

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO VOLUMÉTRICO PARA
DETERMINAR CALCIO EN UN PRODUCTO FARMACÉUTICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

LETICIA REZA JOSÉ



MÉXICO, D.F.

2007



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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Pedro Villanueva González
Vocal	Prof. María del Socorro Alpizar Ramos
Secretario	Prof. María de los Dolores Campos Echeverría
1er. Suplente	Prof. Pedro Salvador Valadez Eslava
2º. Suplente	Prof. Joaquín González Robledo

Se desarrolló el tema en el Laboratorio 3D, Edificio A,
Facultad de Química

Asesor de tesis

Q. Pedro Villanueva González

Sustentante

Leticia Reza José

AGRADECIMIENTOS

“Si te atrae una lucecita, síguela.

Si te conduce al pantano, ya saldrás de él.

Pero si no la sigues, toda la vida te mortificarás pensando que acaso era tu estrella...”

Gracias Dios mío por haber puesto en mi camino a
personas maravillosas:

Mis padres, Ofelia José García y Lucio Reza Rodríguez. Gracias por su apoyo.

Norma M. Reza José y Margarita Reza José. Gracias hermanas, por su apoyo y confianza al pensar que algún día terminaría este trabajo.

Carlitos. Gracias, por tu paciencia, comprensión y sobre todo por tu amor, en todo momento.

Roberto C. Salcedo. Gracias, por la paciencia, el tiempo, el apoyo, la comprensión y la amistad, mostrados a mi persona, en todo momento.

Sres. (ras.) Roberto Galindo, Silvia González Fuentes y Esperanza Fuentes. Gracias, porque sin su apoyo incondicional y confianza, durante mi formación académica, este trabajo no sería realidad.

Pedro Villanueva González. Gracias profesor, por la oportunidad brindada y el apoyo recibido en este trabajo y en cada momento de mi vida, a partir del día en que me presenté al Laboratorio 3D.

J. Antonio Santiago. Gracias, por tu paciencia, confianza y apoyo, en el momento en que decidí retomar este trabajo.

María de los Dolores Campos Echeverría. Gracias profesora, por su apoyo en la realización y revisión de este trabajo, por la disponibilidad que siempre tuvo para conmigo.

María del Socorro Alpizar Ramos. Gracias profesora, por brindarme su tiempo y apoyo en la revisión de este trabajo.

Compañeros del laboratorio 3D. Gracias por su amabilidad y apoyo en la realización de este trabajo.

“Gracias a todos, por creer en mí, por estar conmigo en mi camino al seguir a mi lucecita y dar más luz a mi vida...”

ÍNDICE

CAPÍTULO	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN	
I.0 Introducción	... 1
II. OBJETIVOS	
II.0 Objetivos	... 3
II.1 Objetivo general	... 3
II.2 Objetivos particulares	... 3
III. GENERALIDADES	
III.0 Generalidades	... 4
III.1 Calcio	... 4
III.2 Disponibilidad del calcio en el cuerpo humano	... 4
III.3 Fisiología del calcio	... 6
III.4 Valores normales y patologías del calcio	... 7
III.5 Detección e identificación del calcio	... 12
III.6 Estudios analíticos del calcio	... 13
III.7 Sal disódica del ácido etilendiaminotetracético EDTA...	15
III.8 Complejo calcio-EDTA	... 17
III.9 Medicamentos	... 18
III.10 Tabletas de carbonato de calcio	... 21
III.11 Método analítico	... 22
III.12 Validación de métodos analíticos	... 23
III.13 Definiciones	... 29
III.14 Protocolo de validación	... 33
III.15 Parámetros de validación del método analítico	... 34

IV.	PARTE EXPERIMENTAL	
	IV.0 Parte experimental	... 40
	IV.1 Material, equipo y reactivos	... 40
	IV.2 Preparación de disoluciones	... 41
	IV.3 Preparación de la muestra	... 43
	IV.4 Método analítico de valoración para la determinación de calcio ionizable (Método validado)...	44
	IV.5 Validación del método analítico	
	IV.5.1 Especificidad (Técnica)	... 47
	IV.5.2 Precisión del sistema (Técnica)	... 49
	IV.5.3 Linealidad del sistema (Técnica)	... 50
	IV.5.4 Exactitud y repetibilidad del método (Técnica)	...51
	IV.5.5 Precisión del método (Técnica)	... 52
	IV.5.6 Linealidad del método (Técnica)	... 53
V.	RESULTADOS	
	V.0 Resultados	... 54
	V.1 Especificidad	... 54
	V.2 Precisión del sistema	... 55
	V.3 Linealidad del sistema	... 56
	V.4 Exactitud y repetibilidad del método	...58
	V.5 Precisión del método	... 59
	V.6 Linealidad del método	... 63
	V.7 Porcentaje de recobro	... 67
VI.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	
	VI.0 Análisis de resultados	... 68

VII.	CONCLUSIONES	
	VII.0 Conclusiones	... 70
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	
	VIII.0 Bibliografía	... 72
IX.	APÉNDICE	
	IX.1 Estándares y reactivos	... 74
	IX.2 Fórmulas	... 75
	IX.3 Tabla estadística de la distribución t de student	... 81
	IX.4 Análisis de varianaza (ANDEVA)	... 82
	IX.5 Tabla estadística de la distribución F de Fisher	... 84

CAPÍTULO I

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO VOLUMÉTRICO PARA DETERMINAR CALCIO EN UN PRODUCTO FARMACÉUTICO

I.0 INTRODUCCIÓN

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del análisis del control de calidad de una forma farmacéutica y del desarrollo de una nueva formulación, ya que durante una evaluación cuidadosa y sistemática de secuencia de pruebas y análisis se demuestra, sí el método cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado. Por lo tanto, la validación de métodos analíticos es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La validación de un método analítico nos permite asegurar que este es consistente y asegura la calidad de un producto a través de una cuidadosa y sistemática atención a todos los factores involucrados en el mismo, contando con la evidencia documental de que el método logra los resultados para los cuales se destina.

La FDA define a la validación como: contar con evidencia documental, que provee de un alto grado de seguridad de que un proceso específico es consistente de acuerdo a especificaciones predeterminadas y atributos de calidad de un producto.

Es importante la validación de procesos ya que asegura la calidad de un medicamento que se fabrica, se optimizan los procesos reduciendo así la posibilidad de rechazo y/o reproceso, se incrementa la competitividad y productividad, cumpliendo con buenas prácticas de fabricación, con requerimientos oficiales y con otros lineamientos regulatorios.

Considerando la naturaleza y la aplicación del método analítico, al realizar la validación, se puede requerir el estudio de los siguientes parámetros de desempeño: precisión / adecuabilidad y linealidad del sistema, exactitud y repetibilidad, linealidad y precisión del método o precisión intermedia, especificidad, estabilidad analítica de la muestra, límite de detección y cuantificación, robustez y tolerancia.

En el presente trabajo, se realizó la validación del método volumétrico para la determinación del contenido de calcio en una presentación farmacéutica de tabletas a base de carbonato de calcio, titulándose con disolución de etilendiaminotetracetato de sodio 0.1M, llevando a cabo Buenas Prácticas de Laboratorio, cuidando los factores involucrados y midiendo la respuesta del analito en la muestra, con un sistema de medición establecido. El método volumétrico para determinar la cantidad de calcio es de tipo complejométrico a través de un equilibrio calcio-etilendiaminotetraacetato.

En el método analítico complejométrico, un factor importante es la completa disolución del producto, el carbonato de calcio, es prácticamente insoluble en agua y soluble en soluciones de ácidos diluidos, por lo tanto, la disolución del producto se realizó con ácido clorhídrico y agitación. Otro factor determinante es el pH para que se lleve a cabo la reacción, el ión calcio tiene una de las menores tendencias hacia la formación de complejos, el agente complejante hexadentado, etilendiaminotetracetato, es capaz de formar un complejo muy estable con el ión calcio a un pH de 11, por lo que se adicionó hidróxido de sodio para obtener el pH deseado.

Otro punto importante es, poder observar el punto final de la reacción, ya que puede ser una de las limitaciones que tiene el desarrollo de los métodos volumétricos, para ello se emplean indicadores, cuya misión es advertir cuando la reacción ha llegado a ser completa, el indicador con que se trabajó fue el azul de hidroxinaftol, que permitió ver un vire de rosa -violeta a azul.

La valoración de la disolución de etilendiaminotetracetato de sodio, se realizó con una disolución estándar de referencia secundaria de carbonato de calcio, según el método de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

La aplicación analítica del método en estudio, basándose en los criterios de aceptación establecidos, cumplió con los parámetros de desempeño: precisión / adecuabilidad del sistema, linealidad del sistema, especificidad, exactitud y repetibilidad, linealidad del método y precisión del método o precisión intermedia.

CAPÍTULO II

II.0 OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GENERAL

- El objetivo del presente trabajo es realizar la validación de un método analítico volumétrico para determinar calcio en un producto farmacéutico.

II.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los parámetros de desempeño del método analítico: especificidad, linealidad, precisión, exactitud y repetibilidad.
- Comprobar que el método analítico realizado es específico, preciso, exacto y lineal.
- Aplicar el método volumétrico validado en un producto farmacéutico que contiene carbonato de calcio equivalente a 500 mg de calcio elemental.

CAPÍTULO III

III.0 GENERALIDADES

III.1 CALCIO

El calcio es un metal moderadamente maleable y dúctil, color blanco plateado, tiene un punto de fusión de 839°C, un punto de ebullición de 1.484°C, una densidad de 1.54g/cm³, número atómico 20, peso atómico 40.08g/mol, pertenece al grupo II de la tabla periódica, grupo de los elementos alcalino térreos; su estado de oxidación es de +2. El calcio tiene seis isótopos estables y varios radiactivos. El calcio es un metal de reactividad relativa, cuyo catión es estable, no obstante sus sales solubles sufren metástasis con boratos, carbonatos, citratos, oxalatos, fosfatos, sulfatos y tartratos, para dar origen a compuestos de calcio insolubles. A menudo estas reacciones causan incompatibilidades farmacéuticas.

El calcio ocupa el quinto lugar en abundancia entre los elementos de la corteza terrestre, pero no se encuentra en estado puro en la naturaleza. El químico británico Sir Humphry Davy aisló el calcio en 1808 mediante electrólisis. El calcio se encuentra en varios compuestos muy útiles, tales como el carbonato de calcio, del que están formados la calcita, el mármol, la piedra caliza y la marga; el sulfato de calcio, presente en el alabastro o el yeso; el fluoruro de calcio, en la fluorita; el fosfato de calcio o roca de fosfato y varios silicatos. En aire frío y seco, el calcio no es fácilmente atacado por el oxígeno, pero al calentarse, reacciona fácilmente con los halógenos, el oxígeno, el azufre, el fósforo, el hidrógeno y el nitrógeno.

El calcio es indispensable para la vida, esencial para muchos procesos fisiológicos. Las categorías terapéuticas representadas por compuestos de calcio aceptados incluyen, los antiácidos y los suplementos de calcio.

III.2 DISPONIBILIDAD DEL CALCIO EN EL CUERPO HUMANO

Alrededor del 99% del calcio se localiza en los huesos y en los dientes, donde las sales cálcicas principalmente hidroxiapatita, son un componente esencial que provee solidez estructural.

El calcio es una sustancia que los huesos y los dientes acaparan y conservan para asegurar el crecimiento y mantener la solidez de la arquitectura orgánica. El 90% de calcio se encuentra en el esqueleto, en forma de depósito, en reserva para las necesidades del organismo, ya que el 10% restante, se encuentra distribuido en los músculos, en el cerebro, en la sangre y en el corazón. Su papel es vital, sin el calcio, el corazón no podría latir, los nervios no podrían funcionar. Aunque sea mínima, una disminución de la cantidad de calcio en la sangre es de grandes consecuencias.

Todas las células requieren calcio para numerosas funciones. El calcio es especialmente importante en la estructura de los huesos y en la actividad neuromuscular. En el suero, el calcio puede hallarse presente como calcio no difusible unido a proteínas o como calcio difusible. La forma difusible puede ser compleja o ionizada (forma fisiológicamente activa). La mayor parte de la forma no difusible, se encuentra unida a proteínas, pero la actividad de unión se modifica con algunos estados patológicos y cambios de pH.

Se encuentra calcio asimilable en el agua, en la leche, en el queso y en muchos otros alimentos. Las carnes y los cereales son pobres en calcio o contienen demasiado fósforo, cosa que es incompatible con el buen aprovechamiento del calcio.

El calcio aportado por los alimentos sufre ya en el organismo diversas reacciones que aseguran su asimilación. A nivel del estómago, el ácido clorhídrico segregado libera el calcio de las sales que le acompañan y lo transforman en cloruro de calcio, fácilmente absorbible.

A nivel duodenal, estas sales se encuentran con los ácidos grasos derivados de la digestión de las grasas. Cuando la alcalinidad del medio intestinal es muy intensa, en lugar de favorecer la asimilación cálcica, la dificulta, esto explica por que un exceso de vegetales ingeridos, alcaliniza el medio intestinal, impidiendo la absorción del calcio. En estos casos, un análisis de los excrementos demuestra que la cantidad de calcio desaprovechada es considerable, esto es muy importante tenerlo en cuenta, ya que lo que interesa no es la cantidad de calcio ingerida sino la asimilada.

Para fijar el calcio es conveniente que la alimentación sea equilibrada. Los regímenes demasiado ácidos o demasiado alcalinos disminuyen el calcio, dando origen a numerosos estados de deficiencia. Por otra parte es también importante asegurar el equilibrio calcio-fósforo, así como el aporte de vitamina D y C, que son esenciales para la fijación del calcio. La vitamina D se encuentra presente en algunos alimentos como leche, huevos, mantequilla y actúa en dosis muy pequeñas.

Las sales cálcicas tanto de la sangre como del sistema óseo se eliminan sin cesar y es necesario reponerlas inmediatamente, de lo contrario se produce un déficit que origina diversos trastornos.

III.3 FISIOLOGÍA DEL CALCIO

El calcio es muy importante en la conducción nerviosa, en la excitabilidad de la placa neuromuscular, es indispensable para establecer el potencial de membranas en las células excitables, forma parte del mecanismo secretor de diversas hormonas y de muchas enzimas citoplasmáticas.

El ion calcio se encuentra en el líquido extracelular en concentraciones de aproximadamente 2.5 mmol/L. Es necesario para todas las reacciones de la coagulación de la sangre excepto para la de iniciación por contacto, y se conoce como factor IV de la coagulación. El ion calcio se extrae del interior de todas las células (concentraciones de 10–100nmol/L) por un mecanismo de transporte activo impulsado por ATP que bombea magnesio hacia el citoplasma celular.

El ion calcio juega un importante papel en la contracción muscular: es bombeado desde el sarcoplasma hacia la luz del retículo sarcoplasmático, donde se fija a la proteína calsecuestrina. La unión del ion calcio a la proteína determina una modificación de configuración en la troponina, que constituye el disparador inmediato de la contracción muscular.

El calcio también actúa como segundo mensajero intracelular de hormonas, función mediada por la proteína calmodulina. La concentración del ion calcio en el líquido

extracelular se controla por un mecanismo de retroalimentación negativa que comprende la hormona paratiroidea, la calcitonina y la vitamina D.

Fisiológicamente la homeostasis del calcio y del fósforo se mantiene gracias a la acción de la hormona paratiroidea, de la vitamina D y de la calcitonina. La hormona paratiroidea se requiere para la hidroxilación en el riñón. La hormona paratiroidea y la vitamina D trabajan juntas para estimular la absorción de calcio en el tracto gastrointestinal, la resorción ósea y la reabsorción de calcio en el riñón. Las acciones de la hormona paratiroidea y de la vitamina D se oponen a las de la calcitonina.

III.4 VALORES NORMALES Y PATOLOGÍAS DEL CALCIO

El calcio del suero se mide para detectar: enfermedades óseas, regulación desordenada del calcio, así como enfermedades de la glándula paratiroides, es decir, la medida del nivel de calcio en suero, es útil para determinar los problemas del riñón y si hay una cantidad apropiada de vitamina D en el cuerpo. El calcio ionizado se mide cuando otros factores complican la interpretación de la prueba de calcio, por ejemplo, la presencia de cantidades anormales de albúmina o inmunoglobulinas.

Los valores normales de calcio oscilan entre 9.5 y 11 mg/100mL de plasma.

Valores séricos normales de calcio:

- Niños 4.4 a 6.0 mg/dL
- Adultos 4.4 a 5.3 mg/dL

Calcemia: presencia de calcio en la sangre (hipercalcemia). Los niveles séricos altos de calcio pueden indicar:

- Intoxicación por vitamina D
- Mieloma múltiple

Calcipenia: deficiencia de calcio en el organismo (hipocalcemia). Los niveles séricos bajos de calcio pueden indicar:

- Mala absorción
- Pancreatitis
- Insuficiencia renal
- Raquitismo
- Deficiencia de vitamina D

Los trastornos del metabolismo del calcio pueden relacionarse con una disfunción de la glándula paratiroidea o con una deficiencia de vitamina D.

Hiperparatiroidismo primario. Este consiste en la sobreproducción de la hormona paratiroidea junto con un aumento del calcio en suero y una disminución del fosfato sérico. La mayoría de los casos se debe a adenomas benignos de la glándula paratiroides, unos pocos se deben a un carcinoma de las paratiroides. Las neoplasias neuroendocrinas sin metástasis óseas que secretan un péptido relacionado con la hormona paratiroidea producen pseudohiperparatiroidismo.

El Hiperparatiroidismo primario es una enfermedad asintomática, las personas se presentan con nefrolitiasis recurrente, que genera obstrucción del tracto urinario, infección recurrente del tracto urinario, predisposición hacia la pielonefritis y, por último, insuficiencia renal crónica. Los cálculos suelen estar formados por oxalato de calcio o por fosfato de calcio.

La nefrocalcinosis puede generar una insuficiencia renal crónica. El efecto del aumento de los niveles de la hormona paratiroidea en el hueso es el aumento del número de trabéculas, el aumento de los osteoblastos y el reemplazo del hueso normal por un tejido fibroso, lo que se denomina osteítis fibrosa quística. Las manos y el cráneo se ven comprometidos con mayor frecuencia. Las radiografías muestran la resorción de las falanges.

El aumento de los niveles de calcio en suero puede generar cambios del estado mental, que oscilan desde alteraciones leves de la personalidad hasta trastornos sicóticos severos, obnubilación y coma. El aumento del calcio sérico produce debilidad de los músculos proximales, fatiga rápida y atrofia muscular. Los pacientes con hiperparatiroidismo tienen una alta incidencia de úlcera duodenal que a veces se asocia con el aumento del calcio sérico.

Deben descartarse otras causas de hipercalcemia, como las metástasis osteolíticas de varias neoplasias malignas, los efectos de cánceres sin metástasis ósea, la intoxicación por vitamina D, el síndrome lácteo alcalino y la inmovilización prolongada. Si bien estas situaciones no aumentan los niveles séricos de la hormona paratiroidea, pueden aumentar el nivel del péptido relacionado con esta hormona cuando la hipercalcemia se debe a un cáncer.

Hiperparatiroidismo secundario. Este ocurre en situaciones en las que el calcio sérico disminuye y las paratiroides están indemnes. La insuficiencia renal crónica produce hiperparatiroidismo secundario; por lo tanto, la osteítis fibrosa quística es parte de la enfermedad ósea de la insuficiencia renal crónica. El nivel sérico de calcio es normal, aunque el nivel sérico de fosfato y los niveles de la hormona paratiroidea se encuentran elevados.

Hipoparatiroidismo. En esta enfermedad la producción de la hormona paratiroidea disminuye.

El pseudohipoparatiroidismo es una resistencia de los túbulos renales a la acción de la hormona paratiroidea. El calcio sérico se encuentra disminuido y el fosfato sérico y la hormona paratiroidea están elevados.

Osteomalacia y raquitismo. La osteomalacia se refiere a un trastorno que ocurre luego que los huesos han dejado de crecer; el raquitismo se refiere a un trastorno de los huesos en crecimiento, que implica descalcificación debido a la falta de vitamina D.

Estas condiciones se deben a la mineralización defectuosa de la matriz ósea normal. La mineralización de la matriz ósea requiere una concentración precisa de calcio y de fosfato. La deficiencia de vitamina D produce la disminución de la absorción de calcio y de fosfato del tracto gastrointestinal. La deficiencia de vitamina D, puede deberse: al consumo de una dieta deficitaria, a una exposición inadecuada al sol, a la mal absorción intestinal de la vitamina la cual es liposoluble, a una acidosis crónica, a alteraciones de los túbulos renales y al tratamiento con anticonvulsivantes. La vitamina D, está presente en los productos lácteos enriquecidos, en el aceite de hígado de bacalao y en los pescados grasos.

Un niño con raquitismo presenta deformidades esqueléticas, aumento de la susceptibilidad a las fracturas óseas, debilidad muscular, hipotonía, demora de la erupción de los dientes; defectos del esmalte dentario y, en los casos severos, tetania. Los adultos con osteomalacia presentan dolor esquelético, sensibilidad ósea, debilidad muscular y fracturas de los huesos ante traumatismos mínimos.

También puede presentarse la descalcificación en forma de fragilidad ósea. Quienes la padecen, son fácilmente reconocibles por el color azulado de la esclerótica, parecen de cristal, sufriendo fracturas al menor contacto. Finalmente existe la pérdida de los minerales del esqueleto a través de la orina. Suele ir asociada a la tuberculosis.

La hipocalcemia estimula la producción de la hormona paratiroidea, que aumenta la resorción de calcio de los huesos y la excreción renal de fosfato. La mineralización no puede ocurrir debido a la disminución de calcio y de fosfato.

Osteoporosis. La osteoporosis es una enfermedad que afecta al sistema óseo y se caracteriza por el deterioro progresivo del tejido óseo y la cantidad de los huesos, debido a la pérdida normal de calcio y otros minerales. En la osteoporosis la cantidad de calcio por unidad de masa ósea es normal, si bien la cantidad de hueso disminuye. Esta afección se produce a medida que avanza la edad debido a que la resorción ósea excede la formación ósea. Es una enfermedad que se desarrolla de forma silenciosa y en sus primeras etapas no produce molestias, pero puede ser muy peligrosa por los riesgos que conlleva. Los principales riesgos de fracturas por osteoporosis se presentan en la columna vertebral, fundamentalmente por aplastamiento o desgaste en las vértebras, en las muñecas, en los

huesos de los brazos, en la pelvis y en la cadera. La compresión de las vértebras origina la disminución de altura y una deformidad que generalmente se conoce como joroba de viuda. Cuando ocurre una fractura, hay mayores probabilidades de que ocurran más, lo cual causa dolor, pérdida de movilidad y posible necesidad de cirugía.

La osteoporosis es una enfermedad que afecta principalmente a personas en edad avanzada y de forma especial a las mujeres, ya que se calcula que aproximadamente el 30% de las mujeres posmenopáusicas la padecen y su incidencia aumenta con la edad. Sin embargo, después de los 60 años, el riesgo es igual para hombres y mujeres. La menopausia es uno de los principales factores de riesgo de la osteoporosis y se debe a la disminución de los niveles de estrógeno, una hormona que es fundamental para la fijación del calcio. Sin embargo, mediante el conocimiento, la prevención al consumir la cantidad necesaria de calcio todos los días y el desarrollo de estilos de vida saludables, la osteoporosis se puede evitar y controlar adecuadamente.

Hay falsos reumatismos osteopáticos, principalmente en la columna vertebral que se pueden curar con pocas inyecciones intravenosas de calcio.

La falta de calcio tiene asimismo repercusiones pésimas en el estado de los dientes que se carian o rompen.

La calcificación es un depósito de sales de calcio, en su mayor parte fosfatos de calcio en la forma de cristales aguzados de hidroxapatita en los tejidos del organismo. Esto sucede normalmente en los dientes y en los huesos en desarrollo, y puede observarse en el cartílago envejecido. En los dientes, los cristales constituyen grandes placas hexagonales, en cuyo depósito colaboran los ameloblastos.

La calcificación distrófica, es la acumulación de sales de calcio en tejidos de enfermos, como sucede en la tuberculosis crónica, en las válvulas cardíacas lesionadas y en las placas ateroscleróticas.

La calcificación metastásica, es la calcificación patológica de tejidos normales, por ejemplo, alvéolos pulmonares, túbulos renales, paredes arteriales y otros tejidos, como sucede en el hiperparatiroidismo, ciertos tumores, leucemia y enfermedad de Addison.

La calcinosis es un depósito anormal de sales de calcio en nódulos debajo de la piel, en los músculos y en los tendones. El trastorno puede deberse a Hipercalcemia, resultado de alteraciones locales consecutivas a una infección o ser secundario a esclerodermia o dermatomiositis. Los depósitos se colorean de color azul intenso, con hematoxilina y eosina, y de negro con la técnica de Von Kossa.

En la descalcificación o desmineralización no se puede perder calcio sin perder al mismo tiempo otros minerales y en particular fósforo (fosfatos), toda vez que los diversos elementos están solidarizados y no existen en estado puro en el organismo. Puede ser el primer signo, un estado de pesadez, de fatiga general, apareciendo luego dolores más o menos difusos en la espalda. A medida que la descalcificación se acentúa, aparecen manifestaciones dolorosas concretas, tales como ciática, reumatismo e incluso accidentes graves en la columna vertebral.

III.5 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL CALCIO

Los métodos histológicos para la detección de: fosfato de calcio, carbonato de calcio e hidroxiapatita en cortes de tejidos, utilizan la reacción del calcio con el colorante rojo de alizarina S, para formar una laca cálcica color rojo-anaranjada birrefringente, la reacción del carbonato o el fosfato con un metal pesado da como resultado un precipitado insoluble. En el método de Von Kossa, los cortes se hacen reaccionar con nitrato de plata bajo una luz brillante (preferentemente la del sol), lo que genera carbonato o fosfato de plata. El tratamiento posterior con tiosulfato de sodio reduce el resto de la plata no unida.

Luego se procede a realizar la coloración de contraste con rojo nuclear rápido y se montan los cortes. Los depósitos de calcio aparecen de color negro sobre un fondo rosado a rojo.

Las muestras de sangre deben restringirse a suero o plasma heparinizado; la sangre recolectada con EDTA u oxalato resulta inadecuada para su análisis.

Una prueba de búsqueda de calcio en orina es la de Sulkowitch, en la cual se agrega a la muestra oxalato cuyo pH es regulado con acetato (reactivo de Sulkowitch). El grado de turbiedad es una medida semicuantitativa de la cantidad de calcio presente en la muestra. La determinación cuantitativa de calcio urinario puede llevarse a cabo mediante espectrofotometría de absorción atómica o alguno de los métodos colorimétricos descritos en determinaciones de calcio total.

Las muestras de materia fecal son convertidas en cenizas en una mufla, el residuo se disuelve en ácido y la concentración de calcio se mide mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Las muestras de hueso pueden analizarse por espectroscopia de fluorescencia de rayos X.

III.6 ESTUDIOS ANALÍTICOS DEL CALCIO

La investigación realizada en diferentes campos de la química en estudios acerca del calcio, ha tenido resultados sorprendentes:

Se ha realizado la determinación de potasio y calcio por espectrofotometría de emisión atómica en miel.

En los estudios realizados acerca del metabolismo mineral se ha empleado el isótopo radiactivo artificial ^{45}Ca .

Se ha realizado la determinación potenciométrica de calcio y magnesio en suero de sangre.

La dureza total del agua debida a calcio y magnesio, se puede determinar por medio de una titulación directa con EDTA utilizando como indicador el negro de eriocromo T o la

Calmagita, aunque el complejo entre el calcio y el indicador es demasiado débil para que ocurra el cambio de color adecuado, el magnesio forma un complejo más estable que el calcio. De esta manera, cuando se agrega a la disolución que contiene calcio, se forma la sal edetato de calcio que es más estable y se libera el magnesio que reacciona con el indicador produciéndose un color azul. También se ha determinado la dureza total del agua natural usando sensores potenciométricos, los resultados concuerdan con los obtenidos con métodos estandarizados basados en complejometría.

Se ha estudiado la reacción complejométrica en microorganismos con EDTA y los iones calcio y magnesio aplicando un modelo físico matemático y así determinar los puntos finales de reacción a través de disoluciones estándar que contienen calcio y magnesio.

Determinación rápida de calcio en aleaciones de calcio-silicón, a través de un método con solución de trietanolamina, ácido sulfosalicílico y titulado con EDTA hasta un punto final, observándose un color azul, obteniéndose resultados semejantes a los obtenidos en una titulación complejométrica directa.

Estudio del comportamiento oscilográfico del calcio / rojo de alizarin y sus aplicaciones, a través de un método voltamétrico con un electrodo de mercurio, este método fue aplicado a disolución oral y tabletas de gluconato de calcio y los resultados fueron comparados contra polarografía convencional, donde el calcio produce compuestos de coordinación.

El EDTA como componente eluente en cromatografía. Estudio predictivo y comparativo de análisis de tierras alcalinas y iones alcalino térreos utilizando EDTA como eluente. Se comparan los análisis de cromatografía iónica y titulaciones complejométricas, con los iones calcio y magnesio, los datos estadísticos indican que no hay diferencia relativa entre los dos métodos. Sin embargo, la cromatografía iónica tiene una ligera ventaja sobre el método volumétrico.

Estudio de métodos para la preparación de muestras en la determinación de calcio en jugos, vinos y otras bebidas alcohólicas a través de espectrofotometría de absorción atómica.

Determinación de plomo y calcio usando una combinación de espectrofotometría de flama por absorción atómica con una microcolumna preconcentrada. Reportándose resultados satisfactorios.

Determinación de calcio en leche en polvo a través de un método de espectrofotometría de absorción atómica a la flama, haciendo digerir la muestra previamente con ácido nítrico.

III.7 SAL DISÓDICA DEL ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO

El ácido etilendiaminotetraacético es un ligando hexadentado que se puede combinar con un ión metálico mediante sus dos nitrógenos y sus cuatro grupos carboxilo. El ácido etilendiaminotetraacético es un ácido tetraprótico, su solubilidad en agua a la temperatura ambiente es bastante baja 0.2g dm^{-3} (0.0007M), es insoluble en los ácidos y en la mayoría de los solventes. La sal disódica del EDTA ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), reactivo dihidratado, no debe secarse a una temperatura mayor de 80°C para no iniciar la deshidratación. El dihidrato es estable a la temperatura ambiente.

Tipos de titulaciones con EDTA:

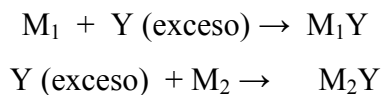
Titulación directa.



La disolución que contiene el catión metálico a determinar se regula para tener un pH adecuado y se titula directamente con una disolución de EDTA estandarizada. En algunos casos es necesario impedir la precipitación de hidróxidos metálicos o de sales básicas mediante la adición de agentes complejantes auxiliares, tales como tartrato-citrato o

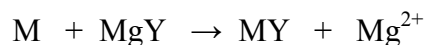
trietanolamina. El punto final de la titulación se determina mediante un indicador metalcrómico u otro método instrumental.

Titulaciones por retroceso.



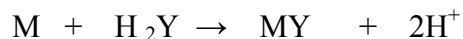
Numerosos cationes no pueden ser titulados directamente porque; precipitan hidróxidos y otros compuestos en la zona de pH necesario para realizar la titulación, no existe un indicador de fin de reacción, la reacción de formación del complejo es lenta y requiere tiempo y calentamiento; en tales casos se añade un exceso de EDTA, luego se ajusta el pH en el valor deseado y el exceso del reactivo se titula por retroceso con una disolución patrón de un catión metálico que no perturbara el primer complejo formado. Los cloruros o sulfatos de zinc o magnesio se usan frecuentemente para titular el exceso de EDTA. El punto final se detecta con un indicador que responde al catión utilizado en la titulación por retroceso.

Titulación por sustitución



Se puede aplicar cuando al realizar la titulación con el catión metálico no se puede observar el punto final de la reacción con el indicador y cuando el catión forma un complejo más estable con el EDTA que el de metales como el calcio o el magnesio. A la disolución del catión a determinar se añade una cantidad conocida del complejo MgY en exceso respecto al catión a determinar. El ión magnesio liberado en cantidad igual a la del catión, se titula con una disolución de EDTA y un indicador de reacción adecuado.

Titulación ácido-base



Según la ecuación química, cada mol de la sal disódica del EDTA añadida a una disolución de un catión con la que forma un complejo libera dos equivalentes de protones que pueden titularse con una disolución de hidróxido de sodio. El punto final se detecta con un indicador ácido-base o potenciométricamente.

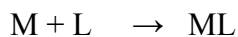
III.8 COMPLEJO CALCIO-EDTA

El tipo de reacción es importante dentro de un método analítico. La reacción química que implica la formación de un complejo puede servir como base de una determinación volumétrica.

En el presente trabajo, el método llevado a cabo para titular al catión metálico Ca^{2+} se basó en la titulación directa con EDTA. Se validó el método volumétrico basado en una reacción en la que se forma un compuesto complejo del tipo ML que consiste en un catión metálico central M, al cual se hallan unidos varios aniones y/o moléculas llamadas ligandos, L, la expresión de la constante de estabilidad del complejo es:

$$K = [ML] / [M][L]$$

Las reacciones de los iones metálicos con agentes quelantes, por lo general son reacciones con estequiometría 1:1, en las que se forma un complejo soluble, se puede representar la reacción de manera general como:



Los ligandos libres, tienen por lo menos un par de electrones que no está involucrado en el proceso. Se puede considerar que estos pares de electrones se donan a los iones metálicos deficientes en electrones para la formación de complejos. Los ligandos multidentados como el etilendiaminotetracetato puede coordinar 6 posiciones, es un agente

complejante hexadentado, capaz de formar un complejo muy estable con el ión calcio. El EDTA forma quelatos muy estables con más de 56 cationes metálicos. Ciertos agentes quelantes que contienen oxígeno y nitrógeno son particularmente eficaces para formar complejos estables con una amplia variedad de metales. De estos agentes, el que mejor se conoce es el ácido etilendiaminotetraacético, que algunas veces se designa como ácido etilendinitrilotetraacético, EDTA.

El término quelón, se ha propuesto como un nombre genérico para este tipo de reactivos, incluyendo las poliaminas, los ácidos poliaminocarboxilicos como el EDTA y los compuestos afines que forman con los iones metálicos, complejos solubles en agua en una proporción 1:1 y que se pueden utilizar como titulantes para los metales. A los complejos, clase especial de compuestos quelatos, se les llama quelonatos metálicos y a las titulaciones se les denomina titulaciones quelométricas. Los quelones prácticamente han revolucionado la química analítica de muchos elementos metálicos y son de gran importancia en muchos campos.

III.9 MEDICAMENTOS

Los medicamentos basados en calcio tienen un papel importante dentro de la salud y el bienestar general. El tratamiento con medicamentos basados en calcio, es importante en la prevención de enfermedades, relacionadas con este mineral.

Los medicamentos basados en calcio están indicados en estados que incrementan la demanda de calcio como: crecimiento, embarazo, lactancia, dentición, menopausia y osteoporosis. Y en enfermedades caracterizadas por la pérdida acelerada del contenido mineral óseo.

Existen varias formas farmacéuticas especiales para el tratamiento o prevención de enfermedades, a causa de la deficiencia de calcio, en sus diferentes formulaciones: cloruro de calcio, carbonato de calcio, gluconato de calcio, fosfato tricálcico, fosfato dibásico de calcio, D-pantotenato de calcio, lactato de calcio, glicerofosfato de calcio, etc.

Cloruro de calcio: la sal cristalina (hexahidrato) forma grandes prismas hexagonales que funden a 29°C-30°C. Se disuelve fácilmente en agua con absorción de calor; también es bastante soluble en alcohol. La sal anhidra forma un polvo blanco de punto de fusión superior a 70°C. Al aire son deliquescentes lo mismo la sal cristalizada que la anhidra, más ésta que aquella.

El cloruro de calcio, en Medicina, se ha empleado en el tratamiento de la tuberculosis, en el asma, en el raquitismo, en el eczema, en la urticaria y en el prurito. El dihidrato es la forma más usada como hemostático, cuando la falta de coagulabilidad de la sangre se debe a una deficiencia de calcio.

Carbonato de calcio: polvo blanco, microcristalino, insoluble en agua, débilmente soluble (1:4000) en agua saturada de CO₂. En Farmacia se emplea como antiácido, en la úlcera péptica, en la hiperclorhidria y en la diarrea ácida. Por su contenido en calcio y por disolverse en el estómago, en forma de cloruro, se usa también en el raquitismo, en la formación retrasada y para elevar la coagulabilidad de la sangre cuando hay una deficiencia de calcio.

Gluconato de calcio: sal cálcica del ácido glucónico que se presenta como polvo o en forma de gránulos cristalinos, de color blanco, sin olor, ni sabor. Su empleo se recomienda en todos los procesos en que se necesita una calcificación intensa (tuberculosis, raquitismo), como reconstituyente general, en hemorragias y en dermatosis. Se le emplea en forma de tabletas o en inyección intravenosa, como fuente calcio suplementario o terapéutico.

Fosfato tricálcico: polvo blanco, amargo, insoluble en agua fría; en agua hirviendo se va descomponiendo lentamente y produce una sal básica insoluble y otra soluble que es fosfato primario.

Fosfato dibásico de calcio: polvo ligero, blanco cristalino, muy poco soluble en agua, fácilmente soluble en ácidos clorhídrico o nítrico sin efervescencia, difícilmente soluble en ácido acético.

El fosfato dibásico de calcio es la sal de calcio más utilizada cuando se desea administrar simultáneamente fósforo y calcio, por ejemplo, en el raquitismo, enfermedades de los huesos, osteomielitis, caries y dentición defectuosa. Con tales fines se emplea también el fosfato tricálcico, aunque no parece tan recomendable por absorberse con mayor dificultad. El fosfato dibásico de calcio se utiliza también como antiácido y como hemostático, en los mismos casos que el cloruro.

Lactato de calcio: polvo cristalino blanco, lentamente soluble en 20p. de agua fría, fácilmente soluble en agua hirviendo, poco soluble en el alcohol frío y algo en alcohol caliente. La solución acuosa tiene reacción neutra. Los preparados comerciales de lactato de calcio contienen un 25% de agua, en lugar de 29.22%, que es lo teórico para cinco moléculas. Para obtener un preparado anhidro hay que calentar a 120°C. El lactato cálcico es utilizado como antirraquítico, hemostático y antiespasmódico.

Glicerofosfato de calcio: polvo blanco cristalino, inodoro, de sabor débilmente amargo, soluble en 40p. de agua a 20°C. Su solubilidad en agua aumenta en presencia de ácido láctico o cítrico. El ácido glicerofosfórico es un componente de las lecitinas y se encuentra libre en la sangre, músculo y orina. Es un producto intermedio en el metabolismo de los hidratos de carbono (combustión de la glucosa).

El glicerofosfato de calcio se emplea como reconstituyente por ser una fuente de fósforo y calcio, fácilmente asimilables.

Orotato de calcio: forma más asimilable del calcio se utiliza como suplemento nutricional; es capaz de penetrar en las células mejor que las otras formas de calcio.

A menudo el calcio es el catión de elección para transportar aniones activos, desde el punto de vista terapéutico, por ejemplo el aminosalicilato de calcio y el ciclobarbital de calcio, debido a las características físicas del compuesto.

III.10 TABLETAS DE CARBONATO DE CALCIO

Carbonato de calcio (CaCO_3): se emplea en medicamentos como antiácido y como suplemento cálcico de la dieta.

FARMACODINÁMICA

El calcio es esencial para conservar la integridad funcional de los sistemas: nervioso, muscular y óseo, así como para la permeabilidad capilar y de la membrana celular. Las sales de calcio se usan como fuente del catión calcio para tratar o prevenir el agotamiento de calcio en pacientes en quienes las medidas dietéticas son inadecuadas. Las enfermedades que producen hipocalcemia son: diarrea crónica, deficiencia de vitamina D, esteatorrea, esprue, embarazo y lactancia, menopausia, pancreatitis, insuficiencia renal, alcalosis, hiperfosfatemia e hipoparatiroidismo.

FARMACOCINÉTICA

El calcio administrado oralmente, se absorbe activamente en el duodeno y yeyuno proximal y, en menor grado en la parte distal del intestino delgado. El calcio se absorbe sólo en forma ionizada. El embarazo y la reducción de la ingestión de calcio pueden aumentar la eficiencia de la absorción. Para la resorción del calcio se requiere de vitamina D en su forma activa.

El calcio entra al líquido extracelular y luego rápidamente se incorpora en el tejido óseo. Los huesos contienen 99 % del calcio total; 1% se distribuye igualmente entre los líquidos intra y extra celular. En el líquido cefalorraquídeo, las concentraciones de calcio son altas.

El calcio se elimina principalmente en las heces, como calcio no absorbido, que fue secretado por la bilis y el jugo pancreático hacia la luz de la vía gastrointestinal. La mayor parte del calcio que llega a los riñones se resorbe en asa de Henle y en los túbulos contorsionados proximal y distal. En la orina sólo se excretan cantidades escasas de calcio.

III.11 MÉTODO ANALÍTICO

Un método analítico, se define como la descripción de la secuencia de: actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. Los métodos analíticos están definidos como un sistema crítico en el Aseguramiento de Calidad de una empresa farmacéutica, ya que impactan de manera directa en la evaluación de la calidad de un producto, siendo también importante para una empresa, utilizar métodos de prueba de menor costo y mayor rapidez. Un método analítico mide un componente específico, en una muestra y como todo proceso de medición, éste debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido.

Los métodos analíticos son usados para determinar la potencia de los ingredientes, activos, niveles de impureza o degradación de productos, etc. La calidad de los métodos analíticos requiere la demostración apropiada de que cumple con linealidad, exactitud, precisión, especificidad, sensibilidad y tolerancia del método.

Todo producto farmacéutico debe reunir atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad, para cumplir con los aspectos normativos oficiales e internos y no menos importantes, los éticos, por los que si un método analítico, que finalmente es el medidor de las características críticas de calidad del producto, no es confiable, se corre el riesgo de afectar al usuario final, que es alguien que lo necesita.

El método analítico, es la metodología de medición utilizada para medir un componente de interés en una muestra, por ello las empresas farmacéuticas, requieren que las metodologías farmacopéicas o las desarrolladas por las propias empresas, sean confiables. Para ello, es necesario realizar estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo así, un proceso que permite cumplir con este fin, es la validación.

III.12 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de métodos analíticos, es una herramienta involucrada en los procesos de fabricación y en el área de calidad de una empresa, el objetivo final de un dictamen de calidad es la liberación o no de un producto, sobre la base de especificaciones previamente establecidas para cumplir con los aspectos normativos oficiales e internos, por lo que si un método analítico no cumple con los parámetros establecidos, que finalmente sea el medidor de las características críticas de calidad del producto, se corre el grave riesgo de afectar al usuario final del producto.

La validación de métodos analíticos, es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito.

Los métodos analíticos se clasifican:

1. En función de su estado regulatorio:

a: Métodos farmacopeicos: métodos que aparecen en cualquier farmacopea; FEUM, USP, BP, EP, etc.

b: Métodos no farmacopeicos: métodos que no aparecen en las farmacopeas.

2. En función de su aplicación (NOM-059-SSAI-1993 y NOM-073-SSAI-1993):

a: Métodos para producto a granel

b: Métodos para producto terminado

c: Métodos para materia prima

d: Métodos indicadores de estabilidad

3. En función de su propósito analítico:

a: Métodos para cuantificar el analito (contenido o potencia)

b: Métodos para establecer la presencia del analito a un límite

c: Métodos para identificar el analito

4. En función de la naturaleza de la respuesta analítica:

a: Métodos físico-químicos. Cuando la respuesta es de carácter físico o químico

b: Métodos biológicos. Cuando la respuesta es de carácter biológico.

5. En función de la naturaleza del sistema de medición se clasifica:

a: Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica, permite medir una señal de ruido.

b: Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido.

6. De acuerdo a su alcance:

a: Rutina

b: Indicador de estabilidad

La validación de métodos analíticos, le proporciona a quien aplica la metodología, una seguridad de la confiabilidad de dichos métodos y puede tomar la decisión final con certeza. La validación de métodos analíticos, tiene impacto en las áreas relacionadas con la calidad de un producto, no se puede pasar por alto, el hecho de que el factor más importante durante la validación de todo método analítico, es siempre el criterio del profesional responsable de ésta decisión, criterio que es necesario aplicar después de tomar en cuenta todos los factores relacionados con él, o los principios activos, concentraciones, forma farmacéutica, tipo de muestra, método de análisis, propósito de la técnica analítica, instrumentación, sustancias relacionadas, etc.

El proceso de validación de métodos analíticos se lleva a cabo en:

Laboratorio o fábrica responsable de la fabricación de materias primas para la elaboración de medicamentos o productos biológicos para uso humano.

Laboratorio o fábrica de medicamentos o productos biológicos para uso humano.

Laboratorio de control auxiliar de la regulación.

Laboratorio de control químico biológico, farmacéutico o de toxicología, para el estudio y experimentación de medicamentos y materias primas, con el objeto de establecer la validez de los métodos analíticos utilizados para el control analítico del producto.

La validación es un requerimiento regulatorio importante dentro de la industria farmacéutica, que se debe cumplir según los reglamentos establecidos en regulaciones importantes y que a continuación se mencionan:

Publicación en el Diario Oficial de la Federación el 4 de Febrero de 1998, en el Reglamento de Insumos para la Salud, el cual indica:

Artículo 15 “los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos, llevarán el control analítico de estos. Dicho control deberá incluir:

III. La validación de las técnicas empleadas”.

En la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico-farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, que indica:

5.6 “El encargado del área de producción, se encargará de realizar las siguientes funciones, sin perjuicio de las obligaciones y responsabilidades que correspondan al responsable sanitario, conforme a la Ley General de Salud y el Reglamento de Insumos para la Salud:

5.6.3. Que se lleven a cabo estudios de validación de los procesos de fabricación y de los sistemas involucrados”.

5.7 “El encargado del área de calidad se encargará de realizar las siguientes funciones, sin perjuicio de las obligaciones y responsabilidades que corresponden al responsable sanitario, conforme a la Ley General de Salud y al Reglamento de Insumos para la salud:

5.7.4. Que se lleven a cabo estudios de validación de los procesos de fabricación y de los sistemas involucrados”.

9.11.3. “Los métodos analíticos deben ser validados, de acuerdo con lo establecido en el apartado 9.12 control de laboratorio analítico”.

“Se debe contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la FEUM.”

En el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-SSA1-2004. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico-farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos (modifica a la NOM-059-SSAI-1993), indica:

5.7. “El responsable del más alto nivel jerárquico del área de fabricación se encargará de garantizar que la fabricación de los medicamentos cumpla con el contenido de este Proyecto de Norma Oficial Mexicana, sin perjuicio de las obligaciones y responsabilidades que correspondan al responsable sanitario, conforme a la Ley General de Salud y al Reglamento de Insumos para la Salud.”

5.8. “El responsable del más alto nivel jerárquico del área de producción se encargará de que la producción de los medicamentos se realice de acuerdo a los estudios de validación y órdenes maestras aprobadas, garantizando que se cumple con las especificaciones de producto establecidas y el contenido de este Proyecto de Norma Oficial Mexicana.”

5.9. “El responsable del más alto nivel jerárquico de la unidad de calidad deberá tener toda la responsabilidad y la autoridad para garantizar que el establecimiento cumpla con las especificaciones establecidas en el presente proyecto de norma una vez que se publique como norma definitiva:

5.9.5 Aprobar todos los estudios del Plan Maestro de Validación.”

5.7. “El responsable del más alto nivel jerárquico del área de fabricación se encargará de garantizar que la fabricación de los medicamentos cumpla con el contenido de este Proyecto de Norma Oficial Mexicana, sin perjuicio de las obligaciones y responsabilidades que correspondan al responsable sanitario, conforme a la Ley General de Salud y al Reglamento de Insumos para la Salud.”

14. Validación.

14.1 Política.

Es un requerimiento de este Proyecto de Norma Oficial que los fabricantes de medicamentos determinen que actividades de validación son necesarias para demostrar el control de los aspectos críticos de sus operaciones particulares.

Todas las instalaciones, equipos, sistemas críticos y computacionales (que impacten en la calidad del producto) deben estar calificados y los métodos de limpieza y analíticos deben validarse al inicio de la operación y terminados antes de la liberación de un producto.

14.7. “Métodos analíticos.”

14.7.1. “Deben ser validados de acuerdo a un protocolo aprobado, los métodos analíticos usados para:

14.7.1.1 Evaluación de materias primas.

14.7.1.2 Evaluación de producto a granel, en proceso y terminado.”

14.7.2. “En el caso de métodos farmacopeicos para producto procesado o producto terminado deberá realizarse pruebas que demuestren la aplicabilidad del método a su producto e instalaciones.”

14.7.3. “Cualquier cambio en un método analítico validado deberá ser sometido al proceso de control de cambios.”

14.7.4. “Los métodos analíticos usados para medir los parámetros críticos de procesos o de validación de limpieza, deben ser validados antes de cualquier estudio de validación.”

En la Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998. Buenas prácticas de fabricación para fármacos.

16.11 “Los controles de laboratorio e inspecciones deben apoyarse en normas, PNO’s o manuales que contengan las especificaciones para garantizar la confiabilidad de sus resultados, tales controles deben incluir:

16.1.5. Validación de métodos analíticos utilizados por la empresa, no farmacopeicos o farmacopeicos que tengan desviaciones frente a la farmacopea de referencia”.

En la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993. Estabilidad de medicamentos.

5.5. “Cuando se cambie el método analítico durante el estudio de estabilidad, se debe demostrar que los dos métodos son equivalentes durante el proceso de validación.

5.10.2. Información general, especificaciones y métodos analíticos.

5.10.2.3. Información de la linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, repetibilidad y especificidad del método analítico, indicativo de estabilidad.

6. Fármacos. Para fines de registro de un medicamento con fármacos nuevos en México, el fabricante del medicamento debe presentar ante la Secretaría de Salud, estudios de estabilidad acelerada y/o a largo plazo, de tres lotes del (los) fármaco(s) efectuados por el fabricante de los mismos, utilizando métodos analíticos validados”.

III.13 DEFINICIONES

Validación

Es un proceso que permite demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo en estudios experimentales, con un propósito definido y sustentado con actividades documentadas. Siendo esencial al realizar un método analítico.

Es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.

Las sustancias de referencia son importantes en la validación de métodos analíticos, ya que constituyen un componente propio del método y una herramienta en la evaluación de los parámetros de desempeño, lo que permite establecer la confiabilidad de la metodología.

Sustancia de referencia

Sustancia de uniformidad conocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con la sustancia en evaluación.

Muestra

Porción del material a estudiar.

Analito

Componente específico de una muestra a medir, en un análisis.

Método analítico

Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben de cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

Validación del método analítico

Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, es decir, cumple con un propósito definido, a través de actividades documentadas.

La validación de métodos analíticos, es un sistema involucrado en los procesos de fabricación, en el área de calidad.

Parámetro de desempeño

Parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación.

Documentación

Conjunto de información que sustenta una actividad realizada.

Especificidad

Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Linealidad

Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Precisión

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

Exactitud

Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

Repetibilidad

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

Adecuabilidad del sistema

Verificación, de que el sistema opera con base a criterios preestablecidos, que permiten asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

Límite de detección

Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de cuantificación

Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptable, bajo las condiciones de operación establecidas.

Recobro

Es la cantidad del analito determinada en el placebo adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico.

Precisión intermedia

Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

La precisión intermedia ó tolerancia expresa variaciones dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferente equipo. El análisis de diseño es la forma más eficiente de probar la precisión intermedia. Esta técnica permite la evaluación simultánea de varios factores (días, estándares, analistas, preparaciones estándar y preparaciones de muestra). El único criterio de aceptación para la prueba de tolerancia es que la desviación estándar global no iguale o exceda el error permisible de adecuación del sistema.

Robustez

Es la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que la tolerancia, se refiere a los factores externos al método.

III.14 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

El protocolo de validación, es la descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistente.

El protocolo de validación, es un diseño experimental delineado a través de un programa de validación, es un documento, que describe el método para la obtención de datos para su análisis incluyendo el monitoreo de los parámetros críticos del proceso, no se limita a definir el diseño experimental y puede incorporar información adicional.

Las actividades de la validación de un método analítico, deben ser sustentas por:

- I. Protocolo
- II. Reporte

Es crítico documentar los registros analíticos. La documentación debe estar ordenada, disponible y estar bajo la responsabilidad del área de calidad.

El protocolo debe contener:

1. Título
2. Propósito u objetivo. Describe el propósito de la validación.
3. Alcance. Describe lo que se va a incluir en el protocolo y que actividades se llevarán a cabo.
4. Responsabilidades. Se describe las responsabilidades del personal involucrado en la validación de un proceso específico.
5. Plan de prueba. Descripción de los parámetros de desempeño que permitan verificar la aplicación analítica deseada

6. Criterios de aceptación para cada parámetro
7. Formatos de registro de resultados
8. Bibliografía

El reporte debe contener:

1. Título
2. Resultados
3. Análisis de resultados
4. Confrontación contra los criterios de aceptación
5. Conclusión
6. Bibliografía

III.15 PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Sabemos que el parámetro de desempeño es un parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación.

En función del método, en la validación, los parámetros de desempeño a estudiar pueden ser: precisión del sistema, adecuabilidad del sistema, linealidad del sistema, especificidad, exactitud, y repetibilidad, linealidad del método, precisión del método, o precisión intermedia, estabilidad analítica de la muestra, límites de detección, límite de cuantificación, robustez y tolerancia.

El método de valoración está en función de la aplicación analítica de los siguientes parámetros de desempeño: precisión del sistema, linealidad del sistema, especificidad, exactitud y repetibilidad, linealidad del método, precisión del método.

ESPECIFICIDAD

Se establecen las posibles sustancias que interfieren en el análisis, se adicionan cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y se evalúa la respuesta al método bajo las mismas condiciones de análisis.

En el caso de contenido/potencia/valoración, el criterio de aceptación es que la respuesta del método únicamente es debida al analito.

Para métodos de identificación, se deben seleccionar sustancias que potencialmente interfieren en la determinación con base en la estructura molecular del analito, precursores, sustancias relacionadas, vías degradativas, entre otros.

Para métodos de contenido/potencia/valoración, se deben analizar placebos del producto, como lo indica el método, muestras de producto, y cuando proceda; sustancias relacionadas, precursores, homólogos y una mezcla del producto con ellos o cualquiera de ellos.

Para métodos de contenido/potencia/valoración de impurezas, si se dispone de las impurezas se deben adicionar éstas al analito y/o a la muestra analítica en niveles que incluya la especificación. Analizar como lo indica el método. Cuando no se dispone de éstas, la muestra que contiene el analito debe someterse a condiciones que generen su inestabilidad química y aplicar el método a la muestra resultante.

Para métodos de límite de impurezas, proceder a analizar muestras individuales de la impureza, el producto y la mezcla de estos, como lo indica el método.

Para métodos indicadores de estabilidad, en caso de contar con los productos de degradación, se preparan muestras con placebo adicionado de éstos, el placebo o adicionado de analito, el placebo adicionado de analito y de productos de degradación y analizar con el método. Si no se cuentan con los posibles productos de degradación a través de condiciones específicas para favorecer la inestabilidad del analito en la muestra con el fin de degradar al analito a niveles de un 15 a 30 %.

En el caso de métodos no selectivos, como por ejemplo los métodos que utilizan sistemas de medición volumétricos, la especificidad para los componentes de una muestra, es sustentada con los resultados de exactitud y linealidad del método, si el método cumple con los criterios de aceptación.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se mide la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de las disoluciones de concentración que representan el 100 % de la muestra procesada para su medición o disoluciones a la concentración del analito que representen la concentración de la disolución de referencia utilizada.

Se calcula la desviación estándar S y el coeficiente de variación CV de la respuesta analítica.

Siendo los criterios de aceptación:

$CV \leq 1.5 \%$ para métodos físico químicos

$CV \leq 3 \%$ para métodos biológicos

PRECISIÓN DEL MÉTODO

En dos días diferentes y por dos analistas diferentes se analiza una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100 % utilizando de preferencia la misma sustancia de referencia así como los mismos instrumentos y/o equipos.

Se calcula: la media aritmética \bar{y} , la desviación estándar S y el coeficiente de variación CV del contenido/potencia/valoración, siendo los criterios de aceptación:

$CV \leq 2\%$ para métodos cromatográficos y volumétricos

$CV \leq 3 \%$ para métodos químicos y espectrofotométricos

$CV \leq 5 \%$ para métodos biológicos

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se mide la respuesta analítica, de las disoluciones de referencia, bajo las mismas condiciones a 5 niveles de concentración (intervalo) por triplicado, en donde la

concentración central represente el 100 % en la muestra procesada para su medición o igual a la que se prepara la disolución de referencia en el método y el intervalo debe incluir la especificación para el caso de métodos utilizados para contenido/potencia/valoración.

Se calcula el valor de la pendiente b_1 , la ordenada en el origen b_0 , el coeficiente de determinación r^2 , y el Intervalo de confianza para la pendiente IC β_1 obtenidos de la relación Concentración vs. Respuesta analítica. El intervalo debe incluir la especificación para el caso de aquellos métodos utilizados para contenido/potencia/valoración. El intervalo está en función del propósito del método, y por lo general se expresa en forma porcentual de la concentración de la disolución de referencia o en función del contenido del analito en la muestra procesada para su medición.

Para contenido / potencia / valoración, se sugiere un mínimo de $\pm 20\%$.

Para contenido / valoración de impurezas desde un nivel apropiado hasta un 20% por arriba de la especificación.

Para métodos indicadores de estabilidad, desde un nivel apropiado hasta un 120%. Es crítico, que el intervalo no excluya valores de concentración que potencialmente puedan dar lugar al contenido del analito en la muestra.

Los criterios de aceptación son:

$$r^2 \geq 0.98$$

IC (β) no debe incluir el cero.

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Si se conocen los componentes de la muestra, se prepara un placebo analítico, equivalente a una muestra analítica por triplicado, adicionándole la cantidad de analito o sustancia de referencia correspondiente al 100 % de éste en la muestra, determinando la cantidad recuperada del analito, si no se conocen los componentes de la muestra, se preparan muestras adicionadas a una concentración que depende del propósito del método y debe incluir la especificación.

Se determina la cantidad recuperada del analito, reportándose la relación: Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada, calculando el valor de la pendiente b_1 , la ordenada en el origen b_0 , el coeficiente de determinación r^2 , el intervalo de confianza para pendiente IC (β_1), el intervalo de confianza para la ordenada al origen IC (β_0) y el coeficiente de variación de la regresión $CV_{y/x}$.

Se calcula el porcentaje de recobro de cada placebo adicionado o muestra adicionada, el promedio aritmético \bar{y} , la desviación estándar S , el coeficiente de variación CV y el intervalo de confianza para la media poblacional IC(μ), del porcentaje de recobro.

Los criterios de aceptación para Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada son: $r^2 \geq 0.98$, el IC (β_1) debe incluir la unidad, IC (β_0) debe incluir el cero, el $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro

Los criterios de aceptación para porcentaje de recobro:

El IC (μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:

98 – 102 % si el método es Cromatográfico,

98 – 102 % si el método es volumétrico,

97 – 103 % si el método es químico o espectrofotométrico,

95 – 105 % si el método es microbiológico.

El CV del porcentaje de recobro:

No debe ser mayor de 2 % si el método es cromatográfico,

No mayor de 2% si el método es volumétrico,

No mayor de 3 % si es químico o espectrofotométrico,

No mayor del 5 % si es microbiológico.

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Se basa en el conocimiento de los componentes de la muestra. Si se conocen estos se prepara un placebo analítico equivalente a una muestra analítica por sextuplicado, adicionándole una cantidad de analito correspondiente al 100% de éste en la muestra. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones determinando la cantidad recuperada del analito.

Si no se conocen los componentes de la muestra, se preparan 6 muestras adicionadas del analito y analizadas por un mismo analista bajo las mismas condiciones, determinando la cantidad recuperada del analito. Se calcula el porcentaje de recobro de cada placebo analítico o muestra adicionada, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje. Así, como el promedio aritmético \bar{y} , la desviación estándar S , el coeficiente de variación CV y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro.

Siendo los criterios de aceptación:

El $IC(\mu)$ debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:

98 – 102 % si el método es cromatográfico

97 – 103 % si el método es químico espectrofotométrico,

95 – 105 % si el método es microbiológico

El coeficiente de variación del porcentaje de recobro: no debe ser mayor de 2 % si el método es cromatográfico o volumétrico, no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico, no mayor del 5 % si es microbiológico, no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

CAPÍTULO IV

IV.0 PARTE EXPERIMENTAL

IV.1 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

Material

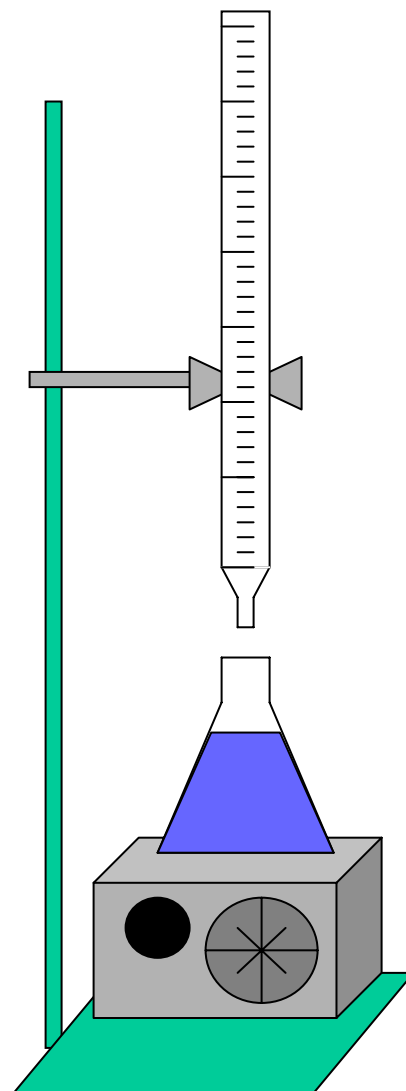
- Bureta de 50mL
- Matraces Erlenmeyer de 250mL
- Vasos de precipitados de 250mL y 500mL
- Mortero
- Matraces volumétricos de 100mL y 1 L
- Vidrios de reloj
- Pipetas de 10mL
- Soporte universal

Equipo

- Estufa
- Balanza
- Agitador magnético

Reactivos

- Azul de hidroxinaftol
- Ácido clorhídrico
- Sustancia de referencia secundaria de carbonato de calcio
- Agua destilada
- Hidróxido de sodio
- Hidróxido de amonio
- Cloruro de amonio
- Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético
- Muestra comercial a base de calcio



IV.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

◆ Disolución de Hidróxido de sodio 1M

Preparación: Disolver 4.0g de Hidróxido de sodio en agua y aforar a 100mL.

Pesada en balanza: 4.0520g de NaOH

◆ Disolución reguladora de amoniaco-cloruro de amonio de pH = 10

Preparación: Disolver 6.75g de cloruro de amonio en agua, agregar 57.0 mL de hidróxido de amonio y diluir con agua a 100mL.

Pesada en balanza: 6.7529g Cloruro de amonio

Volumen de Hidróxido de Amonio: 57mL

◆ Disolución de ácido clorhídrico al 10 %

Preparación: En un matraz con aproximadamente 10mL de agua, adicionar 10mL de Ácido clorhídrico y diluir con agua a 100mL.

◆ Disolución de ácido clorhídrico al 3M

Preparación: En un matraz con aproximadamente 10mL de agua, adicionar 25.5mL de Ácido clorhídrico y diluir con agua a 100mL.

◆ Disolución de la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético 0.1 M

Preparación: En un matraz volumétrico de 1000mL disolver 37.2g de Edetato disódico en agua y aforar a la marca.

Pesadas en balanza: 37.2293g

37.2214g

Se prepararon 2L de disolución de la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético.

Valoración de la disolución de la sal disódica del ácido etilendiaminotetracético 0.1 M

Pesar 200mg de carbonato de calcio, con una exactitud de 0.1mg, previamente secado en la estufa durante 2 horas a 80°C, pasar a un vaso de precipitados de 500mL, agregar 10mL de agua y agitar suavemente hasta formar una suspensión. Cubrir el vaso con un vidrio de reloj y adicionar 2mL de disolución de ácido clorhídrico al 10 % (hasta completa disolución del carbonato), lavar las paredes y diluir con agua hasta cerca de 100mL. Agitar la disolución con un agitador magnético y añadir 15mL de la disolución de EDTA contenido en una bureta. Agregar 15mL de la disolución de hidróxido de sodio o la cantidad necesaria para que la disolución tenga un pH = 11, y 5mL de disolución reguladora de Hidróxido de amonio-cloruro de amonio, y 300mg de indicador de azul de hidroxinaftol, continuar la titulación agregando la disolución de EDTA hasta aparición de color azul.

Calcular la molaridad con la fórmula: $P / (100.09 * V)$; en donde, P es el peso en mg de CaCO₃ tomados, V es el volumen, en mL, gastados de la disolución de Edetato disódico.

$$\text{Molaridad} = 200.7\text{mg} / (100.09 * 20.1\text{mL}) = 0.0996\text{M}$$

Peso CaCO ₃ (g)	Volumen gastado EDTA (mL)	Molaridad EDTA
0.2007	20.1	0.09976
0.2110	21.1	0.09991
0.2086	20.9	0.09972
0.2205	22.2	0.09924
0.2214	22.2	0.09964
0.2027	20.4	0.09927
		$\bar{y} = 0.0996\text{M}$

Tabla No.1 Peso de CaCO₃, volumen de EDTA gastado y Molaridad, al realizar la valoración de la disolución de EDTA.

IV.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Producto:

Tabletas masticables de carbonato de calcio

Lote: ae040511

Formulación:

Excipiente 1..... 2.1g

Excipiente 2..... 1.7g

H₂O..... 2.1g

Carbonato de calcio.....1.25g

Pesar 25 tabletas, calcular su peso promedio, triturar hasta polvo fino y homogenizar. Colocar este polvo en un recipiente herméticamente cerrado porque es hidroscópico y rotularlo adecuadamente.

Peso promedio tabletas (\bar{P})

Peso tabletas (g)				
7.2202	7.1647	7.0793	7.2543	7.1513
7.1963	7.1144	7.1753	7.0988	7.1261
7.0783	7.0869	7.1129	7.1427	7.0939
7.1925	7.1295	7.1528	7.0583	7.1145
7.2144	7.1705	7.1257	7.115	7.1505
$\bar{P} = 7.1408\text{g}$				

Tabla No.2 Peso promedio de las tabletas.

IV.4 MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO IONIZABLE

TÉCNICA

Pesar 1.0g de polvo, con exactitud de 0.1mg, transferir a un matraz erlenmeyer de 250mL, adicionar 100mL de agua, adicionar 6mL de ácido clorhídrico 3M, agitar durante 10 minutos, agregar 10mL de EDTA 0.0996M de una bureta, adicionar 30mL de hidróxido de sodio 1M, y 80mg del indicador azul de hidroxinaftol, seguir titulando con la disolución de EDTA 0.0996M hasta que el color cambie de rosa a azul.

Este método es aplicado a producto terminado, la respuesta analítica según su naturaleza esta en función de un método químico a través del consumo de un agente complejante (EDTA), cuantificando así la cantidad de calcio por tableta.

Calcular la cantidad, en miligramos de calcio, en la porción de muestra tomada, considerando que cada mililitro de la disolución valorada de edetato disódico 0.1M es equivalente a 4.008 mg de calcio.

Relacionar el valor obtenido con el peso promedio por tableta, calculado al principio de la valoración. Cada comprimido debe contener de 475.0-525.0mg de carbonato de calcio.

Ejemplo:

Datos

Peso muestra: 1.0000g

Volumen gastado EDTA: 18.2mL

Peso promedio: 7.1408g

Cálculos

Analizando:

1 mL EDTA 0.1M	————	4.008mg Ca ²⁺	
18.2mL	————	X	X = 72.9456mg Ca ²⁺
1000.0mg muestra	————	72.9456mg Ca ²⁺	
7140.8mg tableta	————	X	X = 520.89mg Ca ²⁺ /tableta
EDTA 0.1M	————	520.89mg Ca ²⁺ /tableta	
EDTA 0.0996M	————	X	X = 518.81mg Ca ²⁺ /tableta

En cálculos posteriores se aplicará la siguiente expresión, obtenida del análisis anterior:

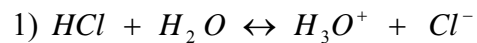
$$\frac{\text{mg de calcio}}{\text{tableta}} = \frac{\text{Volumen gastado EDTA (mL)} * 0.0996M * 40.08 * \text{Peso promedio de tabletas (mg)}}{\text{Peso de la muestra (mg)}}$$

Así, como la siguiente consideración:

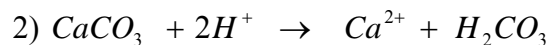
$$18.2\text{mL} \times 0.0996M \times 40.08 = 72.7\text{mg calcio en } 1\text{g de muestra}$$

REACCIÓN DE MÉTODO

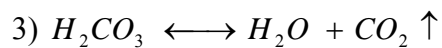
El ácido clorhídrico, es un ácido fuerte, y en medio acuoso no existe como tal; sino, como ion hidronio H_3O^+ o ion H^+ .



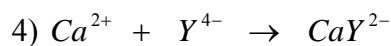
El carbonato de calcio es poco soluble en agua con un valor de $K_s = 9.3 \cdot 10^{-20}$, pero en medio ácido es completamente soluble, quedando disociado el ion de calcio:



En medio acuoso, el ácido carbónico, se descompone produciendo agua y dióxido de carbono en estado de gas, siendo la reacción reversible:



A pH de 11 el ión de calcio reacciona con el EDTA produciéndose el complejo edetato de calcio, altamente estable:



IV.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

IV.5.1 ESPECIFICIDAD

TÉCNICA

En la realización del método analítico se establece que las posibles sustancias interferentes en la muestra son el excipiente 1, el excipiente 2 y el agua.

Se evalúa la respuesta al método bajo las mismas condiciones de análisis de los excipientes, así como adicionando la sustancia de referencia de carbonato de calcio y la muestra al placebo.

Aunque se puede sustentar la especificidad con los resultados de exactitud y linealidad del método (si cumple con los criterios de aceptación) se analizaron los excipientes del producto, muestra del producto, sustancia de referencia de carbonato de calcio, una mezcla de la sustancia de referencia de carbonato de calcio-placebo y una mezcla del producto-placebo.

Placebo: mezcla del excipiente 1 + excipiente 2

Sustancia	Peso (g)
Excipiente 1	15.0001
Excipiente 2	12.0001

Tabla No. 3 Peso de los excipientes 1 y 2 en la preparación del placebo.

Se pesan 540.0mg del placebo, para la realización del método analítico de los placebos adicionados con la sustancia de referencia de carbonato de calcio y con la muestra.

Sustancia	Peso (mg)
Excipiente 1	300.0
Excipiente 2	240.0
H ₂ O	300.0
Tabletas de CaCO ₃ (muestra)	1233.9
Placebo + muestra	1000.0
Sustancia de referencia de carbonato de calcio	183.8
Placebo + sustancia de referencia de carbonato de calcio	196.5

Tabla No.4 Peso de los excipientes, sustancia de referencia de carbonato de calcio, sustancia de referencia de carbonato de calcio + placebo, muestra y muestra + placebo, para realizar el método analítico, al evaluar el parámetro de especificidad.

IV.5.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

TÉCNICA

Se preparan por pesadas independientes, un sextuplicado de soluciones de CaCO_3 , con la sustancia de referencia secundaria, a la concentración que representa el 100 % del analito en la muestra procesada para su medición.

Se mide la respuesta analítica a través del método de valoración, bajo las mismas condiciones.

Se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación de la respuesta analítica.

Considerando que 1250.0mg de la sustancia de referencia secundaria equivalen a 500.0mg Ca^{2+} , que representa una concentración del 100% en una tableta. Se pesa aproximadamente 175.0mg de la sustancia de referencia secundaria, equivalente a 70.0mg de calcio, que representa el 100% de la concentración de la muestra procesada para su medición.

Peso CaCO_3 (g)
0.1865
0.1865
0.1865
0.1865
0.1865
0.1865

Tabla No.5 Peso de la sustancia de referencia de carbonato de calcio para evaluar la precisión del sistema.

IV.5.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

TÉCNICA

Preparar por triplicado, 5 niveles de concentración de la disolución de referencia, por pesadas independientes, donde, el intervalo incluye la especificación y la concentración central que representa el 100% en la muestra procesada para su medición. Medir la respuesta analítica a través del método validado bajo las mismas condiciones de medición.

Reportar la relación Concentración vs. Respuesta analítica.

Trazar la gráfica correspondiente y calcular el valor de la pendiente, la ordenada en el origen, el coeficiente de determinación y el intervalo de confianza para la pendiente.

Concentración de la disolución de referencia de CaCO ₃ (%)	Peso de la sustancia de referencia de CaCO ₃ (g)
60	0.1119
60	0.1119
60	0.1119
80	0.1497
80	0.1496
80	0.1496
100	0.1865
100	0.1865
100	0.1864
120	0.2237
120	0.2235
120	0.2237
140	0.2608
140	0.2608
140	0.2608

Tabla No. 6 Peso de la sustancia de referencia de carbonato de calcio en cinco niveles de concentración al realizar el método analítico para evaluar la linealidad del sistema.

IV.5.4 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

TÉCNICA

A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica adicionar la sustancia de referencia secundaria correspondiente al 100 % de ésta en la muestra.

Preparar por sextuplicado placebos adicionados.

Determinar la cantidad recuperada del analito.

Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro.

Peso placebo (g)	Peso CaCO ₃ (g)	Cantidad adicionada del analito (mg calcio)	Volumen gastado EDTA (mL)
0.5400	0.1858	74.3	18.6
0.5400	0.1861	74.4	18.6
0.5400	0.1860	74.4	18.6
0.5400	0.1861	74.4	18.6
0.5400	0.1858	74.3	18.6
0.5400	0.1858	74.3	18.6

Tabla No. 7 Peso del placebo, peso de la sustancia de referencia, así como el equivalente a la cantidad de calcio adicionada en cada placebo adicionado y volumen de EDTA gastado en la realización del método analítico para evaluar la exactitud y repetibilidad del método.

IV.5.5 PRECISIÓN DEL MÉTODO

TÉCNICA

Analizar por triplicado, una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100 %, en dos días diferentes y por dos analistas diferentes.

Muestra: 540.0mg del placebo + sustancia de referencia de carbonato de calcio.

Calcular la media aritmética, la desviación estándar y coeficiente de variación.

DIA 1

Peso CaCO ₃ (g)	Volumen gastado EDTA (mL)
Analista 1	
0.1825	18.3
0.1838	18.4
0.2040	20.4
Analista 2	
0.2233	22.4
0.2070	20.8
0.2243	22.5

Tabla No. 8. Peso de la muestra analizada y volumen gastado de EDTA por los analistas en el día 1.

DIA 2

Peso muestra (g)	Volumen gastado EDTA (mL)
Analista 1	
0.2040	20.5
0.1973	19.8
0.2120	21.3
Analista 2	
0.1965	19.7
0.1966	19.7
0.2043	20.5

Tabla No. 9 Peso de la muestra analizada y volumen gastado de EDTA por los analistas en el día 2.

IV.5.6 LINEALIDAD DEL MÉTODO

TÉCNICA

A una cantidad de placebo, equivalente a una muestra analítica, adicionar la cantidad de analito (sustancia de referencia secundaria) correspondiente al 100 % de éste en la muestra.

Seleccionar 5 niveles de la cantidad de analito (intervalo). Preparar por triplicado, placebos adicionados de cada nivel de concentración, mantener constante la cantidad de placebo analítico.

Placebo adicionado: placebo (540.0mg) + sustancia de referencia de carbonato de calcio.

Determinar la cantidad recuperada del analito.

Cantidad adicionada de calcio (mg)	Peso de la sustancia de referencia de CaCO ₃ (g)	Volumen gastado de EDTA (mL)
39.9	0.0998	10.0
39.9	0.0998	10.0
39.9	0.0998	10.0
57.0	0.1426	14.3
57.0	0.1426	14.3
57.0	0.1425	14.3
74.3	0.1858	18.6
74.3	0.1858	18.6
74.3	0.1857	18.6
91.1	0.2278	22.8
91.1	0.2278	22.8
91.1	0.2278	22.8
102.5	0.2563	25.7
102.5	0.2563	25.7
102.5	0.2563	25.7

Tabla No. 10 Cantidad adicionada de calcio correspondiente a los cinco niveles, peso de la sustancia de referencia de carbonato de calcio analizada y volumen gastado de EDTA al evaluar la linealidad del método.

CAPÍTULO V

V.0 RESULTADOS

V.1 ESPECIFICIDAD

A continuación se presentan los resultados obtenidos para la especificidad:

Sustancia	Peso (mg)	Volumen gastado de EDTA (mL)
Excipiente 1	300.0	0.0
Excipiente 2	240.0	0.0
H ₂ O	300.0	0.0
Tabletas de CaCO ₃ (muestra)	1233.9	22.5
Placebo + muestra	1000.0	18.2
Sustancia de referencia de CaCO ₃	183.8	18.4
Placebo + sustancia de referencia de CaCO ₃	196.5	19.7

Tabla No. 11 Volumen de EDTA gastado por los excipientes y placebos adicionados.

Aunque se puede sustentar la especificidad con los resultados de exactitud y linealidad del método, se analizaron los excipientes del producto, muestra del producto, sustancia de referencia de carbonato de calcio, mezcla de la sustancia de referencia de carbonato de calcio con el placebo y una mezcla del producto con el placebo; y se encontró que la respuesta del método únicamente es debida al analito ya que se observa que los excipientes no consumen EDTA al realizar el método, por lo tanto, los excipientes no interfieren en la respuesta del analito.

El método cumple con el parámetro de especificidad al haber consumo de EDTA por la muestra del producto y no por los excipientes.

V.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

A continuación se presentan los resultados obtenidos para la precisión del sistema:

Volumen gastado EDTA (mL)
18.6
18.6
18.6
18.6
18.6
18.7

Tabla No. 12 Volumen gastado de EDTA por la sustancia de referencia de carbonato de calcio en respuesta al método analítico.

Calculo de la desviación estándar (S) y del coeficiente de variación (CV) de la respuesta analítica.

$$\sum y = 111.65$$

$$\sum y^2 = 2077.6225$$

$$n = 6$$

$$\bar{y} = 18.61$$

$$S = 0.0204$$

$$CV = 0.1097\%$$

La desviación estándar y el coeficiente de variación de la propiedad analítica medida, volumen gastado de EDTA (mL), de la disolución de referencia, en respuesta al método analítico, demuestran un comportamiento preciso en el sistema.

V.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

A continuación se presentan los resultados de linealidad del sistema:

Concentración de la disolución de referencia de CaCO ₃ (%)	Volumen gastado de EDTA (mL)
60	11.1
60	11.1
60	11.1
80	14.9
80	14.9
80	14.9
100	18.6
100	18.6
100	18.6
120	22.3
120	22.3
120	22.3
140	26.0
140	26.0
140	26.0
$\Sigma x = 1500$ $\Sigma x^2 = 162000$ $(\Sigma x)^2 = 2250000$	$\Sigma y = 278.70$ $\Sigma y^2 = 5593.41$ $(\Sigma y)^2 = 77673.69$

Tabla No. 13 Volumen gastado de EDTA con respecto a la concentración de la disolución de referencia de carbonato de calcio en respuesta al método analítico.

Calculo de la respuesta analítica de la linealidad del sistema: el valor de la pendiente (b_1), la ordenada en el origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$, con respecto a la relación Concentración vs. Respuesta analítica.

$$\sum xy = 30102$$

$$n = 15$$

$$b_1 = 0.186$$

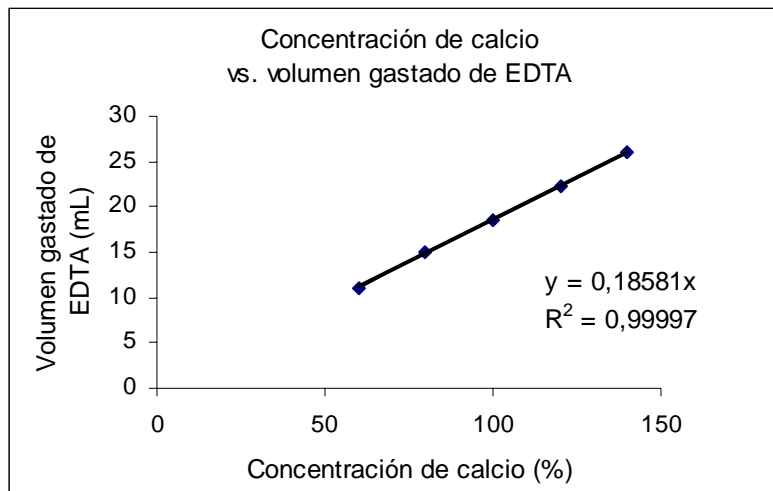
$$b_0 = -0.02$$

$$r^2 = 0.99$$

$$IC(\beta_1) = 0.1854, 0.1866$$

Concentración de la disolución de referencia de CaCO ₃ (%)	Volumen gastado de EDTA (mL)
60	11.1
80	14.9
100	18.6
120	22.3
140	26.0

Tabla No. 14 Datos del promedio de los resultados de la respuesta analítica de la linealidad del sistema representados en la gráfica No. 1



Gráfica No. 1 Concentración de calcio vs. Volumen gastado de EDTA de la respuesta analítica de la linealidad del sistema.

En la gráfica se observa que el r^2 es 0.9999 y que el sistema presenta un comportamiento lineal en respuesta al método analítico.

V.4 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

A continuación se presentan los resultados de exactitud y repetibilidad del método:

Cantidad adicionada del analito (mg calcio)	Cantidad recuperada del analito (mg calcio)	% Recobro (y)
74.3	74.3	100.0
74.4	74.3	99.9
74.4	74.3	99.9
74.4	74.3	99.9
74.3	74.3	100.0
74.3	74.3	100.0

Tabla No. 15 Datos de cantidad adicionada del analito, cantidad recuperada del analito y del % de recobro de calcio en respuesta al método analítico de la exactitud y repetibilidad del método.

Calculo de la media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC(μ) del porcentaje de recobro:

$$\sum y = 599.7$$

$$\sum y^2 = 59940.03$$

$$n = 6$$

$$\bar{y} = 99.95$$

$$S = 0.0548$$

$$CV = 0.0408\%$$

$$t_{0.975,5} = 2.571$$

$$IC(\mu) = 99.9, 100.0$$

Se observa un coeficiente de variación de porcentaje de recobro de 0.0408% para el método y un IC (μ) entre 99.9 y 100.0 que incluye al 100%, por lo tanto, el método cumple con los parámetros de exactitud y repetibilidad.

V.5 PRECISIÓN DEL MÉTODO

A continuación se presentan los resultados de precisión del método:

		ANALISTA	
		Cantidad recuperada del analito (mg de calcio)	
		1	2
DIA	1	73.1	89.4
		73.5	83.0
		81.8	89.8
	2	81.8	78.6
		79.0	78.6
		85.0	81.8

Tabla No. 16 Datos de cantidad de calcio correspondiente al placebo adicionado con la sustancia de referencia de carbonato de calcio, obtenidos en respuesta al método analítico, por dos analistas diferentes en dos días diferentes.

Día 1. Analista 1.

1) Peso muestra: 0.1825g

Volumen gastado EDTA: 18.3mL

Molaridad de EDTA: 0.0996M

Cantidad recuperada del analito = $18.3 \times 40.08 \times 0.0996M = 73.1\text{mg}$ de calcio

Si se considera que: 500.0mg de calcio hay en 1250.0mg de la sustancia de referencia de carbonato de calcio, entonces, en 182.5mg de placebo adicionado con la sustancia de referencia de carbonato de calcio hay 73.0mg de calcio.

Se realiza la misma consideración, para obtener la cantidad adicionada del analito, por los analistas en dos días diferentes y se obtienen los siguientes resultados:

		ANALISTA	
		Cantidad adicionada del analito (mg de calcio)	
		1	2
DIA	1	73.0	89.3
		73.5	82.8
		81.6	89.7
	2	81.6	78.6
		78.9	78.6
		84.8	81.7

Tabla No. 17 Datos de la cantidad de calcio adicionado al placebo con la sustancia de referencia de carbonato de calcio, al medir la respuesta al método analítico, por dos analistas diferentes en dos días diferentes.

Si se considera que: 73.1mg de calcio hay en 182.5mg de la sustancia de referencia de carbonato de calcio, entonces, en 175.0mg de la sustancia de referencia de carbonato de calcio hay 70.1mg de calcio, que corresponden al 100% de la muestra.

Se realiza la misma consideración, para los resultados obtenidos de cantidad recuperada del analito, por los analistas en dos días diferentes y se obtienen los siguientes resultados:

		ANALISTA	
		Cantidad recuperada del analito correspondiente al 100 % de la muestra (mg de calcio)	
		1	2
DIA	1	70.1	70.1
		70.0	70.2
		70.2	70.1
	2	70.2	70.0
		70.1	70.0
		70.2	70.1

Tabla No. 18 Datos de cantidad de calcio recuperado, al medir la respuesta del método analítico, por dos analistas diferentes en dos días diferentes, correspondientes al 100% de la muestra.

Calculo de la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) de la respuesta analítica:

$$\begin{aligned}\Sigma y &= 70.1 + 70.0 + 70.2 + \dots + 70.1 = 841.3 \\ \Sigma y^2 &= 70.1^2 + 70.0^2 + 70.2^2 + \dots + 70.1^2 = 58982.21 \\ n &= 12 \\ \bar{y} &= \Sigma y/n = 70.11 \text{mg Calcio} \\ S &= \sqrt{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2 / n(n-1)} = 0.0793 \\ CV &= S/\bar{y} * 100 = 0.1131 \%\end{aligned}$$

Se observa que el CV es de 0.1131 %, por lo tanto, el método cumple el parámetro de precisión.

A continuación se presentan los datos de % de recobro de la precisión del método, para calcular el grado de tolerancia del método a las fuentes de variación entre analistas (reproducibilidad interanalistas), entre días (reproducibilidad interdías) y la variabilidad del método analítico (repetibilidad).

		ANALISTA	
		% Recobro	
		1	2
DIA	1	100.1	100.1
		100.0	100.2
		100.2	100.1
	2	100.2	100.1
		100.1	100.0
		100.2	100.1

Tabla No. 19 Datos de porcentaje de recobro de calcio en las muestras del placebo adicionado, obtenidos en respuesta al método analítico, por dos analistas diferentes en dos días diferentes.

Análisis de la variación

Factor de variación (FV)	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Suma de cuadrado medio(MC)	F calculada	F teórica
Analistas (A)	1	0.007533	0.007533	1.510	5.32
Días (D)	1	0.000867	0.000867	0.174	5.32
AD	1	0.0209	0.0209	4.190	5.32
Error	8	0.0399	0.0049875		
Total	11	0.0692	0.00629091		

Tabla No. 20 Datos de análisis de la variación (ANDEVA).

Tanto para la interacción entre analistas, entre días y entre día-analista, la $F_{calculada} < F_{teórica}$, por lo tanto, se observa que no hay diferencia estadísticamente significativa

V.6 LINEALIDAD DEL MÉTODO

A continuación se presentan los resultados de linealidad del método:

Cantidad adicionada (mg de calcio) + placebos (X)	Cantidad recuperada (mg de calcio) (Y)
39.9	39.9
39.9	39.9
39.9	39.9
57.0	57.1
57.0	57.1
57.0	57.1
74.3	74.3
74.3	74.3
74.3	74.3
91.1	91.0
91.1	91.0
91.1	91.0
102.5	102.6
102.5	102.6
102.5	102.6

Tabla No. 21 Datos correspondientes a los cinco niveles de cantidad adicionada de calcio a placebos y de la cantidad recuperada de calcio en respuesta al método analítico:

Calculo de el valor de la pendiente (b_1), la ordenada en el origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$, el intervalo de confianza para la ordenada al origen $IC(\beta_0)$ y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$) según la relación Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada:

$$\sum x = 1094.4$$

$$\sum x^2 = 87500.88$$

$$\bar{x} = 72.96$$

$$\sum y = 1094.7$$

$$\sum y^2 = 87542.01$$

$$\bar{y} = 72.98$$

$$\sum_{n=15} xy = 87521.4$$

$$n = 15$$

$$b_1 = 0.9998$$

$$b_0 = 0.0330$$

$$r^2 = 0.9999$$

Método de estimación por mínimos cuadrados

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$S_{y/x} = \sqrt{87542.01 - 0.9998 \times 87521.4 - (0.0330) \times 1094.7 / 15 - 2}$$

$$S_{y/x} = 0.080266572$$

$$Sb_1 = 0.080266572 \sqrt{\frac{1}{87500.88 - \frac{(1094.4)^2}{15}}}$$

$$Sb_1 = 0.0009174996786$$

$$t_{0.975,13} = 2.160$$

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} Sb_1 = 0.9998 \pm 2.160 \times 0.0009174996786$$

$$IC(\beta_1) = 0.9978, 1.0018$$

El intervalo incluye la unidad.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$Sb_0 = 0.080266572 \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{(72.96)^2}{87500.88 - \frac{(1094.4)^2}{15}}}$$

$$Sb_0 = 0.873035263$$

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} Sb_0 = 0.0330 \pm 2.160 \times 0.873035263$$

$$IC(\beta_0) = -1.8528, 1.9188$$

El intervalo incluye el cero.

Coefficiente de variación de regresión

$$CV_{y/x} = \frac{0.080266572}{72.98} \times 100$$

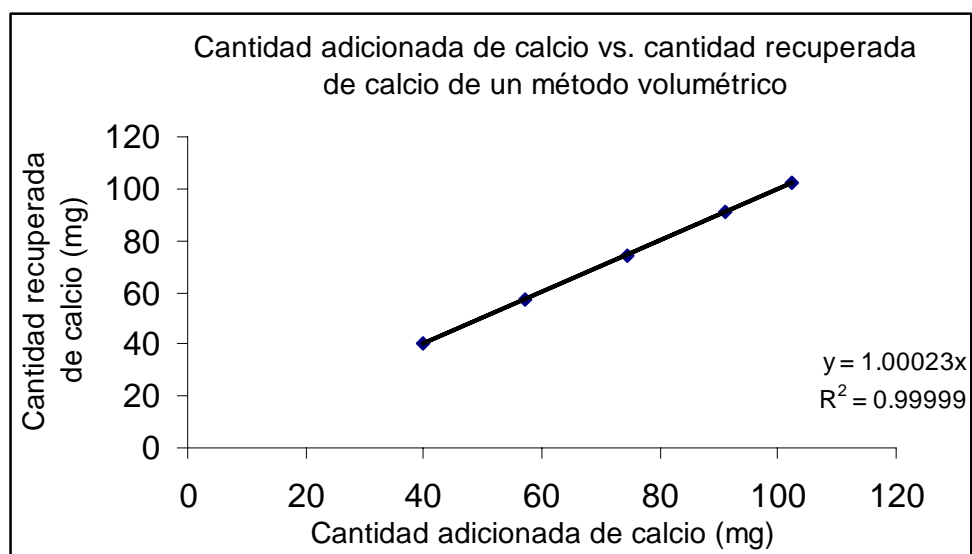
$$CV_{y/x} = 0.10998 \%$$

Se observa un coeficiente de variación de 0.11 %, que no excede el 2%.

Regresión lineal:

Cantidad adicionada (mg de calcio) + placebos (X)	Cantidad recuperada (mg de calcio) (Y)
39.9	39.9
57.0	57.1
74.3	74.3
91.1	91.0
102.5	102.6

Tabla No. 22 Datos del promedio de los resultados de la respuesta analítica de la linealidad del método representados en la gráfica No. 2



Gráfica No. 2 Cantidad adicionada de calcio vs. Cantidad recuperada de calcio de la respuesta analítica de la linealidad del método.

En la gráfica se presenta un comportamiento lineal en respuesta al método analítico y se observa un coeficiente de correlación de 0.9998.

V.7 PORCENTAJE DE RECOBRO

Cantidad adicionada (mg de Calcio) + placebos	Cantidad recuperada (mg de Calcio)	% recobro (y)
39.9	39.9	100.0
39.9	39.9	100.0
39.9	39.9	100.0
57.0	57.1	100.2
57.0	57.1	100.2
57.0	57.1	100.2
74.3	74.3	100.0
74.3	74.3	100.0
74.3	74.3	100.0
91.1	91.0	99.9
91.1	91.0	99.9
91.1	91.0	99.9
102.5	102.6	100.1
102.5	102.6	100.1
102.5	102.6	100.1

Tabla No. 23 Datos de la cantidad adicionada, cantidad recuperada y el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada de calcio en respuesta a la linealidad del método.

$$\bar{y} = 100.04$$

$$n = 15$$

$$\sum y = 1500.6$$

$$\sum y^2 = 150120.18$$

$$S = 0.1056$$

$$CV = 0.1055 \%$$

Se observa que el coeficiente de variación no excede el 2%.

$$t_{0.975, n-1} = t_{0.975, 14} = 2.145$$

$$IC(\mu) = 100.04 \pm 2.145 \times \frac{0.1056}{\sqrt{15}}$$

$$IC(\mu) = 99.98, 100.10$$

El intervalo no incluye el valor de 100.

CAPÍTULO VI

VI.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS

ESPECIFICIDAD

Se observa que no hay consumo de volumen de disolución de EDTA al realizar el método con los excipientes del producto individualmente, sin embargo, las muestras del producto y la mezcla del producto con los excipientes si consumen disolución de EDTA debido al calcio presente en el producto, por lo tanto, los excipientes no interfieren en la respuesta del analito.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se encuentra que los resultados individuales de la respuesta analítica de volumen consumido de EDTA con respecto a la concentración del analito, obtenidos al realizar el método presentan un grado de concordancia entre ellos, denotando precisión en el sistema al obtener un CV de 0.1097%.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se observa que hay proporcionalidad entre la concentración del analito de interés y el volumen gastado de disolución de EDTA al obtener un coeficiente de correlación de 0.99 y un $IC(\beta_1)$ de 0.1854, 0.1866. Por lo tanto el sistema presenta un comportamiento lineal dentro del intervalo de concentración establecido.

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Utilizando el mismo sistema se observa que el método es exacto y repetible al presentar concordancia en la respuesta analítica de la sustancia de referencia obtenida en las determinaciones independientes de placebos adicionados al obtener los resultados: CV de 0.0408% y el $IC(\mu)$ de 99.9, 100.0 del porcentaje de recobro.

PRECISIÓN DEL MÉTODO

Se observa que la respuesta del método analítico presenta un CV de 0.1131%, cumpliendo con la precisión del método. Y que hay concordancia entre las determinaciones independientes realizadas en el laboratorio por analistas diferentes en distintos días como se observa al utilizar el modelo estadístico de análisis de la varianza y analizar el efecto del analista y del día que no hay diferencia estadísticamente significativa, ya que la F calculada es menor que la F teórica entre los analistas, entre días y entre la interacción analista-día.

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Al analizar los placebos adicionados con la sustancia de referencia dentro de los niveles establecidos se observa que la respuesta del método entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada presenta un comportamiento lineal al haber proporcionalidad entre la respuesta y la concentración del analito.

CAPÍTULO VII

VII.0 CONCLUSIONES

El método analítico es capaz de obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra. Los excipientes no interfieren en la respuesta del analito, por lo tanto, el método cumple con el parámetro de especificidad, para la tableta masticable de carbonato de calcio.

La respuesta analítica del sistema presenta un comportamiento lineal al presentar un $r^2 \geq 0.98$ y el IC(β_1) no incluye el cero.

El sistema es preciso al presentar un $CV \leq 1.5\%$.

El método volumétrico para determinar calcio en tabletas masticables de carbonato de calcio, cumple con los parámetros de exactitud y repetibilidad ya que el coeficiente del porcentaje de recobro es no mayor de 3% para el método que es volumétrico, así como, el IC (μ) incluye al 100% y se encuentra dentro del intervalo del 97-103%.

El método analítico volumétrico cumple con la precisión del método al presentar un $CV \leq 3\%$. Además, el método analítico cumple con el parámetro de repetibilidad y de precisión intermedia o tolerancia al no presentarse diferencia estadísticamente significativa entre los resultados del análisis de la varianza, es decir, el método no presenta efectos por analista, por día, ni por la interacción analista-día, cumpliendo con la reproducibilidad interanalistas, interdías y la variabilidad del método analítico.

El método analítico presenta un comportamiento lineal que cumple con los criterios de aceptación de $r^2 \geq 0.98$ de Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada, el IC(β_1) incluye la unidad, el IC(β_0) incluye al cero, el $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro es no mayor de 3%. El IC (μ) del porcentaje de recobro se encuentra entre el intervalo de 97-103% y el CV del porcentaje de recobro es no mayor de 3%.

El método analítico es capaz de determinar calcio en tabletas masticables de carbonato de calcio, demostrando ser confiable al cumplir con los parámetros de validación establecidos.

El método de validación volumétrico para determinar calcio en tabletas masticables de carbonato de calcio es: específico, preciso, lineal, exacto y repetible, además es rápido, reproducible y satisface los requerimientos para los cuales fue desarrollado.

CAPÍTULO VIII

VIII.0 BIBLIOGRAFÍA

Skoog A. Douglas, West M. Donald. Química analítica. McGraw-Hill. 4ª Edición, 1989. Pág. 246-264.

Remington, Gennaro Alfonso. Farmacia. Tomo 1. Editorial Médica Panamericana. 20ª Edición, 2000. Pág. 420c, 421, 2154c, 2067c, 669c, 666, 1266, 585c, 1434.

Remington. Farmacia. Tomo 2. Editorial Médica Panamericana. 20ª Edición, 2000. Pág. 1493.

Rohjan C. A, Giral Francisco. Productos Químicos y farmacéuticos. Volumen I, volumen II y volumen III. Editorial Atlante. 1ª Edición, 1946. Pág. 79, 80, 84-89, 330-331, 532, 533, 1977-1980.

Ángel M. Gilberto, Ángel R. Mauricio. Interpretación clínica del laboratorio. Editorial Médica Panamericana. 5ª Edición, 1996. Pág. 119-120.

Guerci A. Aldo. Laboratorio. Métodos de análisis clínicos y su interpretación. El Ateneo. 4ª Edición, 1988. Pág. 32-33, 215-218, 260-261.

Bennington, James Lynne. Diccionario enciclopédico del Laboratorio Clínico. Editorial Médica Panamericana. Pág. 198-201.

Hawley, Gessner Goodrich. Diccionario de Química y Productos Químicos. Ediciones Omega. Nueva Edición. 1993. Pág. 186.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 5ª. Edición, 1988. Pág. 264, 268, 275, 281.

Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Métodos analíticos. Guía de validación. Edición 2002.

McVan Bárbara F. Índice de medicamentos. Editorial el Manual Moderno. 5ta Edición, 1995. Pág. 231-240.

The Merck Index. Merck & Co., Inc. 9ª Edición. 1976. Pág. 1626.

Miale, John B. Hematología. Medicina de laboratorio. Editorial Reverté. 6ª Edición, 1985
Pág. 396-398.

Vadecum Farmacéutico IPE. Rezza Editores. 6ª Edición, 1997. Pág. 393-401.

Cotton, Wilkinson. Química Inorgánica. Básica Limusa Noriega Editores. 8ª Reimpresión.
Pág. 143-182, 151, 257,260.

Direcciones electrónicas:

<http://dsrscope.com/privados/pac/generales/desequilibrio/calcio.htm>

http://www.itcomitan.edu.mx/tutoriales/estadistica/contenido/unidad_2_7.html

<http://www.salud.gob.mx/>

APÉNDICE

IX.1 ESTÁNDARES Y REACTIVOS

Carbonato de Calcio

Proveedor	Lote	Pureza	Caducidad
J.T. Baker	ES-C36347	99.99%	Ago-2010

EDTA

Proveedor	Lote	Pureza	Caducidad
J.T. Baker	39891	99.8%	No disponible

Hidróxido de Sodio

Proveedor	Lote	Pureza	Caducidad
J.T. Baker	3722-01	98.8%	No disponible

Hidróxido de amonio

Proveedor	Lote	Pureza	Caducidad
J.T. Baker	3821-03	28-30%	No disponible

Cloruro de amonio

Proveedor	Lote	Pureza	Caducidad
J.T. Baker	J51457	99.8%	No disponible

Azul de hidroxinaftol

Proveedor	Lote	Pureza	Caducidad
Goleen Bell	0110629	No disponible	08/Ago/2008

Ácido clorhídrico

Proveedor	Lote	Pureza	Caducidad
Tecsiquim	CLO-01-TL	36.5-38.0%	Ago/2010

IX.2 FÓRMULAS

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Media aritmética

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{S}{y} * 100$$

n = número de mediciones

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$t_{0.975, n-1}$ Referirse a la tabla para determinar el valor de la t de Student

$n = \text{número de recobros}$

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = número de mediciones (cantidad adicionada – cantidad recuperada)

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

$t_{0.975, n-1}$ Referirse a la tabla para determinar el valor de la t de Student

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Coefficiente de variación de regresión

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} * 100$$

PORCENTAJE DE RECOBRO

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0,975,n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$t_{0,975,n-1}$ Referirse a la tabla para determinar el valor de la t de Student

$n = \text{número de recobros}$

IX.3 TABLA ESTADÍSTICA DE LA DISTRIBUCIÓN t DE STUDENT

GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0.975}$	GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0.975}$	GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0.975}$
1	12.706	26	2.056	51	2.008
2	4.303	27	2.052	52	2.007
3	3.182	28	2.048	53	2.006
4	2.776	29	2.045	54	2.005
5	2.571	30	2.042	55	2.004
6	2.447	31	2.040	56	2.003
7	2.365	32	2.037	57	2.002
8	2.306	33	2.035	58	2.002
9	2.262	34	2.032	59	2.001
10	2.228	35	2.030	60	2.000
11	2.201	36	2.028	61	2.000
12	2.179	37	2.026	62	1.999
13	2.160	38	2.024	63	1.998
14	2.145	39	2.023	64	1.998
15	2.131	40	2.021	65	1.997
16	2.120	41	2.020	66	1.997
17	2.110	42	2.018	67	1.996
18	2.101	43	2.017	68	1.995
19	2.093	44	2.015	69	1.995
20	2.086	45	2.014	70	1.994
21	2.080	46	2.013	71	1.994
22	2.074	47	2.012	72	1.993
23	2.069	48	2.011	73	1.993
24	2.064	49	2.010	74	1.993
25	2.060	50	2.009	75	1.992

IX.4 Análisis de varianza

Los resultados obtenidos en la tabla No. 19 se consideran de acuerdo a la siguiente tabla:

		ANALISTA (A)	
		(A1) 1	(A2) 2
DIA (D)	(D1) 1	X ₁ X ₂ X ₃	X ₄ X ₅ X ₆
	(D2) 2	X ₇ X ₈ X ₉	X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂

Donde:

X_n = observaciones

N = número total de observaciones

y = número de observaciones

A = analista

A1 = analista 1

A2 = analista 2

D = día

D1 = día 1

D2 = día 2

F_c = factor de corrección

SC = suma de cuadrados

SCM = suma de cuadrados medio

gl = grados de libertad

FV = fuente de variación

Se considera F de tablas de la distribución F de Fisher: F_{0.05,gl_n,gl_d}

F_{0.05,1,8} = 5.32

Fórmula del factor de corrección

$$F_c = (\sum X_n)^2 / N$$

Fuente de variación: A

$$\sum A1 = X_1 + X_2 + X_3 + X_7 + X_8 + X_9$$

$$\sum A2 = X_4 + X_5 + X_6 + X_{10} + X_{11} + X_{12}$$

Fuente de variación: D

$$\sum D1 = X_1 + X_2 + X_3 + X_4 + X_5 + X_6$$

$$\sum D2 = X_7 + X_8 + X_9 + X_{10} + X_{11} + X_{12}$$

Fuente de variación: AD

$$\begin{aligned} \sum AD &= (\sum A1D1 + \sum A2D2)^2 / y + (\sum A2D1 + \sum A1D1)^2 / y \\ &= (X_1 + X_2 + X_3 + X_{10} + X_{11} + X_{12})^2 / y + (X_4 + X_5 + X_6 + X_7 + X_8 + X_9)^2 / y \end{aligned}$$

Suma de cuadrados de todas las observaciones: SC_N

$$SC_N = (\sum X_n)^2 = X_1 + X_2 + X_3 + X_7 + X_8 + X_9 + X_4 + X_5 + X_6 + X_{10} + X_{11} + X_{12}$$

Se realiza el análisis de varianza (ANDEVA) como se indica en la siguiente tabla:

FV	gl	SC	SCM	Fcalculada
A	1	$(\sum A1)^2 / y + (\sum A2)^2 / y - F_c$	SC_A / gl	SCM_A / SCM_{Error}
D	1	$(\sum D1)^2 / y + (\sum D2)^2 / y - F_c$	SC_D / gl	SCM_D / SCM_{Error}
AD	1	$\sum AD - F_c$	SC_{AD} / gl	SCM_{AD} / SCM_{Error}
TOTAL	11	$SC_N - F_c$	SC_{Total} / gl	
ERROR	8	$SC_N - SC_A - SC_D - SC_{AD} - F_c$	SC_{Error} / gl	

IX.5 Tabla estadística de la distribución F de Fisher

$F_{0.05, gln, gld}$

$F_{0.05, gln, gld}$														
gln gld	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	60	100	10000
1	161.446	199.499	215.707	224.583	230.16	233.988	236.767	238.884	240.543	241.882	248.016	252.196	253.043	254.302
2	18.5128	19	19.1642	19.2467	19.2963	19.3295	19.3531	19.3709	19.3847	19.3959	19.4457	19.4791	19.4857	19.4957
3	10.128	9.55208	9.27662	9.11717	9.01343	8.94067	8.88673	8.84523	8.81232	8.78549	8.66021	8.57199	8.55391	8.52674
4	7.70865	6.94428	6.59139	6.38823	6.25607	6.16313	6.09421	6.04103	5.9988	5.96435	5.80255	5.68775	5.66405	5.62844
5	6.60788	5.78615	5.40945	5.19216	5.05034	4.95029	4.87586	4.81833	4.77246	4.73506	4.55813	4.43137	4.40508	4.36540
6	5.98737	5.14325	4.75706	4.53369	4.38737	4.28386	4.20667	4.14681	4.09901	4.05996	3.87419	3.7398	3.71175	3.6693
7	5.59146	4.73742	4.34683	4.12031	3.97152	3.86598	3.78705	3.72572	3.67667	3.63653	3.44453	3.30432	3.27489	3.23021
8	5.31764	4.45897	4.06618	3.83785	3.6875	3.58058	3.50046	3.4381	3.38812	3.34717	3.15032	3.0053	2.97467	2.92805
9	5.11736	4.25649	3.86254	3.63309	3.48166	3.37376	3.29274	3.22959	3.1789	3.13727	2.93646	2.78725	2.75556	2.70717
10	4.96459	4.10282	3.70827	3.47805	3.32584	3.21718	3.13547	3.07166	3.02038	2.97824	2.77402	2.62108	2.58841	2.53839
11	4.84434	3.98231	3.58743	3.35669	3.20388	3.09461	3.01233	2.94798	2.89622	2.85362	2.64644	2.49013	2.45655	2.4050
12	4.74722	3.88529	3.4903	3.25916	3.10587	2.99612	2.91335	2.84857	2.79638	2.75339	2.54359	2.38417	2.34975	2.29674
13	4.66719	3.80557	3.41053	3.17912	3.02543	2.91527	2.8321	2.76691	2.71436	2.67102	2.45888	2.29659	2.26139	2.20700
14	4.60011	3.73889	3.34389	3.11225	2.95825	2.84773	2.7642	2.69867	2.64579	2.60216	2.38789	2.22295	2.18699	2.13127
15	4.54307	3.68232	3.28738	3.05557	2.9013	2.79046	2.70663	2.6408	2.58763	2.54371	2.32753	2.16011	2.12343	2.06644
16	4.494	3.63372	3.23887	3.00692	2.85241	2.74131	2.6572	2.59109	2.53767	2.49351	2.27557	2.10581	2.06845	2.01024
17	4.45132	3.59154	3.19677	2.96471	2.81	2.69866	2.6143	2.54796	2.49429	2.44992	2.23035	2.05841	2.0204	1.96101
18	4.41386	3.55456	3.15991	2.92775	2.77285	2.6613	2.57672	2.51016	2.45628	2.4117	2.19065	2.01664	1.97801	1.91747
19	4.38075	3.52189	3.12735	2.89511	2.74006	2.62832	2.54354	2.47677	2.4227	2.37793	2.1555	1.97954	1.94031	1.87867
20	4.35125	3.49283	3.09839	2.86608	2.71089	2.59898	2.51401	2.44707	2.39282	2.34787	2.12415	1.94636	1.90655	1.84384
21	4.32479	3.46679	3.07247	2.8401	2.68478	2.57271	2.48758	2.42046	2.36605	2.32095	2.09603	1.91649	1.87613	1.81237
22	4.30094	3.44336	3.04912	2.81671	2.66127	2.54906	2.46377	2.3965	2.34193	2.29669	2.07066	1.88945	1.84856	1.78379
23	4.27934	3.42213	3.028	2.79554	2.64	2.52766	2.44223	2.37481	2.32011	2.27472	2.04764	1.86484	1.82344	1.75769

		F_{0.05, gln, gld} (Continuación)												
gln gld	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	60	100	10000
24	4.25968	3.40283	3.00879	2.77629	2.62065	2.50819	2.42263	2.35508	2.30024	2.25474	2.02666	1.84236	1.80047	1.73376
25	4.2417	3.3852	2.99124	2.75871	2.60299	2.49041	2.40473	2.33706	2.2821	2.23648	2.00747	1.82172	1.77936	1.71171
26	4.2252	3.36901	2.97516	2.7426	2.58679	2.47411	2.38831	2.32053	2.26545	2.21972	1.98984	1.80272	1.75989	1.69133
27	4.21001	3.35413	2.96035	2.72777	2.57189	2.45911	2.37321	2.30531	2.25013	2.2043	1.97359	1.78515	1.74187	1.67242
28	4.19598	3.34039	2.94668	2.71407	2.55812	2.44526	2.35926	2.29127	2.23598	2.19004	1.95856	1.76886	1.72514	1.65483
29	4.18297	3.32766	2.93403	2.7014	2.54538	2.43244	2.34634	2.27825	2.22288	2.17685	1.94462	1.7537	1.70957	1.6384
30	4.17089	3.31583	2.92228	2.68963	2.53355	2.42052	2.33435	2.26616	2.2107	2.16458	1.93165	1.73957	1.69504	1.62304
40	4.08474	3.23173	2.83875	2.60597	2.44947	2.33585	2.24902	2.18017	2.12403	2.07725	1.83886	1.63725	1.58922	1.50977
50	4.03432	3.18261	2.79001	2.55718	2.40041	2.28643	2.1992	2.12992	2.07335	2.02614	1.78412	1.57565	1.52491	1.43921
60	4.00119	3.15041	2.75808	2.52521	2.36827	2.25405	2.16654	2.09697	2.0401	1.99259	1.74798	1.53431	1.48139	1.3903
70	3.97779	3.12768	2.73554	2.50266	2.34559	2.23119	2.14348	2.07369	2.0166	1.96887	1.72232	1.50457	1.44984	1.35404
80	3.96035	3.11077	2.71879	2.48588	2.32872	2.21419	2.12632	2.05637	1.99912	1.95122	1.70316	1.48211	1.42586	1.32585
90	3.94687	3.0977	2.70584	2.47293	2.31569	2.20106	2.11307	2.04299	1.98559	1.93756	1.6883	1.46453	1.40699	1.3032
100	3.93615	3.08729	2.69554	2.46261	2.30532	2.1906	2.10251	2.03233	1.97483	1.92669	1.67643	1.45038	1.39172	1.2845
200	3.88837	3.04105	2.64976	2.4168	2.25923	2.14413	2.05559	1.98492	1.92692	1.87828	1.62331	1.38558	1.32064	1.19026
300	3.87264	3.02585	2.6347	2.40174	2.24409	2.12885	2.04016	1.96932	1.91115	1.86233	1.60568	1.36344	1.29578	1.15208
400	3.86481	3.01829	2.62722	2.39425	2.23655	2.12125	2.03248	1.96156	1.9033	1.85439	1.59688	1.35225	1.28306	1.13032
500	3.86012	3.01375	2.62273	2.38977	2.23204	2.1167	2.02788	1.95691	1.8986	1.84964	1.5916	1.34548	1.27532	1.11591
600	3.857	3.01074	2.61976	2.38678	2.22904	2.11367	2.02483	1.95382	1.89547	1.84647	1.58809	1.34095	1.27011	1.1055
700	3.85478	3.00859	2.61763	2.38465	2.2269	2.11151	2.02265	1.95161	1.89324	1.84421	1.58558	1.3377	1.26637	1.09755
800	3.8531	3.00697	2.61603	2.38306	2.2253	2.10989	2.02101	1.94996	1.89157	1.84252	1.58369	1.33526	1.26355	1.09124
900	3.85181	3.00572	2.6148	2.38182	2.22405	2.10864	2.01974	1.94867	1.89027	1.84121	1.58223	1.33336	1.26134	1.08608
1000	3.85077	3.00473	2.6138	2.38083	2.22305	2.10763	2.01872	1.94765	1.88923	1.84015	1.58106	1.33184	1.25957	1.08176
1500	3.84767	3.00172	2.61083	2.37786	2.22006	2.10461	2.01567	1.94456	1.88611	1.837	1.57754	1.32725	1.25424	1.06749
2000	3.84611	3.00022	2.60935	2.37637	2.21857	2.10311	2.01415	1.94303	1.88455	1.83542	1.57579	1.32496	1.25155	1.05931
10000	3.84239	2.99663	2.60579	2.37282	2.215	2.0995	2.0105	1.93933	1.88082	1.83165	1.57157	1.31942	1.24506	1.03345