vector de carga o “loading vector”,  $b_h$ , de MCP para A:

$$\text{Modelo:} \quad A = t_h b_h' + E_A \quad (1.39)$$

$$\text{Solución:} \quad b_h = A t_h' / t_h' t_h \quad (1.40)$$

Como se desea que los vectores  $t_h$  sean ortogonales para remover los problemas de colinealidad que son presentados en el método de MCI; los vectores ortogonales  $t_h$  pueden ser obtenidos para formar un nuevo modelo para  $A$  basado en la variable latente  $t_h$ . El nuevo modelo se obtiene en la ecuación 1.39, en donde  $b_h$  es el vector de carga  $n \times 1$  para MCP. A diferencia del primer vector de carga para RCP,  $p_1$ , el primer vector de carga de MCP,  $b_1$ , no explica la máxima varianza en el espectro de calibración.

- PASO 6: Cálculo de los residuales en A y c.

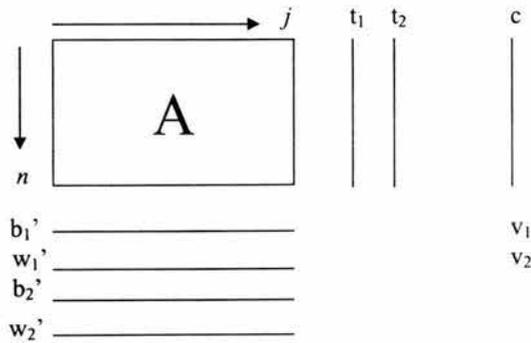
$$\text{Espectros Residuales:} \quad E_A = A - t_h b_h' \quad (1.41)$$

$$\text{Concentraciones Residuales:} \quad e_c = c - v_h t_h' \quad (1.42)$$

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

- PASO 7: Incrementar  $h$ , sustituyendo  $E_A$  por  $A$  y  $e_c$  por  $c$  en el paso 2 y continuar para obtener tantos factores como sea necesario para optimizar el modelo.

Los dos primeros factores obtenidos por el método de MCP también pueden ilustrarse gráficamente (como en ACP), tal y como se muestra en la Figura 1.3:



**Figura 1.3:** Representación gráfica de los dos primeros factores obtenidos por el método de MCP. En MCP, la matriz  $T = [t_1 | t_2]$ , además se debe cumplir que:  $t_1' t_2 = 0$ ,  $w_1' w_2 = 0$  y  $p_1' p_2 \neq 0$ .

## B) ETAPA DE PREDICCIÓN

En esta etapa, se estima la concentración del componente de interés a partir del espectro obtenido para una muestra problema, aplicando cualquiera de los dos métodos de predicción establecidos para MCP que se describen a continuación:

**B.1) MÉTODO 1** <sup>(15, 16)</sup>:

El primer método involucra el cálculo de las intensidades espectrales ( $t_h$ ) del espectro de la muestra problema en el nuevo sistema de coordenadas obtenido durante la etapa de calibración por MCP. Después, estas intensidades son relacionadas a la concentración del componente de interés utilizando una ecuación parecida a la utilizada en el método de MCI.

Así, el principio básico del Método 1 es la generación de "Residuales Espectrales", que no es más que minimizar la suma de cuadrados de las diferencias entre los valores espectrales estimados por el modelo y los valores espectrales medidos experimentalmente. Tales valores espectrales se refieren a los valores centrados, o los valores de residuales provenientes de un análisis anterior.

De esta forma el Método 1 va relacionando 2 o más bloques de datos entre ellos mismos hasta obtener la menor suma de cuadrados.

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

- PASO 2: Cálculo de la variable latente  $t_h$ :

$$t_h = a w_h \tag{1.43}$$

- PASO 3: Cálculo de la concentración:

$$c_h = c_{h-1} + v_h t_h \tag{1.44}$$

- PASO 4: Cálculo de residuales:

$$e_h = e_{h-1} - t_h b_h' \tag{1.45}$$

- PASO 5: Incremente h, sustituir  $e_h$  por "a" y repetir desde el paso 2, hasta calcular el número óptimo de factores empleados en la calibración.

Se debe hacer notar que en el algoritmo de predicción por el método 1,  $w_h^*$ ,  $v_h$  y  $b_h$  provienen de la etapa de calibración por MCP, así también se emplea el valor de concentración promedio del componente presente en la calibración.

## B.2) MÉTODO 2 <sup>(1, 20)</sup>:

El segundo método para poder predecir la concentración del componente de interés a partir del espectro obtenido para una muestra problema, involucra el cálculo y uso del vector del coeficiente de regresión final,  $\mathbf{k}$ , el cual tiene las mismas dimensiones que un espectro normal y puede calcularse de diversas formas. Una de estas formas es aplicando el siguiente algoritmo de predicción:

- PASO 1: Después de la etapa de calibración para MCP, calcular el coeficiente de regresión final  $\mathbf{k}$ :

$$\mathbf{k} = \mathbf{W} (\mathbf{B}' \mathbf{W})^{-1} \mathbf{v}' \quad (1.46)$$

- PASO 2: Cálculo del residual  $\mathbf{e}_c$ :

$$\mathbf{e}_c = \mathbf{c}_0 - \mathbf{a}_0 \mathbf{k} \quad (1.47)$$

- PASO 3: Cálculo de la concentración:

$$\mathbf{c} = \mathbf{a} \mathbf{k} + \mathbf{e}_c \quad (1.48)$$

Se debe hacer notar que en el algoritmo de predicción por el Método 2, los valores de  $\mathbf{a}$  no son centrados, mientras que  $\mathbf{W}$  y  $\mathbf{B}$  son las matrices obtenidas en la etapa de calibración que contienen todos los vectores  $w_h$  y  $b_h$  obtenidos hasta el número de factores óptimo para el modelo;  $\mathbf{v}$  es el vector obtenido utilizando todos los  $v_h$  óptimos calculados para el modelo y  $\mathbf{a}_0$  es el vector de la media del espectro obtenida en la etapa de calibración.

### 1.1.4 PRINCIPALES VENTAJAS DEL MÉTODO DE MCP CONTRA EL MÉTODO DE RCP <sup>(2, 19, 24)</sup>

La Regresión del Componente Principal y el método de Mínimos Cuadrados Parciales utilizan diferentes caminos para obtener ó determinar los valores de los vectores  $\mathbf{t}_h$  y la matriz  $\mathbf{T}$ . Específicamente, RCP sólo utiliza los espectros (matriz  $\mathbf{A}$ ) para determinar la combinación lineal entre las variables, así mismo, las concentraciones sólo se utilizan cuando se desea estimar la matriz de los coeficientes de regresión, pero no se utilizan para estimar los vectores  $\mathbf{t}_h$ . Una desventaja potencial del método de RCP al obtener los vectores  $\mathbf{t}_h$  y la matriz  $\mathbf{T}$  de esta forma es que las variaciones en la matriz  $\mathbf{A}$  que no están correlacionadas con la concentración del ó los componentes de interés son utilizados para encontrar los vectores  $\mathbf{t}_h$ .

Algunas veces puede ser que la varianza que está relacionada a la concentración sea solo una muy pequeña porción de toda la varianza total presente. Si este es el caso, el método de RCP no determinará adecuadamente las combinaciones lineales entre las variables debido a que no encontrará esas pequeñas variaciones para diferenciar las concentraciones del o los componentes de interés del resto de los componentes y de la variancia total presente en las muestras.

Con el método de MCP, se utilizan tanto las concentraciones como los espectros o absorbancias para poder obtener los vectores  $\mathbf{t}_h$ , reduciendo el impacto sobre el modelo de las variaciones de la matriz  $\mathbf{A}$  que no tienen correlación con la respuesta, resolviendo de esta manera el potencial problema descrito para RCP. En resumen, RCP descompone los espectros basándose en la obtención de los vectores  $\mathbf{t}_h$  y  $\mathbf{p}_h$  a partir de varianzas máximas, mientras que la descomposición por MCP es a través de varianzas máximas y concentraciones. Ambos métodos se han empleado exitosamente en el análisis cuantitativo, a pesar de que los argumentos en la literatura generalmente sugieren que el método de MCP proporciona mejores resultados. Sin embargo, mucha gente está más familiarizada con el RCP por ser más fácil de entender.

### 1.1.5 VALIDACIÓN DEL MODELO DE CALIBRACIÓN <sup>(3, 22)</sup>

Uno de los aspectos más importantes de los métodos de calibración multivariante es el modelo de validación. Sin embargo, se debe hacer notar que existe una gran diferencia entre “validar el modelo” que se está utilizando y “validar el método analítico”, ya que en el primer caso solo se demuestra que las condiciones establecidas para realizar los métodos de MCP y RCP son adecuadas, mientras que en el segundo caso, se demuestra que el método analítico desarrollado es confiable para su aplicación.

En la calibración multivariante, el modelo de validación debe involucrar principalmente la determinación de los siguientes parámetros:

- El número óptimo de factores que deben ser incluidos en el modelo.
- La habilidad para predecir muestras de concentración desconocida.
- El grado en el cual las soluciones que conforman la curva de calibración conforman el total de muestras representativas para el modelo.

Sin embargo, algunos otros parámetros pueden también incluirse en esta lista como:

- La detección de muestras desechables (conocidas como “outliers”).
- La selección de variables (longitudes de onda).
- La forma en la que se realizó el pretratamiento de los datos.

Una vez que se cumple con estos parámetros y el modelo ha sido establecido, entonces se puede hablar de “validar” en el sentido de realizar la validación del método analítico.

### 1.1.5.1 VALIDACIÓN CRUZADA

Una herramienta útil utilizada en los métodos de calibración multivariante es la “Validación Cruzada”. En este tipo de validación, los datos obtenidos de la calibración original son divididos en dos partes, una de las cuales contiene al número de muestras y la otra parte solo contiene una o varias muestras separadas, es decir, se separan los datos espectrales de una o varias muestras de la calibración y posteriormente con los datos espectrales de las muestras restantes se realiza una calibración la cual se utiliza para estimar posteriormente la concentración de la ó las muestras que fueron separadas, posteriormente se separan los datos de otra u otras muestras y se incorporan los datos de las primeras muestras separadas a la calibración para repetir el proceso hasta aplicarse a cada una de las muestras de la calibración <sup>(3, 19, 17, 22)</sup>.

Así, la validación cruzada tiene dos propósitos:

1. Se puede emplear como un método para determinar la cantidad suficiente de muestras que pueden ser incluidas en la calibración.
2. Para conocer la capacidad predictiva del modelo.

Se debe hacer notar que en la validación cruzada el dejar una o más muestras fuera de la calibración depende del número de replicas preparadas, es decir, si las muestras de la calibración se preparan por duplicado, se deben dejar fuera los datos espectrales de la muestra y su réplica; si se preparan por triplicado, se dejan fuera las tres muestras y así sucesivamente. De no realizar la validación cruzada de esta forma, se pueden cometer errores al sobreestimar la capacidad predictiva del modelo <sup>(2, 3)</sup>.

Aplicando la validación cruzada se pueden utilizar varias gráficas y pruebas estadísticas para realizar la validación del modelo. Entre las principales se tienen <sup>(2, 15, 16)</sup>.

- Gráfico del valor de la Suma de Cuadrados de los Errores Residuales de Predicción (SCERP) contra el número de factores calculados.
- Gráfico de Concentración estimada contra Concentración real.
- Gráfico de Porcentaje de desviación de la concentración de cada muestra de la calibración.
- Gráfico de concentración residual contra la concentración estimada de cada muestra de la calibración.
- Gráfico del SCERP contra la cantidad de longitudes de onda utilizadas.
- Gráfico del SCERP contra el número de muestras utilizadas en la calibración.

### **1.1.5.2 SELECCIÓN DEL NÚMERO ÓPTIMO DE FACTORES: ANÁLISIS DE SCERP**

Una de las tareas más difícil en la aplicación de los métodos de MCP y RCP es la determinación del número óptimo de factores para modelar los datos. Si se utilizan muy pocos factores, la predicción de las concentraciones son pobres al no analizar todas las variaciones espectrales importantes. Conforme se incorporan más vectores al estudio, estos se ordenan en grado de importancia para el modelo (ya sea varianza en ACP o ponderación de concentración en MCP).

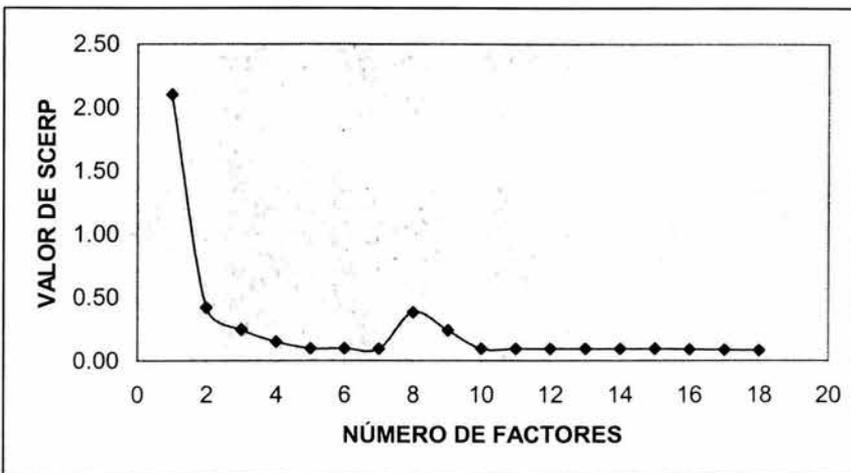
Eventualmente, los vectores comenzarán a modelar el ruido del sistema (el cual generalmente contribuye en menor cantidad a los datos); si los vectores “ruido” se incluyen en la calibración, el error comenzará a incrementarse. La descomposición espectral con tales métodos y la correcta selección del número de factores, es un camino muy efectivo para eliminar el ruido.

La manera más efectiva para establecer el número óptimo de factores, es la aplicación del SCERP. En este método se utiliza la validación cruzada y se aplica la siguiente fórmula <sup>(16)</sup>:

$$\text{SCERP} = \sum_{i=1}^n (c_{i \text{ est}} - c_{i \text{ real}})^2 \quad (1.49)$$

donde  $n$  es el número de muestras de la calibración,  $c_{i \text{ real}}$  es la concentración real y  $c_{i \text{ est}}$  es la concentración estimada al utilizar la validación cruzada.

Los valores de SCERP son un indicador de que tan bien se están estimando las concentraciones de las soluciones de la calibración con cada número de factores. En la Figura 1.4 se muestra una gráfica típica del SCERP contra el número de factores, donde se puede observar que conforme aumenta el número de factores, disminuye el error en la predicción, alcanza un mínimo en un punto determinado y comienza a ascender nuevamente al integrar al modelo vectores ruido.

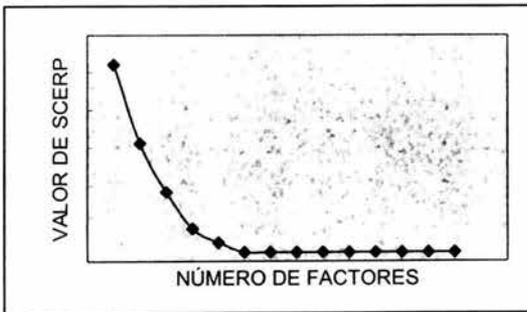


**Figura 1.4:** Gráfico del valor de SCERP contra el número de factores. En este gráfico, el valor mínimo del SCERP se alcanza cuando el número de factores es igual a 7, posteriormente en el número de factor igual a 10 ya puede existir un sobreajuste <sup>(19)</sup>.

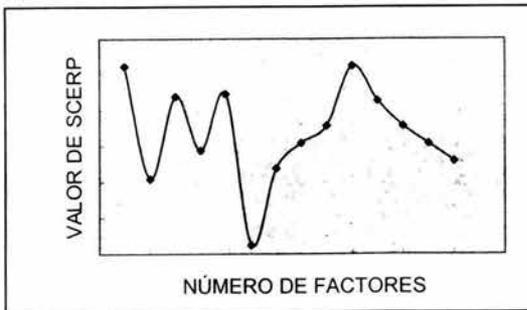
El incluir vectores ruido en la matriz de calibración se conoce como “sobreajuste” (overfitting). Por ello, es recomendable elegir el menor número de factores donde el valor de SCERP alcance el mínimo para evitar el problema del sobreajuste <sup>(17, 19)</sup>.

El realizar el Gráfico del valor de SCERP contra el número de factores también da una idea para saber si el modelo utilizado es adecuado o no, es decir, para saber si el algoritmo empleado es capaz de modelar la variación presente en los datos para poder estimar las concentraciones de las muestras. Si el algoritmo es adecuado, se observará en el gráfico de SCERP, un comportamiento similar al descrito en la Figuras 1.5 (a), mientras que si el algoritmo empleado no puede modelar los datos, se observará un comportamiento similar al descrito en la Figura 1.5 (b).

(a)



(b)



**Figura 1.5:** Posibles comportamientos observados en el

Gráfico del valor de SCERP contra el número de factores:

- (a) Comportamiento más comúnmente observado;
- (b) Comportamiento que indica problemas con los datos ó con el modelo <sup>(2)</sup>.

Cabe mencionar que otros autores <sup>(2, 3, 22)</sup>, aplican otras herramientas estadísticas para determinar el número óptimo de factores, como es el caso de la Raíz del Cuadrado Medio del Error de Predicción (RCMEP):

$$\text{RCMEP} = \left( \sum_{i=1}^n (c_{i \text{ real}} - c_{i \text{ est}})^2 / n \right)^{1/2} \quad (1.50)$$

Si bien existe diferencia entre los valores obtenidos por el RCMEP y por el análisis del SCERP, su aplicación e interpretación es la misma para ambas herramientas estadísticas, determinando el mismo número óptimo de factores que deben incluirse en el modelo.

### 1.1.5.3 CURVA DE CALIBRACIÓN

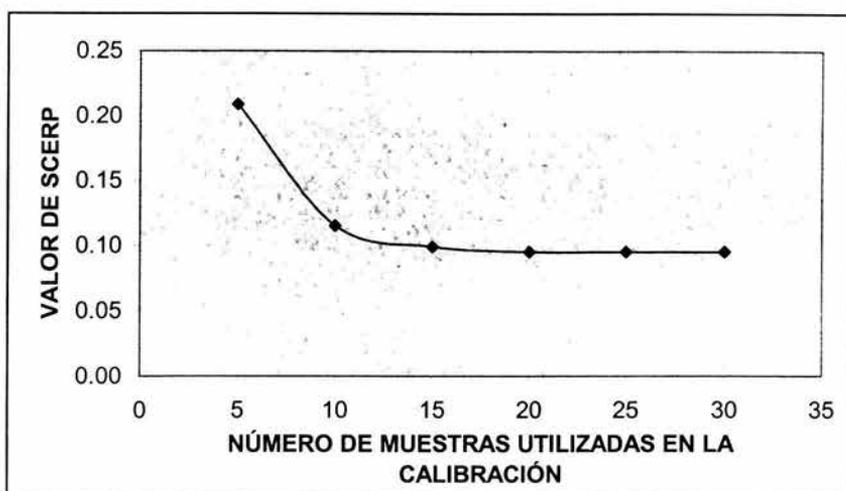
Un aspecto importante en la obtención de buenos resultados, es el diseño de las muestras o conjunto de soluciones patrón para la calibración.

Se puede construir un buen modelo de predicción para los métodos de MCP y RCP en la medida que se cumpla con las siguientes condiciones <sup>(19, 24)</sup>:

- Las disoluciones o muestras preparadas debe contener tantas variables como fuentes de variación relevantes que pueden influir sobre las variables seleccionadas de la matriz **A**. Así, debe haber por lo menos tantas muestras como componentes de interés y generalmente muchas más que estos.
- Las disoluciones o muestras preparadas deberán cubrir todo el intervalo de concentraciones esperadas para las muestras problema.
- Las variables seleccionadas para la matriz **A**, deben contener varianza correlacionada con todas y cada una de las variables de la matriz **c**.
- Las variables seleccionadas en la matriz **A**, deben estar poco correlacionadas entre sí.

- Las concentraciones de los componentes de interés deben estar poco correlacionadas entre sí, además se debe evitar que las concentraciones de los componentes de interés sean colineales, es decir, que la concentración de uno de los componentes aumente mientras que las del otro disminuye.

Una forma para poder determinar cuantas muestras pueden ser preparadas o incluidas en la curva de calibración, es el realizar el gráfico de los valores de SCERP contra el número de muestras incluidas en la curva de calibración (Figura 1.6). Esta gráfica nos da un indicio de con cuantas muestras el modelo puede proporcionar una buena capacidad predictiva.

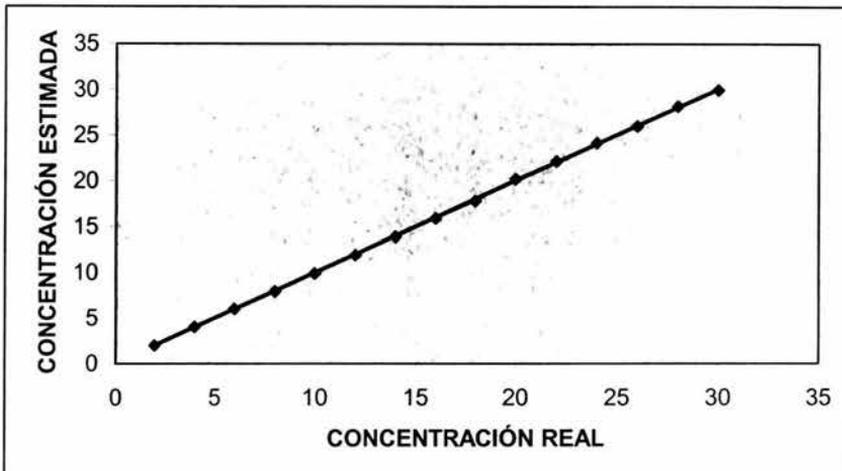


**Figura 1.6:** Gráfico del valor de SCERP contra el Número de muestras utilizadas en la calibración. En este gráfico, el valor del SCERP se debe estimar cuando el número de factores es el óptimo.

Como se muestra en la Figura 1.6, a medida que se incluyen más muestras en la curva de calibración, el valor del SCERP disminuye hasta un punto en donde la diferencia entre cada valor del SCERP es muy pequeña. Para poder elegir el número de muestras a incluir en la curva de calibración, se debe buscar un equilibrio razonable entre el mínimo

valor del SCERP y la mínima cantidad de muestras que puedan proporcionar una buena capacidad predictiva al modelo.

Una vez que se han establecido el número óptimo de factores y el total de las muestras que deben ser incluidas en la curva de calibración, una forma de demostrar la capacidad predictiva del modelo es realizar el gráfico de concentración estimada contra la concentración real, en el cual se espera que exista una relación lineal entre las concentraciones real y estimada, indicando de esta forma, que no existen problemas con el modelo (figura 1.7) <sup>(2)</sup>.

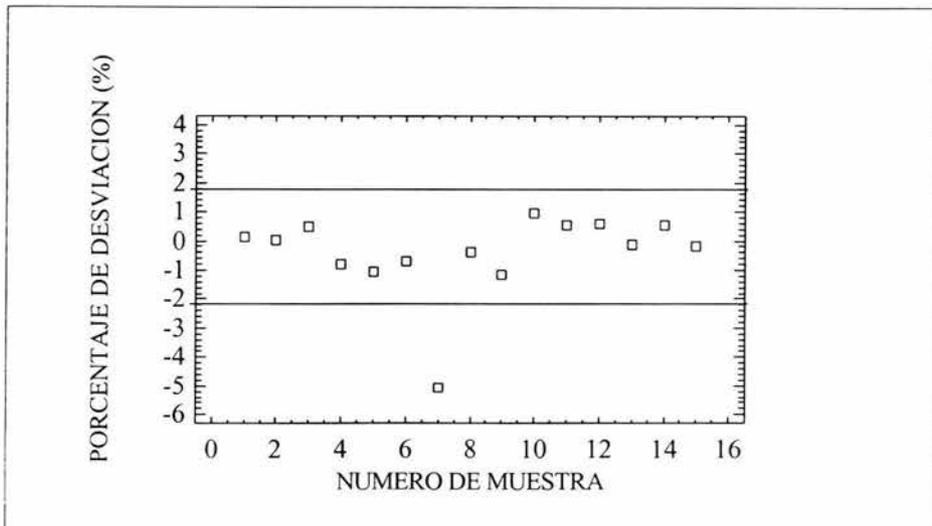


**Figura 1.7:** Gráfico de Concentración estimada contra la Concentración real. Las concentraciones estimadas deben obtenerse utilizando la validación cruzada y se debe cumplir que: el intercepto = 0 y la pendiente = 1 <sup>(2)</sup>.

### 1.1.5.4 DETECCIÓN DE MUESTRAS DESECHABLES <sup>(2, 19)</sup>

La detección de muestras desechables resulta tan importante como el diseño de las disoluciones patrón ó como la elección del número de factores óptimos en los métodos de MCP y RCP, ya que si una o más muestras son erróneas, darán lugar a enormes errores en la calibración y, finalmente, falsos resultados en la predicción de las concentraciones de los componentes de interés en las muestras reales o muestras problema.

Una o varias de las muestras de la calibración pueden tener su valor de concentración incorrecto debido a que las muestras pudieron ser mal preparadas ó que las muestras tuvieran una manipulación inadecuada durante la medición del espectro u otros errores relacionados.

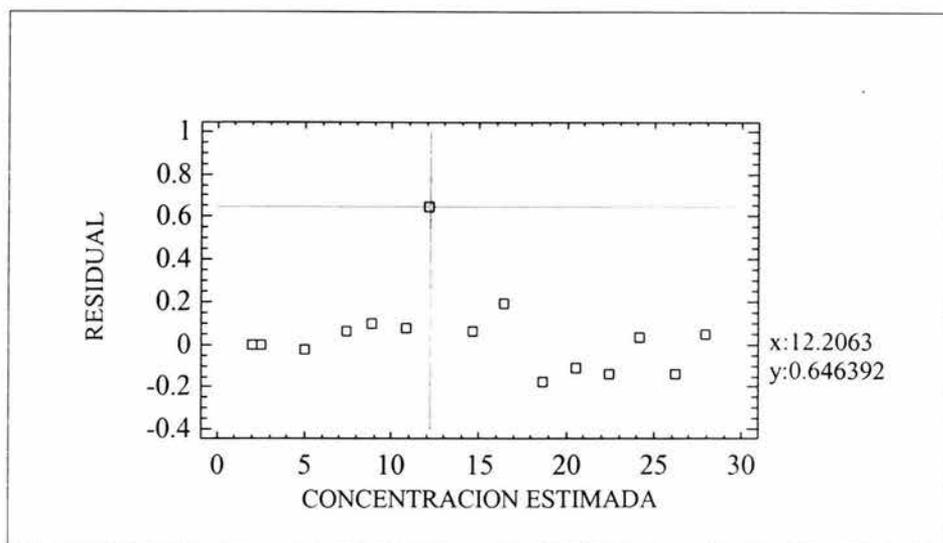


**Figura 1.8:** Gráfico de porcentaje de desviación de cada muestra de la calibración. En este gráfico, si los valores de la mayoría de las muestras deben estar comprendidos dentro de un intervalo de error establecido ( $\pm 2\%$ ), entonces la muestra 7 es “desechable”.

Una poderosa herramienta para la detección de muestras desechables es la utilización de la validación cruzada. Así, tras realizar este procedimiento, se puede determinar el porcentaje de desviación de la concentración estimada con respecto a su concentración real:

$$\left( \frac{c_{\text{est}} - c_{\text{real}}}{c_{\text{real}}} \right) \times 100 \quad (1.51)$$

de esta manera, para determinar si una o más de estas muestras son desechables, se debe realizar el gráfico descrito en la Figura 1.8.



**Figura 1.9:** Gráfico de concentración residual contra concentración estimada de cada muestra de la calibración. En este gráfico, los datos deben agruparse cerca del valor de 0. Así, el valor marcado con una X puede ser considerado como desechable<sup>(2)</sup>.

Los gráficos descritos en la Figura 1.7 y 1.9 también pueden utilizarse para determinar si una o más muestras son desechables; sin embargo se debe tener en cuenta que

en estos gráficos no es tan fácil el determinar muestras desechables como el Gráfico de porcentaje de desviación de cada muestra de la calibración (Figura 1.8).

### 1.1.5.5 SELECCIÓN DE LA REGIÓN ESPECTRAL <sup>(1)</sup>

Una de las ventajas de utilizar los métodos de MCP y RCP es que se puede utilizar el espectro completo para la construcción del modelo con sólo el conocimiento de los espectros de los componentes puros de interés. En estos casos, el número de longitudes de onda puede ser muy grande y el tiempo para realizar los cálculos de la calibración puede ser largo y laborioso, además, ciertas longitudes de onda pueden contener un gran valor de ruido espectral o simplemente no contienen información relevante que pueda ayudar a construir un modelo robusto.

Por tal razón, se pueden escoger inteligentemente sólo un pequeño número de variables (longitudes de onda) que aseguren una buena capacidad predictiva, además de que puede construirse un modelo más fácil de interpretar. Sin embargo, pocos procedimientos empíricos son apropiados para la selección o eliminación de longitudes de onda para el método de MCP.

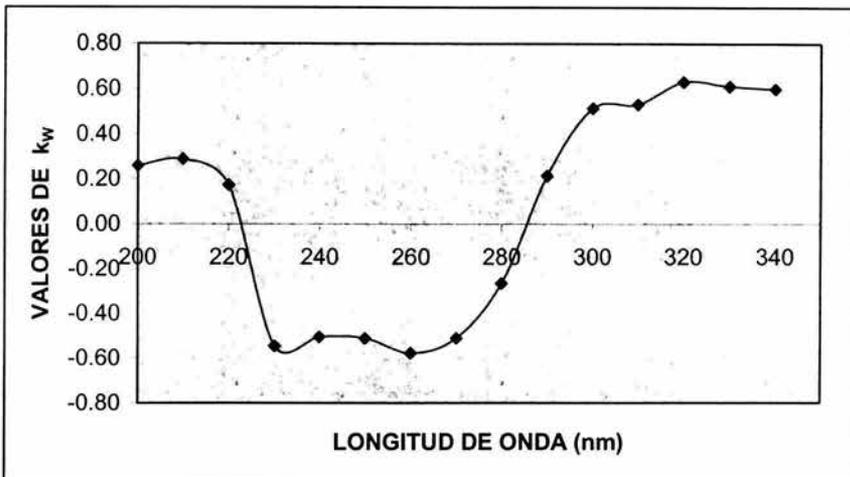
A continuación se explica un sencillo procedimiento que puede ser utilizado para seleccionar o eliminar algunas longitudes de onda, el cual está basado en la obtención del coeficiente de regresión final,  $k_w$ :

1. Realizar el algoritmo de calibración y predicción para MCP con los datos de la calibración “estandarizados”. Posteriormente determinar el número óptimo de factores a incluir en el modelo por medio de la validación cruzada y el análisis de SCERP. La ecuación utilizada para la estandarización de los datos es:

$$(a_i - \bar{a}) / s^2 \quad (1.52)$$

donde  $a_i$  es cada uno de los valores espectrales,  $\bar{a}$  es la media del espectro de calibración y  $s$  es la desviación estándar.

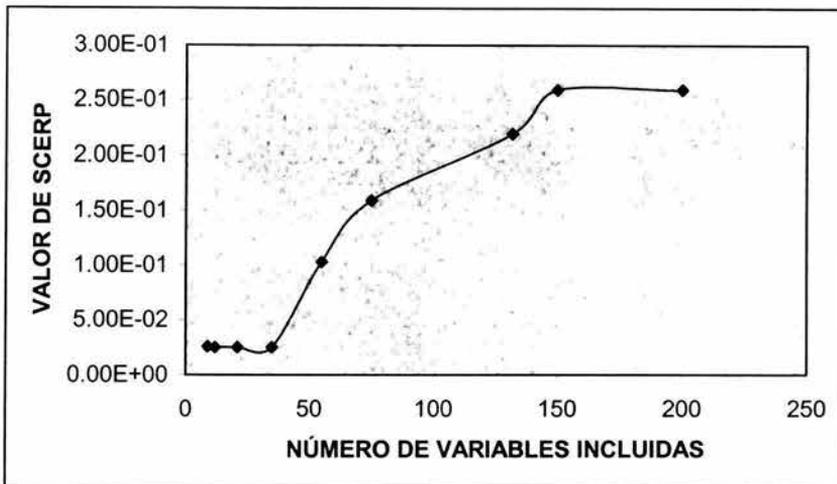
2. Realizar el Gráfico de coeficiente de regresión final estandarizado ( $k_w$ ) contra la Longitud de Onda (Figura 1.10).



**Figura 1.10:** Gráfico de Coeficiente de Regresión final  $k_w$  contra la Longitud de onda para un componente A. En este gráfico, las longitudes de onda comprendidas entre 230-280 nm pueden ser eliminadas del modelo de MCP <sup>(2)</sup>.

3. Seleccionar la región de longitudes de onda que tengan valores de  $k_w$  equidistantes entre sí, o eliminar la región de longitudes de onda que presenten valores de  $k_w$  negativo grandes.
4. Realizar el algoritmo de calibración y predicción para MCP con los datos centrados y con las longitudes de onda seleccionadas.

5. Determinar el número óptimo de factores utilizando la validación cruzada y el análisis de SCERP.
6. Comparar el número óptimo de factores obtenido en el paso 1 con el del paso 5. El número óptimo de longitudes de onda se determina cuando se obtiene el valor más pequeño de SCERP con el menor número de factores calculados (Figura 1.11).



**Figura 1.11:** Gráfico del valor de SCERP contra el número de variables incluidas en el modelo. En este gráfico el número de factores óptimos es el mismo utilizado para cada conjunto de variables utilizadas <sup>(2)</sup>.

De esta forma, se puede elaborar un buen modelo de predicción para MCP utilizando solo un pequeño número de longitudes de onda, eliminando las variables que no son relevantes para el modelo.

## 1.2 CARACTERÍSTICAS DEL ACETAMINOFÉN Y DEL NAPROXENO

El Acetaminofén es un fármaco eficaz que puede utilizarse en vez de la aspirina como analgésico-antipirético; sin embargo, es poca su actividad antiinflamatoria y por ello no es útil para combatir trastornos inflamatorios

El Naproxeno, pertenece al grupo de los antiinflamatorios no esteroides derivados del ácido propiónico. Las indicaciones aprobadas para utilizar el Naproxeno incluyen el tratamiento sintomático de artritis reumatoide y osteoartritis; también se le usa como analgésico, contra tendinitis y en la dismenorrea primaria.

### 1.2.1 ACETAMINOFÉN: DESCRIPCIÓN Y PROPIEDADES FÍSICAS <sup>(5)</sup>

NOMBRE QUÍMICO:

N-(4-Hidroxifenil) acetamida; 4'-hidroxiacetanilida.

SINÓNIMOS:

Paracetamol, N-acetil-p-aminofenol.

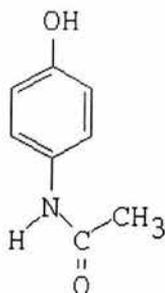
FÓRMULA CONDENSADA:

$C_8H_9NO_2$

PESO MOLECULAR:

151.2 g/mol.

ESTRUCTURA QUÍMICA:



DESCRIPCIÓN:

Cristales Blancos o polvo cristalino.

SOLUBILIDAD:

Soluble en agua, metanol, dimetilformamida y etanol. Muy poco soluble en cloroformo; prácticamente insoluble en éter y benceno.

RANGO DE FUSIÓN:

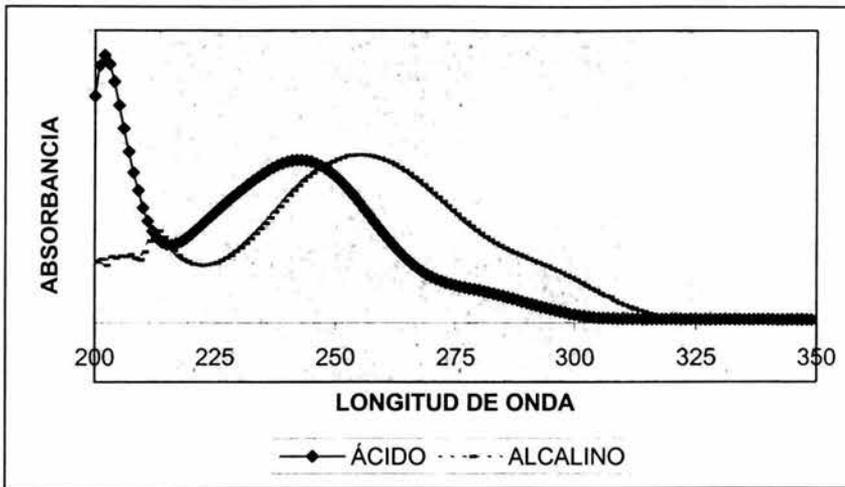
168-172 °C.

NATURALEZA QUÍMICA Y CONSTANTE DE DISOCIACIÓN:

Ácida, con un valor de pKa de 9.5 (25°C).

ESPECTRO ULTRAVIOLETA:

En solución acuosa ácida presenta un pico a 245 nm ( $A_{\lambda}^1=668$ ); en solución acuosa alcalina presenta un pico a 257 nm ( $A_{\lambda}^1=715$ ).



**Figura 1.12:** Espectro Ultravioleta de APAP en solución ácida (—) y en solución alcalina (-----).

## 1.2.2 NAPROXENO: DESCRIPCIÓN Y PROPIEDADES FÍSICAS <sup>(5)</sup>

NOMBRE QUÍMICO:

Ácido (+)-2-(6-Metoxi-2-naftil) propiónico.

SINÓNIMOS:

Equiproxén, Laser, Naproxén, Proxén, Xenar.

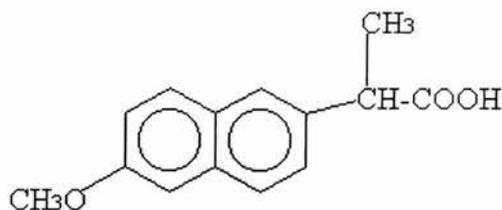
FÓRMULA CONDENSADA:

$C_{14}H_{14}O_3$

PESO MOLECULAR:

230.3 g/mol.

ESTRUCTURA QUÍMICA:



DESCRIPCIÓN:

Polvo blanco cristalino.

SOLUBILIDAD:

Soluble en etanol y éter. Ligeramente soluble en cloroformo; prácticamente insoluble en agua.

PUNTO DE FUSIÓN:

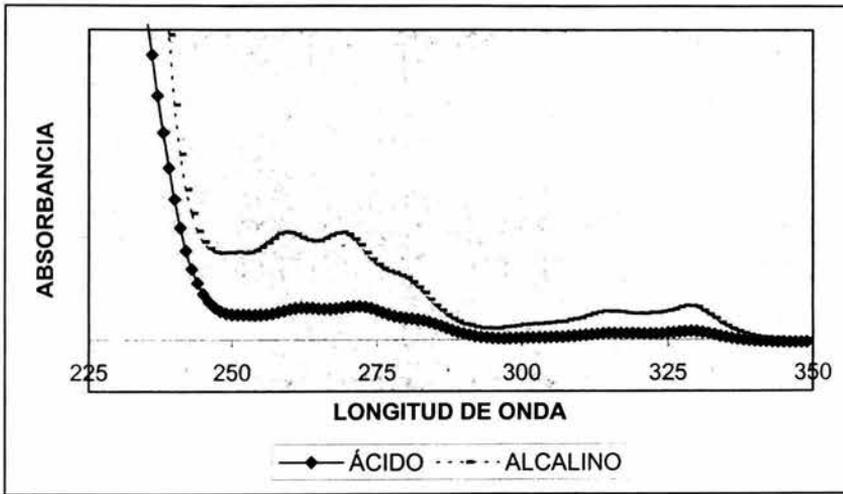
156 °C.

NATURALEZA QUÍMICA Y CONSTANTE DE DISOCIACIÓN:

Ácida, con un valor de pKa de 4.2 (25°C).

ESPECTRO ULTRAVIOLETA:

En solución acuosa ácida presenta picos a 262 nm ( $A_{\epsilon}=208$ ), a 272 nm ( $A_{\epsilon}=215$ ), a 315 nm ( $A_{\epsilon}=52$ ) y a 328 nm ( $A_{\epsilon}=63$ ); en solución acuosa alcalina presenta picos a 261 nm ( $A_{\epsilon}=218$ ) y a 271 nm ( $A_{\epsilon}=218$ ).



**Figura 1.13:** Espectro Ultravioleta de NAP en solución ácida (—) y en solución alcalina (-----).

### 1.2.3 INDICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA MEZCLA APAP-NAP

Analgésico, antipirético y antiinflamatorio no esteroide. Para dolores osteomusculares moderados, cefaleas, procesos dentales y traumáticos, en postoperatorio y posparto. Como auxiliar en el tratamiento sintomático de dolor y fiebre, como complemento de la terapia con antibióticos en infecciones de las vías respiratorias.

### 1.2.4 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA <sup>(5, 6, 12)</sup>

#### NAPROXENO:

El Naproxeno es un compuesto no esteroide que posee acción analgésica, antiinflamatoria y antipirética y puede ofrecer ventajas significativas sobre el Ácido

Acetilsalicílico, la indometacina y los derivados pirazolónicos para muchos pacientes, ya que suele ser mejor tolerado.

**Absorción:** El Naproxeno se absorbe completamente, cuando se administra por vía oral. La presencia de alimento en el estómago influye sobre la rapidez de la absorción, pero no sobre el grado. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en 2 a 4 horas. También se absorbe por vía rectal, pero las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan con más lentitud. La vida media plasmática es de alrededor de 14 horas.

**Distribución:** El Naproxeno se une casi por completo (99%) a las proteínas plasmáticas, atraviesa la placenta y aparece en la leche de mujeres que amamantan en alrededor de 1% de la concentración plasmática materna.

**Eliminación:** Los productos de biotransformación del Naproxeno se excretan casi por completo en la orina. Cerca del 30% sufre 6-desmetilación y la mayor parte de este producto de biotransformación, así como el mismo Naproxeno, se excretan como glucurónidos o como conjugados.

**Dosis:** Usualmente de 0.5 a 1 g al día.

## **ACETAMINOFÉN:**

El Acetaminofén tiene acción analgésica-antipirética efectiva, que no difieren en forma significativa de los del Ácido Acetilsalicílico, sin embargo, tiene efectos antiinflamatorios débiles.

**Absorción:** el Acetaminofén se absorbe con rapidez y casi por completo en el tubo gastrointestinal. Su concentración plasmática llega a su máximo en 30 a 60 minutos y la vida media plasmática es de alrededor de 2 horas después de la dosis terapéutica.

**Distribución:** la distribución del paracetamol es bastante uniforme en la mayoría de los líquidos orgánicos, la unión del Acetaminofén con las proteínas plasmáticas es variable, solo un 20 a 50%.

Eliminación: puede recuperarse de un 90 a un 100% en la orina en el primer día, principalmente después de la conjugación hepática con ácido glucurónico (cerca del 60%), ácido sulfúrico (alrededor del 35%) o cisteína (cerca del 3%); también se detectan pequeñas cantidades de metabolitos hidroxilados y desacetilados. La asociación del Naproxén con el Acetaminofén ha demostrado tener un efecto analgésico y antipirético más rápido y prolongado.

Dosis: Arriba de 4 g al día.

## 1.2.5 MONOGRAFÍAS DE PERFIL DE DISOLUCIÓN

La combinación del Acetaminofén y el Naproxeno se distribuye comercialmente en tabletas que contienen 300 mg de APAP y 250 mg de NAP. Sin embargo, a pesar de existir varias marcas de tabletas en el mercado, no existen datos reportados ni en la Farmacopea Americana (USP) ni la Farmacopea Mexicana (FEUM) sobre las condiciones de los perfiles de disolución de tabletas que contengan de manera simultánea estos dos principios activos, solo encontrándose las condiciones para tabletas de cada principio activo por separado. <sup>(7, 26)</sup>

### 1.2.5.1 TABLETAS DE ACETAMINOFÉN <sup>(7)</sup>

- Condiciones: Aparato 2 de la USP a 50 rpm.
- Medio de Disolución: 900 ml de la Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 5.8, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Tiempos de Muestreo: 10, 15, 20, 30 y 45 minutos.
- Análisis: Método espectrofotométrico UV a 243 nm.

### 1.2.5.2 TABLETAS DE NAPROXENO <sup>(7)</sup>

- Condiciones: Aparato 2 de la USP a 50 rpm.
- Medio de Disolución: 900 ml de la Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Tiempos de Muestreo: 10, 20, 30, 45 y 60 minutos.
- Análisis: Método espectrofotométrico UV a 332 nm.

## 1.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Para el desarrollo químico-farmacéutico de un nuevo medicamento es imprescindible la utilización de un método analítico que permita cuantificar el producto mayoritario en forma de materia prima, como ingrediente activo de una formulación o para evaluar algunas características de desempeño. Para asegurar efectividad y confiabilidad, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación <sup>(4)</sup>.

La validación de métodos analíticos puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por medio de estudios de laboratorios, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en todos los casos, en términos de parámetros o propiedades analíticas, que proporcionan una medida del comportamiento del método analítico <sup>(17, 25, 26)</sup>.

Mediante un proceso de validación, ya sea de carácter prospectivo, retrospectivo, introspectivo o de revalidación, se comprueba si el método analítico es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas para poder resolver un problema analítico en particular. Así mismo, la validación proporciona una idea de las capacidades y limitaciones que posee un método analítico cuando se utiliza para el análisis rutinario.

### 1.3.1 TIPOS DE MÉTODOS ANALÍTICOS A SER VALIDADOS <sup>(11, 26)</sup>

A partir del criterio de que no existe un modelo único para validar y de que existen una gran variedad de métodos analíticos, la validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con alguna de las siguientes categorías a la que pertenezca:

- Categoría I: Métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios o principales de fármacos a granel ó principios activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.
- Categoría II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en el producto farmacéutico terminado. Estos métodos incluyen ensayos cuantitativos o pruebas límite.
- Categoría III: Métodos analíticos para la determinación de características de desempeño (disolución, medicamentos de liberación, etc.).
- Categoría IV: Pruebas de identificación.

Características a Evaluar	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantificación	Límite		
Precisión	+	+	*	*	-
Exactitud	+	+	-	+	-
Especificidad	+	+	+	*	+
Límite de Detección	-	-	+	*	-
Límite de Cuantificación	-	+	-	*	-
Linealidad	+	+	-	*	-

**Tabla 1.1:** Características mínimas consideradas para validar un método analítico según su tipo. En esta tabla: (+) debe ser evaluado, (-) no debe ser evaluado y (\*) Puede ser evaluado, dependiendo de los requerimientos del método.

De esta forma, las características que deben evaluarse durante la validación de los métodos analíticos dependen tanto del tipo de método analítico, como del uso que se pretende dar a éstos.

## **1.3.2 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO**

El procedimiento o método analítico es la forma en la que se debe llevar a cabo el análisis. En él, se debe describir detalladamente los pasos necesarios para realizar cada ensayo analítico. Entre estos pasos se deben incluir algunos tales como: la muestra, las soluciones estándares y la preparación de soluciones, aparatos utilizados, generación de la curva de calibración, uso de la fórmula para el cálculo de las concentraciones, etc <sup>(13)</sup>.

## **1.3.3 LINEALIDAD**

### **1.3.3.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA** (4, 11, 14, 23, 25)

La linealidad del sistema es la capacidad del mismo para asegurar que las respuestas analíticas, las cuales se obtienen directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son directamente proporcionales a la concentración del analito de interés dentro de un rango determinado.

El rango es el intervalo comprendido entre los niveles superior e inferior de concentración del analito de interés, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal, bajo las condiciones establecidas.

Para realizar la linealidad del sistema, se debe construir una curva de calibración conteniendo cuando menos 5 niveles de diferente concentración por duplicado, preparadas a partir de una misma solución patrón.

La linealidad del sistema debe ser evaluada por una inspección visual en un gráfico de la respuesta analítica como una función de la concentración del analito, en donde se debe apreciar la relación lineal. Así mismo, se deben considerar el coeficiente de correlación ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), la ordenada al origen ( $b$ ) y el coeficiente de variación global, (CV).

### 1.3.3.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO <sup>(11, 14, 23, 25)</sup>

La linealidad del método es la capacidad del mismo para asegurar que la relación establecida entre la concentración real ó cantidad adicionada del analito y la concentración estimada ó la cantidad recuperada son directamente proporcionales y lineal en un rango de concentraciones determinadas.

Para realizar la linealidad del método, se debe construir una calibración con un mínimo de 5 muestras de placebos cargados, con tres ensayos cada una.

La linealidad del método se evalúa por medio de las siguientes características: el coeficiente de correlación ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), la pendiente, conocida también como coeficiente de regresión ( $m$ ), la ordenada al origen ( $b$ ) y el coeficiente de variación global, (CV).

### 1.3.4 PRECISIÓN <sup>(4, 17, 25)</sup>

La precisión está relacionada con la dispersión de los datos alrededor de su valor promedio y corresponde al grado de concordancia 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 de un análisis y generalmente se expresa en términos de desviación estándar, variancia o coeficiente de variación.

La precisión del sistema debe ser evaluada realizando la determinación de la concentración de tres diferentes soluciones por sextuplicado, las cuales deben estar incluidas en el intervalo establecido.

La precisión del método debe ser evaluada realizando la determinación de la concentración de tres diferentes muestras, con seis ensayos cada una.

### **1.3.5 EXACTITUD** <sup>(4, 17, 25)</sup>

La exactitud es el grado de concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. A diferencia de la precisión que mide el error aleatorio, la exactitud mide el error sistemático o la tendencia hacia él y generalmente 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.

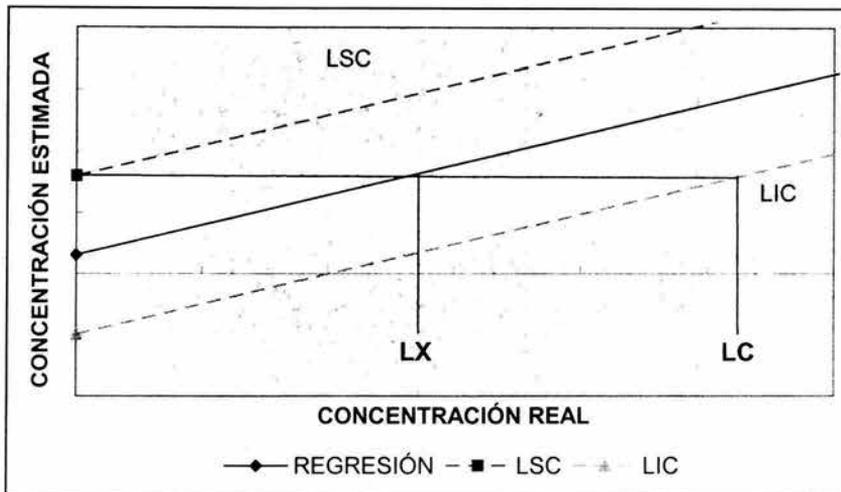
La exactitud debe ser evaluada realizando la determinación de la concentración de tres diferentes muestras, con seis ensayos cada una.

### **1.3.6 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

El Límite de Detección es la cantidad mínima de un analito contenido en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de análisis establecidas y se expresa en términos de la concentración del analito presente en la muestra <sup>(13, 14, 25)</sup>.

El Límite de Cuantificación es la cantidad mínima de un analito contenido en una muestra que puede ser determinado con aceptable precisión y exactitud, bajo las condiciones de análisis establecidas. El límite de cuantificación es particularmente utilizado (aunque no exclusivamente) en la determinación de impurezas, en la determinación de perfiles de disolución ó en la determinación de productos de degradación y se expresa en términos de la concentración del analito presente en la muestra <sup>(13, 14, 25)</sup>.

Una forma para poder estimar el límite de detección y el límite de cuantificación, es utilizando los datos de regresión calculados a partir de la curva de calibración en la linealidad del método. Así, se deben estimar los intervalos de confianza para el intercepto y posteriormente se deben estimar por extrapolación los valores del límite de detección y del límite de cuantificación (Figura 1.14).



**Figura 1.14:** Gráfico que representa la forma para estimar el Límite de Detección y el Límite de Cuantificación.

Sin embargo, en los casos donde se estimen los valores del límite de cuantificación y detección por extrapolación, estas concentraciones deben ser subsecuentemente validadas, realizando un ensayo por sextuplicado de un placebo cargado que presente la concentración estimada para el límite de cuantificación y el límite de detección (13, 14, 17, 23, 25).

### **1.3.7 REPETIBILIDAD ENTRE DÍAS**

La 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, laboratorios) pero en diferentes días.

### **1.3.8 REPRODUCIBILIDAD**

La reproducibilidad es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones de análisis (diferentes analistas, instrumentos, laboratorios, etc.).

Para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad, se debe evaluar el efecto de los eventos aleatorios en la precisión del método analítico, tales como los días (repetibilidad), los analistas ó los equipos (reproducibilidad). Debe analizarse una muestra homogénea del producto, por lo menos por triplicado para probar cada condición.

### **1.3.9 SENSITIVIDAD**

La sensibilidad de un método analítico se define como la mínima diferencia entre la concentración del analito contenido en una muestra que genera una diferencia significativa

---

en la respuesta analítica bajo condiciones de análisis establecidas y se expresa en términos de la concentración del analito presente en la muestra que genera la diferencia significativa.

### **1.3.10 SENSIBILIDAD**

La sensibilidad es la cualidad que tiene el método para dar un cambio en la respuesta analítica al cambiar la concentración del analito, bajo las condiciones de análisis establecidas.

La pendiente indica la sensibilidad de la calibración o del método y se expresa en unidades de respuesta sobre unidades de concentración o cantidad del analito.

### **1.3.11 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA** <sup>(23, 25)</sup>

Es la propiedad de una muestra procesada para su cuantificación, de conservar, sin que se presentes cambios significativos, la concentración del analito de interés después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Se determina mediante la comparación de los resultados de análisis iniciales de 3 muestras procesadas con los obtenidos de las mismas muestras 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. Las muestras almacenadas se analizan bajo las mismas condiciones de análisis, utilizando 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.

### **1.3.12 SELECTIVIDAD**

La selectividad es la capacidad del método para obtener la respuesta analítica debida a varias sustancias relacionadas en sus propiedades físicas (absortividad, por ejemplo), presentes en una misma muestra.

### **1.3.13 ESPECIFICIDAD**

Es la habilidad de un método analítico para obtener el resultado analítico debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes que estén presentes en la muestra, como otros principios activos, excipientes, o cualquier otra sustancia interferente, de lo contrario el método es selectivo.

Los métodos espectroscópicos (UV, IR, colorimetría, etc.) frecuentemente carecen de especificidad cuando existen dos o más componentes presentes en la muestra analítica. Sin embargo, se ha demostrado que la utilización de la espectrofotometría de derivadas y los métodos de calibración multivariante incrementan y logran la especificidad del método, permitiendo la determinación cuantitativa y simultánea de varios componentes presentes en una misma muestra analítica. <sup>(3, 4, 20)</sup>

### **1.3.14 TOLERANCIA**

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo pequeñas modificaciones de las condiciones de operación establecidas, tales como diferentes temperaturas, pH, lotes de reactivos, condiciones ambientales, etc., y da una buena indicación de su confiabilidad durante el trabajo rutinario de laboratorio.

### **1.3.15 ROBUSTEZ**

La robustez del método es el grado de reproducibilidad de los ensayos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo una variedad de condiciones normales de análisis, tales como diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, etc.

# **CAPÍTULO 2 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO**

## 2.1 REACTIVOS, EQUIPOS Y SOFTWARES UTILIZADOS

### 2.1.1 REACTIVOS

REACTIVO	PROVEEDOR	No DE LOTE
➤ Fosfato Monobásico de Potasio.	Baker Analyzed	83012B1
➤ Hidróxido de Sodio.	Baker Analyzed	38211
➤ Lactosa 200M.	I. M. Bruluart S. A.	MP1B139
➤ Avicel pH 102.	I. M. Bruluart S. A.	MP1A078
➤ Plasdone K 30.	I. M. Bruluart S. A.	MP1I1172
➤ Poliplasdone XL.	I. M. Bruluart S. A.	MP0L1413
➤ Talco.	I. M. Bruluart S. A.	MP1C246
➤ Estearato de Magnesio.	I. M. Bruluart S. A.	MP2C306
➤ Materia Prima de APAP DC 90.	Helm	0114802P995
➤ Materia Prima de NAP.	Simbiotic	NPM066K02
➤ Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.0.	Baker Analyzed	-
➤ Estándar Secundario de Acetaminofén.	I. M. Bruluart S. A.	MP1L113
➤ Estándar Secundario de Naproxéno Sódico.	I. M. Bruluart S. A.	MP1F655

### 2.1.2 EQUIPO

El equipo utilizado se encuentra en el Laboratorio de Estudios Multidisciplinario (LEM) Farmacia, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, UNAM, y tiene las siguientes características:

EQUIPO	MARCA	No INVENTARIO
➤ Balanza Analítica.	Ohaus, Modelo plus.	1581170
➤ Disolutor.	Elecsa, Modelo DIE 25-250.	1440175
➤ Espectrofotómetro.	Varian, Modelo Cary 13E.	95031303
➤ Computadora Pentium 3.	GenuineIntel.	1969861
➤ Potenciómetro.	Oakton No 35613-01.	1945203
➤ Purificador de agua Rios 5.	Millipore	1592150
➤ Sistema de purificación Milli-Q plus.	Millipore	1587776

### 2.1.3 SOFTWARES

Los datos fueron recolectados utilizando los programas “Cary Simple Reads” y “Cary Scan”, cuya versión es 01.00(9) para ambos programas.

Para el tratamiento de los datos, en el caso del método de MCP, se utilizó tanto el programa de ISHEJA INC. Versión 1.0.0 soportado en ambiente Windows 98 <sup>(17)</sup> (el cual utiliza el algoritmo NIPALS para MCP establecido por Haaland <sup>(15)</sup>), como el programa Excel de la paquetería de Microsoft Office; mientras que en el caso del método de RCP se utilizó el programa Excel de la paquetería de Microsoft Office.

Los gráficos se realizaron con el programa Excel de la paquetería de Microsoft Office y con el programa estadístico STAT-GRAPHICS plus 4.0.

## **2.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

### **2.2.1 PREPARACIÓN DE 1 LITRO DE LA SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO 0.2 N**

1. Pesar en un vaso de precipitado de 100 mL, aproximadamente 8.0 g de NaOH con una balanza analítica.
2. Adicionar aproximadamente 20 mL de agua desionizada al vaso de precipitado.
3. Agitar manualmente con una varilla de vidrio hasta completa disolución.
4. Transvasar esta solución a un matraz volumétrico de 1000 mL.
5. Enjuagar 3 veces el vaso de precipitado con un total de 15 mL de agua desionizada y transferir el contenido al matraz volumétrico.
6. Llevar a la marca de aforo con agua desionizada.

### **2.2.2 PREPARACIÓN DE 1 LITRO DE LA SOLUCIÓN DE FOSFATO MONOBÁSICO DE POTASIO 0.2 M**

1. Pesar en un vaso de precipitado de 100 mL, aproximadamente 27.24 g de fosfato monobásico de potasio con una balanza analítica.
2. Adicionar aproximadamente 50 mL de agua destilada al vaso de precipitado.
3. Colocar el vaso de precipitado sobre una parrilla con agitador.
4. Agitar la muestra con una barra magnética hasta completa disolución del fosfato monobásico de potasio.
5. Transvasar esta solución a un matraz volumétrico de 1000 mL.
6. Enjuagar 3 veces el vaso de precipitado con un total de 15 mL de agua destilada y transferir el contenido al matraz volumétrico.
7. Llevar a la marca de aforo con agua destilada.

### **2.2.3 PREPARACIÓN DE 2 LITROS LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH 7.4**

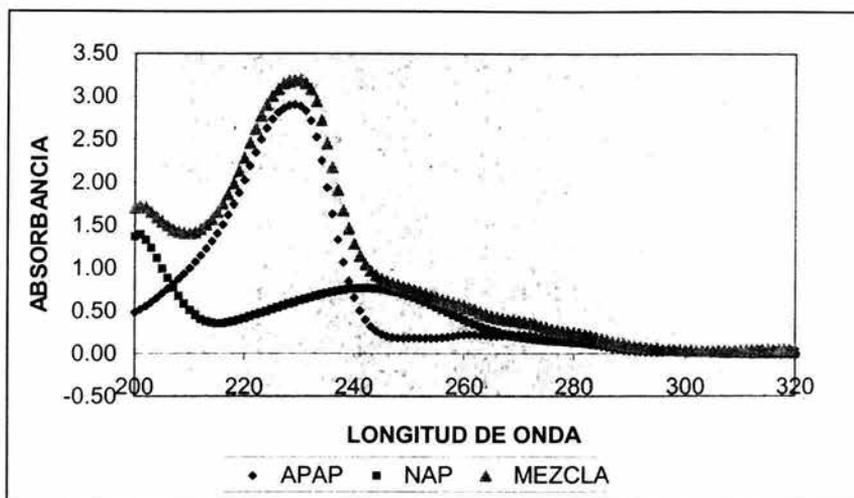
1. Colocar en una probeta graduada de 500 mL, 390.0 mL de la solución de NaOH 0.2 N y transferir su contenido a un matraz volumétrico de 2 litros.
2. Adicionar en otra probeta graduada de 500 mL, 500.0 mL de la solución de fosfato monobásico de potasio 0.2 M y transferir su contenido al mismo matraz volumétrico.
3. Adicionar aproximadamente 1100 mL de agua destilada al matraz volumétrico.
4. Tomar y registrar la lectura del valor de pH de esta Solución con el pHmetro.
5. Ajustar el valor de pH a 7.4 con la cantidad necesaria de la solución de fosfato monobásico de potasio ó de NaOH.
6. Llevar a la marca de aforo con agua destilada (Solución Amortiguadora de Fosfatos).

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

Se estableció que el medio de trabajo adecuado para el análisis de APAP y NAP es la Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Esta solución es la misma que se utiliza en los perfiles de disolución para tabletas que contienen como principios activos al APAP y al NAP por separado (en donde el pH de 7.4 es utilizado en el caso del NAP), y por lo que una vez obtenida la muestra, se puede utilizar sin ninguna manipulación excesiva para la determinación de los componentes de la mezcla. Además en este valor de pH, se encuentra presente sólo una especie química tanto del APAP como para el NAP.

Con el propósito de establecer las condiciones espectrofotométricas adecuadas, se obtuvieron los espectros de absorción del APAP, del NAP y una mezcla de ambos en la

Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, en un rango de longitudes de onda de 200 a 320 nm (Figura 2.1).



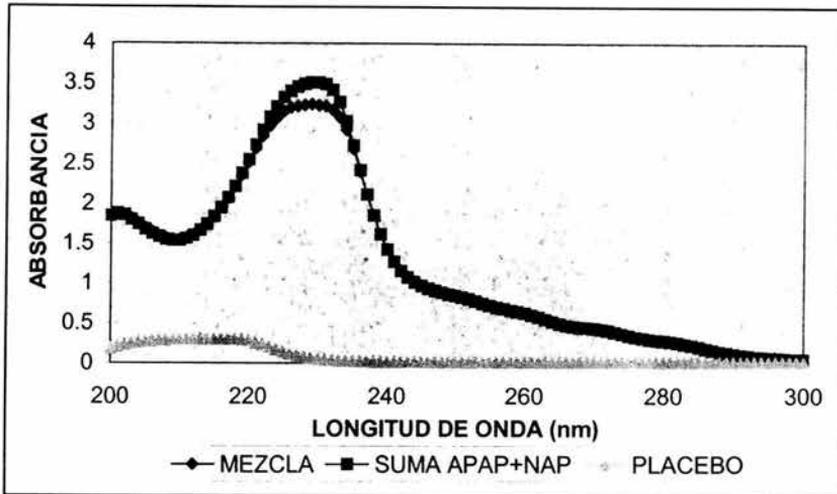
**Figura 2.1:** Gráfico que muestra los espectros obtenidos de las soluciones de APAP (10.7 mcg/mL), NAP (10.8 mcg/mL) y la mezcla APAP-NAP (10.7-10.8 mcg/mL) en un rango espectral de 200 a 320 nm / Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4.

### 2.3.1 ADITIVIDAD, INTERACCIÓN E INTERFERENCIA

Para determinar si existe aditividad entre el espectro obtenido por la mezcla de APAP-NAP, este se comparó con la suma de los espectros individuales de APAP y de NAP. Así mismo, se realizó el barrido de una muestra placebo para determinar si los excipientes pueden interferir en la cuantificación del APAP y del NAP.

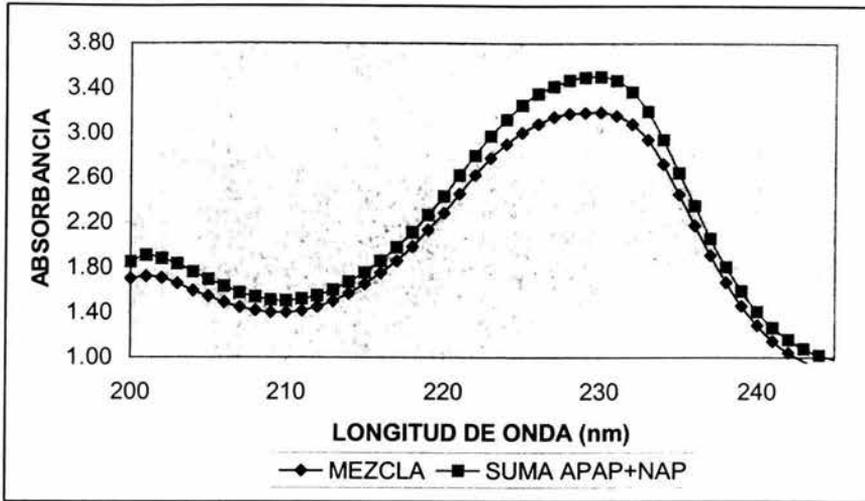
Los espectros de APAP y NAP al ser sumados (Figura 2.2) presentan el mismo espectro a lo largo de la región espectral entre 240 a 300 nm, por lo que se comprueba que existe aditividad entre los espectros de APAP y NAP en esta región espectral. Así mismo, el espectro obtenido para la solución placebo en esta región, presenta lecturas apenas arriba

del cero, por lo que se espera que la presencia de los excipientes no produzca interferencia para el análisis posterior.



**Figura 2.2:** Gráfico que muestra los espectros obtenidos de la mezcla APAP-NAP (10.7-10.8 mcg/mL), la suma de los espectros individuales de APAP y de NAP, y de una solución placebo, en un rango espectral de 200 a 300 nm / Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4.

Por otra parte, en la región espectral comprendida entre los 200 y 240 nm, el espectro obtenido para la mezcla APAP-NAP comienza a ser diferente con respecto al obtenido por la suma de los espectros por separado (Figura 2.2 y Figura 2.3), por lo que se afirma que se presenta el fenómeno de interacción a lo largo de esta región espectral. En el caso de la solución placebo, esta comienza a registrar valores de absorbancia mayores de cero en la región espectral de 200-230 nm.



**Figura 2.3:** Gráfico que muestra los espectros obtenidos de la mezcla APAP-NAP (10.7-10.8 mcg/mL) y la suma de los espectros individuales de APAP y de NAP, en la región espectral de 200 a 240 nm. En este gráfico se observa que existe diferencia entre los espectros obtenidos (fenómeno de interacción).

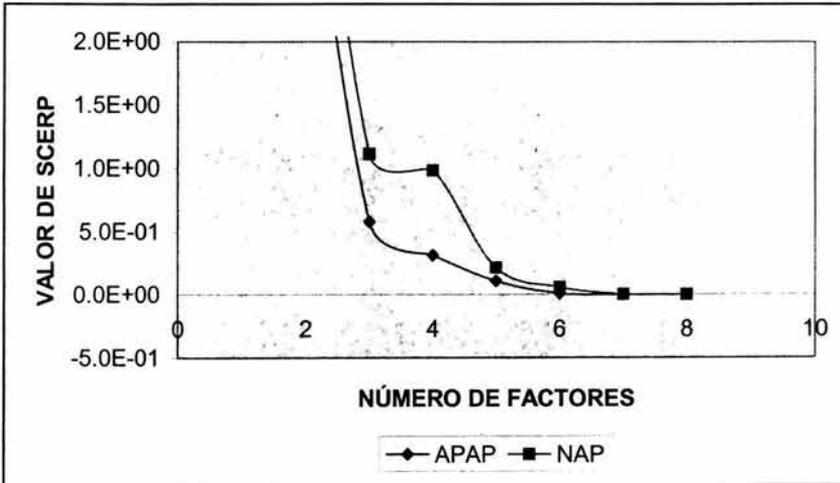
## 2.3.2 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MODELO

### 2.3.2.1 SELECCIÓN DE LA REGIÓN ESPECTRAL

Uno de los aspectos importantes en los métodos de RCP y MCP es que se puede utilizar toda la región espectral para poder obtener las variables que pueden ser incluidas en el modelo. También se puede cuantificar los componentes de interés presentes en la mezcla aún cuando existan los fenómenos de Interacción e interferencia.

Para comprobar lo anterior, se preparó una calibración con 10 mezclas de APAP y de NAP en concentraciones conocidas y estas muestras se leyeron a 22 longitudes de onda, de las cuales 10 de ellas se encuentran en la región de 200-240 nm donde se presenta la interacción entre los analitos de interés. Posteriormente se determinó el número óptimo de

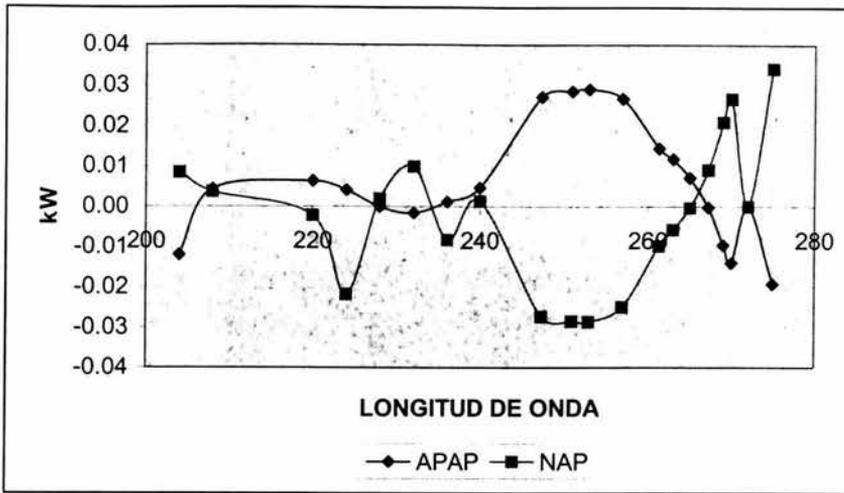
factores con los datos estandarizados y se realizó el gráfico de los valores del SCERP contra el número de factores, tal y como lo muestra la Figura 2.4.



**Figura 2.4:** Gráfico del valor de SCERP contra el número de factores. En este gráfico, los valores de la matriz A y c fueron estandarizados.

En la Figura 2.4, el número óptimo de factores obtenido fue de 6 tanto para el APAP como para el NAP, alcanzando valores de SCERP de 0.008 y 0.057, respectivamente. Así mismo, los valores de SCERP obtenidos cuando el número de factores empleados es de 4 son de 0.315 para APAP y de 0.984 para NAP.

Posteriormente, con el fin de determinar las longitudes de onda que pueden ser eliminadas del modelo de MCP se realizó el Gráfico de Coeficiente de Regresión final estandarizado ( $k_w$ ) contra la longitud de onda.

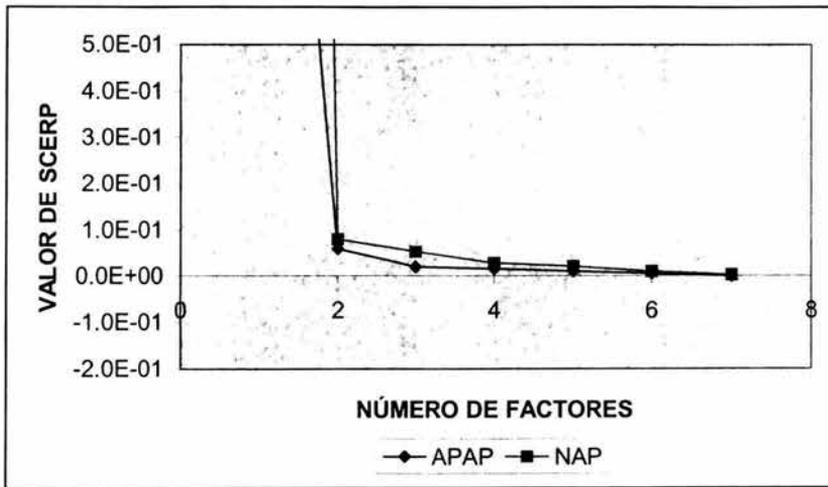


**Figura 2.5:** Gráfico del valor de  $k_w$  contra la Longitud de onda.

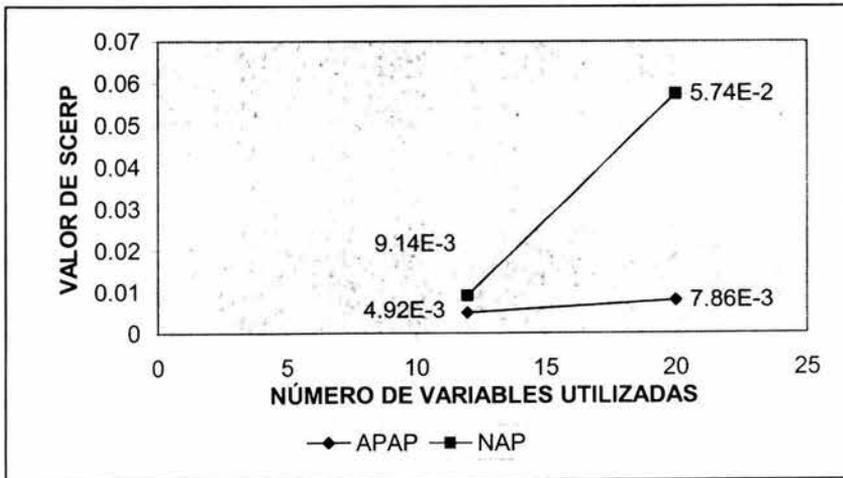
Como se observa en la Figura 2.5, los valores obtenidos del  $k_w$  para APAP presentan valores positivos dentro de la región espectral de 240-260 nm mientras que en el resto de la región espectral, los valores de  $k_w$  son muy pequeños e incluso negativos. Por otra parte, los valores de  $k_w$  para NAP presentan valores negativos en la región espectral de 240-260 nm. Esto es lógico debido a que esa región espectral está fuertemente influenciada por el APAP, y por tal razón ya no puede existir influencia por el NAP. Por el contrario, la región espectral comprendida entre 260-275 nm presenta valores positivos para NAP.

Como la mayor información para APAP y el NAP en el modelo de MCP se encuentra comprendida dentro de la región espectral de 240-275 nm, se eliminaron las longitudes de onda comprendidas entre 200-240 nm, posteriormente se volvió a realizar el gráfico de los valores de SCERP contra el número de factores (Figura 2.6).

Los nuevos valores de SCERP obtenidos fueron comparados con los valores obtenidos cuando se incluyeron en el modelo las longitudes de onda comprendidas entre 200-240 nm, para poder determinar si el eliminar estas longitudes de onda puede mejorar la capacidad predictiva del modelo. Así, los resultados se muestran en la Figura 2.7.



**Figura 2.6:** Gráfico del valor de SCERP contra el número de factores. En este gráfico, los valores de la matriz A y c solo fueron centrados.



**Figura 2.7:** Gráfico del valor de SCERP contra el número de variables incluidas en el modelo. En este gráfico, el número de factores calculados es de 6.

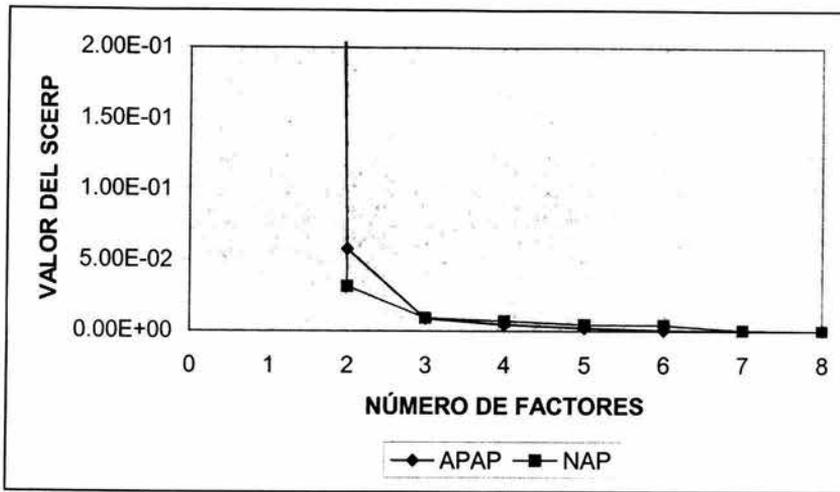
Como se observa en la figura 2.7, los valores de SCERP son menores tanto para el NAP como para el APAP cuando se eliminaron las longitudes de onda comprendidas en la región espectral de 200-240 nm, debido a que en esta región no se encuentra información que pueda ayudar al modelo de MCP.

Por lo anterior, las longitudes de onda que fueron seleccionadas y que presentan una buena capacidad predictiva para el modelo de MCP son: 275, 272, 270, 269, 267.2, 265, 263, 261.3, 257, 253, 251 y 247 nm. Así mismo, estas longitudes de onda serán utilizadas también para el modelo de RCP.

### **2.3.2.2 SELECCIÓN DEL NÚMERO ÓPTIMO DE FACTORES**

Para poder establecer el número óptimo de factores que deben incluirse en el modelo de MCP y de RCP, se construyó una calibración con 10 diferentes mezclas que contenían al APAP y al NAP. Posteriormente, aplicando los algoritmos correspondientes para cada método de calibración multivariante, se realizaron los gráficos del valor de SCERP contra el número de factores, utilizando la validación cruzada de dejar una muestra fuera.

Como se muestra en la Figura 2.8, para el caso del método de MCP, el menor valor del SCERP obtenido para el APAP se encuentra en el número de factor de 5, mientras que para el NAP se presenta en el número de factor de 6.



**Figura 2.8:** Gráfico del valor de SCERP contra el Número de factores calculados para el modelo de MCP.

Sin embargo, se realizó la prueba F con los mismos criterios descritos en Haaland <sup>(15)</sup> para poder elegir el menor número de factores que pueden ser incluidos en el modelo (para que este sea más fácil de realizar) sin perder confiabilidad en los ensayos posteriores, mostrando los resultados en la Tabla 2.1:

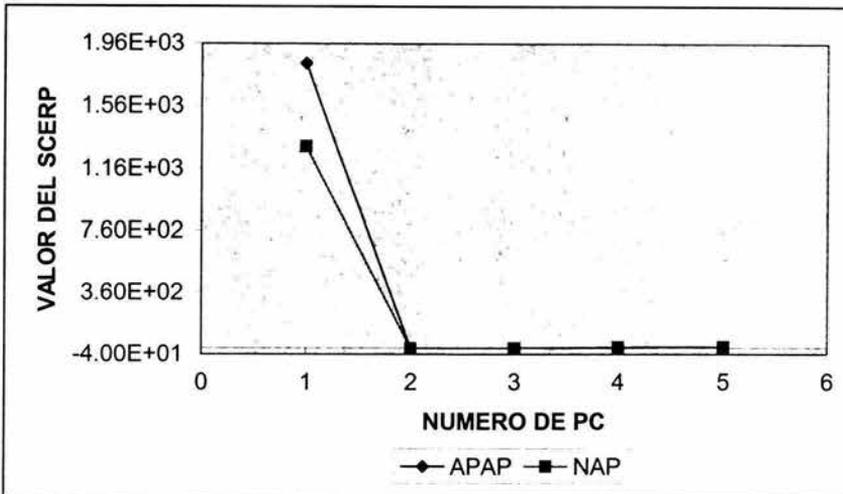
APAP (h) / (h*)	NAP (h) / (h*)	f calculada APAP	f calculada NAP	f crítica ( $\alpha=0.05; 10, 10$ )
(3) / (5)	(4) / (6)	3.9371	1.6982	2.978
(4) / (5)	(5) / (6)	2.0645	1.1078	2.978

**Tabla 2.1:** Resultados de la f calculada para el modelo de MCP.

Como se muestra en la tabla 2.1, los valores de la f calculada en el caso de NAP son menores que el valor para la f crítica. Por lo cual se demuestra que no existe diferencia estadística entre los datos obtenidos cuando se utiliza un factor de 6 que cuando se utiliza un factor de 4, por lo que este último es el número óptimo de factores que deben ser incluidos en el modelo de MCP.

En el caso del APAP, el valor de  $f$  calculada cuando el número de factores es igual a 3 es mayor que la  $f$  crítica, mientras que cuando el número de factores es igual a 4, la  $f$  calculada es menor a la  $f$  crítica, por lo que se concluyó que número óptimo de factores que deben ser incluidos para el APAP es también de 4.

Para el caso del método de RCP (Figura 2.9), el menor valor de SCERP obtenido tanto para el APAP como para el NAP se encuentra entre el número de CP calculados igual a 2 y 3, sin embargo, las mejores estimaciones para las muestras reales se obtuvieron cuando el número de CP calculado es de 3 por lo cual se concluyó que el número óptimo de CP que deben ser calculados es de 3.



**Figura 2.9:** Gráfico del valor de SCERP contra el Número de CP calculados para el modelo de RCP.

Para determinar qué modelo puede tener mejor capacidad de predicción, se compararon los valores de SCERP obtenidos para MCP con los valores obtenidos para RCP, cuando el número de factores es el óptimo para ambos modelos.

Componente	Valor de SCERP		f calculada	f crítica ( $\alpha=0.05, 10, 10$ )
	MCP	RCP		
APAP	4.6150E-03	1.1595E-01	25.1239	2.978
NAP	7.1212E-03	5.7757E-02	8.1106	2.978

**Tabla 2.2:** Resultados de los valores de f calculados para comparar los métodos de MCP y RCP. La f calculada se estimó de la siguiente forma:  $SCERP_{RCP} / SCERP_{MCP}$ .

Como se muestra en la Tabla 2.2, los valores de SCERP obtenidos son menores para el método de MCP en comparación con el método de RCP, además de que la f calculada es mayor que la f crítica, por lo que se espera que el método de MCP presente una mejor predicción de la concentración de APAP y NAP en comparación con el método de RCP.

### 2.3.2.3 CURVA DE CALIBRACIÓN

#### 2.3.2.3.1 ELECCIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR

Para establecer las soluciones estándar que van a conformar la matriz de calibración, se construyó una calibración con 10 soluciones estándar que contenían al APAP y al NAP, preparadas por dilución a partir de una solución patrón de APAP y otra de NAP. Posteriormente, con el fin de evaluar la capacidad predictiva del modelo para MCP y RCP, se utilizó la validación cruzada de “dejar una muestra fuera” y se realizaron los gráficos de concentración estimada contra la concentración real para ambos analitos de interés.

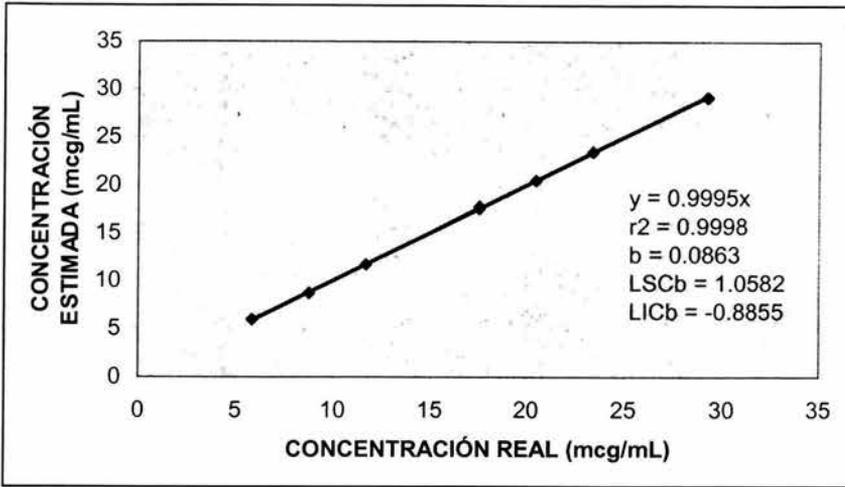


Figura 2.10: Gráfico de concentración estimada contra la concentración real para el APAP aplicando el método de MCP.

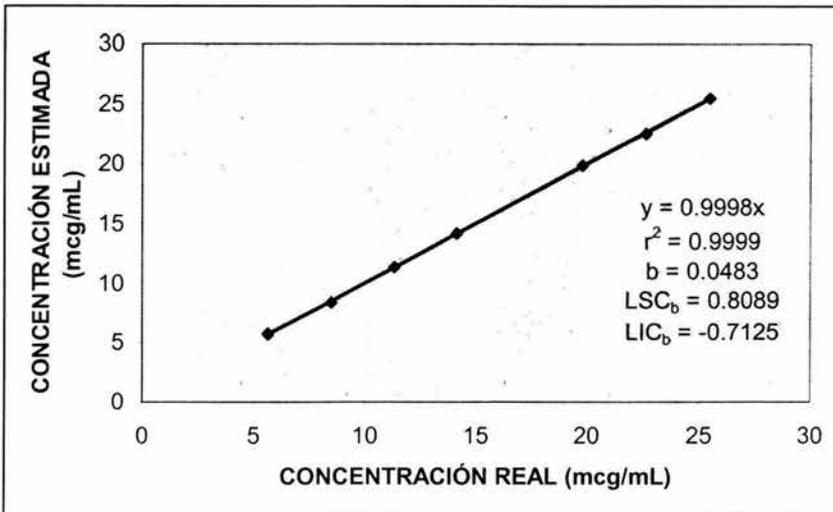


Figura 2.11: Gráfico de concentración estimada contra la concentración real para el NAP aplicando el método de MCP.

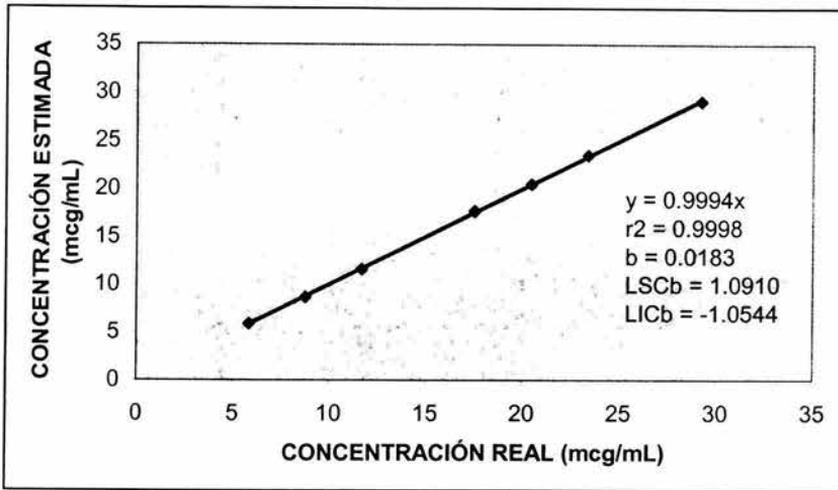


Figura 2.12: Gráfico de concentración estimada contra la concentración real para el APAP aplicando el método de RCP.

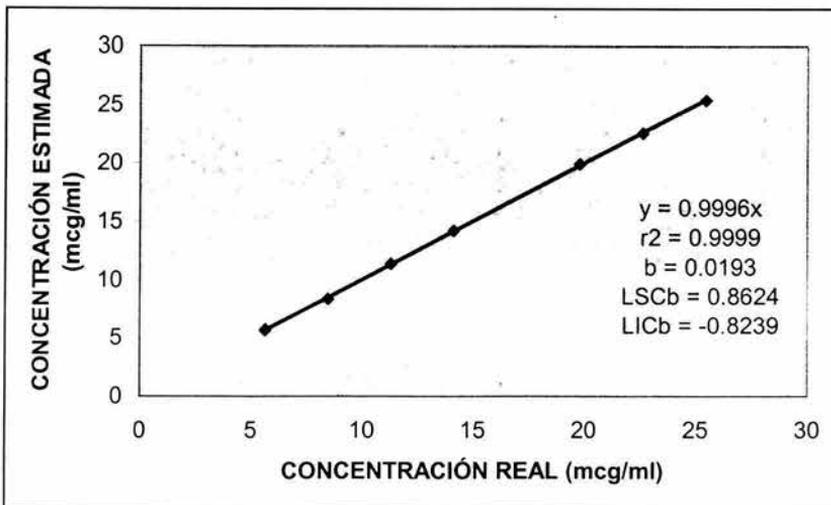


Figura 2.13: Gráfico de concentración estimada contra la concentración real para el NAP aplicando el método de RCP.

Con los resultados descritos en las figuras 2.10, 2.11, 2.12 y 2.13 en donde se aprecia una relación lineal entre la concentración estimada y real, se determinó que las 10 soluciones estándar preparadas presentan una buena capacidad predictiva, por lo cual éstas son la que conformarán la matriz de calibración para ambos métodos de calibración multivariante.

Solución Estándar	Concentración APAP (mcg/mL)	Concentración NAP (mcg/mL)	Concentración Total (mcg/mL)	Fracción APAP	Fracción NAP
1	5.6	5.6	11.2	0.5000	0.5000
2	8.4	5.6	14.0	0.6000	0.4000
3	11.2	5.6	16.8	0.6667	0.3333
4	11.2	8.4	19.6	0.5714	0.4286
5	16.8	11.2	28.0	0.6000	0.4000
6	16.8	14.0	30.8	0.5455	0.4545
7	19.6	14.0	33.6	0.5833	0.4167
8	22.4	19.6	42.0	0.5333	0.4667
9	28.0	22.4	50.4	0.5556	0.4444
10	28.0	25.2	53.2	0.5263	0.4737

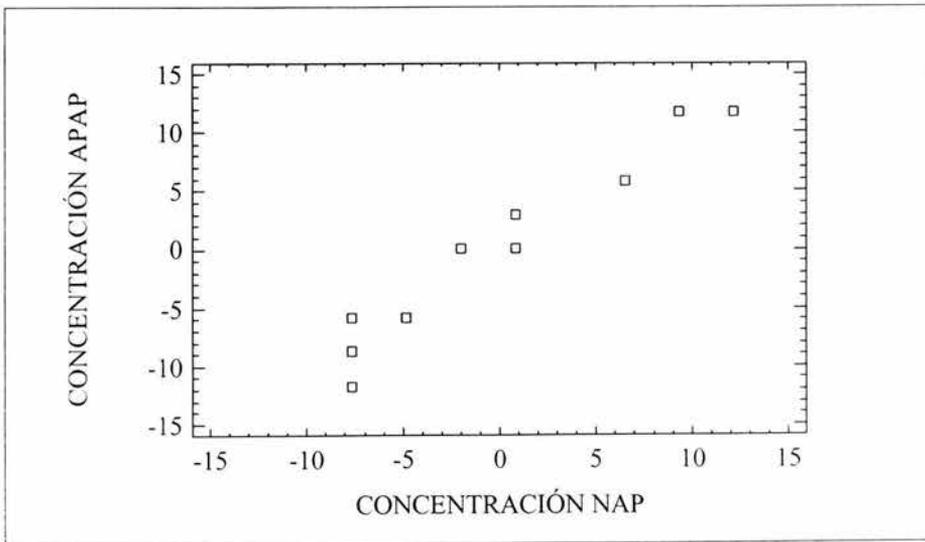
**Tabla 2.3:** Soluciones Estándar que conforman la matriz de calibración.

### 2.3.2.3.2 INTERPRETACIÓN DEL MODELO DE MCP Y RCP EN EL NUEVO SISTEMA DE COORDENADAS

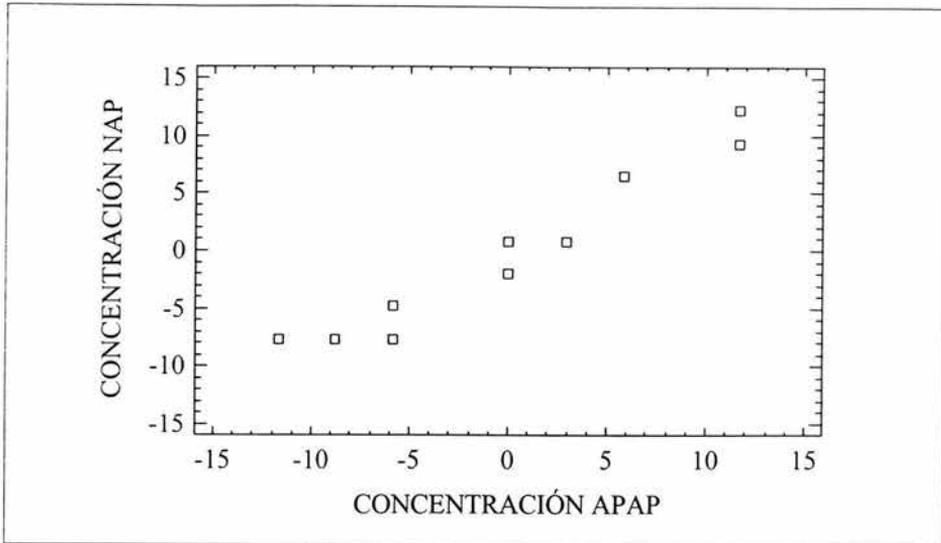
Los vectores  $t_h$  son las coordenadas de la concentración del componente de interés en el nuevo eje de coordenadas, donde los ejes están definidos en RCP por los componentes principales y en MCP por los Factores. Estos nuevos ejes se emplean para ver la relación que existe entre la concentración de los componentes de interés y los vectores  $t_h$  estimados. Así, el gráfico de los vectores  $t_h$  debe presentar un comportamiento razonablemente similar al gráfico de la concentración de NAP contra la concentración de APAP, de ser lo contrario, se puede establecer que existen problemas con el modelo utilizado ó con la

preparación de las soluciones estándar, por lo cual tanto las concentraciones establecidas como la manipulación de las muestras deben ser siempre examinados en un análisis posterior. De esta forma, los gráficos de los vectores  $t_h$  (Figura 2.16, 2.17, 2.18 y 2.19) son comparados con los gráficos de la concentración de un componente contra la concentración del otro componente (Figura 2.14, 2.15).

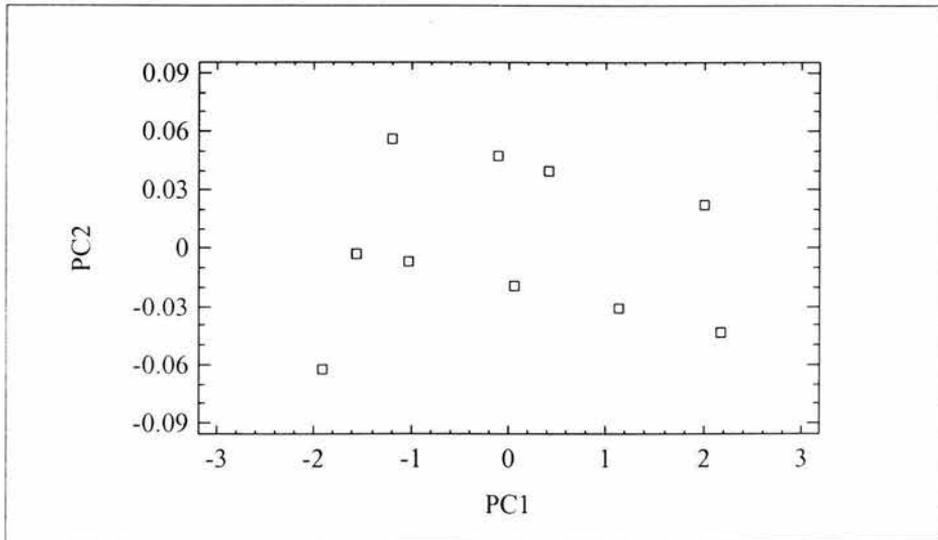
Al comparar los gráficos, se encuentran similitudes entre las Figuras 2.15 y 2.17 debido a que los vectores  $t_h$  estimados fueron obtenidos cuando solamente se incluyó en el análisis las concentraciones del NAP. De la misma forma, se aprecia un comportamiento similar en las Figuras 2.14, 2.16 y 2.18. La Figura 2.16 es más parecida a la figura 2.14 que a la figura 2.15 lo cual significa que la variabilidad presente en la matriz  $A$  se debe más al componente de APAP que al componente de NAP en el método de RCP, por lo que se puede esperar que haya una mejor estimación de la concentración de APAP con respecto a la de NAP en este método de calibración.



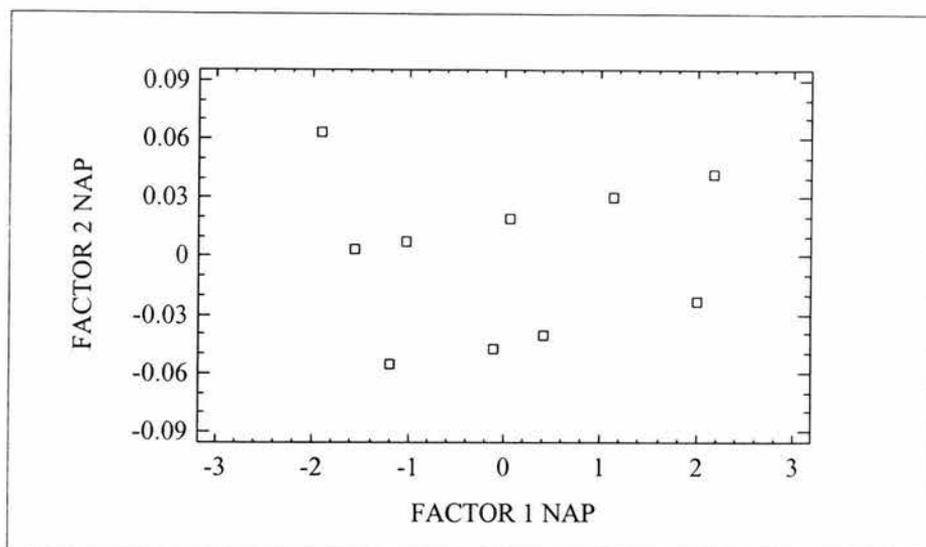
**Figura 2.14:** Gráfico de la Concentración real de APAP (mcg/mL) contra la Concentración real de NAP (mcg/mL) para las 10 soluciones estándar (valores centrados).



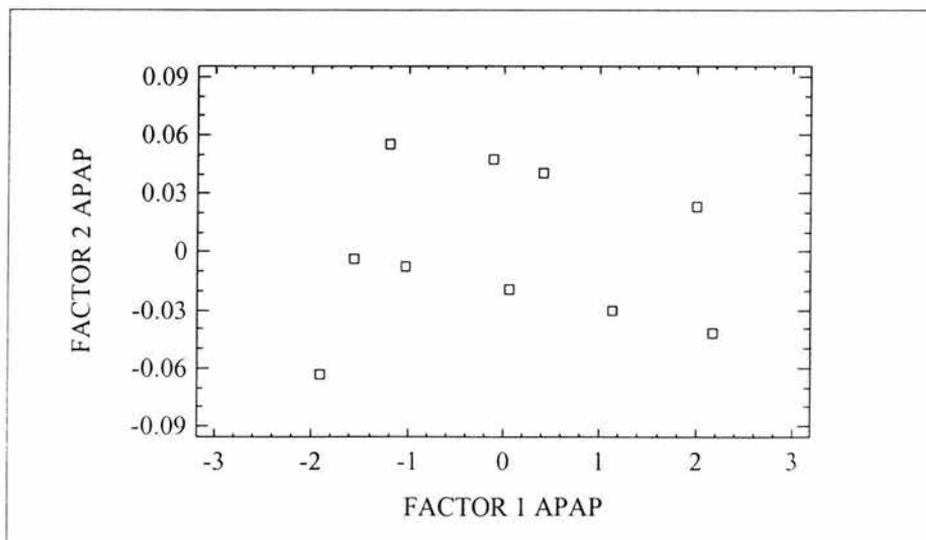
**Figura 2.15:** Gráfico de la Concentración real de NAP (mcg/mL) contra la Concentración real de APAP (mcg/mL) para las 10 soluciones estándar (valores centrados).



**Figura 2.16:** Gráfico CP2 contra CP1 para el modelo de RCP. Este gráfico presenta un comportamiento similar presentado en la Figura 2.15.

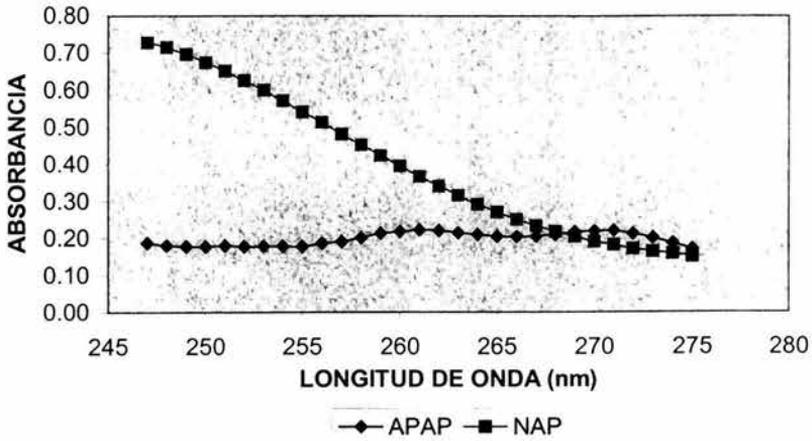


**Figura 2.17:** Gráfico Factor2 contra Factor1 para el NAP para el modelo de MCP. Este gráfico presenta un comportamiento similar presentado en la Figura 2.14.

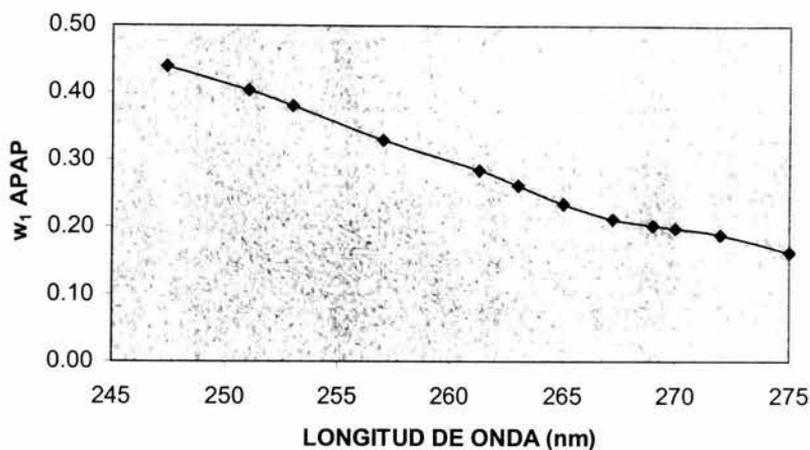


**Figura 2.18:** Gráfico Factor2 contra Factor1 para el APAP para el modelo de MCP. Este gráfico presenta un comportamiento similar presentado en la Figura 2.16.

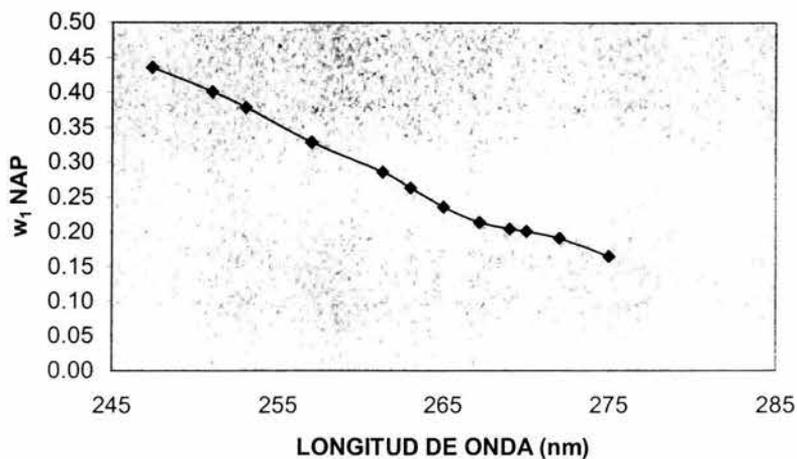
Por otro lado, en el método de MCP, el primer vector cargador de peso ( $w_1$ ) es una estimación del espectro puro de cada analito de interés a lo largo de la región espectral seleccionada, tal y como se aprecia al comparar las Figuras 2.20 y 2.21 con la Figura 2.19:



**Figura 2.19:** Gráfico que muestra los espectros obtenidos de las soluciones de APAP (10.7 mcg/mL) y NAP (10.8 mcg/mL) en un rango espectral de 240 a 275 nm / Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4.



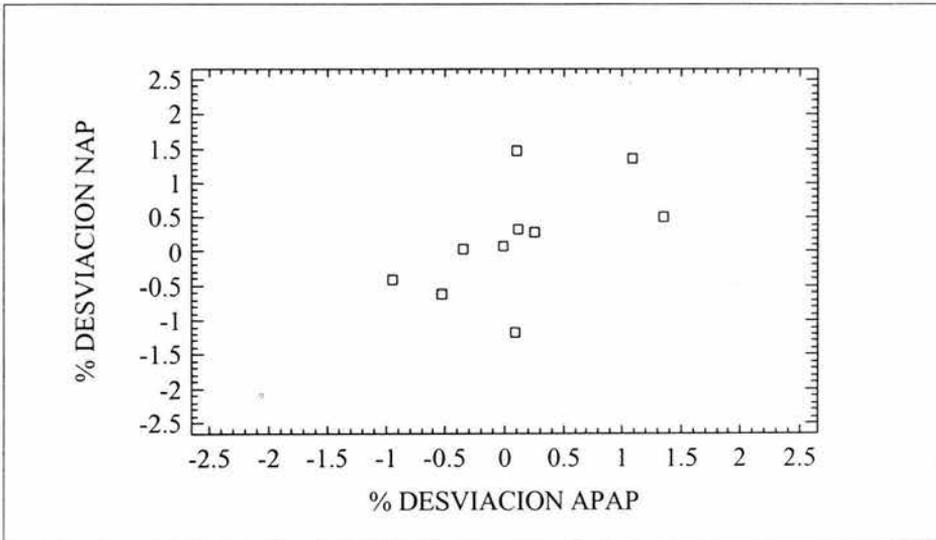
**Figura 2.20:** Gráfico de los valores obtenidos del vector  $w_1$  estimado para APAP a cada una de las longitudes de onda empleadas.



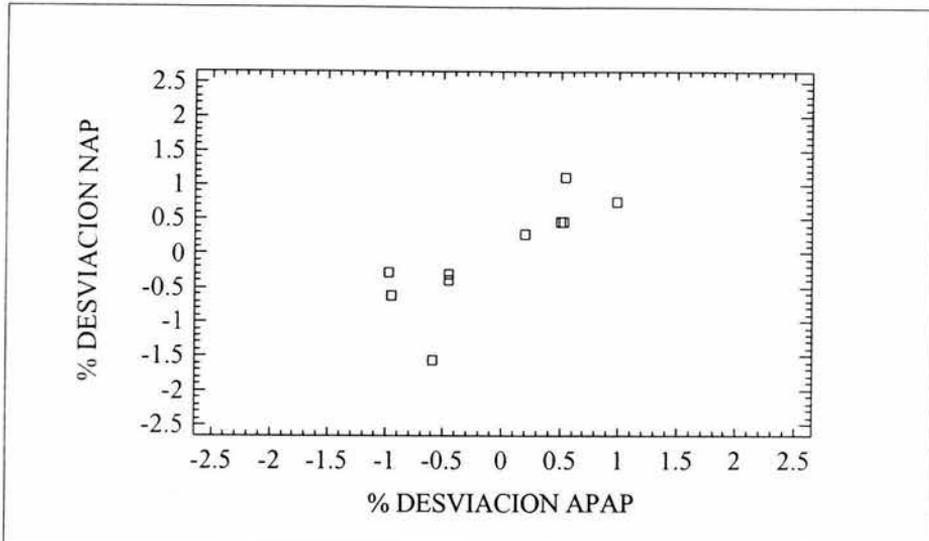
**Figura 2.21:** Gráfico de los valores obtenidos del vector  $w_1$  estimado para NAP a cada una de las longitudes de onda empleadas.

### 2.3.2.4 DETECCIÓN DE MUESTRAS DESECHABLES

Para determinar si una o varias de las soluciones estándar fueron mal preparadas, se debe realizar la detección de muestras desechables con el fin de asegurar la confiabilidad en la predicción de las muestras bajo análisis en donde todas las muestras deben encontrarse dentro del intervalo de error de  $\pm 2\%$  (Figura 2.22 y 2.23). Así, si alguna de las soluciones estándar fue preparada incorrectamente, esta deberá ser preparada nuevamente.



**Figura 2.22:** Gráfico del porcentaje de desviación del NAP contra el porcentaje de desviación del APAP por el método de MCP. Todas las muestras se encuentran dentro del intervalo de error de  $\pm 2\%$ .



**Figura 2.23:** Gráfico del porcentaje de desviación del NAP contra el porcentaje de desviación del APAP por el método de RCP. Todas las muestras se encuentran dentro del intervalo de error de  $\pm 2\%$ .

## 2.4 CONDICIONES FINALES DE ANÁLISIS

- Las muestras de análisis deben estar en la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.
- En cada ensayo, se deben preparar las 10 soluciones estándares que conforman la matriz de calibración.
- Las soluciones estándar y las muestras de análisis deben leerse a las longitudes de onda de 275, 272, 270, 269, 267.2, 265, 263, 261.3, 257, 253, 251 y 247.2 nm, para ambos métodos de calibración multivariante.
- El modelo de MCP debe realizarse según el algoritmo descrito en la sección 1.1.3.1.
- El modelo de RCP debe realizarse según el algoritmo descrito en las secciones 1.1.2.2. y 1.1.2.3.

- El número óptimo de factores que debe ser calculados en el método de MCP, es de 4 tanto para el APAP como para el NAP.
- El número de PC óptimos que debe ser calculados para el método de RCP es de 3.
- En cada matriz de calibración se debe realizar la detección de muestras desechables (utilizando la validación cruzada).

### 2.4.1 ENSAYO ANALÍTICO

Una vez que se determinaron las condiciones necesarias para poder aplicar los métodos de MCP y RCP, se estableció un sencillo ensayo analítico, el cual no requiere una manipulación excesiva de la muestra de disolución y se pueden cuantificar de manera simultánea ambos analitos de interés sin llevar a cabo un proceso de separación; así mismo, con este ensayo se pueden obtener resultados precisos, exactos y confiables para ambos analitos en un corto periodo de tiempo.

1. Tomar con una pipeta volumétrica 5 mL de la muestra de disolución.
2. Filtrar por gravedad los 5 mL (muestra analítica) utilizando el papel filtro Whatman N° 42 y recolectar el filtrado en un tubo de ensaye.
3. Tomar con una pipeta volumétrica 2 mL del filtrado y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 mL.
4. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.

### 2.4.2 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR

1. Pesar en un vaso de precipitado de 100 mL, aproximadamente 70.00 mg del estándar secundario de Acetaminofén en una balanza analítica.
2. Adicionar al vaso de precipitado la cantidad mínima suficiente de la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 para disolver al APAP.
3. Agitar con una varilla de vidrio hasta completa disolución.

4. Transvasar esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL.
5. Enjuagar 3 veces el vaso de precipitado con un total de 15 mL de la Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 y transferir los 15 mL al matraz volumétrico.
6. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (Solución A).
7. Tomar con una pipeta volumétrica, 25 mL de la Solución A y verter su contenido a un matraz volumétrico de 250 mL. Llevar a la marca de aforo con la Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4 (Solución Patrón de APAP).
8. Repetir los pasos 1-7 con aproximadamente 70.00 mg del estándar secundario de Naproxéno (Solución Patrón de NAP).
9. Tomar con una pipeta volumétrica, 2 mL de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 mL; tomar con otra pipeta volumétrica, 2 mL de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 mL. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (**Solución Estándar 1**).
10. Tomar con una pipeta volumétrica, 3 mL de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 mL; tomar con otra pipeta volumétrica, 2 mL de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 mL. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (**Solución Estándar 2**).
11. Tomar con una pipeta volumétrica, 4 mL de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 mL; tomar con otra pipeta volumétrica, 2 mL de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 mL. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (**Solución Estándar 3**).
12. Tomar con una pipeta volumétrica, 4 mL de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 mL; tomar con otra pipeta volumétrica, 3 mL de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 mL. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (**Solución Estándar 4**).

13. Tomar con una pipeta volumétrica, 6 mL de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 mL; tomar con otra pipeta volumétrica, 4 mL de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 mL. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (**Solución Estándar 5**).
14. Tomar con una pipeta volumétrica, 6 mL de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 mL; tomar con otra pipeta volumétrica, 5 mL de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 mL. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (**Solución Estándar 6**).
15. Tomar con una pipeta volumétrica, 7 mL de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 mL; tomar con otra pipeta volumétrica, 5 mL de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 mL. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (**Solución Estándar 7**).
16. Tomar con una pipeta volumétrica, 8 mL de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 mL; tomar con otra pipeta volumétrica, 7 mL de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 mL. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (**Solución Estándar 8**).
17. Tomar con una pipeta volumétrica, 10 mL de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 mL; tomar con otra pipeta volumétrica, 8 mL de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 mL. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (**Solución Estándar 9**).
18. Tomar con una pipeta volumétrica, 10 mL de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 mL; tomar con otra pipeta volumétrica, 9 mL de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 mL. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (**Solución Estándar 10**).

### 2.3.3.2 LECTURA Y ESTIMACIÓN

1. Leer cada Solución estándar y cada muestra problema a las longitudes de onda de 275, 272, 270, 269, 267.2, 265, 263, 261.3, 257, 253, 251 y 247.2 nm, empleando como blanco la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.
2. Estimar las concentraciones de APAP y de NAP presentes en cada muestra de análisis utilizando los métodos de RCP y MCP.

# **CAPÍTULO 3**

# **VALIDACIÓN DEL**

# **MÉTODO**

### 3.1 CRITERIOS DE ACEPTACION

Los criterios establecidos para que el método analítico sea confiable, se muestran a continuación en la siguiente tabla:

CARACTERÍSTICA A EVALUAR	FACTOR DE EVALUACIÓN	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Linealidad del Sistema	Coeficiente de Variación (CV) Coeficiente de correlación (r) Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) Intercepto (b)	$\leq 2\%$ $\geq 0.999$ $\geq 0.98$ $= 0$
Precisión del Sistema Exactitud del Sistema	Coeficiente de Variación (CV) Prueba t de Student	$\leq 2\%$ $t_{cal} < t_{critica} (\alpha=0.05, 5 \text{ gl})$
Linealidad del Método	Coeficiente de Variación (CV) Coeficiente de correlación (r) Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) Intercepto (b) Pendiente (m)	$\leq 2\%$ $\geq 0.999$ $\geq 0.98$ $= 0$ $= 1$
Precisión del Método	Coeficiente de Variación (CV)	$\leq 2\%$
Exactitud del Método	Prueba t de Student Porcentaje de recobro	$t_{cal} < t_{critica} (\alpha=0.05, 5 \text{ gl})$ 97-103 %
(1)Repetibilidad (2)Reproducibilidad	Coeficiente de Variación (CV) Modelo Anidado-Cruzado	(1) Global $= \pm 3\%$ (2) Global $= \pm 3\%$ (1): $f_{cal} < f_{critica} (\alpha=0.05, \text{gl})$ (2): $f_{cal} < f_{critica} (\alpha=0.05, \text{gl})$
Límite de Cuantificación Límite de Detección	Prueba t de Student Coeficiente de Variación (CV) Método Gráfico	$t_{cal} < t_{critica} (\alpha=0.05, 5 \text{ gl})$ $\leq 2\%$ *
Sensitividad	Diferencia Mínima Significativa (DMS)	*
Estabilidad de la Muestra Procesada	Prueba t de Student	$t_{cal} < t_{critica} (\alpha=0.05, \text{gl})$

**Tabla 3.1:** Criterios de Aceptación para la Validación del Método Analítico. (\*) En esta Prueba, solo se realiza la determinación de la magnitud de la característica a evaluar.

Solución	Concentración Real		Respuesta Analítica		Normalización	
	APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	APAP	NAP
1	8.3988	5.5664	8.3620	5.5866	0.9956	1.0036
1	8.3988	5.5664	8.3378	5.6419	0.9927	1.0136
2	11.1984	5.5664	11.1569	5.6611	0.9963	1.0170
2	11.1984	5.5664	11.1729	5.5665	0.9977	1.0000
3	13.9980	5.5664	14.0756	5.5892	1.0055	1.0041
3	13.9980	5.5664	13.9824	5.5750	0.9989	1.0015
4	16.7976	5.5664	16.7730	5.5687	0.9985	1.0004
4	16.7976	5.5664	16.7975	5.5924	1.0000	1.0047
5	11.1984	8.3496	11.2147	8.2831	1.0015	0.9920
5	11.1984	8.3496	11.1841	8.2604	0.9987	0.9893
6	13.9980	8.3496	14.0422	8.2929	1.0032	0.9932
6	13.9980	8.3496	13.9899	8.1782	0.9994	0.9795
7	16.7976	8.3496	16.8385	8.3162	1.0024	0.9960
7	16.7976	8.3496	16.8127	8.2540	1.0009	0.9886
8	13.9980	11.1328	13.9918	11.2370	0.9996	1.0094
8	13.9980	11.1328	14.0706	11.1922	1.0052	1.0053
9	16.7976	11.1328	16.7676	11.2011	0.9982	1.0061
9	16.7976	11.1328	16.7891	11.1159	0.9995	0.9985
10	19.5972	11.1328	19.5694	11.1770	0.9986	1.0040
10	19.5972	11.1328	19.6347	11.1497	1.0019	1.0015
11	19.5972	13.9160	19.6519	13.8909	1.0028	0.9982
11	19.5972	13.9160	19.6318	13.8767	1.0018	0.9972
12	22.3968	13.9160	22.3780	13.8751	0.9992	0.9971
12	22.3968	13.9160	22.4152	13.9043	1.0008	0.9992
13	22.3968	16.6992	22.4525	16.7265	1.0025	1.0016
13	22.3968	16.6992	22.4377	16.6546	1.0018	0.9973
14	25.1964	16.6992	25.1081	16.7389	0.9965	1.0024
14	25.1964	16.6992	25.1570	16.7533	0.9984	1.0032
15	25.1964	19.4824	25.1659	19.5163	0.9988	1.0017
15	25.1964	19.4824	25.1632	19.5524	0.9987	1.0036
16	27.9960	22.2656	27.9873	22.2616	0.9997	0.9998
16	27.9960	22.2656	27.9993	22.2859	1.0001	1.0009
17	27.9960	25.0488	28.0222	25.0047	1.0009	0.9982
17	27.9960	25.0488	27.9768	24.9996	0.9993	0.9980

Tabla 3.2: Concentración real y respuestas analíticas obtenidas en el método de MCP.

Solución	Concentración Real		Respuesta Analítica		Normalización	
	APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	APAP	NAP
1	8.3988	5.5664	8.3584	5.5535	0.9956	1.0036
1	8.3988	5.5664	8.3377	5.6417	0.9927	1.0136
2	11.1984	5.5664	11.1612	5.7266	0.9963	1.0170
2	11.1984	5.5664	11.1827	5.5929	0.9977	1.0000
3	13.9980	5.5664	14.0344	5.5394	1.0055	1.0041
3	13.9980	5.5664	13.9827	5.5698	0.9989	1.0015
4	16.7976	5.5664	16.7948	5.5860	0.9985	1.0004
4	16.7976	5.5664	16.8129	5.6056	1.0000	1.0047
5	11.1984	8.3496	11.2089	8.3004	1.0015	0.9920
5	11.1984	8.3496	11.1932	8.2459	0.9987	0.9893
6	13.9980	8.3496	14.0460	8.2969	1.0032	0.9932
6	13.9980	8.3496	13.9845	8.1713	0.9994	0.9795
7	16.7976	8.3496	16.8497	8.3249	1.0024	0.9960
7	16.7976	8.3496	16.8227	8.2665	1.0009	0.9886
8	13.9980	11.1328	13.9876	11.2498	0.9996	1.0094
8	13.9980	11.1328	14.0705	11.1975	1.0052	1.0053
9	16.7976	11.1328	16.7674	11.1823	0.9982	1.0061
9	16.7976	11.1328	16.7777	11.1192	0.9995	0.9985
10	19.5972	11.1328	19.5787	11.1832	0.9986	1.0040
10	19.5972	11.1328	19.6436	11.0987	1.0019	1.0015
11	19.5972	13.9160	19.6570	13.8909	1.0028	0.9982
11	19.5972	13.9160	19.6252	13.8560	1.0018	0.9972
12	22.3968	13.9160	22.3590	13.8696	0.9992	0.9971
12	22.3968	13.9160	22.4101	13.9040	1.0008	0.9992
13	22.3968	16.6992	22.4513	16.7138	1.0025	1.0016
13	22.3968	16.6992	22.4511	16.6693	1.0018	0.9973
14	25.1964	16.6992	25.0978	16.7307	0.9965	1.0024
14	25.1964	16.6992	25.1503	16.7557	0.9984	1.0032
15	25.1964	19.4824	25.1564	19.5148	0.9988	1.0017
15	25.1964	19.4824	25.1336	19.4841	0.9987	1.0036
16	27.9960	22.2656	27.9970	22.3236	0.9997	0.9998
16	27.9960	22.2656	27.9891	22.3383	1.0001	1.0009
17	27.9960	25.0488	28.0349	24.9958	1.0009	0.9982
17	27.9960	25.0488	28.0023	24.9815	0.9993	0.9980

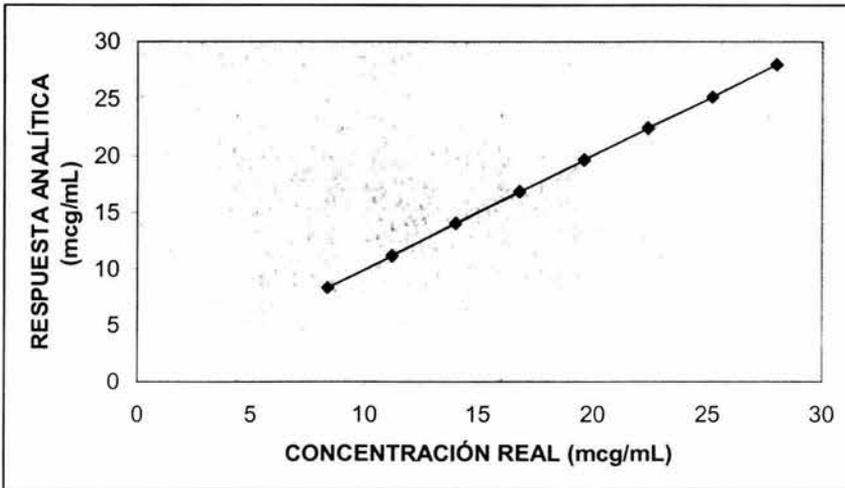
Tabla 3.3: Concentración real y respuestas analíticas obtenidas en el método de RCP.

## 3.2 VALIDACIÓN DEL SISTEMA

### 3.2.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

La linealidad del sistema se evaluó por medio de la estimación de la concentración de 17 diferentes soluciones de mezclas de APAP y de NAP, las cuales fueron preparadas por duplicado y a partir de una solución patrón de ambos analitos.

En las tablas 3.2 y 3.3 se muestran las respuestas analíticas obtenidas por los métodos de MCP y RCP, respectivamente, así como las concentraciones correspondientes utilizadas de APAP y de NAP. En las figuras 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 se muestran los gráficos de la concentración real contra la respuesta analítica obtenida para cada analito utilizando los métodos de MCP y RCP. El análisis de variancia para determinar si existe o no una relación lineal entre la concentración real y la respuesta analítica obtenida para ambos analitos y métodos de calibración multivariante se muestran en las tablas 3.4, 3.5, 3.6 y 3.7.



**Figura 3.1:** Gráfico de la Concentración Real de APAP contra su Respuesta Analítica obtenida, aplicando el método de MCP.

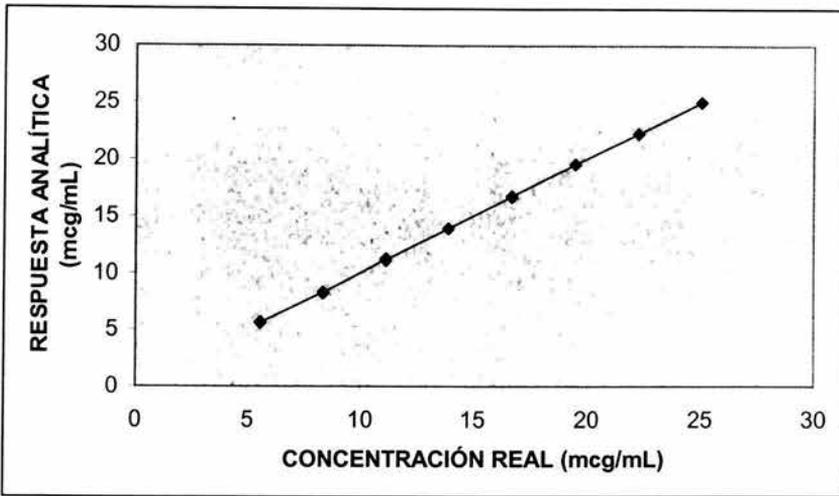


Figura 3.2: Gráfico de la Concentración Real de NAP contra su Respuesta Analítica obtenida, aplicando el método de MCP.

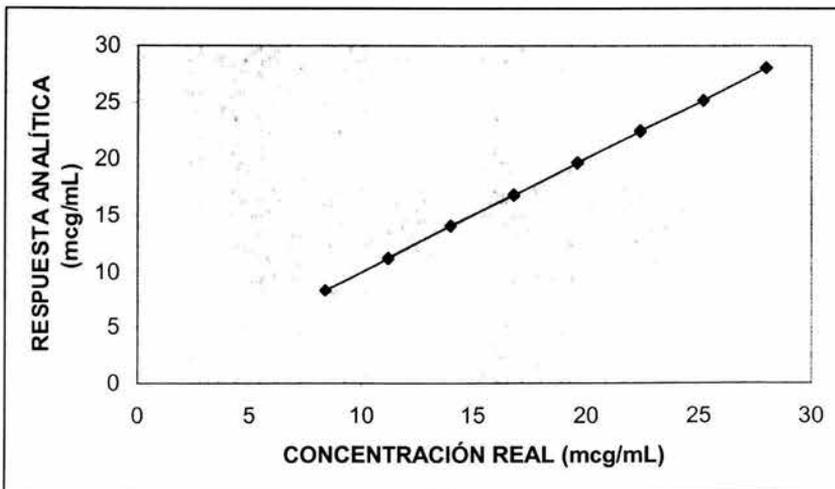
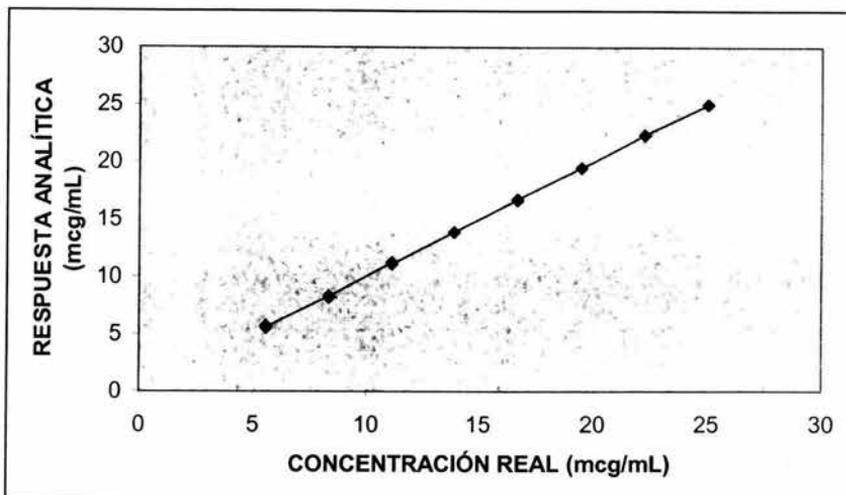


Figura 3.3: Gráfico de la Concentración Real de APAP contra su Respuesta Analítica obtenida, aplicando el método de RCP.



**Figura 3.4:** Gráfico de la Concentración Real de NAP contra su Respuesta Analítica obtenida, aplicando el método de RCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	1161.7350	1161.7350	753353.47	4.17
Residuos	32	0.0494	0.0015		
Total	33	1161.7844			

**Tabla 3.4:** Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entre la Concentración real de APAP y su respuesta analítica, aplicando el método de MCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	1161.7231	1161.7231	678414.73	4.17
Residuos	32	0.0548	0.0017		
Total	33	1161.7779			

**Tabla 3.5:** Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entre la Concentración real de APAP y su respuesta analítica, empleando el método de RCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	1179.0163	1179.0163	327484.45	4.17
Residuos	32	0.1152	0.0036		
Total	33	1179.1315			

**Tabla 3.6:** Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entre la Concentración real de NAP y su respuesta analítica, empleando el método de MCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	1178.9590	1178.9590	263493.12	4.17
Residuos	32	0.1432	0.0045		
Total	33	1179.1022			

**Tabla 3.7:** Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entre la Concentración de NAP y su respuesta analítica, empleando el método de RCP.

De acuerdo a los gráficos de concentración real contra la respuesta analítica obtenida y a los análisis de variancia efectuados, en donde la f calculada es mayor con respecto a su f crítica en todos los casos, se determinó que existe una relación lineal entre la concentración real y su respuesta analítica obtenida, en ambos analitos y ambos métodos de calibración multivariante.

Posteriormente, en la Tabla 3.8 se muestran los valores de las características empleadas para evaluar la linealidad del sistema obtenidas por análisis de regresión para cada analito y cada método de calibración multivariante.

Características a Evaluar	Método de MCP		Método de RCP	
	APAP	NAP	APAP	NAP
Intercepto (b)	0.00077	0.00119	0.00087	0.00149
Pendiente (m)	0.99996	0.99990	0.99995	0.99988
Coefficiente de Correlación (r)	0.99998	0.99995	0.99998	0.99994
Coefficiente de Determinación ( $r^2$ )	0.99996	0.99990	0.99995	0.99988
CV (%)	0.2598	0.6880	0.2566	0.8152

**Tabla 3.8:** Características requeridas para evaluar la Linealidad del Sistema.

Como se observa en la tabla anterior, los valores obtenidos para el Coeficiente de Correlación, el Coeficiente de Determinación y el CV, se encuentran dentro del criterio de aceptación establecido para determinar si el sistema es lineal, tanto en el método de MCP como en el método de RCP.

Método de Calibración Multivariante	Curva de Regresión	Valor del Intercepto (b)	LIC 95%	LSC 95%	t calculada	Valor de t crítica ( $\alpha=0.05, n-1$ )
MCP	APAP	0.0008	-0.0772	0.0788	0.0194	2.01
	NAP	0.0012	-0.1180	0.1204	0.0196	2.01
RCP	APAP	0.0009	-0.0813	0.0831	0.0207	2.01
	NAP	0.0015	-0.1314	0.1343	0.0220	2.01

**Tabla 3.9:** Intervalos de confianza y valor de t calculados para determinar si el valor del intercepto es igual o no a cero en las cuatro rectas de regresión.

Por otra parte, con los resultados obtenidos en la tabla 3.9 de los intervalos de confianza estimados así como el valor de t calculada, la cual es menor a su correspondiente t crítica, se determina que el valor del intercepto en cada una de las cuatro rectas de regresión es igual a cero, por lo cual se establece que el sistema es lineal para cada analito de interés y tanto en el método de MCP como en el método de RCP.

### 3.2.2 PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL SISTEMA

La precisión y exactitud del sistema se evaluó mediante la estimación de la concentración de tres diferentes soluciones de APAP y NAP. Cada solución se preparó por sextuplicado.

En la Tabla 3.10, se muestran los porcentajes determinados por los métodos de MCP Y RCP en cada una de las tres soluciones empleadas así como las concentraciones utilizadas de APAP y de NAP. En las tablas 3.11 y 3.12 se muestran los valores obtenidos del CV en cada analito para determinar la precisión del sistema y en las tablas 3.13 y 3.14 se muestran los valores obtenidos de t calculada para determinar si el sistema es exacto.

Concentración Real		Método de MCP		Método de RCP	
APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	Porcentaje Determinado (%)		Porcentaje Determinado (%)	
		APAP	NAP	APAP	NAP
8.4720	5.6560	99.6081	99.7690	99.2037	99.9821
		99.5361	101.6231	99.2777	101.9863
		100.5701	102.8571	100.4254	102.9600
		101.2288	101.5753	101.0269	101.9292
		100.4816	102.4558	100.2753	102.7750
		100.1428	101.6690	99.5816	101.6937
16.9440	14.1200	100.5500	100.6622	100.5961	100.5517
		100.4810	100.7323	100.5819	100.5952
		100.7253	101.0014	100.7601	100.9528
		100.0260	100.0659	100.0408	100.0129
		100.3689	100.1870	100.0478	100.5411
		100.6728	100.1586	100.5229	100.3608
28.2400	25.4160	100.2309	100.0275	99.7244	100.5261
		99.8017	100.0732	99.4632	100.4195
		100.0956	100.2636	99.6758	100.7146
		100.2252	100.3348	99.9845	100.6396
		100.3144	100.6787	99.9977	101.0036
		100.4104	99.8363	99.9281	100.3425

**Tabla 3.10:** Porcentajes determinados obtenidos por los métodos de MCP y RCP.

Concentración Real APAP (mcg/mL)	Método de MCP			Método de RCP		
	Promedio (%)	Desv. Est	CV (%)	Promedio (%)	Desv. Est	CV (%)
8.4720	100.2613	0.6398	0.6381	99.9651	0.7259	0.7262
16.9440	100.4707	0.2531	0.2519	100.4249	0.3052	0.3039
28.2400	100.1797	0.2126	0.2122	99.7956	0.2117	0.2121

**Tabla 3.11:** Características determinadas para evaluar la Precisión del Sistema para el APAP, en ambos métodos de calibración multivariante.

Concentración Real NAP (mcg/mL)	Método de MCP			Método de RCP		
	Promedio (%)	Desv. Est	CV (%)	Promedio (%)	Desv. Est	CV (%)
5.6560	101.6582	1.0631	1.0458	101.8878	1.0600	1.0403
14.1200	100.4679	0.3817	0.3800	100.5024	0.3082	0.3067
25.4160	100.2024	0.2930	0.2925	100.6077	1.0109	1.0048

**Tabla 3.12:** Características determinadas para evaluar la Precisión del Sistema para el NAP, en ambos métodos de calibración multivariante.

En las tablas 3.11 y 3.12 se observa que los valores calculados del CV para ambos analitos y para ambos métodos de calibración multivariante en las tres diferentes concentraciones utilizadas, son menores al 2 % por lo cual se establece que el sistema es preciso.

Concentración real APAP (mcg/mL)	Método de MCP		Método de RCP	
	t calculada	t crítica ( $\alpha = 0.05$ )	t calculada	t crítica ( $\alpha = 0.05$ )
8.4720	0.4084	2.57	-0.0481	2.57
16.9440	1.8598	2.57	1.3924	2.57
28.2400	0.8452	2.57	-0.9656	2.57

**Tabla 3.13:** Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del sistema para el APAP.

Concentración real NAP (mcg/mL)	Método de MCP		Método de RCP	
	t calculada	t crítica ( $\alpha = 0.05$ )	t calculada	t crítica ( $\alpha = 0.05$ )
5.6560	1.5598	2.57	1.7809	2.57
14.1200	1.2258	2.57	1.6300	2.57
25.4160	0.6905	2.57	0.6011	2.57

**Tabla 3.14:** Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del sistema para el NAP.

Por otra parte, con los resultados obtenidos en las tablas 3.13 y 3.14, se observa que todos los valores de la t calculada son menores que el valor de la t crítica correspondiente por lo cual se establece que el sistema es exacto, en las tres diferentes concentraciones utilizadas para APAP y para NAP y en ambos métodos de calibración multivariante.

### 3.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

#### 3.3.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad del método se evaluó mediante la estimación de la concentración de 17 diferentes muestras de placebos cargados. Cada muestra se preparó por duplicado. En el Anexo A.2 se muestra de manera general, el procedimiento realizado para la calibración del método.

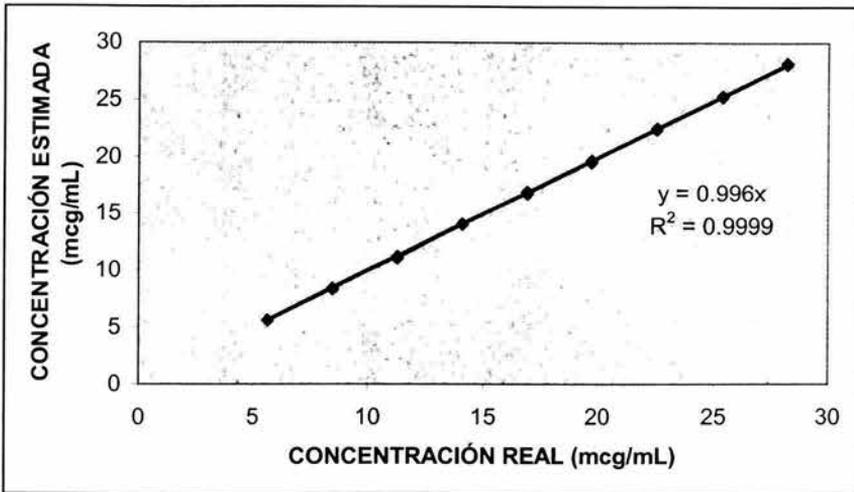
En las tablas 3.15 y 3.16 se muestran las concentraciones estimadas obtenidas por los métodos de MCP y RCP, respectivamente, así como las correspondientes concentraciones utilizadas de APAP y de NAP. En las figuras 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8 se muestran los gráficos de la concentración real contra la concentración estimada obtenida para cada analito utilizando ambos métodos de calibración multivariante.

Solución	Concentración Real		Concentración Estimada		Concentración Estimada / Concentración real	
	APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	APAP	NAP
	1	5.6360	5.6554	5.6467	5.5994	1.0019
1	5.6360	5.6554	5.5887	5.7613	0.9916	1.0187
2	8.4540	5.6554	8.3750	5.6506	0.9907	0.9992
2	8.4540	5.6554	8.3373	5.8080	0.9862	1.0270
3	11.2720	5.6554	11.2272	5.7410	0.9960	1.0151
3	11.2720	5.6554	11.2036	5.7274	0.9939	1.0127
4	8.4540	8.4830	8.3371	8.4385	0.9862	0.9947
4	8.4540	8.4830	8.3191	8.4195	0.9840	0.9925
5	11.2720	8.4830	11.1435	8.4143	0.9886	0.9919
5	11.2720	8.4830	11.0678	8.4482	0.9819	0.9959
6	14.0900	11.3107	14.0383	11.5871	0.9963	1.0244
6	14.0900	11.3107	14.0495	11.5387	0.9971	1.0202
7	16.9080	11.3107	16.9178	11.4000	1.0006	1.0079
7	16.9080	11.3107	16.8914	11.3831	0.9990	1.0064
8	14.0900	14.1384	14.0122	14.1208	0.9945	0.9988
8	14.0900	14.1384	13.9964	14.0907	0.9934	0.9966
9	16.9080	14.1384	16.9641	14.3762	1.0033	1.0168
9	16.9080	14.1384	16.7244	14.2503	0.9891	1.0079
10	19.7260	14.1384	19.6744	14.0641	0.9974	0.9947
10	19.7260	14.1384	19.5597	14.0306	0.9916	0.9924
11	19.7260	16.9661	19.4970	16.8773	0.9884	0.9948
11	19.7260	16.9661	19.6773	16.8862	0.9975	0.9953
12	22.5440	16.9661	22.5166	16.9505	0.9988	0.9991
12	22.5440	16.9661	22.4831	17.0036	0.9973	1.0022
13	22.5440	19.7938	22.3866	19.9551	0.9930	1.0081
13	22.5440	19.7938	22.4076	19.8468	0.9939	1.0027
14	25.3620	19.7938	25.2320	19.8252	0.9949	1.0016
14	25.3620	19.7938	25.2194	19.8401	0.9944	1.0023
15	25.3620	22.6215	25.2442	22.7049	0.9954	1.0037
15	25.3620	22.6215	25.3129	22.6320	0.9981	1.0005
16	28.1800	22.6215	28.1862	22.6231	1.0002	1.0001
16	28.1800	22.6215	28.1419	22.6851	0.9986	1.0028
17	28.1800	25.4491	28.0900	25.5995	0.9968	1.0059
17	28.1800	25.4491	28.1616	25.3357	0.9993	0.9955

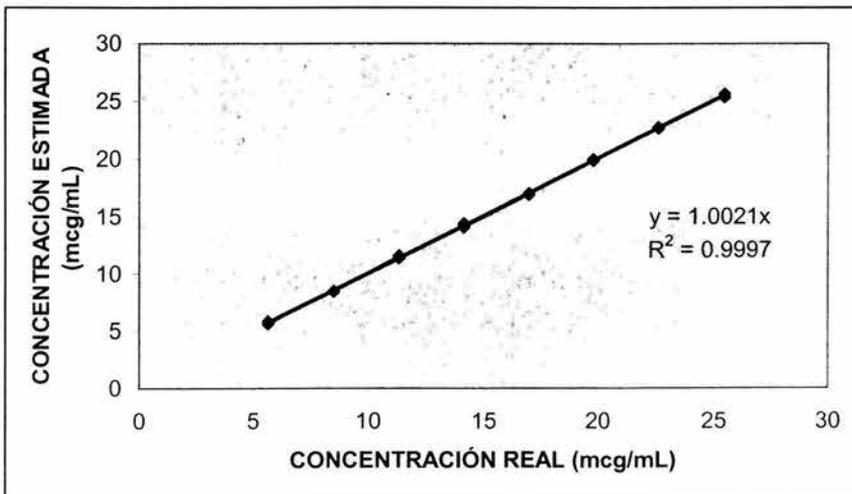
Tabla 3.15: Concentraciones estimadas obtenidas aplicando el método de MCP.

Solución	Concentración Real		Concentración Estimada		Concentración Estimada / Concentración real	
	APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	APAP	NAP
	1	5.6360	5.6554	5.7327	5.7013	1.0172
1	5.6360	5.6554	5.7281	5.6655	1.0164	1.0018
2	8.4540	5.6554	8.5617	5.7429	1.0127	1.0155
2	8.4540	5.6554	8.5582	5.6532	1.0123	0.9996
3	11.2720	5.6554	11.5052	5.8006	1.0207	1.0257
3	11.2720	5.6554	11.3196	5.8212	1.0042	1.0293
4	8.4540	8.4830	8.4998	8.5979	1.0054	1.0135
4	8.4540	8.4830	8.4564	8.6124	1.0003	1.0152
5	11.2720	8.4830	11.2648	8.5297	0.9994	1.0055
5	11.2720	8.4830	11.2195	8.5446	0.9953	1.0073
6	14.0900	11.3107	14.2754	11.6506	1.0132	1.0300
6	14.0900	11.3107	14.2703	11.6679	1.0128	1.0316
7	16.9080	11.3107	17.0902	11.4431	1.0108	1.0117
7	16.9080	11.3107	17.0848	11.4880	1.0105	1.0157
8	14.0900	14.1384	14.1903	14.3329	1.0071	1.0138
8	14.0900	14.1384	14.1456	14.2461	1.0039	1.0076
9	16.9080	14.1384	17.1617	14.5718	1.0150	1.0307
9	16.9080	14.1384	16.9822	14.4895	1.0044	1.0248
10	19.7260	14.1384	19.8186	14.1462	1.0047	1.0006
10	19.7260	14.1384	19.7460	14.1423	1.0010	1.0003
11	19.7260	16.9661	19.7043	16.9988	0.9989	1.0019
11	19.7260	16.9661	19.8484	17.0058	1.0062	1.0023
12	22.5440	16.9661	22.6731	17.0637	1.0057	1.0058
12	22.5440	16.9661	22.6897	17.0525	1.0065	1.0051
13	22.5440	19.7938	22.6206	19.9383	1.0034	1.0073
13	22.5440	19.7938	22.5945	19.8576	1.0022	1.0032
14	25.3620	19.7938	25.4443	19.7966	1.0032	1.0001
14	25.3620	19.7938	25.4320	19.8296	1.0028	1.0018
15	25.3620	22.6215	25.4658	22.6779	1.0041	1.0025
15	25.3620	22.6215	25.5028	22.6408	1.0056	1.0009
16	28.1800	22.6215	28.3633	22.5860	1.0065	0.9984
16	28.1800	22.6215	28.3395	22.6586	1.0057	1.0016
17	28.1800	25.4491	28.3174	25.5595	1.0049	1.0043
17	28.1800	25.4491	28.3507	25.5347	1.0061	1.0034

**Tabla 3.16:** Concentraciones estimadas obtenidas aplicando el método de RCP.



**Figura 3.5:** Gráfico de la Concentración Real de APAP y su Concentración estimada obtenida aplicando el método de MCP.



**Figura 3.6:** Gráfico de la Concentración Real de NAP y su Concentración estimada obtenida aplicando el método de MCP.

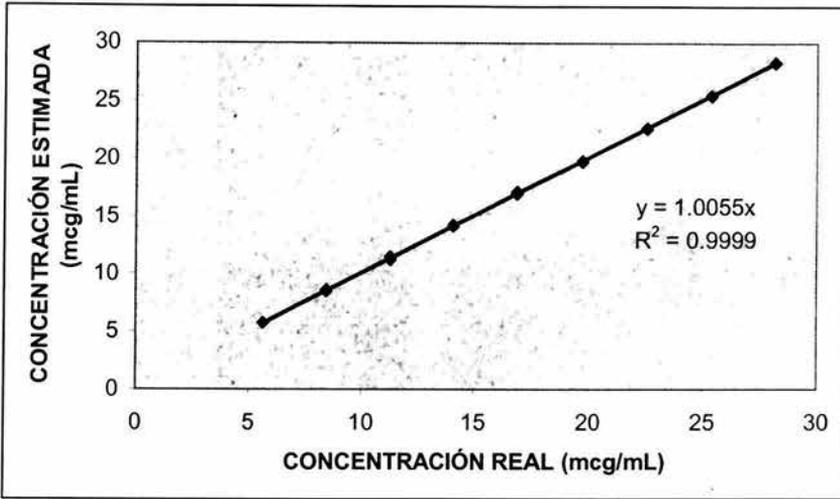


Figura 3.7: Gráfico de la Concentración Real de APAP y su Concentración estimada obtenida aplicando el método de RCP.

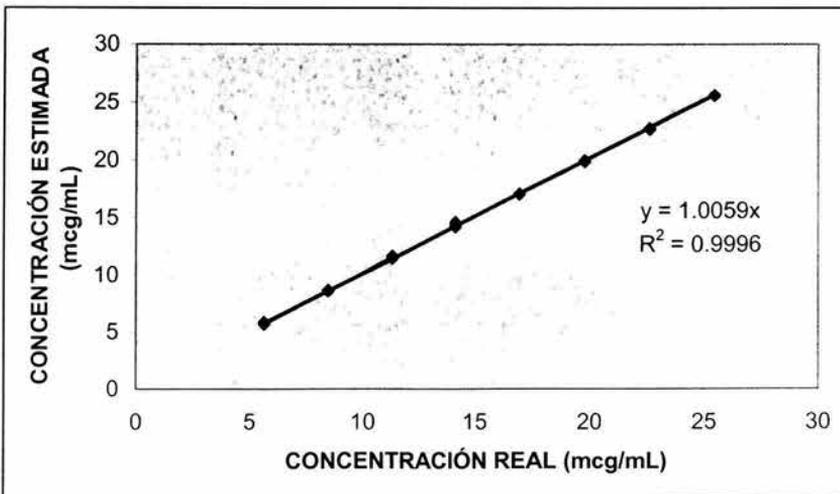


Figura 3.8: Gráfico de la Concentración Real de NAP y su Concentración estimada obtenida aplicando el método de RCP.

El análisis de variancia efectuado para determinar si existe o no una relación lineal entre la concentración real y la concentración estimada obtenida para ambos analitos y métodos de calibración multivariante se muestran en las tablas 3.17, 3.18, 3.19 y 3.20.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	Valor crítico de f ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	1640.0973	1640.0973	394357.69	4.17
Residuos	32	0.1331	0.0042		
Total	33	1640.2304			

**Tabla 3.17:** Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entre la Concentración de APAP y su Concentración estimada, empleando el método de MCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	Valor crítico de f ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	1661.4839	1661.4839	354639.03	4.17
Residuos	32	0.1593	0.0047		
Total	33	1661.6432			

**Tabla 3.18:** Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entre la Concentración de APAP y su Concentración estimada, empleando el método de RCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	Valor crítico de f ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	1292.5692	1292.5692	121584.27	4.17
Residuos	32	0.3402	0.0106		
Total	33	1292.9094			

**Tabla 3.19:** Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entre la Concentración de NAP y su Concentración estimada, empleando el método de MCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	Valor crítico de f ( $\alpha=0.05$ )
Regresión	1	1285.7974	1285.7974	101715.64	4.17
Residuos	32	0.4045	0.0126		
Total	33	1286.2019			

**Tabla 3.20:** Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entre la Concentración de NAP y su Concentración estimada, empleando el método de RCP.

De acuerdo a las figuras 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8, y a los análisis de variancia en donde todas las f calculadas son mayores a sus respectivas f críticas, se determinó que si existe una relación lineal entre la concentración real y su concentración estimada obtenida, en ambos analitos y ambos métodos de calibración multivariante.

Posteriormente, en la Tabla 3.21 se muestran los valores de las características empleadas para evaluar la Linealidad del Método obtenidas por análisis de regresión por mínimos cuadrados para cada analito y cada método de calibración multivariante.

Característica a Evaluar	Método de MCP		Método de RCP	
	APAP	NAP	APAP	NAP
Intercepto (b)	-0.0868	0.0468	0.0594	0.1559
Pendiente (m)	1.0003	0.9993	1.0025	0.9967
Coefficiente de Correlación (r)	0.9999	0.9998	0.9999	0.9998
Coefficiente de Determinación ( $r^2$ )	0.9999	0.9997	0.9999	0.9997
CV (%)	0.5198	0.9637	0.5628	1.0122

**Tabla 3.21:** Características empleadas para evaluar la Linealidad del Método.

Como se observa en la tabla anterior, los valores obtenidos para el Coeficiente de Correlación, el Coeficiente de Determinación y el CV, se encuentran dentro del criterio de aceptación establecido para determinar si el método es lineal, tanto en MCP como en RCP.

Método de Calibración Multivariante	Curva de Regresión	Valor del Intercepto (b)	LIC 95%	LSC 95%	t calculada	Valor de t crítica ( $\alpha = 0.05$ )
MCP	APAP	-0.0868	-0.2231	0.0496	-1.2792	2.04
	NAP	0.0469	-0.5446	0.6383	0.1592	2.04
RCP	APAP	0.0594	-0.0796	0.1984	-0.1680	2.04
	NAP	0.1559	-0.4763	0.7882	0.6198	2.04

**Tabla 3.22:** Intervalos de confianza y valor de t calculados para determinar si el valor del intercepto es igual o no a cero en las cuatro rectas de regresión.

Método de Calibración Multivariante	Curva de Regresión	Valor de la Pendiente (m)	LIC 95%	LSC 95%
MCP	APAP	1.0003	0.9948	1.0057
	NAP	0.9993	0.9931	1.0055
RCP	APAP	1.0025	0.9995	1.0049
	NAP	0.9967	0.9931	1.0003

**Tabla 3.23:** Intervalos de confianza calculados para determinar si el valor de la pendiente incluye el valor de uno en las cuatro rectas de regresión.

Por otra parte, con los resultados obtenidos en la tabla 3.22 de los intervalos de confianza estimados así como el valor de t calculada, la cual es menor a su correspondiente t crítica, se determina que el valor del intercepto en cada una de las cuatro rectas de regresión es igual a cero. Así mismo, como se observa en la Tabla 3.23, los intervalos de confianza calculados para la pendiente incluyen el uno en las cuatro rectas de regresión, por lo cual se puede establecer que el método es lineal para ambos analitos y para ambos métodos de calibración multivariante.

### 3.3.2 PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO

La precisión y exactitud del método se evaluó por medio de la determinación de la concentración de tres diferentes muestras de placebos cargados. Las muestras preparadas contenían la concentración inferior, media y superior del intervalo lineal establecido en la linealidad del método y se hicieron seis ensayos de cada una.

En la Tabla 3.24, se muestran los porcentajes determinados por los métodos de MCP y RCP en las tres diferentes soluciones empleadas así como las concentraciones utilizadas de APAP y de NAP. En las tablas 3.25 y 3.26 se muestran los valores obtenidos del CV de cada analito para determinar la precisión del método y en las tablas 3.27 y 3.28 se muestran los valores obtenidos de  $t$  calculada para determinar si el método es exacto.

Concentración Real		Método de MCP		Método de RCP	
APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	Porcentaje determinado (%)		Porcentaje determinado (%)	
		APAP	NAP	APAP	NAP
5.5031	5.9379	98.1049	101.9898	99.9671	101.0913
		98.8027	102.6887	99.6527	102.0180
		98.1467	100.5246	99.8648	100.0355
		100.4691	102.8655	102.4337	102.6175
		98.1758	102.4159	99.0652	102.1342
		98.4411	101.8837	100.0161	100.9934
16.2476	15.2235	100.2711	101.2621	100.7198	100.8339
		100.0581	100.5665	100.3371	100.3512
		100.1228	101.5485	100.5443	101.3202
		100.0944	100.8246	100.5010	100.4484
		100.3443	100.6144	100.6733	100.2765
		100.0489	100.8483	100.4766	100.5062
28.2060	27.0994	98.3388	101.0589	98.3756	101.8041
		100.2877	102.3046	100.2597	102.8408
		98.8823	102.6209	98.8844	102.5619
		97.5543	100.8382	97.6576	100.6724
		99.3113	102.4246	99.2699	102.1682
		98.2477	101.8566	98.1476	101.6417

**Tabla 3.24:** Porcentajes determinados obtenidos aplicando los métodos de MCP y RCP.

Concentración Real APAP (mcg/mL)	Método de MCP			Método de RCP		
	Promedio (%)	Desv. Est	CV (%)	Promedio (%)	Desv. Est	CV (%)
5.5031	98.6901	0.9101	0.9222	100.1666	1.1636	1.1617
16.2476	100.1566	0.1222	0.1220	100.5420	0.1391	0.1384
28.2060	98.7704	0.9535	0.9654	98.7658	0.9233	0.9348

**Tabla 3.25:** Características determinadas para evaluar la Precisión del Método para el APAP, en ambos métodos de calibración multivariante.

Concentración Real NAP (mcg/mL)	Método de MCP			Método de RCP		
	Promedio (%)	Desv. Est	CV (%)	Promedio (%)	Desv. Est	CV (%)
5.9379	102.0614	0.8443	0.8272	101.4817	0.9472	0.9334
15.2235	100.9441	0.3850	0.3814	100.6227	0.3921	0.3897
27.0994	101.8506	0.7458	0.7322	101.9482	0.8160	0.8004

**Tabla 3.26:** Características determinadas para evaluar la Precisión del Método para el NAP, en ambos métodos de calibración multivariante.

Concentración Real APAP (mcg/mL)	Método de MCP		Método de RCP	
	t calculada	t crítica ( $\alpha = 0.05$ )	t calculada	t crítica ( $\alpha = 0.05$ )
5.5031	-1.4393	2.57	0.1432	2.57
16.2476	1.2816	2.57	3.8957	2.57
28.2060	-1.2896	2.57	-1.3368	2.57

**Tabla 3.27:** Resultados obtenidos para evaluar la Exactitud del Método para el APAP.

Concentración Real NAP (mcg/mL)	Método de MCP		Método de RCP	
	t calculada	t crítica ( $\alpha = 0.05$ )	t calculada	t crítica ( $\alpha = 0.05$ )
5.9379	2.4415	2.57	1.5642	2.57
15.2235	2.4520	2.57	1.5883	2.57
27.0994	2.4815	2.57	2.3876	2.57

**Tabla 3.28:** Resultados obtenidos para evaluar la Exactitud del Método para el NAP.

Como se observa en las tablas 3.25 y 3.26, los valores calculados del CV para ambos analitos y par ambos métodos de calibración multivariante en las tres diferentes soluciones empleadas, son menores al 2 %, por lo cual se establece que el método es preciso.

Por otra parte, como se observa en las tablas 3.27 y 3.28 para el caso del método de MCP, los valores de  $t$  calculada en las tres diferentes soluciones empleadas son menores que el valor de la  $t$  crítica, por lo cual se establece que este método es capaz de cuantificar ambos analitos con aceptable precisión y exactitud aún con los excipientes presentes en la muestra analítica. Así también, como se observa en la tabla 3.28 para el caso del método de RCP, todos los valores de  $t$  calculada son menores que el valor de la  $t$  crítica correspondiente por lo cual se establece que el método de RCP puede cuantificar al NAP con precisión y exactitud en las tres diferentes soluciones empleadas, aún con la presencia de excipientes.

Sin embargo, como se puede observar en la tabla 3.27 para el caso del método de RCP, la  $t$  calculada es mayor que la  $t$  crítica en la concentración de 16.2476 mcg/mL, por lo cual se podría asegurar que el método de RCP no puede cuantificar con exactitud al APAP. Sin embargo, el valor alto de la  $t$  calculada fue obtenido a causa de un pequeño valor de la desviación estándar lo cual indica poca dispersión de los datos entre sí, además de que los porcentajes determinados se encuentran dentro del 100 al 100.8 % (valores determinados entre 100.3371 a 100.7198).

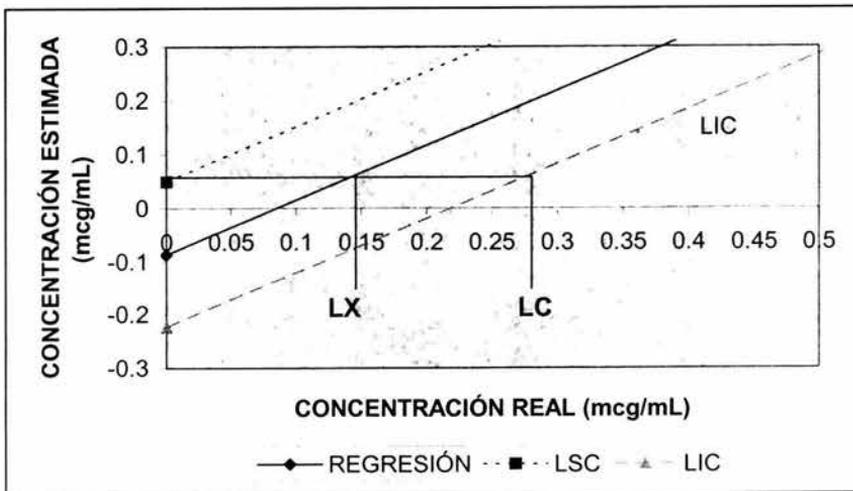
Como lo muestra la tabla 3.1, los valores del porcentaje determinado deben encontrarse entre los valores del 98-102 %, por lo cual se comprueba por medio de la tabla 3.29 de que el método también es exacto para el APAP en el método de RCP además de que los valores del LSC y LIC incluyen el 100 % y el CV es menor de 2%.

Analito de Interés	Método de MCP			Método de RCP		
	CV Global (%)	Porcentaje determinado		CV Global (%)	Porcentaje determinado	
		LIC (%)	LSC (%)		LIC (%)	LSC (%)
APAP	1.0056	98.9944	101.0056	1.1304	98.8696	101.1304
NAP	0.8028	99.1972	100.8028	0.8839	99.1161	100.8839

**Tabla 3.29:** CV e intervalos de confianza globales calculados del porcentaje determinado (%) para cada analito de interés.

### 3.3.3 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN

Con los datos de regresión obtenidos durante la calibración del método para cada analito y cada método de calibración multivariante, se calcularon los intervalos de confianza del intercepto y se estimaron por extrapolación los valores del límite de cuantificación y límite de detección, tal y como se muestra en las figuras 3.9, 3.10, 3.11 y 3.12 y en la Tabla 3.30.



**Figura 3.9:** Estimación por extrapolación del valor del Límite de Cuantificación (LC) y el Límite de Detección (LX) para el APAP aplicando el método de MCP.

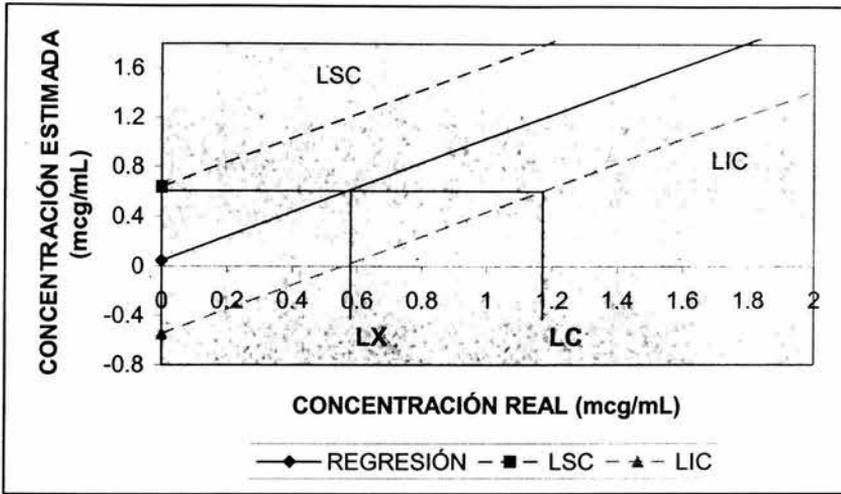


Figura 3.10: Estimación por extrapolación del valor del Límite de Cuantificación (LC) y el Límite de Detección (LX) para el NAP aplicando el método de MCP.

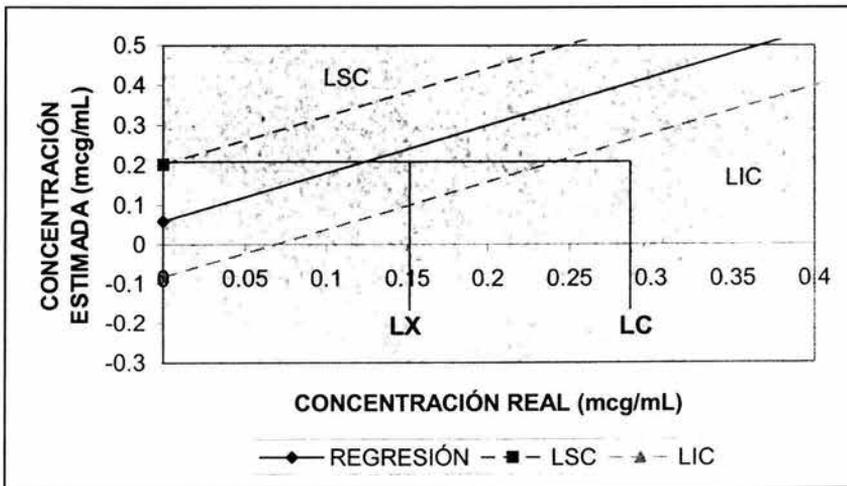


Figura 3.11: Estimación por extrapolación del valor del Límite de Cuantificación (LC) y el Límite de Detección (LX) para el APAP aplicando el método de RCP.

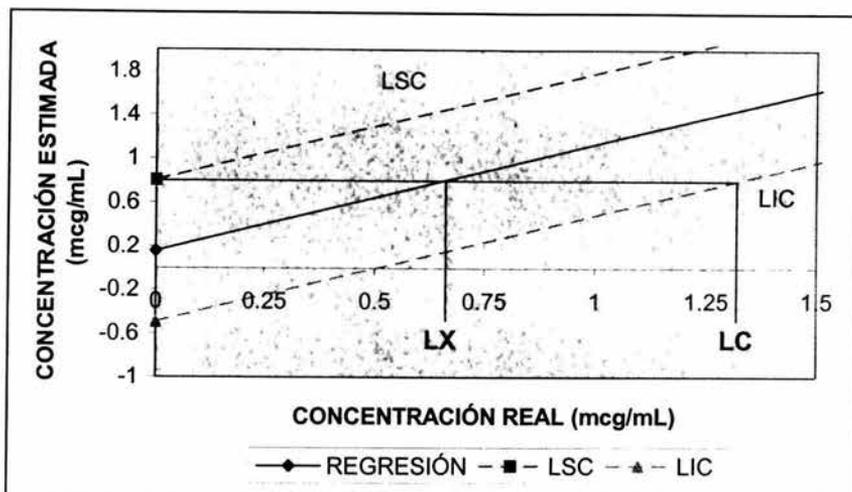


Figura 3.12: Estimación por extrapolación del valor del Límite de Cuantificación (LC) y el Límite de Detección (LX) para el NAP aplicando el método de RCP.

Componente a Cuantificar	Método de MCP		Método de RCP	
	Valor Estimado (mcg/mL)		Valor Estimado (mcg/mL)	
	LC	LX	LC	LX
APAP	0.2727	0.1364	0.2884	0.1442
NAP	1.2066	0.6033	1.5877	0.7939

Tabla 3.30: Valores estimados por extrapolación del límite de detección (LX) y del límite de cuantificación (LC) para ambos analitos de interés y para ambos métodos de calibración multivariante.

De acuerdo con los datos reportados en la FEUM, el primer tiempo de muestreo para un perfil de disolución es a los 5 minutos <sup>(5, 7)</sup>; por otra parte, de acuerdo a lo establecido en la sección 1.2.5.1 y 1.2.5.2, el primer tiempo de muestreo realizado para tabletas de cada principio activo por separado, es a los 10 minutos. Sin embargo es muy difícil que las concentraciones reportadas en la tabla 3.30 para el límite de cuantificación puedan presentarse en una muestra real de un estudio de disolución en los primeros 5 ó 10 minutos.

Por tal razón, se estimó la concentración de un placebo cargado (Anexo A.3), en donde la concentración de cada analito se encuentra por debajo del intervalo lineal establecido con el fin de demostrar que el método es capaz de cuantificar por debajo de dicho intervalo. En la Tabla 3.31 se muestran los porcentajes determinados por los métodos de MCP y RCP en la solución empleada así como las concentraciones utilizadas de APAP y de NAP.

Concentración		Método de MCP		Método de RCP	
APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	Porcentaje Determinado (%)		Porcentaje Determinado (%)	
		APAP	NAP	APAP	NAP
1.5185	2.0640	98.4511	98.9572	97.8538	99.5939
		100.7551	102.0503	98.0377	101.8366
		101.1987	101.9669	101.4931	102.7029
		101.1125	97.5131	98.5564	97.8208
		102.6831	99.2349	101.0961	100.3784
		102.4681	98.3621	100.2485	98.0908
<b>Promedio</b>		101.1114	99.6807	99.5476	100.0706
<b>Desv. Est.</b>		1.5181	1.8974	1.6003	1.9673
<b>CV</b>		1.5014	1.9035	1.6076	1.9659

**Tabla 3.31:** Resultados obtenidos para evaluar el Límite de cuantificación para ambos métodos de calibración multivariante y valores obtenidos de CV para cada analito.

Como se observa en la tabla 3.31, el valor obtenido del CV es menor a 2% en ambos analitos por lo que se establece que estas concentraciones son determinadas con aceptable precisión en ambos métodos de calibración multivariante.

Por otra parte, en la Tabla 3.32 se muestran los valores obtenidos de  $t$  calculada para determinar si las concentraciones empleadas pueden ser estimadas con exactitud.

Analito de Interés	Método de MCP			Método de RCP			Valor de t crítica ( $\alpha=0.05$ )
	LSC (%)	LIC (%)	t calculada	LSC (%)	LIC (%)	t calculada	
APAP	105.0128	97.2100	0.7321	103.6605	95.4348	-0.2827	2.57
NAP	104.5571	94.8043	-0.1683	105.1264	95.0147	0.0359	2.57

**Tabla 3.32:** Valores de t calculada obtenidos para evaluar la exactitud del límite de cuantificación.

Como se observa en la Tabla 3.32, todos los valores de la t calculada son menores que el valor de la t crítica correspondiente por lo cual se establece que las concentraciones de 1.5185 mcg/mL de APAP y 2.0640 mcg/mL de NAP son determinadas con aceptable precisión y exactitud en ambos métodos de calibración multivariante.

### 3.3.4 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

La repetibilidad y reproducibilidad se evaluó por medio de la determinación de la concentración de tres diferentes muestras de placebos cargados, con tres ensayos cada uno. Las muestras fueron preparadas por dos diferentes analistas, en dos diferentes días y bajo las condiciones de análisis establecidas. En la Tabla 3.33 se muestran las concentraciones utilizadas de APAP y de NAP.

Analito de interés	Concentración 1 (mcg/mL)	Concentración 2 (mcg/mL)	Concentración 3 (mcg/mL)
APAP	19.5964	21.1388	27.8521
NAP	14.2756	16.6200	25.3223

**Tabla 3.33:** Concentraciones utilizadas para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del método.

Por otra parte, en las tablas 3.34, 3.35, 3.36 y 3.37 se muestran los porcentajes determinados por ambos métodos de calibración multivariante. El análisis de variancia Anidado-cruzado efectuado para determinar la repetibilidad y reproducibilidad en ambos

analitos y métodos de calibración multivariante se muestra en las tablas 3.38, 3.39, 3.40 y 3.41.

Analito APAP		Porcentaje Determinado (%)		
		Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3
Analista 1	Día 1	99.2451	99.5034	99.3522
		99.8570	99.4021	100.0345
		100.4737	100.4722	100.5465
	Día 2	99.6858	100.4789	99.4111
		99.6335	99.3766	100.6277
		100.3055	100.3038	99.0978
Analista 2	Día 1	99.9634	100.2691	99.3759
		100.0439	100.1856	99.9848
		99.9268	100.0723	101.2224
	Día 2	99.9284	101.0186	100.3832
		100.4741	100.3676	99.7853
		100.2848	99.7878	99.9281

Tabla 3.34: Porcentajes determinados para el APAP, aplicando el método de MCP.

Analito APAP		Porcentaje Determinado (%)		
		Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3
Analista 1	Día 1	100.4446	99.1322	99.0671
		100.5703	99.3437	100.0067
		100.6197	100.4583	100.3888
	Día 2	100.6078	100.4964	99.4599
		99.6759	101.0402	100.9001
		101.2531	100.6488	99.6128
Analista 2	Día 1	100.5903	100.2531	99.4037
		100.4506	100.1322	100.0062
		100.2388	99.8904	101.2378
	Día 2	99.9573	100.8690	99.9947
		100.4937	100.2704	99.6331
		99.9956	99.7849	99.6721

Tabla 3.35: Porcentajes determinados para el APAP, aplicando el método de RCP.

Analito NAP		Porcentaje Determinado (%)		
		Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3
Analista 1	Día 1	99.4396	100.2824	99.2673
		99.6945	99.2782	100.3820
		100.2892	100.3746	100.9829
	Día 2	99.5150	99.9363	99.8606
		101.0329	101.4650	100.7103
		98.9076	98.5591	99.2673
Analista 2	Día 1	99.8542	101.1393	99.9856
		99.6852	99.9887	100.2981
		100.9607	101.2192	100.3959
	Día 2	99.2332	99.2859	100.1204
		102.0853	100.0743	99.2978
		101.9394	99.2192	99.4959

Tabla 3.36: Porcentajes determinados para el NAP, aplicando el método de MCP.

Analito NAP		Porcentaje Determinado (%)		
		Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3
Analista 1	Día 1	99.4438	100.0728	103.7759
		99.4973	100.4678	101.1795
		100.2965	100.7007	102.7795
	Día 2	99.4771	101.4736	100.3429
		102.6361	103.5040	100.9700
		99.3961	98.8270	99.6758
Analista 2	Día 1	100.1676	101.0795	100.1061
		99.7602	100.2080	100.2383
		100.0039	101.2456	101.8319
	Día 2	99.7113	99.3435	100.7341
		102.2908	100.5791	99.7784
		102.1610	100.0140	99.9655

Tabla 3.37: Porcentajes determinados para el NAP, aplicando el método de RCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ( $\alpha=0.05$ )
Concentración	2	0.1174	0.0587	0.1914	3.40
Analista	1	0.7496	0.7496	32.2725	18.51
Día	2	0.0465	0.0232	0.0757	3.40
Concentración-analista	2	0.0249	0.0124	0.5351	19.00
Concentración-día	4	0.3653	0.0913	0.2977	2.78
Error	24	7.3625	0.3068		
Total	35				

Tabla 3.38: Análisis de variancia realizado para el APAP, aplicando el método de MCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ( $\alpha=0.05$ )
Concentración	2	1.2690	0.6345	2.0720	3.40
Analista	1	0.0202	0.0202	0.0461	18.51
Día	2	0.8761	0.4381	1.4305	3.40
Concentración-analista	2	0.1762	0.0881	0.2011	19.00
Concentración-día	4	1.4192	0.3548	1.1586	2.78
Error	24	7.3494	0.3062		
Total	35				

Tabla 3.39: Análisis de variancia realizado para el APAP, aplicando el método de RCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ( $\alpha=0.05$ )
Concentración	2	0.2913	0.1456	0.1911	3.40
Analista	1	0.7037	0.7037	3.0721	18.51
Día	2	0.4581	0.2291	0.3006	3.40
Concentración-analista	2	1.4327	0.7163	3.1272	19.00
Concentración-día	4	3.8003	0.9501	1.2466	2.78
Error	24	18.2908	0.7621		
Total	35				

Tabla 3.40: Análisis de variancia realizado para el NAP, aplicando el método de MCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ( $\alpha=0.05$ )
Concentración	2	1.7997	0.8998	0.7010	3.40
Analista	1	0.7795	0.7795	7.6742	18.51
Día	2	0.2032	0.1016	0.0791	3.40
Concentración-analista	2	3.7773	1.8886	18.5932	19.00
Concentración-día	4	13.9257	3.4814	2.7122	2.78
Error	24	30.8073	1.2836		
Total	35				

**Tabla 3.41:** Análisis de variancia realizado para el NAP, aplicando el método de RCP.

Como se observa en las tablas 3.39, 3.40 y 3.41, los valores obtenidos de la  $f$  calculada son menores a su correspondiente valor de la  $f$  crítica en todas las fuentes de variación, por lo cual se establece que el método es repetible entre días y reproducible entre analistas para el APAP y el NAP aplicando el método de RCP y para el NAP aplicando el método de MCP.

Por otra parte, como se observa en la Tabla 3.38 para el caso de la fuente de variación del analista, la  $f$  calculada es mayor a la  $f$  crítica por lo cual se podría pensar que el método no es reproducible entre analistas para el APAP, aplicando el método de MCP.

Sin embargo, el valor de la  $f$  calculada se obtuvo a causa de que el valor del Promedio de los Cuadrados del día presenta el menor valor obtenido de entre los cuatro análisis de variancia realizados (0.0232). Por tal razón y tomando en cuenta de que los porcentajes de recobro obtenidos presentan valores muy cercanos al 100 % (valores de entre 99.2471-100.6277 para el analista 1 y 99.7853-101.0186 para el analista 2), se calcularon los coeficientes de variación para cada analista, cada día y global, para determinar si realmente el método no es reproducible entre analista en el caso del APAP, aplicando este método de calibración multivariante.

Factor de Evaluación	Método de MCP					
	APAP			NAP		
	LIC (%)	LSC (%)	CV (%)	LIC (%)	LSC (%)	CV (%)
Analista 1	98.8492	100.9072	0.53	98.4080	101.5081	0.79
Analista 2	99.3123	101.0213	0.44	98.4820	101.9934	0.89
Día 1	99.0029	100.9894	0.51	98.9318	101.3119	0.61
Día 2	99.0659	101.0318	0.50	97.9630	102.0376	1.04
Global	99.0472	100.9978	0.50	98.4421	101.7536	0.84

**Tabla 3.42:** Coeficiente de Variación obtenidos para evaluar la repetibilidad entre días y la reproducibilidad entre analistas, aplicando el método de MCP.

Factor de Evaluación	Método de RCP					
	APAP			NAP		
	LIC (%)	LSC (%)	CV (%)	LIC (%)	LSC (%)	CV (%)
Analista 1	98.8968	101.5172	0.67	97.8912	103.7217	1.48
Analista 2	99.2712	101.0481	0.45	98.8045	102.2199	0.87
Día 1	98.9692	101.1503	0.56	98.3923	102.7651	1.11
Día 2	99.2514	101.3767	0.54	97.6862	103.0976	1.38
Global	99.0791	101.2876	0.56	98.2866	103.0320	1.20

**Tabla 3.43:** Coeficiente de Variación obtenidos para evaluar la repetibilidad entre días y la reproducibilidad entre analistas, aplicando el método de RCP.

Como se muestra en las tablas 3.42 y 3.43, todos los valores del CV para cada analista, cada día y global, son menores al 3% <sup>(5)</sup>, además de que los intervalos de confianza calculados de los porcentajes determinados incluyen el 100 %. Por lo anterior podemos establecer que el método es reproducible entre analistas y repetible entre días, utilizando cualquiera de los dos métodos de calibración multivariante.

### 3.3.5 SENSITIVIDAD

La sensibilidad se evaluó realizando la estimación de la concentración de 5 muestras de placebos cargados con tres ensayos cada uno y efectuando la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS). En la tabla 3.44 se muestran las concentraciones estimadas (respuesta analítica) obtenidas con ambos métodos de calibración multivariante así como las respectivas concentraciones utilizadas de APAP y NAP. En las tablas 3.45 y 3.46 se muestra el análisis de variancia realizado para obtener el valor de DMS para cada método de calibración multivariante y en las tablas 3.47, 3.48, 3.49 y 3.50 se muestran los valores obtenidos de las diferencias entre cada promedio para ser comparados con su respectivo DMS.

Muestra	Concentración Real		Método de MCP		Método de RCP	
	APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	Concentración Estimada		Concentración Estimada	
			APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)
1	10.0092	7.3513	10.0007	7.3847	9.9722	7.4308
			9.8018	7.2161	9.7834	7.2124
			9.9555	7.3575	9.9468	7.3523
2	10.7964	8.5765	10.6475	8.5331	10.6454	8.5229
			10.5203	8.4168	10.4730	8.4751
			10.6188	8.4700	10.5991	8.4733
3	11.2603	9.8017	11.0013	9.6680	10.9796	9.6879
			10.9814	9.6550	10.9628	9.6654
			11.1524	9.8028	11.1307	9.8182
4	11.9960	11.0270	11.6642	10.7675	11.6457	10.7732
			11.6835	10.7908	11.6531	10.8203
			11.8263	10.9217	11.7981	10.9417
5	12.5115	12.2522	12.3869	12.1747	12.3341	12.2443
			12.2370	12.0700	12.2125	12.1095
			12.2367	12.0057	12.2253	12.0194

**Tabla 3.44:** Respuestas analíticas obtenidas por ambos métodos de calibración multivariante para determinar la sensibilidad del método.

Analito de interés	Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los cuadrados	Valor de la DMS
APAP	Concentración	4	10.3482	2.5871	0.1617
	Error	10	0.0788	0.0079	
NAP	Concentración	4	42.3614	10.5903	0.1467
	Error	10	0.0649	0.0065	

**Tabla 3.45:** Análisis de variancia efectuado para determinar el valor de la DMS aplicando el método de MCP.

Analito de interés	Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los cuadrados	Valor de la DMS
APAP	Concentración	4	10.2591	2.5648	0.1605
	Error	10	0.0777	0.0078	
NAP	Concentración	4	42.7825	10.6956	0.1633
	Error	10	0.0804	0.0080	

**Tabla 3.46:** Análisis de variancia efectuado para determinar el valor de la DMS aplicando el método de RCP.

Diferencias obtenidas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Muestra 1	0.0000	0.6762	1.1257	1.8054	2.3676
Muestra 2	-0.6762	0.0000	<b>0.4495</b>	1.1292	1.6914
Muestra 3	-1.1257	-0.4495	0.0000	0.6797	1.2418
Muestra 4	-1.8054	-1.1292	-0.6797	0.0000	0.5622
Muestra 5	-2.3676	-1.6914	-1.2418	-0.5622	0.0000

**Tabla 3.47:** Diferencias de los promedios de las muestras de APAP, aplicando el método de MCP (valor de DMS = 0.1617).

Diferencias obtenidas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Muestra 1	0.0000	0.6717	1.1235	1.7982	2.3565
Muestra 2	-0.6717	0.0000	<b>0.4518</b>	1.1265	1.6848
Muestra 3	-1.1235	-0.4518	0.0000	0.6746	1.2330
Muestra 4	-1.7982	-1.1265	-0.6746	0.0000	0.5583
Muestra 5	-2.3565	-1.6848	-1.2330	-0.5583	0.0000

**Tabla 3.48:** Diferencias de los promedios de las muestras de APAP, aplicando el método de RCP (valor de DMS = 0.1605).

Diferencias obtenidas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Muestra 1	0.0000	1.2353	2.3533	3.6101	-8.4733
Muestra 2	-1.2353	0.0000	<b>1.1180</b>	2.3748	-9.7086
Muestra 3	-2.3533	-1.1180	0.0000	1.2568	-10.8267
Muestra 4	-3.6101	-2.3748	-1.2568	0.0000	-12.0835
Muestra 5	8.4733	9.7086	10.8267	12.0835	0.0000

**Tabla 3.49:** Diferencias de los promedios de las muestras de NAP, aplicando el método de RCP (valor de DMS = 0.1467).

Diferencias obtenidas	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Muestra 1	0.0000	1.2334	2.3547	3.6340	-8.4904
Muestra 2	-1.2334	0.0000	<b>1.1213</b>	2.4006	-9.7238
Muestra 3	-2.3547	-1.1213	0.0000	1.2793	-10.8451
Muestra 4	-3.6340	-2.4006	-1.2793	0.0000	-12.1244
Muestra 5	8.4904	9.7238	10.8451	12.1244	0.0000

**Tabla 3.50:** Diferencias de los promedios de las muestras de NAP, aplicando el método de RCP (valor de DMS = 0.1633).

De acuerdo a los resultados obtenidos en las tablas 3.47, 3.48, 3.49 y 3.50, ninguna de las diferencias entre los promedios obtenidas es menor a su correspondiente valor de DMS por lo cual se establece que las concentraciones estimadas presentes entre cada muestra son significativamente diferentes entre sí. De esta forma también se establece que la sensibilidad para el APAP es de 0.46 mcg/mL mientras que para el NAP es de 1.22 mcg/mL para ambos métodos de calibración multivariante.

### **3.3.6 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA**

La estabilidad de la muestra procesada se evaluó mediante la comparación en la estimación de la concentración de tres muestras de placebos cargados contra la estimación de la concentración de las mismas muestras después de ser almacenadas en refrigeración a 4 ° C. por un periodo de 48 y 96 horas. Cada muestra fue preparada por triplicado.

En las tablas 3.51 y 3.52 se muestran los porcentajes determinados por los métodos de MCP y RCP en las tres muestras empleadas así como las concentraciones utilizadas de APAP y de NAP.

Por otra parte, con el fin de determinar si las concentraciones estimadas inicialmente (0 horas) son o no significativamente diferentes con respecto a las concentraciones estimadas después de los tiempos en los que fueron almacenadas las muestras, se realizó la prueba de la DMS. Así, en las tablas 3.53, 3.54, 3.55 y 3.56, se muestran las diferencias de los promedios y su correspondiente valor de DMS.

Concentración		0 Horas		48 Horas		96 Horas	
APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	Porcentaje Determinado (%)		Porcentaje Determinado (%)		Porcentaje Determinado (%)	
		APAP	NAP	APAP	NAP	APAP	NAP
5.5031	5.9379	100.469	102.416	99.516	100.285	109.546	109.280
		98.803	101.884	98.914	102.803	101.948	108.573
		98.441	100.525	98.556	99.876	102.600	105.381
16.2476	15.2235	100.271	101.262	99.989	100.015	101.410	101.802
		100.058	100.566	100.242	101.468	100.907	101.478
		100.123	101.549	99.963	101.552	102.455	104.441
28.2060	27.0994	97.554	100.838	97.403	100.797	99.756	102.794
		99.311	102.425	99.160	102.290	101.968	104.532
		98.248	101.857	98.103	101.844	102.059	106.632

**Tabla 3.51:** Resultados obtenidos para determinar la estabilidad de las muestras procesadas aplicando el método de MCP.

Concentración		0 Horas		48 Horas		96 Horas	
APAP (mcg/mL)	NAP (mcg/mL)	Porcentaje Determinado (%)		Porcentaje Determinado (%)		Porcentaje Determinado (%)	
		APAP	NAP	APAP	NAP	APAP	NAP
5.5031	5.9379	99.967	101.091	99.860	102.797	100.791	106.770
		99.653	102.018	98.546	103.430	99.212	112.812
		99.865	100.035	98.442	100.774	98.521	108.602
16.2476	15.2235	100.720	100.448	100.058	100.058	100.867	104.847
		100.337	100.276	100.483	100.483	100.622	102.617
		100.544	100.506	100.075	100.075	103.627	105.136
28.2060	27.0994	98.376	100.672	99.463	101.536	98.976	102.624
		100.260	102.168	98.367	103.572	100.796	104.891
		98.884	101.642	98.491	102.392	100.679	106.878

**Tabla 3.52:** Resultados obtenidos para determinar la estabilidad de las muestras procesadas aplicando el método de RCP.

<b>APAP</b> 5.5031 mcg/mL	0 Horas	48 Horas	96 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.0000	-0.0133	0.3005	0.3309
48 Horas	0.0133	0.0000	0.3138	
96 Horas	-0.3005	-0.3138	0.0000	
<b>APAP</b> 16.2476 mcg/mL	0 Horas	48 Horas	96 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.0000	-0.0140	0.2340	0.3309
48 Horas	0.0140	0.0000	0.2480	
96 Horas	-0.2340	-0.2480	0.0000	
<b>APAP</b> 28.2060 mcg/mL	0 Horas	48 Horas	96 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.0000	-0.0420	0.8151	0.3309
48 Horas	0.0420	0.0000	<b>0.8571</b>	
96 Horas	-0.8151	-0.8571	0.0000	

**Tabla 3.53:** Diferencias de los promedios para el APAP, aplicando el método de MCP.

<b>APAP</b> 5.5031 mcg/mL	0 Horas	48 Horas	96 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.0000	-0.0484	-0.0176	0.2964
48 Horas	0.0484	0.0000	0.0308	
96 Horas	0.0176	-0.0308	0.0000	
<b>APAP</b> 16.2476 mcg/mL	0 Horas	48 Horas	96 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.0000	-0.0534	0.1904	0.2964
48 Horas	0.0534	0.0000	0.2438	
96 Horas	-0.1904	-0.2438	0.0000	
<b>APAP</b> 28.2060 mcg/mL	0 Horas	48 Horas	96 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.0000	-0.1126	0.2756	0.2964
48 Horas	0.1126	0.0000	<b>0.3882</b>	
96 Horas	-0.2756	-0.3882	0.0000	

**Tabla 3.54:** Diferencias de los promedios para el APAP, aplicando el método de RCP.

<b>NAP</b> 5.9379 mcg/mL	0 Horas	48 Horas	96 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.0000	-0.0368	0.3644	0.3933
48 Horas	0.0368	0.0000	0.4012	
96 Horas	-0.3644	-0.4012	0.0000	
<b>NAP</b> 15.2235 mcg/mL	0 Horas	48 Horas	96 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.0000	-0.0174	0.2205	0.3933
48 Horas	0.0174	0.0000	0.2378	
96 Horas	-0.2205	-0.2378	0.0000	
<b>NAP</b> 27.0994 mcg/mL	0 Horas	48 Horas	96 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.0000	-0.0170	0.7984	0.3933
48 Horas	0.0170	0.0000	<b>0.8153</b>	
96 Horas	<b>-0.7984</b>	-0.8153	0.0000	

Tabla 3.55: Diferencias de los promedios para el NAP, aplicando el método de MCP.

<b>NAP</b> 5.9379 mcg/mL	0 Horas	48 Horas	96 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.0000	0.0763	0.4956	0.4206
48 Horas	-0.0763	0.0000	0.4193	
96 Horas	<b>-0.4956</b>	-0.4193	0.0000	
<b>NAP</b> 15.2235 mcg/mL	0 Horas	48 Horas	96 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.0000	-0.0312	0.5769	0.4206
48 Horas	0.0312	0.0000	<b>0.6081</b>	
96 Horas	<b>-0.5769</b>	-0.6081	0.0000	
<b>NAP</b> 27.0994 mcg/mL	0 Horas	48 Horas	96 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.0000	0.2726	0.8952	0.4206
48 Horas	-0.2726	0.0000	<b>0.6226</b>	
96 Horas	<b>-0.8952</b>	-0.6226	0.0000	

Tabla 3.56: Diferencias de los promedios para el NAP, aplicando el método de RCP.

Como se observa en las tablas 3.53 y 3.54, las diferencias entre los promedios obtenidos al tiempo de almacenamiento de 0 Horas con respecto a los tiempos de 48 y 96 horas son menores a sus correspondientes valores de DMS por lo cual se establece que no existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos a diferentes tiempos de almacenamiento para el caso del APAP en ambos métodos de calibración multivariante.

Sin embargo, como se observa en las tablas 3.55 y 3.56, las diferencias entre los promedios obtenidos al tiempo de almacenamiento de 0 horas con respecto al tiempo de 96 horas son mayores a sus correspondientes valores de DMS en todas las concentraciones en el caso del método de RCP y en la concentración de 27.0994 mcg/mL en el caso del método de MCP, por lo cual se establece que si existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos al tiempo de almacenamiento de 96 horas y por lo tanto se establece que la muestras procesadas no son estables en este tiempo de almacenamiento.

Posteriormente, en las tablas 3.57 y 3.58 se muestran los valores obtenidos de  $t$  calculada para determinar si los resultados obtenidos son exactos en los tiempos de almacenamiento de 0 y 48 horas.

Tiempo	Concentración APAP mcg/mL	Método de MCP			Método de RCP			Valor de $t$ crítica ( $\alpha=0.05$ )
		LSC (%)	LIC (%)	$t$ calculada	LSC (%)	LIC (%)	$t$ calculada	
0 Horas	5.5031	103.89	94.58	-0.705	100.52	99.14	-1.071	4.30
	16.2476	100.62	99.68	1.380	101.36	99.71	2.786	4.30
	28.2060	102.18	94.56	-1.841	103.37	94.98	-0.848	4.30
48 Horas	5.5031	101.08	96.91	-2.070	102.35	95.55	-1.329	4.30
	16.2476	100.73	99.40	0.418	101.24	99.17	0.853	4.30
	28.2060	102.03	94.42	-2.011	101.36	96.19	-2.043	4.30

**Tabla 3.57:** Valores de  $t$  calculada obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra procesada para el APAP.

Tiempo	Concentración NAP mcg/mL	Método de MCP			Método de RCP			Valor de t crítica ( $\alpha=0.05$ )
		LSC (%)	LIC (%)	t calculada	LSC (%)	LIC (%)	t calculada	
0 Horas	5.9379	105.80	97.41	1.649	105.32	96.78	1.057	4.30
	15.2235	103.30	98.95	2.229	100.92	99.90	3.434	4.30
	27.0994	105.17	98.25	2.123	104.76	98.23	1.969	4.30
48 Horas	5.9379	107.81	94.17	0.623	108.30	96.36	1.682	4.30
	15.2235	104.73	97.29	1.170	101.24	99.17	0.853	4.30
	27.0994	104.94	98.35	2.145	106.90	98.10	2.446	4.30

**Tabla 3.58:** Valores de t calculada obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra procesada para el NAP.

Como se observa en las tablas 3.57 y 3.58, todos los valores de la t calculada son menores a la t crítica por lo cual se determina que los resultados analíticos son exactos y se establece que las muestras procesadas pueden ser almacenadas durante 48 horas a 4 ° C. sin sufrir un cambio significativo en la concentración de APAP y de NAP, en ambos métodos de calibración multivariante.

# CONCLUSIONES

---

---

## CONCLUSIONES

El método analítico se estableció bajo las siguientes condiciones de análisis:

- Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 como medio de dilución
- Preparar las 10 soluciones estándares (sección 2.4.2, página 78).
- Las longitudes de onda elegidas son 275, 272, 270, 269, 267.2, 265, 263, 261.3, 257, 253, 251 y 247.2 nm, para ambos métodos de calibración multivariante.
- El número de factores óptimo en el método de MCP es de 4 para ambos analitos.
- El número de CP óptimos en el método de RCP es de 3.

Así mismo el método analítico al ser validado es:

- Capaz de cuantificar de forma específica y de manera simultánea al APAP y al NAP presentes en la muestra analítica.
- Lineal, en el rango establecido de concentraciones.
- Preciso, con un CV menor al 2 %
- Capaz de cuantificar con exactitud las concentraciones de 5.5031, 16.2476 y 28.2060 mcg/mL de APAP y de 5.9379, 15.2235 y 27.0994 mcg/mL de NAP.
- Capaz de cuantificar con precisión y exactitud la concentración de 1.5185 mcg/mL de APAP y 2.0640 de NAP (límite de cuantificación).
- Repetible entre días y reproducible entre analistas.
- Capaz de cuantificar con una sensibilidad de 0.46 mcg/mL para el APAP y de 1.22 mcg/mL para el NAP.
- Capaz de cuantificar confiablemente muestras almacenadas durante 48 horas bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C.

Los resultados obtenidos durante la validación del método analítico demuestran que ambos métodos de calibración multivariante son igualmente eficaces en la estimación de los analitos en la muestra, bajo las condiciones de análisis establecidas.

# ANEXOS



# Importadora y Manufacturera Bruluart, S.A

LABORATORIO DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS

Geranios No. 9 San Francisco Chilpan  
Tultitlán Edo. de México Apdo. Postal  
No. 90 C.P. 54940

Tels. 884-17-66 884-18-97  
884-25-87 884-19-95  
Fax 884-91-88

## REPORTE DE ANÁLISIS DE ESTANDARIZACIÓN

ELABORADO POR: QFB. LGR FECHA DE EMISIÓN: OCTUBRE, 2002 AUTORIZACIÓN: QFB. MARTHA I. ROMERO M.

Nombre: PARACETAMOL (ACETAMINOFÉN) No. de Aprobación: MP-3E 631  
Proveedor: MALLINCKROAT No. Lote de Prov.: 0048903D143 Clave Interna: ES-A01-V-04  
Cantidad: 125.0 gramos No. de Envases: 3 Fecha de Reanálisis: 13-MAYO-2004  
Muestreado por: LZM Fecha de muestreo: 09-MAYO-2003 Fecha de Inicio de Análisis: 13-MAYO-2003

Hoja 1 de 2  
Clave PA-A01

Referencia: Monografía de PARACETAMOL (ACETAMINOFÉN), OCTUBRE, 2002.

DETERMINACIONES	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
1. DESCRIPCIÓN	POLVO BLANCO CRISTALINO, INODORO, CON LIGERO SABOR AMARGO, LIBRE DE PARTÍCULAS EXTRAÑAS.	CUMPLE
2. SOLUBILIDAD	FÁCILMENTE SOLUBLE EN ETANOL Y METANOL; SOLUBLE EN ACETONA, AGUA CALIENTE Y SOLUCIÓN 1 N DE HIDRÓXIDO DE SODIO, POCO SOLUBLE EN CLOROFORMO.	CUMPLE
3. IDENTIFICACIÓN	A) EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN IR DE LA MUESTRA PRESENTA MÁXIMOS SOLAMENTE A LA MISMA LONGITUD DE ONDA QUE EL ESTÁNDAR DE REFERENCIA. B) EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN EN LA REGIÓN ULTRAVIOLETA DE LA MUESTRA EXHIBE MÁXIMOS Y MÍNIMOS A LA MISMA LONGITUD DE ONDA QUE EL ESTÁNDAR DE REFERENCIA. C) DESARROLLA COLORACIÓN VIOLÁCEA. D) SE DESARROLLA UNA COLORACIÓN VIOLETA QUE NO DEBE CAMBIAR A ROJA.	CUMPLE
4. TEMPERATURA DE FUSIÓN	ENTRE 168 Y 172 ° C	171 °C
5. RESIDUO DE IGNICIÓN	NO MÁS DEL 0.1 %	0.0 %
6. pH.	ENTRE 5.1 Y 6.5.	5.48
7. AGUA	NO MÁS DE 0.5 %.	0.0 %
8. METALES PESADOS.	NO MÁS DE 0.001 %.	MENOS DE 0.001 %
9. SULFATOS.	NO MÁS DE 0.02 %.	MENOS DE 0.02%
10. SULFURO.	NO DEBE PRODUCIRSE COLORACIÓN O MANCHAS EN LA TIRA DE PAPEL REACTIVO.	CUMPLE
11. CLORUROS	NO MÁS DE 0.014 %	MENOS DE 0.014 %
12. SUSTANCIAS FÁCILMENTE CARBONIZABLES	LA SOLUCIÓN NO PRESENTA MÁS COLOR QUE LA SOLUCIÓN DE COMPARACIÓN XVIII	CUMPLE

BIBLIOGRAFÍA:  
I. FEUM, 7ª Edición. México, 2000 Tomo I. Métodos Generales de Análisis. Pág. 901 - 903.  
II. USP 24, NF 19. USA, 2000 Pags. 17 - 18, 1857 - 1858, 1878.  
III. Especificaciones internas.

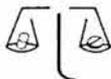
OBSERVACIONES: \*DATOS DE ESTANDARIZACIÓN: ESTÁNDAR PRIMARIO USP, LOTE J-1, PUREZA 100 %

LOS CÁLCULOS Y LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA SE ENCUENTRAN EN EL REPORTE CORRESPONDIENTE.

Analista: QFB. MARIELA CRUZ RODRÍGUEZ Fecha: 13-MAYO-2003

Verificado por: QFB. ANA LILIA CONTRERAS CORONA Fecha: 13-MAYO-2003

  
Autorización de Control de Calidad



I.M. BRULUART

**Importadora y Manufacturera Bruluart, S.A**

LABORATORIO DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS

Geranios No. 9 San Francisco Chilpan  
Tuxtillán Edo. de México Apdo. Postal  
No. 90 C.P. 54940Tels. 884-17-66 884-18-97  
884-25-87 884-19-95  
Fax 884-91-88**REPORTE DE ANÁLISIS DE ESTANDARIZACIÓN**ELABORADO POR: QFB. LGR FECHA DE EMISIÓN: OCTUBRE, 2002 AUTORIZACIÓN: QFB. MARTHA J. ROMERO M.Nombre: PARACETAMOL (ACETAMINOFÉN) No. de Aprobación: MP-3E 631Proveedor: MALLINCKROAT No. Lote de Prov.: 0048903D143 Clave Interna: ES-A01-V-04Cantidad: 125.0 gramos No. de Envases: 3 Fecha de Reanálisis: 13-MAYO-2004Muestreado por: LZM Fecha de muestreo: 09-MAYO-2003 Fecha de Inicio de Análisis: 13-MAYO-2003

Hoja 2 de 2

Referencia: Monografía de PARACETAMOL (ACETAMINOFÉN), OCTUBRE, 2002.

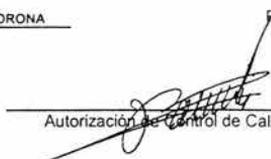
Clave PA-A01

DETERMINACIONES	ESPECIFICACIONES		RESULTADOS
13. p-AMINOFENOL LIBRE	NO MÁS DEL 0.005%		MENOS DE 0.005 %
14. P-CLOROACETANILIDA	NO MÁS DEL 0.001%		MENOS DE 0.001 %
15. IMPUREZAS ORGÁNICAS VOLÁTILES	IMPUREZA	LÍMITE	CUMPLE
	BENCENO	NO MÁS DE 2 ppm	
	CLOROFORMO	NO MÁS DE 60 ppm	
	1,4-DIOXANO	NO MÁS DE 380 ppm	
	CLORURO DE METILENO	NO MÁS DE 600 ppm	
	TRICLOROETILENO	NO MÁS DE 80 ppm	
16. VALORACIÓN	CONTIENE NO MENOS DEL 98.0 % Y NO MÁS DEL 101.0 % BASE SECA.		*99.90 % B.H.

BIBLIOGRAFIA: I. FEUM, 7ª Edición. México, 2000 Tomo I. Métodos Generales de Análisis. Pág. 901 - 903.

II. USP 24, NF 19, USA, 2000 Pags. 17 - 18, 1857 - 1858, 1878.

III Especificaciones internas.

OBSERVACIONES: \*DATOS DE ESTANDARIZACIÓN: ESTÁNDAR PRIMARIO USP, LOTE J-1, PUREZA 100 %LOS CÁLCULOS Y LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA SE ENCUENTRAN EN EL REPORTE CORRESPONDIENTE.Analista: QFB. MARIELA CRUZ RODRÍGUEZ Fecha: 13-MAYO-2003Verificado por: QFB. ANA LILIA CONTRERAS CORONA Fecha: 13-MAYO-2003

 Autorización de Control de Calidad



I.M. BRULUART

## Importadora y Manufacturera Bruluart, S.A

LABORATORIO DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS

Geranios No. 9 San Francisco Chilpan  
Tultitlán Edo. de México Apdo. Postal  
No. 90 C.P. 54940

Tels. 884-17-66 884-18-97  
884-25-87 884-19-95  
Fax 884-91-88

### REPORTE DE ANÁLISIS DE ESTANDARIZACIÓN

ELABORADO POR: QFB. FSV FECHA DE EMISIÓN: AGOSTO, 2001. AUTORIZACION: QFB. MARTHA I. ROMERO M.

Nombre: **NAPROXENO SÓDICO** No. de Aprobación: **MP-3B 153**  
Proveedor: **NUTRER** No. Lote de Prov.: **SN-1571102** Clave Interna: **ES-N07-III-04**  
Cantidad: **58.0 gramos** No. de Envases: **3** Fecha de Reanálisis: **24-MARZO-2004**  
Muestreo por: **FJM** Fecha de muestreo: **20-MARZO-2003** Fecha de Inicio de Análisis: **24-MARZO-2003**

Referencia: Monografía de Naproxeno Sódico. AGOSTO, 2001.

Clave PA-N07

DETERMINACIONES	ESPECIFICACIONES		
1. DESCRIPCIÓN	POLVO CRISTALINO DE COLOR BLANCO.	CUMPLE	
2. SOLUBILIDAD	SOLUBLE EN AGUA Y EN METANOL, POCO SOLUBLE EN ALCOHOL, MUY LIGERAMENTE SOLUBLE EN ACETONA Y PRÁCTICAMENTE INSOLUBLE EN CLOROFORMO Y TOLUENO.	CUMPLE	
3. IDENTIFICACION	A) EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN INFRARROJO DE LA MUESTRA EXHIBE MÁXIMOS Y MÍNIMOS SIMILARES A LOS DE UNA PREPARACIÓN ESTÁNDAR DE REFERENCIA. B) EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV DE LA MUESTRA EXHIBE MÁXIMOS Y MÍNIMOS SIMILARES A LOS DE UNA PREPARACIÓN ESTÁNDAR DE REFERENCIA.	CUMPLE	
4. PUNTO DE FUSIÓN	APROX. 255° CON DESCOMPOSICIÓN.	255 °C	
5. ROTACION OPTICA	ENTRE -17.0° Y -15.3°	-16.18°	
6. PERDIDA POR SECADO	NO MAS DE 1.0 %	0.29 %	
7. METALES PESADOS	NO MAS DE 20 ppm	MENOS DE 20 ppm	
8. PUREZA CROMATOGRÁFICA	EL VALOR RF DE LA MANCHA PRINCIPAL EN EL CROMATOGRAMA DE LA SOLUCIÓN DE LA MUESTRA, CORRESPONDE CON EL DE LA SOLUCIÓN DE REFERENCIA, LA INTENSIDAD DE CUALQUIER MANCHA INDIVIDUAL SECUNDARIA NO EXCEDE DE 100 MCG/ML (SOLUCIÓN DE COMPARACIÓN 0.5 %) Y LA SUMA DE INTENSIDAD DE CUALQUIER MANCHA SECUNDARIA, COMPARADA SIMILARMENTE, NO EXCEDE DEL 2.0 %.	CUMPLE	
9. NAPROXENO LIBRE	NO MAS DE 2.2 ml SON CONSUMIDOS (1.0 %)	0.22 %	
10. VALORACION	NO MENOS DE 98.0 % Y NO MAS DE 102.0 % CALCULADO EN B.S.	*99.74 % B.H.	
11. IMPUREZAS ORGÁNICAS VOLÁTILES	LÍMITES (ppm)		
	BENCENO	2	CUMPLE
	CLOROFORMO	60	
	1,4-DIOXANO	380	
	CLORURO DE METILENO	600	
TRICLOROETILENO	80		

BIBLIOGRAFIA: I. FEUM 7a ed. Mexico, 2000. Pags. 877-878.  
II. USP 24, NF 19. 2000. Pag. 1149-1877.

OBSERVACIONES: \*DATOS DE ESTANDARIZACIÓN: ESTANDAR PRIMARIO USP, LOTE I, PUREZA 100 %

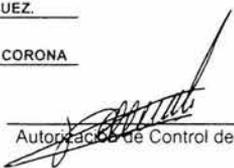
LOS DATOS Y RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA SE ENCUENTRAN EN EL REPORTE CORRESPONDIENTE

Analista: QFB. MARIELA CRUZ RODRIGUEZ.

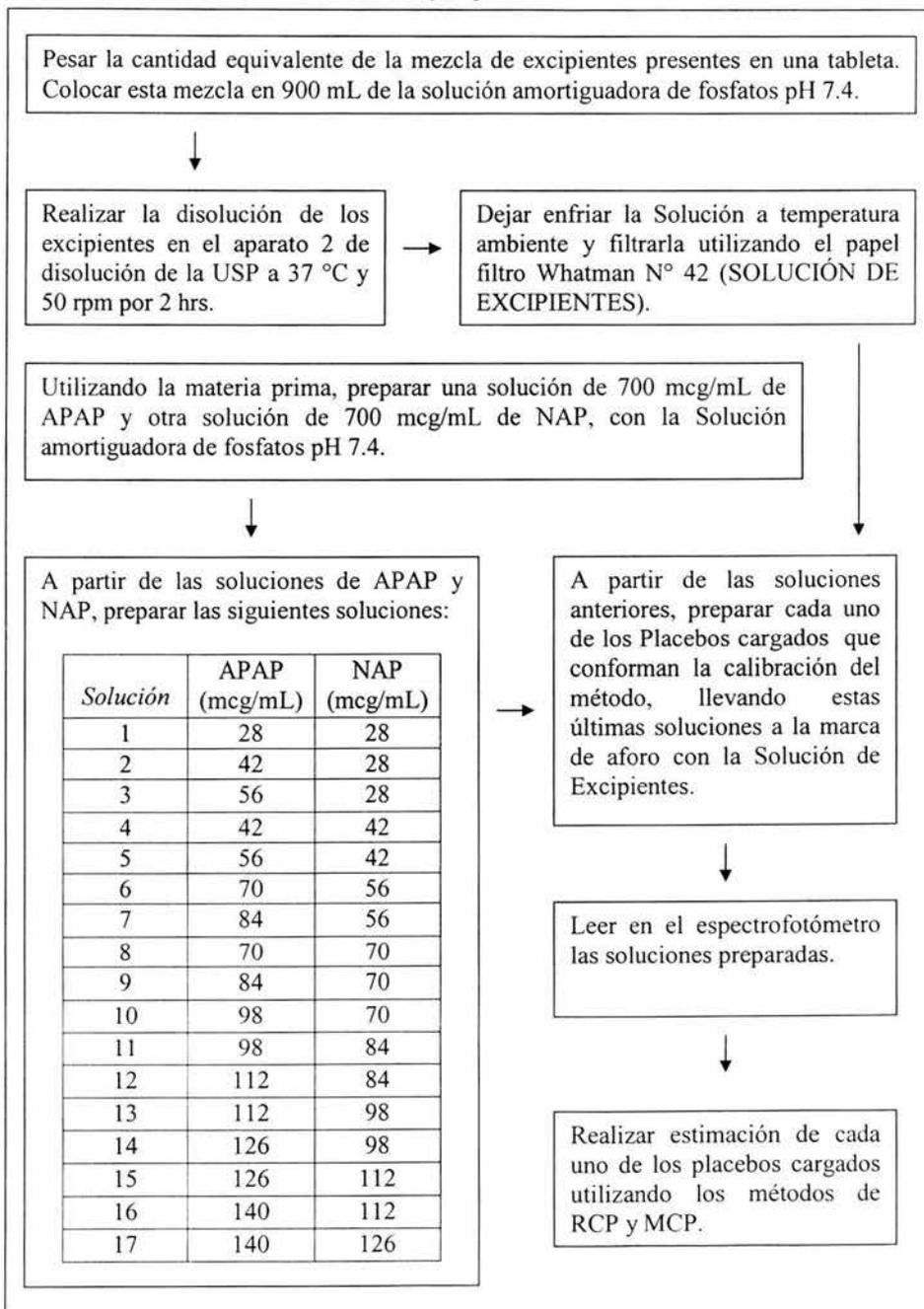
Fecha: 24-MARZO-2003

Verificado por: QFB. ANA LILIA CONTRERAS CORONA

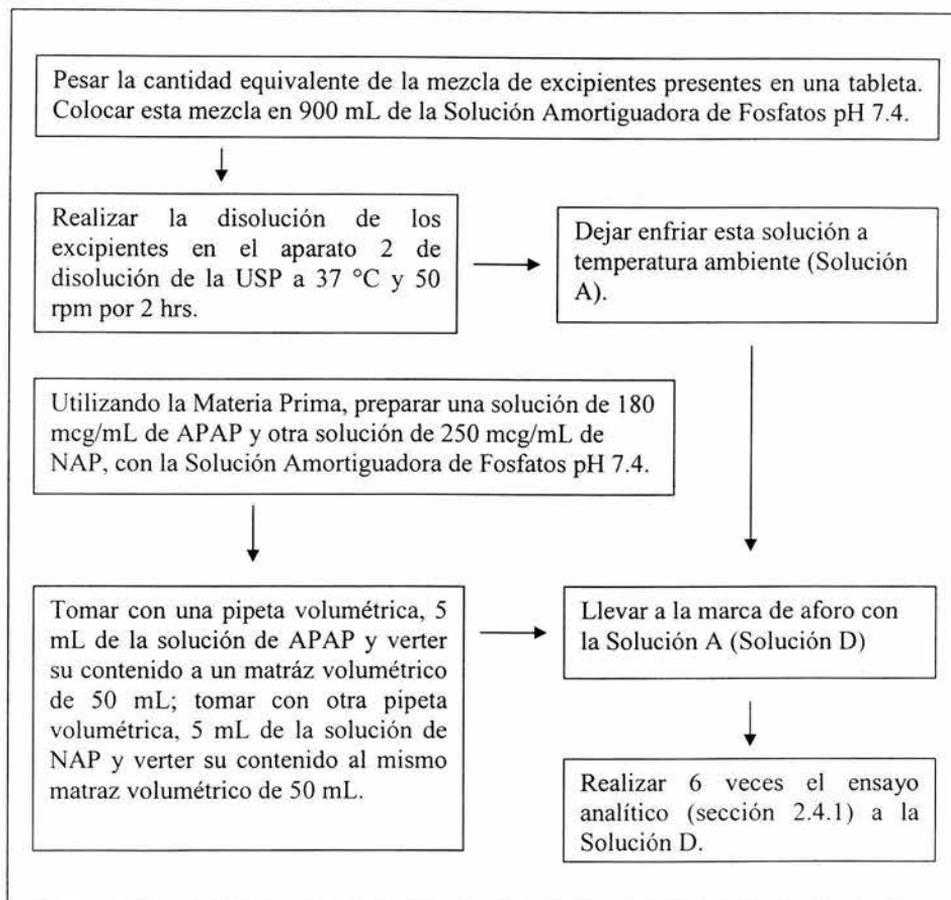
Fecha: 24-MARZO-2003

  
Autorizado de Control de Calidad

## A.2 CALIBRACIÓN DEL MÉTODO



### A.3 PLACEBO CARGADO REALIZADO PARA EL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN



## A.4 ANÁLISIS DE VARIANCIA

(Modelo Factorial Anidado)

Modelo Matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_{(ij)} + E_{k(ij)}$$

donde:

$Y_{ijk}$  = Porcentaje determinado asociado a la  $k$ ésima observación del  $j$ ésimo día para el  $i$ ésimo analista.

$A_i$  = Efecto del  $i$ ésimo analista sobre el porcentaje determinado.

$D_{ij}$  = Efecto del  $j$ ésimo día en el  $i$ ésimo analista sobre el porcentaje determinado.

$E_{k(ij)}$  = Error experimental.

1. Colocar los datos de acuerdo a la siguiente tabla:

	Analista 1	Analista 2
Día 1	$Y_{111}$	$Y_{211}$
	$Y_{112}$	$Y_{212}$
	$Y_{113}$	$Y_{213}$
Día 2	$Y_{121}$	$Y_{221}$
	$Y_{122}$	$Y_{222}$
	$Y_{123}$	$Y_{223}$

2. Calcular las siguientes sumatorias:

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

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

$$\rightarrow Y_{ijk}^2 = (Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + (Y_{121})^2 + (Y_{122})^2 + (Y_{123})^2 + (Y_{211})^2 + (Y_{212})^2 + (Y_{213})^2 + (Y_{221})^2 + (Y_{222})^2 + (Y_{223})^2$$

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

## 3. Realizar la tabla de Anadeva

Fuente de Variación	Grados de libertad (gl)	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados (CM)	f calculada	f crítica ( $\alpha = 0.05$ )
Analista	a - 1	SC <sub>Analista</sub>	SC <sub>Analista</sub> / a-1	CM <sub>Analista</sub> / CM <sub>día</sub>	f <sub>(gl Analista / gl Día)</sub>
Día	(d - 1) a	SC <sub>día</sub>	SC <sub>día</sub> / (d - 1) a	CM <sub>Día</sub> / CM <sub>error</sub>	f <sub>(gl Día / gl error)</sub>
Error	(r - 1) a d	SC <sub>error</sub>	SC <sub>error</sub> / (r - 1) ad		
Total	(a d r) - 1				

Fuente de variación	Tratamiento	PSS	PSD	gl
Analista	i	i - 1	i - 1	a - 1
Día	(i)j	(j - 1) i	ij - i	(d - 1) a
Error	k(ij)	(k - 1)ij	kij - ij	(r - 1) a d

donde:

$$SC_{Analista} = (Y_{i..}^2 / dr) - (Y_{...}^2 / adr)$$

$$SC_{Día} = (Y_{(i)j.}^2 / r) - (Y_{i..}^2 / dr)$$

$$SC_{error} = Y_{ijk}^2 - (Y_{(i)j.}^2 / r)$$

a = Número de Analistas.

d = Número de días.

r = Número de réplicas (número de observaciones).

PSS = Producto simbólico simple.

PSD = Producto simbólico desarrollado.

## A.5 ANÁLISIS DE VARIANCIA

(Modelo Factorial Cruzado)

Modelo Matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + E_{k(ij)}$$

donde:

$Y_{ijk}$  = Porcentaje determinado asociado a la  $k$ ésima observación del  $j$ ésimo factor B para el  $i$ ésimo factor A.

$A_i$  = Efecto del  $i$ ésimo factor A sobre el porcentaje determinado.

$B_j$  = Efecto del  $j$ ésimo factor B sobre el porcentaje determinado.

$AB_{ij}$  = Efecto del  $i$ ésimo factor A y el  $j$ ésimo factor B sobre el porcentaje determinado.

$E_{k(ij)}$  = Error experimental.

1. Colocar los datos de acuerdo a la siguiente tabla:

	A 1	A 2
B 1	$Y_{111}$	$Y_{211}$
	$Y_{112}$	$Y_{212}$
	$Y_{113}$	$Y_{213}$
B 2	$Y_{121}$	$Y_{221}$
	$Y_{122}$	$Y_{222}$
	$Y_{123}$	$Y_{223}$

2. Calcular las siguientes sumatorias:

$$\text{➤ } Y_{i..}^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

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

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

3. Realizar la tabla de Anadeva:

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados (CM)	f calculada	f crítica ( $\alpha=0.05$ )
A	a - 1	SC <sub>A</sub>	SC <sub>A</sub> / a - 1	CM <sub>A</sub> / CM <sub>error</sub>	f(gl <sub>A</sub> / gl <sub>error</sub> )
B	b - 1	SC <sub>B</sub>	SC <sub>B</sub> / b - 1	CM <sub>B</sub> / CM <sub>error</sub>	f(gl <sub>B</sub> / gl <sub>error</sub> )
AB	(a - 1)(b - 1)	SC <sub>AB</sub>	SC <sub>AB</sub> / (a - 1)(b - 1)	CM <sub>AB</sub> / CM <sub>error</sub>	f(gl <sub>AB</sub> / gl <sub>error</sub> )
Error	(r - 1) ab	SC <sub>error</sub>	SC <sub>error</sub> / (r - 1)ab		
Total	(a d r) - 1				

Fuente de variación	Tratamiento	PSS	PSD	gl
A	i	i - 1	i - 1	a - 1
B	j	(j - 1)	j - 1	b - 1
AB	ij	(i - 1)(j - 1)	ij - j - i + 1	(a - 1)(b - 1)
Error	k(ij)	(k - 1) ij	kij - ij	(r - 1) ab

donde:

$$SC_A = (Y_{i..}^2 / br) - (Y_{...}^2 / abr)$$

a = Número de A.

$$SC_B = (Y_{.j.}^2 / ar) - (Y_{...}^2 / abr)$$

b = Número de B.

$$SC_{AB} = (Y_{ij.}^2 / r) - (Y_{i..}^2 / br) - (Y_{.j.}^2 / ar) + (Y_{...}^2 / abr)$$

r = Número de réplicas.

$$SC_{error} = Y_{ijk}^2 - (Y_{ij.}^2 / r)$$

## A.6 ANÁLISIS DE VARIANCIA (Modelo Factorial Anidado-Cruzado)

Modelo Matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + A_j + D_{(j)k} + CA_{ij} + CD_{ik(j)} + E_{l(ijk)}$$

donde:

$Y_{ijkl}$  = Porcentaje determinado asociado a la  $l$ ésima observación del  $k$ ésimo día del  $j$ ésimo analista para la  $i$ ésima concentración.

$C_i$  = Efecto de la  $i$ ésima concentración sobre el porcentaje determinado.

$A_j$  = Efecto del  $j$ ésimo analista sobre el porcentaje determinado.

$D_{(j)k}$  = Efecto del  $k$ ésimo día en el  $j$ ésimo analista sobre el porcentaje determinado.

$CA_{ij}$  = Efecto de la  $i$ ésima concentración y el  $j$ ésimo analista sobre el porcentaje determinado.

$CD_{ik(j)}$  = Efecto de la  $i$ ésima concentración y el  $k$ ésimo día en el  $j$ ésimo analista sobre el porcentaje determinado.

$E_{l(ijk)}$  = Error experimental.

1. Colocar los datos de acuerdo a la siguiente tabla:

		Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3
Analista 1	Día 1	$Y_{1111}$	$Y_{2111}$	$Y_{3111}$
		$Y_{1112}$	$Y_{2112}$	$Y_{3112}$
		$Y_{1113}$	$Y_{2113}$	$Y_{3113}$
	Día 2	$Y_{1121}$	$Y_{2121}$	$Y_{3121}$
		$Y_{1122}$	$Y_{2122}$	$Y_{3122}$
		$Y_{1123}$	$Y_{2123}$	$Y_{3123}$
Analista 2	Día 1	$Y_{1211}$	$Y_{2211}$	$Y_{3211}$
		$Y_{1212}$	$Y_{2212}$	$Y_{3212}$
		$Y_{1213}$	$Y_{2213}$	$Y_{3213}$
	Día 2	$Y_{1221}$	$Y_{2221}$	$Y_{3221}$
		$Y_{1222}$	$Y_{2222}$	$Y_{3222}$
		$Y_{1223}$	$Y_{2223}$	$Y_{3223}$

2. Calcular las siguientes sumatorias:

$$Y_{i...}^2 = (Y_{1111} + Y_{1112} + Y_{1113} + Y_{1121} + Y_{1122} + Y_{1123} + Y_{1211} + Y_{1212} + Y_{1213} + Y_{1221} + Y_{1222} + Y_{1223})^2 + (Y_{2111} + Y_{2112} + Y_{2113} + Y_{2121} + Y_{2122} + Y_{2123} + Y_{2211} + Y_{2212} + Y_{2213} + Y_{2221} + Y_{2222} + Y_{2223})^2 + (Y_{3111} + Y_{3112} + Y_{3113} + Y_{3121} + Y_{3122} + Y_{3123} + Y_{3211} + Y_{3212} + Y_{3213} + Y_{3221} + Y_{3222} + Y_{3223})^2$$

$$Y_{.j.}^2 = (Y_{1111} + Y_{1112} + Y_{1113} + Y_{1121} + Y_{1122} + Y_{1123} + Y_{2111} + Y_{2112} + Y_{2113} + Y_{2121} + Y_{2122} + Y_{2123} + Y_{3111} + Y_{3112} + Y_{3113} + Y_{3121} + Y_{3122} + Y_{3123})^2 + (Y_{1211} + Y_{1212} + Y_{1213} + Y_{1221} + Y_{1222} + Y_{1223} + Y_{2211} + Y_{2212} + Y_{2213} + Y_{2221} + Y_{2222} + Y_{2223} + Y_{3211} + Y_{3212} + Y_{3213} + Y_{3221} + Y_{3222} + Y_{3223})^2$$

$$Y_{.jk.}^2 = (Y_{1111} + Y_{1112} + Y_{1113} + Y_{2111} + Y_{2112} + Y_{2113} + Y_{3111} + Y_{3112} + Y_{3113})^2 + (Y_{1121} + Y_{1122} + Y_{1123} + Y_{2121} + Y_{2122} + Y_{2123} + Y_{3121} + Y_{3122} + Y_{3123})^2 + (Y_{1211} + Y_{1212} + Y_{1213} + Y_{2211} + Y_{2212} + Y_{2213} + Y_{3211} + Y_{3212} + Y_{3213})^2 + (Y_{1221} + Y_{1222} + Y_{1223} + Y_{2221} + Y_{2222} + Y_{2223} + Y_{3221} + Y_{3222} + Y_{3223})^2$$

$$Y_{ij.}^2 = (Y_{1111} + Y_{1112} + Y_{1113} + Y_{1121} + Y_{1122} + Y_{1123})^2 + (Y_{2111} + Y_{2112} + Y_{2113} + Y_{2121} + Y_{2122} + Y_{2123})^2 + (Y_{3111} + Y_{3112} + Y_{3113} + Y_{3121} + Y_{3122} + Y_{3123})^2 + (Y_{1211} + Y_{1212} + Y_{1213} + Y_{1221} + Y_{1222} + Y_{1223})^2 + (Y_{2211} + Y_{2212} + Y_{2213} + Y_{2221} + Y_{2222} + Y_{2223})^2 + (Y_{3211} + Y_{3212} + Y_{3213} + Y_{3221} + Y_{3222} + Y_{3223})^2$$

$$Y_{ijk.}^2 = (Y_{1111} + Y_{1112} + Y_{1113})^2 + (Y_{2111} + Y_{2112} + Y_{2113})^2 + (Y_{3111} + Y_{3112} + Y_{3113})^2 + (Y_{1121} + Y_{1122} + Y_{1123})^2 + (Y_{2121} + Y_{2122} + Y_{2123})^2 + (Y_{3121} + Y_{3122} + Y_{3123})^2 + (Y_{1211} + Y_{1212} + Y_{1213} + Y_{1221} + Y_{1222} + Y_{1223})^2 + (Y_{2211} + Y_{2212} + Y_{2213} + Y_{2221} + Y_{2222} + Y_{2223})^2 + (Y_{3211} + Y_{3212} + Y_{3213} + Y_{3221} + Y_{3222} + Y_{3223})^2$$

$$Y_{ijkl}^2 = ((Y_{1111})^2 + (Y_{1112})^2 + \dots + (Y_{3223})^2)$$

$$Y_{.....}^2 = (Y_{1111} + Y_{1112} + Y_{1113} + \dots + Y_{3223})^2$$

3. Realizar la tabla de Anadeva:

Fuente de variación	Tratamiento	PSS	PSD	Grados de Libertad (gl)
Concentración	i	(i - 1)	i - 1	a - 1
Analista	j	(j - 1)	j - 1	b - 1
Día	(jk)	(k - 1) j	kj - j	(c - 1) b
Concentración - Analista	ij	(i - 1) (j - 1)	ij - j - i + 1	(a - 1) (b - 1)
Concentración-día	(j)ik	(i - 1)(k - 1) j	ijk - ij - jk + j	(a - 1)(c - 1) b
Error	l(ijk)	(l - 1) ijk	ijkl - ijk	(d - 1) abc

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados (CM)	f calculada	f crítica ( $\alpha=0.05$ )
Concentración	SC <sub>C</sub>	SC <sub>C</sub> / a - 1	CM <sub>C</sub> / CM <sub>error</sub>	f (gl <sub>C</sub> / gl <sub>error</sub> )
Analista	SC <sub>A</sub>	SC <sub>A</sub> / b - 1	CM <sub>A</sub> / CM <sub>D</sub>	f (gl <sub>A</sub> / gl <sub>D</sub> )
Día	SC <sub>D</sub>	SC <sub>D</sub> / (c - 1) b	CM <sub>D</sub> / CM <sub>error</sub>	f (gl <sub>D</sub> / gl <sub>error</sub> )
Concentración - Analista	SC <sub>C-A</sub>	SC <sub>C-A</sub> / (a-1) (b-1)	CM <sub>C-A</sub> / CM <sub>D</sub>	f (gl <sub>C-A</sub> / gl <sub>D</sub> )
Concentración-Día	SC <sub>C-D</sub>	SC <sub>C-D</sub> / (a - 1)(c - 1) b	CM <sub>C-D</sub> / CM <sub>error</sub>	f (gl <sub>CD</sub> / gl <sub>error</sub> )
Error	SC <sub>error</sub>	SC <sub>error</sub> / (d - 1) abc		
Total				

donde:

$$SC_C = (Y_{i..}^2 / bcr) - (Y_{...}^2 / abcr)$$

$$SC_A = (Y_{.j.}^2 / acr) - (Y_{...}^2 / abcr)$$

$$SC_D = (Y_{.jk.}^2 / ar) - (Y_{.j.}^2 / acr)$$

$$SC_{C-A} = (Y_{ij.}^2 / cr) - (Y_{.j.}^2 / acr) - (Y_{i..}^2 / bcr) + (Y_{...}^2 / abcr)$$

$$SC_{C-D} = (Y_{ijk.}^2 / r) - (Y_{ij.}^2 / cr) - (Y_{.jk.}^2 / ar) + (Y_{.j.}^2 / acr)$$

$$SC_{error} = (Y_{ijkl}^2) - (Y_{ijk.}^2 / r)$$

a = Número de Concentraciones.

c = Número de días.

b = Número de analistas.

r = Número de réplicas.

## A.7 SENSITIVIDAD

A. *Análisis de Variancia para determinar el cuadrado medio.*

Modelo Matemático:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + E_{ij}$$

1. Ordenar los datos de acuerdo a la siguiente tabla:

Respuestas Analíticas para cada nivel de concentración					
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
	Y <sub>11</sub>	Y <sub>21</sub>	Y <sub>31</sub>	Y <sub>41</sub>	Y <sub>51</sub>
	Y <sub>12</sub>	Y <sub>22</sub>	Y <sub>32</sub>	Y <sub>42</sub>	Y <sub>62</sub>
	Y <sub>13</sub>	Y <sub>23</sub>	Y <sub>33</sub>	Y <sub>43</sub>	Y <sub>63</sub>
Promedio	y <sub>1</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>3</sub>	y <sub>4</sub>	y <sub>5</sub>

2. Calcular las siguientes sumatorias:

$$Y_{1.}^2 = (Y_{11} + Y_{12} + Y_{13})^2 + (Y_{21} + Y_{22} + Y_{23})^2 + (Y_{31} + Y_{32} + Y_{33})^2 + (Y_{41} + Y_{42} + Y_{43})^2 + (Y_{51} + Y_{52} + Y_{53})^2$$

$$Y_{..}^2 = (Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{53})^2$$

$$Y_{ij}^2 = (Y_{11})^2 + (Y_{12})^2 + \dots + (Y_{53})^2$$

3. Construir la siguiente tabla:

Fuente de Variación	Grados de Libertad (gl)	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados (CM)	f calculada	Valor de f crítica
Concentración	a - 1	SC <sub>C</sub>	SC <sub>C</sub> / (a - 1)	CM <sub>C</sub> / CM <sub>error</sub>	f(gl <sub>C</sub> / gl <sub>error</sub> )
Error	(r - 1) a	SC <sub>error</sub>	SC <sub>error</sub> / ((r - 1) a)		
Total	(ar) - 1				

## B. Prueba de DMS.

1. Calcular el promedio de las respuestas analíticas para cada nivel de concentración.
2. Ordenar los promedios en forma creciente como se muestra en la siguiente tabla:

<b>Medias</b>	$y_1$	$y_2$	$y_3$	$y_4$	$y_5$
$y_1$	$y_1 - y_1$	$y_2 - y_1$	$y_3 - y_1$	$y_4 - y_1$	$y_5 - y_1$
$y_2$	$y_1 - y_2$	$y_2 - y_2$	$y_3 - y_2$	$y_4 - y_2$	$y_5 - y_2$
$y_3$	$y_1 - y_3$	$y_2 - y_3$	$y_3 - y_3$	$y_4 - y_3$	$y_5 - y_3$
$y_4$	$y_1 - y_4$	$y_2 - y_4$	$y_3 - y_4$	$y_4 - y_4$	$y_5 - y_4$
$y_5$	$y_1 - y_5$	$y_2 - y_5$	$y_3 - y_5$	$y_4 - y_5$	$y_5 - y_5$

3. Restar el valor de las medias entre si como se observa en la tabla anterior.
4. Determinar el valor de DMS utilizando la siguiente fórmula:

$$DMS = t_{0.05/2, gl\ error} \left( (2CM_{error}) / r \right)^{1/2}$$

5. El valor de la DMS obtenida debe ser comparado con la diferencia de las medias obtenidas.

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

**BIBLIOGRAFÍA**

1. A. Garrido French, D. L. Jouan-Rimbaud, Massart, Kuttatharmmakul, Martínez Galera y J. L. Martínez Vidal. "Wavelength Selection Method for Multicomponent Spectrophotometric Determinations Using Partial Least Squares". *Analyst*, 1995. Vol. 120, pp. 2787-2792.
2. Beebe Kenneth, Pell Randy and Seasholtz Mary Beth. "Chemometrics: A practical Guide". Wiley. New York, 1998. pág. 81-101, 278-339.
3. Brereton R. G. "Introduction to Multivariate Calibration in Analytical Chemistry". *Analyst*, 2000, Vol. 125, pp. 2125-2154.
4. Castillo Aguilar B., González Hernández R. "Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para la Cuantificación de Fármacos". *Rev. Cubana Farm.* 1997; 30 (1).
5. "Clarke's Isolation and Identification of Drugs", 2a Edición. The Pharmaceutical Press: Inglaterra, 1986. pág. 799, 800, 849, 850.
6. "Diccionario de Especialidades Farmacéuticas". Versión Electrónica Edición 2000. Ediciones PLM S. A. de CV
7. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), 7ª Edición. Tomo II. México 2000. pág. 1742-1743.
8. Gabrielsson Jon, Lindberg N. O. and Lundstedt T. "Multivariate Methods in Pharmaceutical Applications". *Journal of Chemometrics*. 2002, 16. pp. 141-160.
9. García Vega R. y Resendiz Tapia, L. Tesis de licenciatura: "Determinación Espectrofotométrica de Sulfametoxazol y Trimetoprim por medio de los Métodos

- 
- de Razones de Absorbancia y Mínimos Cuadrados Parciales”. UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo de México, 1998. pág. 11-28.
10. Geraldi, P. and Kowalski, B. “Partial Least Squares regression: a Tutorial”. *Analytica Chimica Acta*, 1986, 185, pp. 1-17.
11. Gómez Mirón, Margot. Tesis de Licenciatura: “Desarrollo de un Método Espectrofotométrico confiable para cuantificar la cantidad de Sulfametazina Sódica liberada en el proceso de disolución de bolos de liberación controlada”. UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo de México, 1998. pág. 14-20, 30, 31.
12. Goodman & Gilman. “Las Bases farmacológicas de la Terapéutica”, 9ª Edición. Interamericana. México 1996. pág. 677-679, 684-686.
13. Harmonised Tripartite Guideline. “Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures”. ICH-Q2A, 1995. pág. A1-A3.
14. Harmonised Tripartite Guideline. “Validation of Analytical Procedures: Methodology”. ICH-Q2B, 1999. pág 1-10.
15. Haaland M. D., Thomas E.V. “Partial Least Squares Methods for Spectral Analysis 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction for quantitative information”. *Analytical Chemistry*, 1988, Vol. 60 (11). pp. 1193-1202.
16. Haaland M. D., Thomas E.V. “Partial Least Squares Methods for Spectral Analysis 2. Application to Simulated and Glass Spectral Data”. *Analytical Chemistry*, 1988, Vol. 60 (11). pp. 1202-1208.
17. Islas Hernández J. Alejandro. Tesis de licenciatura: “Desarrollo de un Método Espectrofotométrico U.V. para la obtención del perfil de Disolución de una forma
-

- 
- farmacéutica que contenga Trimetoprim y Sulfametoxazol". UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo de México, 2004.
18. Lindberg N. O. and Lundstedt T. "Application of Multivariate Analysis in Pharmaceutical Development Work." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1995, 21 (9), pp. 987-1007.
19. López de Alba P. L., López M., L., Amador H. J. "Métodos de Calibración Multivariante". *Sociedad Química de México A. C.*, 1996, 41 (1), pp. 445-475.
20. Martens Harald and Naes Tormod. "Multivariate Calibration". Wiley. New York, 1989. pág. 1-34, 90-121.
21. Miller J. C. y Miller J. N. "Estadística para Química Analítica". 2ª edición. Addison-Wesley Iberoamericana. Delaware 1993.
22. Moberg Ludvig and Karlberg Bo. "Validation of Multivariate Calibration Method for the Determination of chlorophyll *a*, *b* and *c* and their Corresponding Pheopigments". *Analytica Chimica Acta*, 2001, 450, pp. 143-153.
23. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.
24. Ramis Ramos, Guillermo. "Quimiometría". Editorial Sintesis. España 2001. pp. 200-230.
25. "Requisitos Mínimos para la Validación de Métodos Analíticos". Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C. 1993.
26. USP 24. pp: 13, 1148-1149, 2149-2152, 2231-2232.
-