



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA VALIDACIÓN DE 2
TÉCNICAS INSTRUMENTALES – CROMATOGRAFÍA
DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA Y
ESPECTROSCOPIA UV-VIS – PARA EL ANÁLISIS
CUANTITATIVO DE CEFALEXINA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

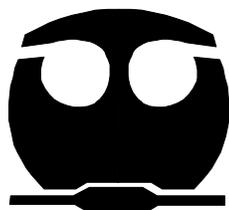
ODEMARIS MARTÍNEZ GONZÁLEZ

ASESOR:

Q. ADOLFO GARCÍA OSUNA

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. SILVIA MENDOZA ARELLANO



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. ADOLFO GARCÍA OSUNA
Vocal	Profa. ELBA ROJAS ESCUDERO
Secretario	Prof. RICARDO RODRÍGUEZ SAENZ
1er. Suplente	Prof. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ CALLEJAS
2do. Suplente	Prof. RAÚL LUGO VILLEGAS

Sitio en donde se desarrolló el tema	Departamento de Química Analítica Edificio "A" Laboratorio 3 B y 3F Facultad de Química Ciudad Universitaria
--------------------------------------	---

Asesor del tema	Q. Adolfo García Osuna
-----------------	------------------------

Supervisor Técnico	Q.F.B. Silvia Mendoza Arellano
--------------------	--------------------------------

Sustentante	Odemaris Martínez González
-------------	----------------------------

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por apoyarme en todo lo emprendido durante mis estudios, por haber hecho de mi una profesionista a base de su esfuerzo constante y por estar cuando más los he necesitado; a mi flakis por estar conmigo todo este tiempo, por apoyarme, motivarme, comprenderme, soportarme y quererme; a mis hermanos Armando y Alan que han soportado mis interrupciones a sus labores por apoyarme; y a mi hermana Ariadna por ser la mejor amiga que he tenido y tendré en la vida.

Agradezco al profesor Adolfo García Osuna por haberme otorgado ese conocimiento que hoy en día es la base de mi vida diaria, por la convivencia, consejos y paciencia que me ha tenido, muchas gracias; a su esposa Silvia Mendoza Arellano por la convivencia, apoyo y tolerancia. También agradezco a las chicas que estuvieron junto conmigo en el laboratorio y que también han sido una base importante para los conocimientos adquiridos.

Agradezco a todos mis amigos que nunca han dejado de motivarme y presionarme para dar este paso, y que juntos hemos tenido experiencias inolvidables que nos unirán para siempre.

“Donde haya un árbol que plantar, plántalo tú. Donde haya un error que enmendar, enmiéndalo tú. Donde haya un esfuerzo que todos esquivan, hazlo tú. Sé tú el que aparta la piedra del camino.”

Gabriela Mistral

“Es mejor cojear por el camino que avanzar a grandes pasos fuera de él. Pues quien cojea en el camino, aunque avance poco, se acerca a la meta, mientras que quien va fuera de él, cuanto más corre, más se aleja.”

San Agustín

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	
CEFALEXINA	7
ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA VISIBLE	15
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA	25
VALIDACIÓN	36
CAPÍTULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL	44
REACTIVOS	45
ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE	46
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA	49
VALIDACIÓN DEL SISTEMA	52
CAPÍTULO III . RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	
ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE	55
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA	59
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES	
ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE	67
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA	67
BIBLIOGRAFÍA	70
ANEXO 1	72
ANEXO 2	76
ANEXO 3	79
ANEXO 4	83
ANEXO 5	86

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN ^{1,2,3,4,5}

La merecida importancia que actualmente se le ha dado a la administración y uso de antibióticos, así como cualquier otro fármaco, ha provocado que en la industria farmacéutica sea necesario usar métodos analíticos confiables que permitan la cuantificación de los principios activos en una formulación, y de esta manera asegurar la eficacia del producto y la satisfactoria recuperación del paciente. Para asegurar la confiabilidad de los métodos analíticos estos se deben someter a un proceso de validación, mediante este proceso se comprueba si el método es lo suficientemente confiable para su uso.

En México la NOM-059-SSA1-1993. “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos” (NOM son las siglas de Norma Oficial Mexicana) establece los siguientes puntos referentes a la validación de métodos analíticos:

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

9.12.3 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 (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos).

La NOM-164-SSA1-1998. “Buenas prácticas de fabricación para fármacos” establece los siguientes puntos referentes a la validación de métodos analíticos:

16.1 los controles de laboratorio e inspecciones deben apoyarse en normas, PNO,s (Procedimientos Normalizados de Operación) 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.

La NOM-173-SSA1-1993. “Estabilidad de medicamentos” establece los siguientes puntos referentes a la validación de métodos analíticos:

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

5.10.2 información general, especificaciones y métodos analíticos:

5.10.2.3 información de 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.

La NOM-177-SSA1-1998. “Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.” Señala los siguientes puntos referentes a validación de métodos analíticos:

7.3 Validación del sistema y del método analítico para las pruebas de perfiles de disolución en formas farmacéuticas orales de liberación inmediata.

9.1. Validación de métodos analíticos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia.

Con base en lo anterior, se plantea que los métodos se validan para asegurar que un procedimiento, instrumento, “software”, analista o método analítico haga apropiadamente lo que está intentando hacer con los requerimientos de precisión y exactitud establecidos, como parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y/o de la técnica de análisis de Control de Calidad de una forma farmacéutica.

En éste trabajo se validarán y compararán los sistemas o instrumentos llamados Espectrofotómetro UV-Visible y Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia y para la cuantificación de monohidrato de cefalexina utilizando las pruebas estadísticas de validación correspondientes a éste analito, como son: condiciones óptimas de trabajo, linealidad del sistema, precisión del sistema y estabilidad del sistema.

La Cefalexina es un antibiótico cefalosporínico semisintético de primera generación (clasificación antigua), o de aplicación oral sin incremento en su estabilidad ante β -lactamasa (clasificación farmacocinética). Este antibiótico es útil en el tratamiento de sinusitis bacteriana, infecciones del aparato respiratorio, otitis media, infecciones de la piel y tejidos blandos, infecciones de los huesos y articulaciones, infecciones del aparato genitourinario, infecciones dentales, infecciones como rinitis, faringitis, laringitis, bronquiectasias, bronquitis aguda y crónica, y en general todas las infecciones bacterianas respiratorias con retención de secreciones, excepto neumonía y bronconeumonía.

En la industria farmacéutica los sistemas evaluados, el Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia y el Espectrofotómetro UV-Visible, son los más utilizados para la cuantificación de principios activos debido a que ambos sistemas han sido los más costeables a la industria. Estas dos técnicas se basan en fundamentos distintos para su funcionamiento, por lo que es necesario estudiarlos para la mejor comprensión de los resultados que se obtienen.

La información obtenida del análisis realizado a ambos sistemas será útil para compararlos, y conocer las ventajas y desventajas en el análisis de cefalexina.

OBJETIVOS

- ▲ La validación de dos técnicas analíticas que pueden ser utilizadas para realizar la cuantificación de la Cefalexina:
Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) y Espectroscopia UV-Visible.
- ▲ Para el caso de esta investigación se determinarán los siguientes parámetros estadísticos para validar el análisis cuantitativo de Cefalexina por estas 2 técnicas instrumentales; condiciones óptimas de los sistemas cromatográfico y espectroscópico, linealidad del sistema, precisión del sistema y estabilidad de los estándares.
- ▲ Una vez obtenidos los resultados de validación anteriores hacer una comparación entre éstas, planteando las ventajas y desventajas de utilizar una u otra técnica.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

CEFALEXINA

Estructura y Propiedades^{6,7}

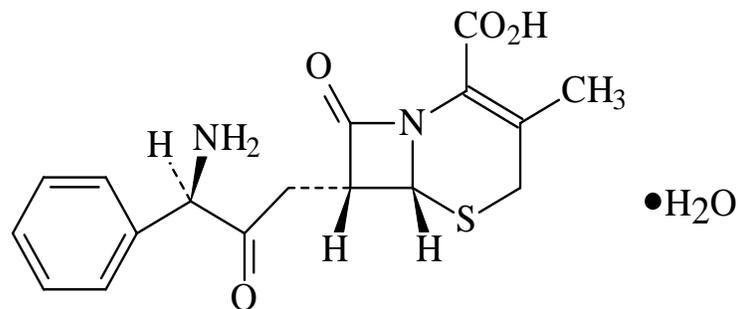


Figura . 1. Estructura del Monohidrato de Cefalexina.

La figura 1 muestra la estructura química del compuesto monohidrato de cefalexina, las propiedades de dicha molécula son:

P.M= 365.41 g/mol

Apariencia: Es un polvo cristalino de color blanco a crema, con olor característico.

Solubilidad en agua: 13.5 mg de monohidrato de cefalexina/mL a 25°C

Rotación específica: +153°

Estabilidad: Es estable bajo refrigeración a pH de 3 a 7; y a temperatura ambiente a aproximadamente pH de 5. Se degrada con luz ultravioleta a 260 nm.

$\lambda_{\text{máx}}$ = 262 nm

$\epsilon_{\text{máx}}$: 236 M⁻¹cm⁻¹

pKa: 7.1 en agua.

Historia^{3,4,5,8}

En 1948, Brotzu aisló al hongo *Cephalosporium acremonium* que fue la primer fuente de cefalosporinas, obtenidas del agua de mar cerca de una descarga de aguas negras en la costa de Cerdeña. Los filtrados "en bruto" del cultivo de dicho hongo inhibieron la proliferación in vitro de *Staphylococcus aureus* y curaron infecciones estafilocócicas y fiebre tifoidea en seres humanos. Los líquidos de cultivo en que proliferó el hongo, contuvieron tres antibióticos diferentes que fueron llamados cefalosporinas P, N y C. Se aisló el núcleo activo de la cefalosporina C, el ácido 7-aminocefalosporínico, y mediante la adición de cadenas laterales fue posible producir compuestos semisintéticos con actividad antibacteriana mucho mayor que la original.

Debido a que se han sintetizado diversas cefalosporinas, Karchmer creó un sistema de clasificación generacional basado en características generales de acción antimicrobiana:

- Primera generación: Tienen actividad satisfactoria contra bacterias grampositivas y acción relativamente moderada contra las gramnegativas.
- Segunda generación: Tienen acción un poco mayor contra gramnegativos, pero mucho menor que la de los compuestos de la tercera generación.
- Tercera generación: Casi siempre son menos activas que los medicamentos de primera generación contra cocos grampositivos, pero son más activas contra Enterobacterias.
- Cuarta generación: Tienen espectro más amplio que las de tercera generación, y mayor estabilidad; útiles contra bacilos gramnegativos aerobios resistentes a cefalosporinas de tercera generación.

Otra manera de clasificarlas, es en base a sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas:

- De aplicación parenteral sin incremento de su estabilidad a β -lactamasa (cefalosporinas básicas).
- De aplicación parenteral con incremento de su estabilidad a β -lactamasa (cefalosporinas transicionales).
- De aplicación parenteral con distintos efectos contra bacterias anaerobias e incremento de su estabilidad a β -lactamasa (cefalosporinas anaerobias).
- De aplicación parenteral con amplio espectro y alta estabilidad a β -lactamasa (cefalosporinas de amplio espectro).
- De aplicación oral sin incremento en su estabilidad a β -lactamasa (cefalosporinas orales antiguas).
- De aplicación oral con incremento de su estabilidad a β -lactamasa (cefalosporinas orales más recientes).

De este modo la Cefalexina es un antibiótico cefalosporínico semisintético de primera generación (clasificación generacional), o de aplicación oral sin incremento en su estabilidad ante β -lactamasa (clasificación farmacocinética).

Indicaciones Terapéuticas⁴

Su administración está indicada para el tratamiento de las siguientes infecciones:

- Sinusitis bacteriana causada por *Streptococcus* (*S.anginosus*, *S.salivarius* *S.pneumonie*) y *Staphylococcus aureus* (sólo cepas susceptibles a metilciclina).
- Infecciones del aparato respiratorio causadas por *S.pneumonie* (neumonía) y *S.pyogenes* (faringitis aguda); usualmente la penicilina es el antibiótico de elección. La cefalexina es generalmente eficaz en la erradicación de los estreptococos de la nasofaringe.

- Otitis media causada por *S.pneumonie*, *H.influenzae*, estafilococos, estreptococos y *M .catarrhalis*.
- Infecciones de la piel y tejidos blandos causadas por estafilococos y/o estreptococos.
- Infecciones de los huesos y articulaciones causadas por estafilococos y/o *P.mirabilis*.
- Infecciones del aparato genitourinario, incluso prostatitis aguda, causadas por *E.coli*, *P.mirabilis* y *Klebsiella pneumonie*.
- Infecciones dentales causadas por estafilococos y/o estreptococos.
- Infecciones como rinitis, faringitis, laringitis, bronquiectasias, bronquitis aguda y crónica, y en general todas las infecciones bacterianas respiratorias que cursen con retención de secreciones, excepto neumonía y bronconeumonía.
- También está indicada para gonorrea cuando no sea posible el tratamiento con penicilina.

No es activa contra la mayoría de las cepas de las especies de *Enterobacter*, *Morganella morganii* y *Proteus vulgaris*. Tampoco es activa contra *Pseudomonas* o *Acinetobacter calcoaceticus*.

Farmacocinética^{6,9}

- ❖ **Absorción:** La cefalexina es resistente al ácido estomacal y se absorbe casi por completo en las porciones altas del tracto gastrointestinal. La absorción se retrasa cuando la cefalexina se administra con o inmediatamente después de los alimentos, sin embargo, las concentraciones séricas son más prolongadas que las obtenidas en sujetos en ayunas, por lo que se puede administrar con o sin alimentos.
- ❖ **Distribución:** Se distribuye ampliamente en los tejidos, huesos y articulaciones. Alcanza niveles terapéuticos en sangre, orina, bilis, líquido sinovial, pus, líquido amniótico, cordón umbilical, sangre fetal y el fluido cerebro espinal. Se une a proteínas en un 6-15%. El volumen de distribución es de 15±2.3 litros.
- ❖ **Metabolismo:** No se metaboliza en el organismo, y se excreta rápidamente sin cambios en orina. Su vida media es de 0.9h, pero es mayor en recién nacidos.
- ❖ **Excreción:** La cefalexina es excretada exclusivamente a través del riñón por filtración glomerular y secreción tubular. Cerca del 50-60% de la dosis administrada es recuperada sin cambios en la orina durante las dos primeras horas después de la administración y de un 80 a 100% es recuperado luego de 6-8 horas.

Farmacodinamia^{3,4,5,6}

La estructura básica de la pared celular bacteriana consiste en ácido murámico (peptidoglicano) el cuál es un componente heteropolimérico que rodea a la bacteria por completo formando una cadena tridimensional y provee de rigidez y estabilidad mecánica.

En la figura 2 se muestra la estructura principal de una bacteria gramnegativa y una grampositiva. Para las bacterias grampositivas, el ácido murámico es un 50% de la pared celular; mientras que para bacterias gramnegativas es del 5-10% de la pared celular. Los principales componentes son cadenas de aminoazúcares, glicanos, y oligopéptidos (los cuáles conectan una con otra las cadenas de glicanos). La estructura de los oligopéptidos es específica para cada especie bacteriana.

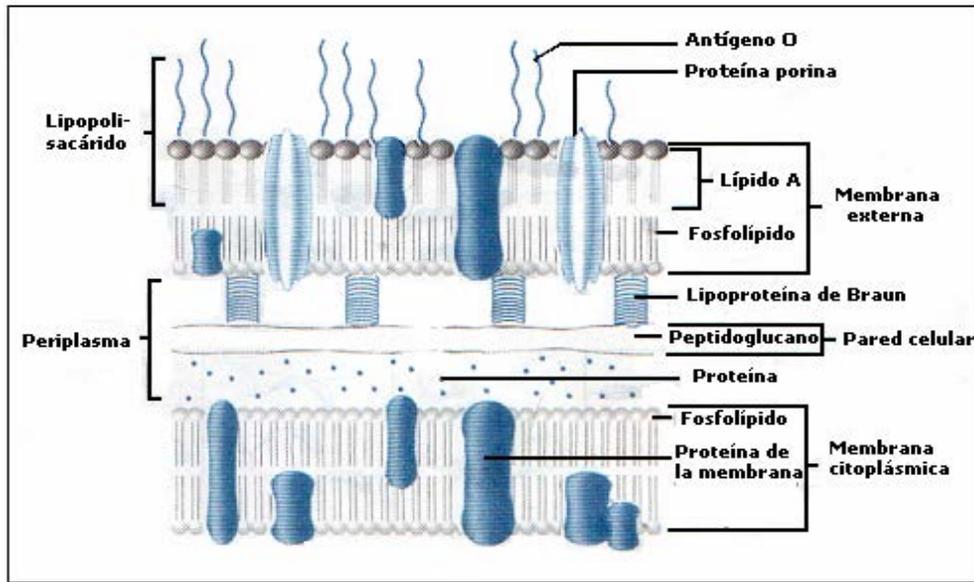
Durante la biosíntesis, el ácido N-acetilmurámico, aminoácidos libres (por ejemplo alanina, ácido glutámico o lisina) y el dipéptido D-alanina-D-alanina se conectan con uridín difosfato en el citoplasma. El polímero de glicano al cuál son conectados los aminoácidos se produce en la membrana celular por una reacción con UDP-acetilglucosamina. Finalmente, la conexión con los aminoácidos libres ocurre a través de la reacción de el aminoácido terminal del oligopéptido a la D-alanina hasta el último aminoácido de el pentapéptido de otra cadena de peptidoglicano . Ésta reacción es catalizada por una transpeptidasa y se muestra en la figura 3.

Debido a la similitud entre D-alanil-D-alanina y el anillo β -lactámico, es posible la unión covalente de este anillo abierto, al sitio activo de la D-alanina transpeptidasa, bloqueando a la enzima irreversiblemente. Las enzimas bloqueadas son llamadas PBP (penicillin binding proteins) necesarias para la síntesis de la cadena de peptidoglicanos. Estas enzimas se encuentran en el espacio transmembranal de la membrana bacteriana. Los β -lactámicos, inhiben varios PBP's en una sola bacteria.

Los microorganismos entre sí son resistentes debido a diferencias estructurales en las PBP's, las cuáles son el objetivo blanco de estos fármacos; incluso pueden adquirir resistencia debido a un incremento del peso molecular de las PBP's y su consecuente decremento de afinidad al fármaco. Otra forma de adquirir resistencia es por recombinación homóloga entre genes PBP de diferentes especies bacterianas.

Las bacterias pueden destruir antibióticos β -lactámicos debido a que producen enzimas que las protegen de éstos, estas enzimas son llamadas β -lactamasas. Las bacterias grampositivas producen un gran número de β -lactamasas que se secretan al espacio extracelular. En bacterias gramnegativas dichas enzimas son producidas en pequeñas cantidades, pero se localizan en el espacio periplásmico entre la membrana celular interna y la externa.

GRAM NEGATIVA



GRAM POSITIVA

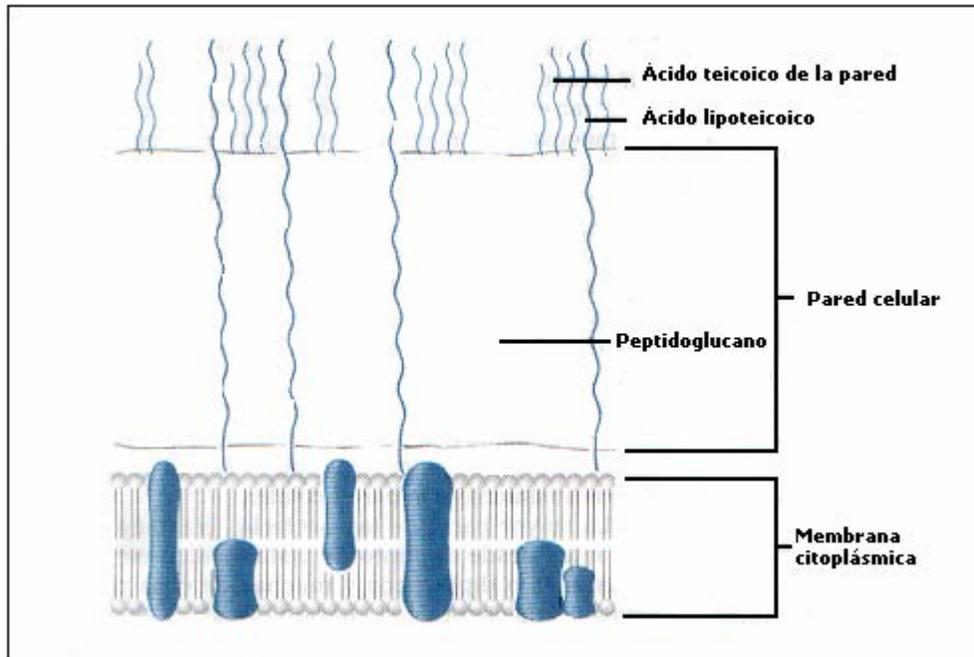


Figura. 2. Estructura celular bacteriana.

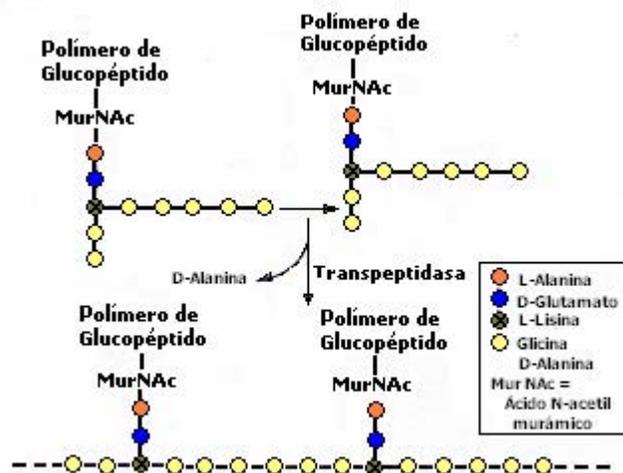


Figura. 3. Diagrama de síntesis de la cadena de peptidoglicano.

La actividad de los β -lactámicos también se ve influenciada por: la densidad de la población bacteriana, la edad de infección, la cantidad de β -lactamasa producida, y la fase de crecimiento en que se encuentra el cultivo.

En síntesis, el mecanismo de acción de la cefalexina es la inhibición de la enzima D-alanina transpeptidasa por lo cuál la síntesis de las nuevas cadenas de glicano de la pared celular no se pueden unir. Esto disminuye la estabilidad mecánica de la pared celular. Además, se incrementa la permeabilidad, y la consecuente pérdida de inhibidores de enzimas autolíticas y el aumento de la inestabilidad osmótica provocan la muerte celular.

Contraindicaciones^{6,9}

La cefalexina no debe utilizarse en pacientes con alergia o hipersensibilidad conocida a medicamentos cefalosporínicos.

Restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia^{6,9}

No se cuenta con estudios en mujeres embarazadas, por lo que se debe usar con precaución sólo cuando sea estrictamente necesario. La cefalexina se excreta en la leche materna, por lo que se debe administrar con precaución en esta etapa.

Reacciones secundarias y adversas^{6,9}

Se han comunicado reacciones alérgicas raras como: exantemas, urticaria, prurito, síndrome de Stevens-Johnson o necrólisis epidérmica, cefalea, somnolencia, desvanecimiento, irritación de la lengua o la boca, indigestión, cólicos intestinales, náusea, vómito, diarrea, fiebre medicamentosa, artralgias y reacción anafiláctica, dolor abdominal. Súper infecciones por hongos y diarrea como resultado de colitis medicamentosa, y raramente nefritis intersticial reversible.

Interacciones medicamentosas y de otro género⁹

La colestiramina reduce la absorción de cefalexina y por ende su efecto. El probenecid prolonga e intensifica las concentraciones séricas de cefalexina. No administrar cefalexina junto con eritromicina o tetraciclinas por riesgo a hipersensibilidad cruzada. El tratamiento concomitante de cefalosporinas en altas dosis y medicamentos nefrotóxicos como aminoglucósidos o diuréticos potentes puede producir efectos adversos sobre la función renal. Debido a que la cefalexina sólo actúa sobre microorganismos proliferantes, no deben combinarse con antibióticos bacteriostáticos.

Alteraciones en los resultados de pruebas de laboratorio⁹

La cefalexina produce reacciones falsas positivas para la prueba de glucosuria determinada con algunas tabletas reactivas que emplean agentes reductores del cobre (soluciones de Benedict y Fehling). En casos raros, se ha presentado eosinofilia, neutropenia y elevación de las transaminasas. La reacción de Coombs directa puede ser positiva en pacientes que reciben cefalexina. También existe interferencia en la determinación de creatinina por métodos de picrato alcalino. Puede intervenir con la determinación de cuerpos de cetona en la orina.

Dosificación^{6,9}

Adultos y niños > 12 años: La mayoría de las infecciones responden a una dosis de 1-2 g, divididos en 2-3 tomas (500 mg cada 8 horas). Se debe considerar que cuando se trata de infecciones severas o de tejidos profundos, cuando participan organismos poco sensibles, la dosis debe incrementarse de 1 a 1.5 g cada 6 horas. En profilaxis de infecciones urinarias en adultos, se recomienda la dosis de 125 mg cada noche y puede ser continuada por varios meses.

Niños < 12 años: Idealmente la dosis se debe calcular con relación al peso, especialmente en los lactantes. Las dosis siguientes para niños se derivan de 25-60 mg/Kg peso/día.

Para enfermedades crónicas, infecciones severas o de tejidos profundos, ésta dosis puede elevarse a 100 mg/Kg peso/día, hasta un máximo de 4 g al día.

0-1 año: 25-60 mg/kg/día.

1-2 años: 62.5-125 mg divididos en tomas de cuatro veces en un día

3-6 años: 125-250 mg divididos en tomas de cuatro veces en un día.

7-12 años: 250-500 mg divididos en tomas de cuatro veces en un día.

Para el tratamiento de la mayoría de las infecciones agudas, el tratamiento debe continuarse por lo menos dos días después de que los signos clínicos se han normalizado y los síntomas han desaparecido, pero en los casos crónicos, como enfermedades recurrentes del tracto urinario, es recomendable el tratamiento con 500 mg cuatro veces al día durante dos semanas. Para gonorrea una dosis única de 3 g con 1

g de probenecid, es suficiente en el caso de los varones. En el caso de las pacientes femeninas, son efectivos 2 g de cefalexina con 0.5 g de probenecid.

Se recomienda reducir las dosis cuando la depuración de creatinina es inferior a 10 mL/min.

En pacientes seniles debe tomarse en cuenta especialmente la función renal. Los adultos sometidos a hemodiálisis deben recibir una dosis adicional post-diálisis.

Almacenamiento^{6,9}

Almacenar a temperatura ambiente, en recipientes bien cerrados y protegidos de la luz.

ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Fundamentos^{10,11,12,13}

Según el espectro electromagnético (figura 4), la región de radiación visible comprende de los 400 a 800nm; mientras que la región de radiación UV comprende al UV cercano de 180 a 400nm, y al UV lejano de 10 a 180nm.

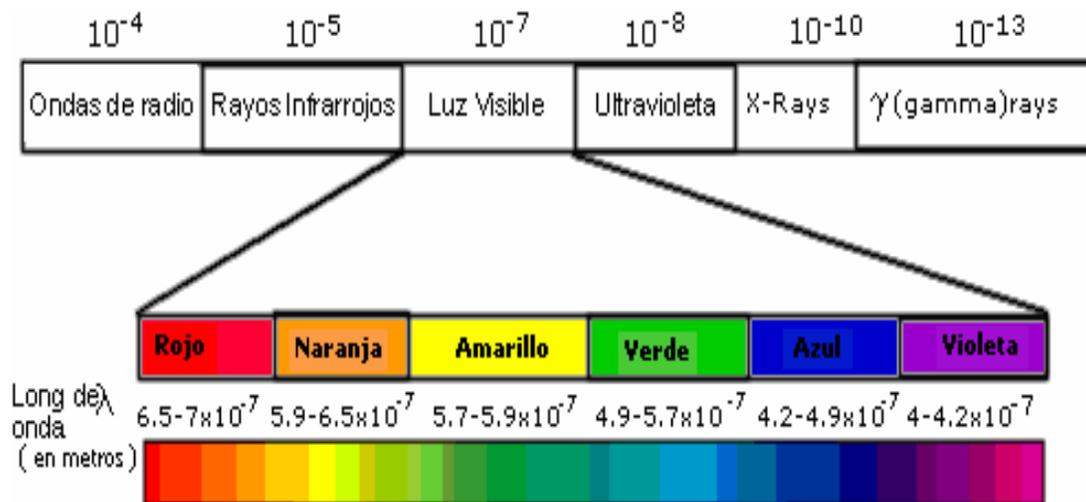


Figura. 4. Espectro de la Radiación Electromagnética.

El fenómeno de absorción mostrado en la figura 5 se refiere a que cuando una molécula en su estado basal absorbe un fotón, su energía aumenta y pasa a su estado excitado. Las radiaciones UV y visible hacen que los electrones pasen a orbitales de mayor energía, ya que sólo proporcionan la energía necesaria para excitar a los electrones de valencia o electrones externos. Este fenómeno se puede observar en sustancias orgánicas e inorgánicas.

La energía absorbida por la sustancia corresponde a un valor de la longitud de onda de la radiación y depende de la diferencia de energía entre el estado basal y el estado excitado, mientras menor sea la diferencia, mayor será la longitud de onda.

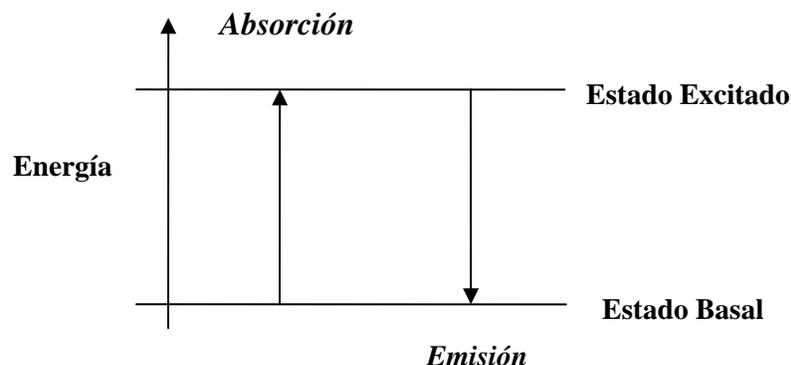


Figura. 5. Esquema de absorción.

Como se puede observar en la figura 6 cuando una molécula se encuentra en su estado basal, los electrones ocupan orbitales de enlace. Al traslaparse los orbitales atómicos se obtiene un orbital molecular de antienlace de alta energía y uno de enlace de baja energía. A los orbitales moleculares asociados con los enlaces sencillos de las moléculas y que involucran electrones sigma (σ) se les designa como orbitales σ ; mientras que al traslape paralelo de orbitales atómicos p y que involucran electrones pi (π) se les designa como orbitales π , a los orbitales moleculares de antienlace se les designa como σ^* y π^* respectivamente. Los electrones no compartidos poseen energía intermedia entre las energías de orbitales de enlace y los orbitales de antienlace, y se les asigna el símbolo n.

En una molécula que absorbe radiación UV pueden ocurrir las siguientes transiciones: de σ a σ^* , de n a σ^* , de n a π^* y de π a π^* .

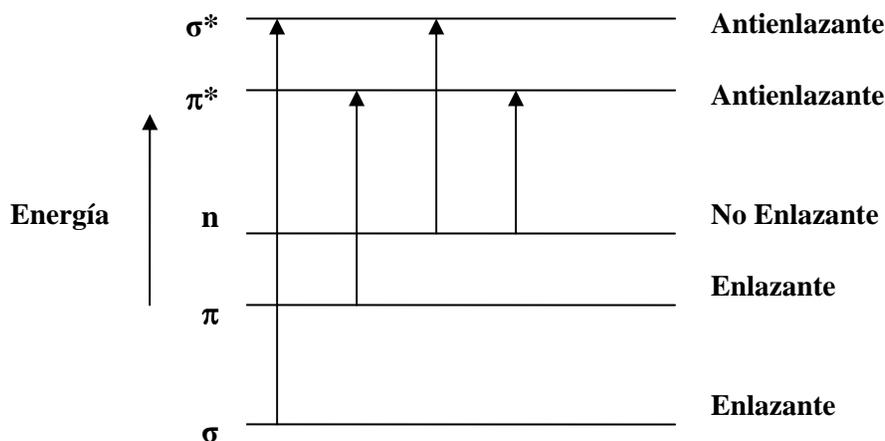


Figura. 6. Esquema de transiciones electrónicas.

Las transiciones de σ a σ^* , son las que requieren de mayor energía para que se lleven a cabo y normalmente se pueden lograr bajo radiación UV al vacío ($8 < 185$ nm).

Las transiciones de n a σ^* se llevan a cabo en compuestos saturados que contienen pares de electrones no compartidos, y requieren menos energía, pero se llevan a cabo debajo de 200nm con absorptividades molares de 100 a 3,000 y los máximos de absorción se desplazan a longitudes de onda más cortas en presencia de disolventes polares como agua o etanol.

Las transiciones de n a π^* que se llevan a cabo en grupos cromóforos simples son prohibidas y las bandas que se obtienen se caracterizan por tener absorptividades molares menores a 100 y sus máximos sufren desplazamiento hipsocrómico con el aumento de polaridad del disolvente, con bandas de absorción entre 200 y 700nm.

Las transiciones de π a π^* ocurren por la presencia de un grupo funcional cromóforo, son de alta absorptividad molar de 1,000 a 10,000, y sufren desplazamientos a mayores o menores longitudes de onda dependiendo del grupo cromóforo, generan bandas de absorción de 200 a 700nm lo cuál no requiere de instrumentación tan compleja.

En general los compuestos orgánicos que se pueden observar son aquellos que cuenten con dobles ligaduras conjugadas y grupos aromáticos, siendo $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ las transiciones más representativas. En el caso de los compuestos inorgánicos se pueden observar cationes cuyos electrones de valencia se encuentren en los orbitales d y f; además se observan aniones con enlaces tipo orgánicos y que cuentan con electrones libres, por ejemplo los nitratos, nitritos, azidas y carbamatos.

A continuación se presentan algunos conceptos de importancia en UV-Vis:

- Los grupos funcionales orgánicos insaturados que son los responsables de la absorción en las regiones ultravioleta y visible son llamados cromóforos ($C=C$, $C=O$, etc). De esta manera, a los grupos saturados unidos a un grupo cromóforo que alteran la longitud de onda y la intensidad del máximo de absorción, son llamados auxócromos ($-Cl$, $-NH_2$, $-OH$, etc.).
- Cuando la longitud de onda sufre un desplazamiento de menor a mayor debido al disolvente o a un grupo sustituyente, se habla de un desplazamiento batocrómico o desplazamiento rojo. Cuando la longitud de onda se desplaza de mayor a menor debido al disolvente o a un grupo sustituyente, se habla de un desplazamiento hipsocrómico o desplazamiento azul.
- Al aumento de la intensidad de absorción se le llama efecto hipercrómico, mientras que a la disminución de la intensidad de absorción se le llama efecto hipocrómico.
- El coeficiente de absorción molar es una constante característica de cada compuesto y dependiente de la longitud de onda a la que se lee, y da una idea de la intensidad de la absorción y depende de la probabilidad de que tenga lugar una transición al absorber energía y está dada en unidades de $L\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$. Cuando el $\epsilon_{\text{máx}}$ es mayor a 10^4 es una absorción de alta intensidad; cuando $\epsilon_{\text{máx}}$ es menor a 10^3 es de baja intensidad, y por lo tanto se consideran de baja probabilidad, por lo que se considera que son transiciones prohibidas.

INSTRUMENTACIÓN^{10,12,13,14}

El equipo que se utiliza para trabajar en la región UV-Vis pueden ser de dos tipos de equipos, el dispersivo o monocromático y el arreglo de diodos. En este trabajo se utilizó un equipo de tipo dispersivo por lo que se dará sólo información de éste, la instrumentación de este equipo se muestra en la figura 7.

DISPERSIVO O MONOCROMÁTICO.

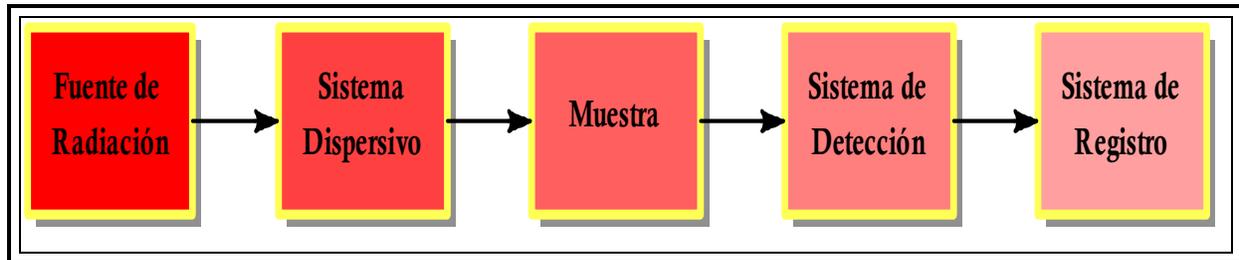


Figura. 7. Instrumentación de un equipo dispersivo en UV-Vis.

Fuente de radiación:

Emite la radiación electromagnética ultravioleta y/o visible. Se utiliza la lámpara de deuterio para emitir radiación ultravioleta y la lámpara de wolframio para emitir radiación visible.

La lámpara de wolframio es una fuente común de radiación continua visible. Un filamento de wolframio trabaja a una temperatura próxima a 3,000K y produce radiación útil en el intervalo de 350 a 2,500nm.

En la lámpara de arco de deuterio (figura 8) una descarga eléctrica disocia D_2 para emitir radiación UV desde 200 a 400nm. Produce un espectro continuo en la región ultravioleta y presenta ventanas de cuarzo ya que el vidrio absorbe fuertemente a longitudes de onda menores de 350nm.

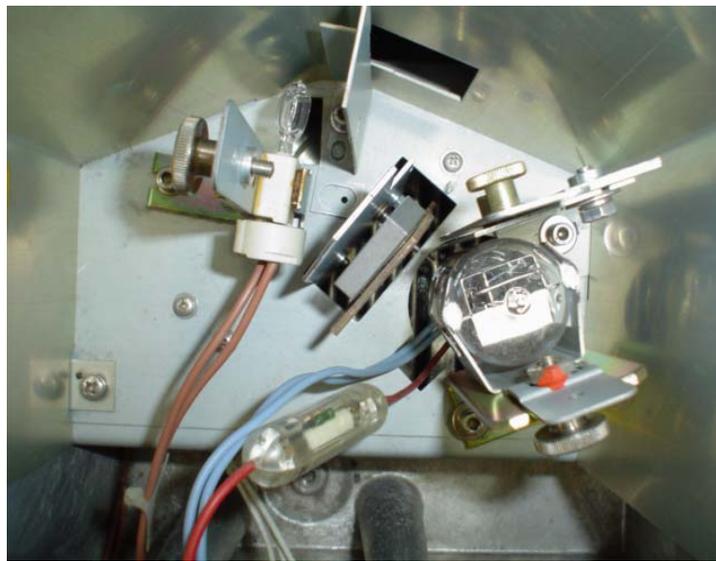


Figura. 8. Lámparas en el equipo.

Sistema dispersivo o monocromador:

Dispersa (o monocromatiza) la radiación electromagnética en las longitudes de onda que la componen y selecciona una banda estrecha de longitudes de onda, que es la que pasa por la muestra o llega al detector.

Este sistema consta de:

- Rendijas de entrada y salida: Son agujeros por los que entra el haz de rayos paralelos, y sale el haz de radiación monocromatizado.
- Espejos: Tienen como función guiar la radiación electromagnética a través del sistema monocromático.
- Lentes: Permiten mantener colimado la radiación electromagnética y con ello tener la menor pérdida de ésta en el sistema monocromático.
- Filtros: Se utilizan para que la luz sea monocromática, es decir para seleccionar o rechazar bandas relativamente anchas de absorción. Es necesario usar varios filtros y cambiarlos de acuerdo a las longitudes de onda que se deseen trabajar. Permite realizar una monocromatización tosca.
- Red de difracción o reflexión (figura 9): Consta de una serie de rayas grabadas próximas entre sí, donde se producen fenómenos de reflexión. Las diferentes longitudes de onda se reflejan formando diferentes ángulos con la red. Se utilizan para diferenciar entre unidades de longitud de onda (nm). Girando ésta red, se logra que salgan por la rendija diferentes longitudes de onda. Realiza la monocromatización fina en el instrumento.

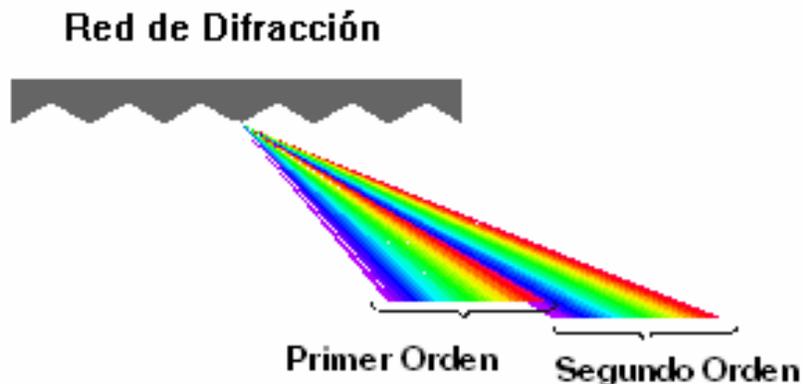


Figura 9. Representación de la red de difracción.

Muestra:

Para contener la muestra se utilizan celdas o cubetas que tienen dos caras opacas para poder sostenerlas y dos caras transparentes para que pase el haz de luz, normalmente tienen un centímetro de diámetro interno o de longitud de paso óptico.

La característica principal del material con que se desee trabajar, es que éste debe dejar pasar la radiación de interés. Se utiliza cuarzo o sílice fundida para trabajar en la región ultravioleta (por debajo de 350nm) y en la región visible. Se pueden usar de vidrio y de plástico para la región visible. En la figura 10 se muestra una celda de cuarzo dentro del equipo.

Se puede trabajar con muestras líquidas y sólidas disueltas; y muestras gaseosas en celdas selladas.

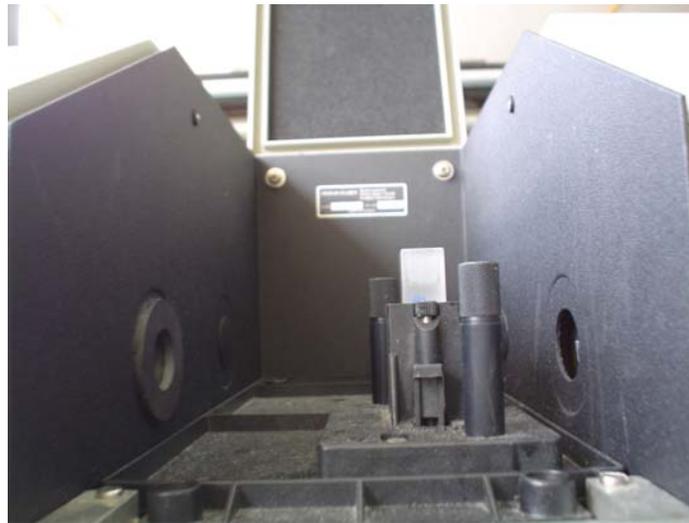


Figura. 10. Celda dentro del equipo.

Sistema de detección:

Se utiliza un fotomultiplicador (figura 11), en este sistema los fotones interaccionan con una lámina de materiales alcalinotérreos (cátodo) fotosensible y que liberará un electrón por fotón, este electrón es energizado por un potencial positivo respecto al emisor. El electrón energizado extrae más de un electrón al chocar con el primer sínode y estos electrones se aceleran hacia el siguiente sínode que posee una carga aún más positiva, así, se extraen aún más electrones que se aceleran hacia el siguiente sínode y así consecutivamente. De tal manera que se pueden extraer más de 10^6 electrones por cada fotón inicial y así obtener señales eléctricas medibles.

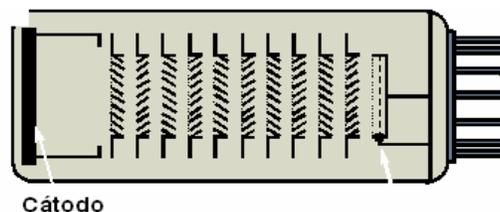


Figura. 11. Dibujo de un fotomultiplicador.

Sistema de Registro:

Traducen la propiedad electrónica a un gráfico de absorbancia contra longitud de onda, llamado espectro, como el mostrado en la figura 12.

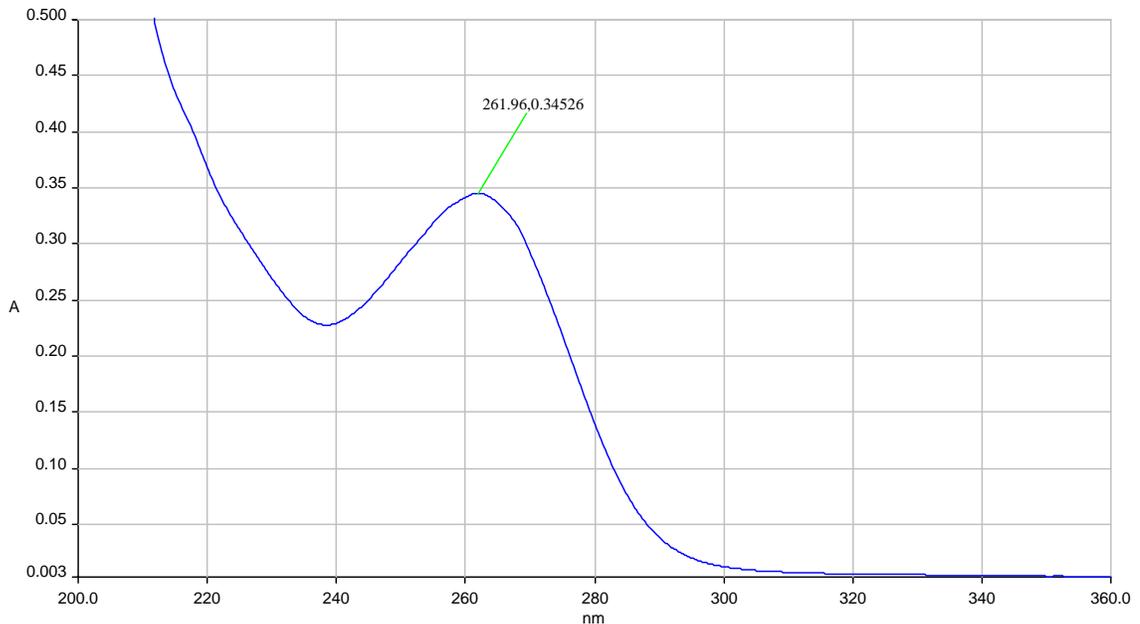


Figura. 12. Ejemplo de un Espectro UV-Vis.

Los sistemas de registro que nos permite obtener las lecturas de absorbancia necesarias y poder tener el espectro pueden ser:

En equipos manuales:

- Escalas: Poseen una escala que nos proporciona una medida de absorbancia o transmitancia que deberá ser graficada con respecto a la longitud de onda para obtener el espectro de absorción.
- Digitales: Se tienen pantallas digitales que nos dan los valores directos de absorbancia o transmitancia.

En equipos automatizados:

- Registradores: Aparatos que nos permiten ir pintando el espectro conforme el instrumento automatizado va realizando el barrido a diferentes longitud de onda.
- Computadoras: Permiten obtener el espectro como en el caso de l registrador pero también permiten el procesamiento de la información que nos da éste, de manera automática debido a la aplicación de los programas de computo que se compran para el control tanto del instrumento como la información dada por éste. En la figura 13 se muestra un ejemplo de equipo Uv-Visible.



Figura. 13. Equipo UV-Vis Lambda 11.

ANÁLISIS CUALITATIVO

Las aplicaciones para el análisis cualitativo son limitadas ya que el número de máximos y mínimos es relativamente pequeño y como ya se mencionó en la parte teórica de la técnica en los compuestos orgánicos sólo se tendría idea de la presencia de dobles ligaduras conjugadas y/o sistemas aromáticos.

La información proporcionada por esta técnica sólo es confiable desde el punto de vista cualitativo cuando se trata de universos cerrados.

ANÁLISIS CUANTITATIVO

La espectroscopia ultravioleta-visible es la más utilizada para realizar análisis cuantitativo debido a que se pueden cuantificar especies absorbentes y también especies no absorbentes que mediante una reacción formen un producto absorbente.

La cuantificación de un compuesto en espectroscopia ultravioleta-visible está dirigida por la ley de Lambert-Beer.

Cuando una muestra absorbe la radiación electromagnética, la intensidad radiante del haz de luz disminuye. La luz monocromática, con una intensidad radiante I_0 , incide en una muestra de longitud b . La intensidad radiante del haz que emerge por el lado opuesto de la muestra es I . Como la muestra pudo haber absorbido radiación, se obtiene que $I \leq I_0$.

Así, la transmitancia se define como la fracción de luz incidente que pasa a través de la muestra. La transmitancia (T) puede valer de 0 a 1.

$$T = I / I_0$$

Lambert hizo una relación de la transmitancia con respecto a la longitud de la celda:

$$T = I / I_0 = e^{-\text{Const} \cdot \text{Pathlength}}$$

También Beer hizo una relación de la transmitancia, pero con respecto a la concentración:

$$T = I / I_0 = e^{-\text{Const} \cdot \text{Concentration}}$$

Posteriormente para poder trabajar el fenómeno desde un aspecto lineal se planteó el parámetro conocido como absorbancia y que define la fracción de luz incidente que absorbe la muestra, y que se relaciona con la transmitancia por medio de la siguiente ecuación:

$$A = \log_{10} (I / I_0) = -\log T$$

Al conjuntar ambas ecuaciones, la transmitancia depende tanto de la longitud de la celda como de la concentración, pero las celdas se mantienen a una longitud constante por lo que la transmitancia y la absorbancia son directamente proporcionales a la concentración C de la especie que absorbe luz en la muestra, por lo tanto la ecuación anterior nos da el planteamiento de una ecuación lineal tomando en cuenta los parámetros ya mencionados.

$$A = abc$$

dónde:

A es la absorbancia y es adimensional.

C es la concentración de la muestra y está dada en unidades de concentración.

b es la longitud del paso óptico y se expresa en centímetros.

a es el coeficiente de absorptividad y está dada en el inverso de las unidades de concentración y cm^{-1} , y como ya se mencionó en caso de que la concentración se de en unidades de Molaridad se llamará coef. de absorptividad molar y la letra griega utilizada será la epsilon (ϵ).

Esta ley se aplica a la radiación monocromática y es válida exactamente para disoluciones diluidas de la mayoría de las sustancias.

En disoluciones concentradas, las moléculas interactúan entre sí debido a su proximidad, por lo cuál sus propiedades cambian y a concentraciones muy altas los solutos se convierten en disolvente. Los solutos de una disolución que no absorben también pueden interactuar con las especies absorbentes y alterar la absorptividad. Si la molécula absorbente participa en un equilibrio químico que depende de la concentración, la absorptividad cambia con la concentración.

De acuerdo con esta ley, es posible cuantificar los componentes de una muestra fabricando estándares a diferentes concentraciones del compuesto a analizar y obteniendo las absorbancias, así, se puede graficar una curva patrón (figura 14) para obtener la pendiente que será el coef. de absortividad y que servirá para calcular la concentración del compuesto en una muestra.

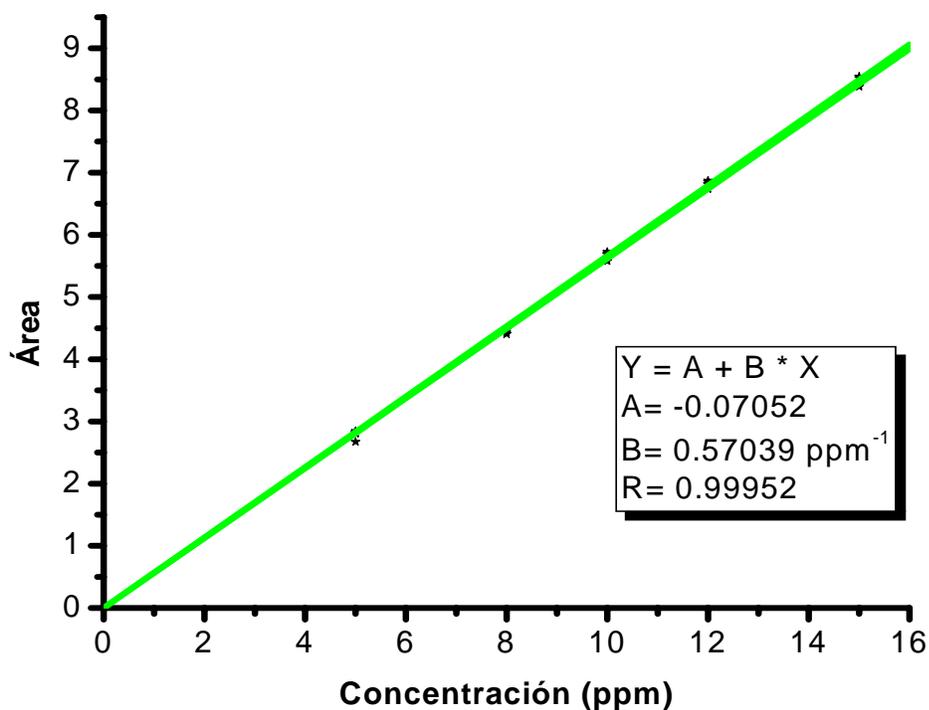


Figura. 14. Ejemplo de una curva patrón.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)

Fundamentos^{14,15}

La cromatografía es un método fisicoquímico de separación cuyo principio es el establecer un equilibrio entre dos fases, la fase estacionaria y la fase móvil. Éste método nos permite, además de separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos.

La cromatografía consiste en un lecho cromatográfico el cuál es el lugar donde se encuentra la fase estacionaria y puede ser abierto (en placa) o cerrado (en columna); a través de este lecho debe fluir la fase móvil, esta fase móvil debe acarrear (gases) o disolver (líquidos) los compuestos de una muestra. De esta manera los solutos se deben repartir entre ambas fases, las moléculas de soluto en la fase estacionaria pueden estancarse en función de la naturaleza química de la fase estacionaria y del soluto., así la velocidad del soluto o analito varía inversamente con la afinidad de la fase estacionaria. Para que la separación de los componentes se lleve a cabo las constantes de distribución de dichos componentes deben ser diferentes entre sí.

$$K_{eq} = \frac{|\text{Solute en Fase Estacionaria}|}{|\text{Solute en Fase Móvil}|}$$

La cromatografía se puede dividir de acuerdo a la fase estacionaria o móvil que se utilice. A continuación se describen algunos aspectos de la clasificación cromatográfica:

- **Cromatografía gas-sólido:** Se basa en la adsorción de sustancias gaseosas sobre superficies sólidas, es útil para la separación de especies tales como los componentes del aire.
- **Cromatografía gas-líquido:** Se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.
- **Cromatografía líquido-sólido:** Se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido.
- **Cromatografía líquido-líquido:** Se basa en la distinta solubilidad que presenta una molécula de la muestra en la fase móvil y la fase estacionaria. Se utiliza para compuestos moderadamente polares, cuyo peso molecular es inferior a 1500uma.
- **Cromatografía de fase químicamente unida:** Se basa en la interacción hidrofóbica - hidrofílica de moléculas unidas covalentemente a la fase estacionaria y los componentes de una mezcla.

- **Cromatografía de intercambio iónico:** Se basa en la competencia entre la fase móvil y la estacionaria por los sitios activos de una resina de intercambio iónico. Es utilizada para la separación de compuestos iónicos.
- **Cromatografía de exclusión:** Se basa en la retención selectiva de las moléculas en función de su tamaño molecular, debido a la penetración o exclusión de dichas moléculas en los poros de la fase estacionaria. Las moléculas más pequeñas se quedan atrapadas en los poros y las más grandes pasan de largo, es decir, excluyen..
- **Cromatografía de fluidos supercríticos:** Se utilizan disolventes con propiedades intermedias entre los gases y los líquidos a ciertas condiciones de temperatura y presión. Se caracteriza por una mayor resolución y rapidez, así como mayores coeficientes de difusión de los solutos. El disolvente más utilizado es el dióxido de carbono.

Una clasificación muy utilizada es la que se presenta en la fig. 15.

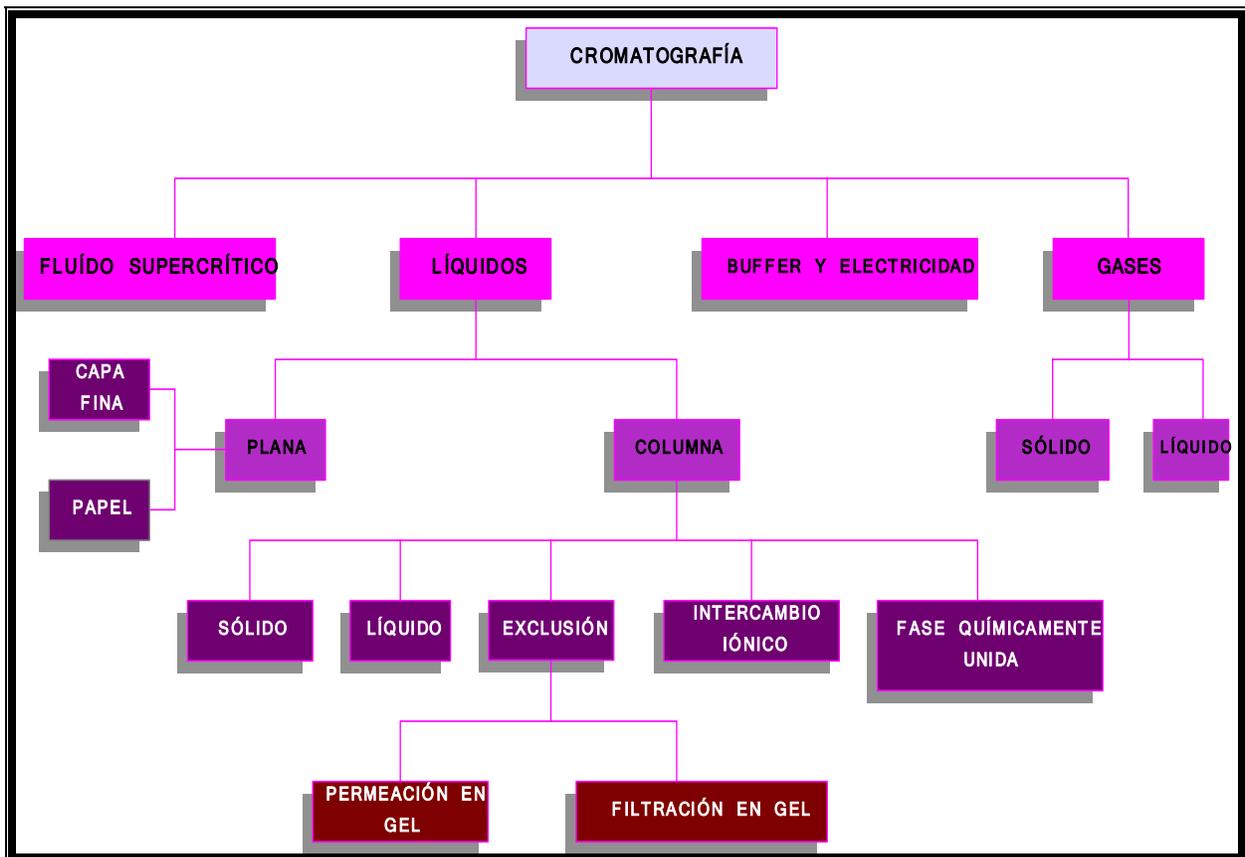


Figura. 15. Clasificación de la Cromatografía.

En el caso de este trabajo una de las técnicas instrumentales utilizadas es la CLAE por lo que se explicará información sobre esta técnica a continuación.

Instrumentación^{10,14,15}

La instrumentación se divide principalmente en las partes mostradas en la figura 16:

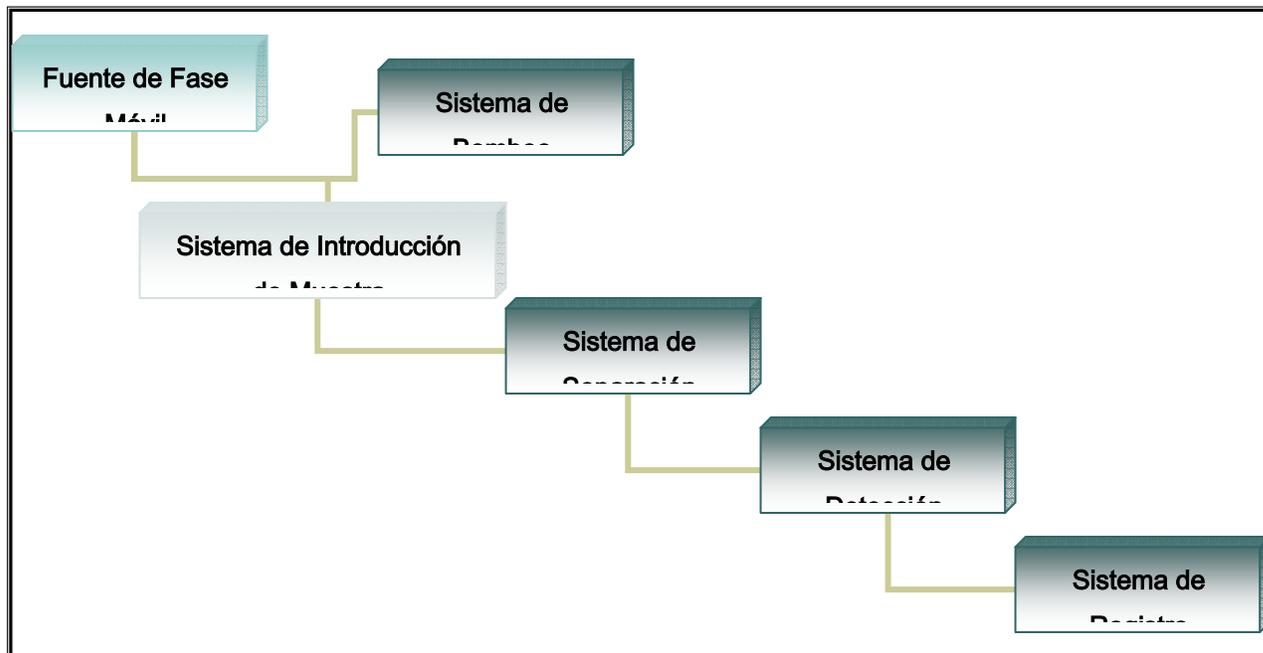


Figura. 16. Instrumentación en CLAE.

Fuente de fase móvil:

Es cualquier recipiente que pueda contener la fase móvil, con capacidad de 1 a 3 L ya que ese volumen es suficiente para un día entero de trabajo (figura 17).

La fase móvil debe de contar con ciertas características importantes para su uso en cromatografía de líquidos de alta presión, como son, que sea inerte, no tóxico, barato, de alta pureza (grado HPLC), de baja viscosidad, y que no sea detectado por el sistema de detección utilizado.

Se usan disolventes, o mezclas de dos o más disolventes ya sean polares o no polares, para formar la fase móvil. Estos disolventes pueden ser:

DISOLVENTE	CONSTANTE DIELÉCTRICA A 25°C
Hexano	1.89
Acetonitrilo	3.88
Cloroformo	4.87
Acetato de etilo	6.02
Tetrahidrofurano	7.58
Propan - 2 - ol	20.1
Metanol	33.6
Agua	78.3

Los disolventes utilizados, deben purgarse previamente, ya sea burbujeando Helio o, aplicando agitación con vacío; con la finalidad de remover el aire disuelto y evitar la generación de burbujas que causan problemas con las bombas, columnas y detectores.

Existen dos técnicas con las que se puede trabajar según el poder de elución, que indica la rapidez con la que los componentes de una muestra son eluidos del sistema:

- ◆ Isocrática: El poder de elución se mantiene constante durante el análisis, es decir, la composición de la fase móvil se mantiene constante.
- ◆ Gradiente de elución: El poder de elución va en aumento durante el análisis, esto quiere decir que la composición de la fase móvil varía durante éste a manera de reducir el tiempo en que se separan los componentes de una mezcla.

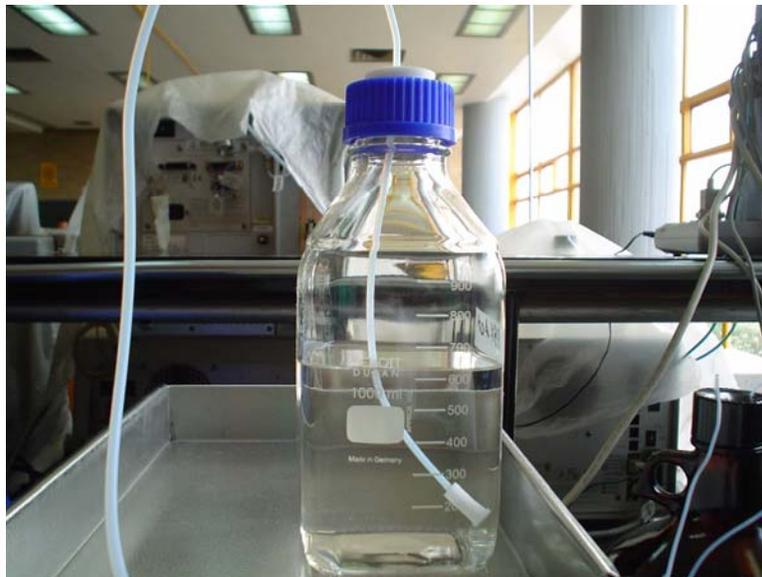


Figura. 17. Contenedor de la fase móvil.

Sistema de bombeo:

Es el sistema que se encarga de abastecer la fase móvil al sistema de separación. Existen dos tipos diferentes de bombeo, el mecánico y el neumático.

El bombeo mecánico cuenta con dos tipos de bombas, las recíprocas y las de desplazamiento continuo. Las recíprocas a su vez se dividen en bombas de un pistón y bombas de doble pistón o reciprocantes. A continuación se explica brevemente su funcionamiento:

- Bombas de un pistón: A través de un sistema de válvulas que se abren y cierran, y de el movimiento de un pistón, se llena y vacía un cámara con la fase móvil; de ésta manera se envían flujos pulsantes y no continuos.
- Bombas reciprocantes (figura 18): Es similar a la bomba de un pistón, la diferencia radica en la presencia de dos pistones, uno que succiona el

disolvente, y otro que lo expulsa fuera de la bomba de manera recíproca entre ellas. De esta manera se obtienen flujos no pulsantes. Son las más utilizadas en los equipos actuales y es la bomba que se tiene en el equipo utilizado en este trabajo.

- Bombas de desplazamiento continuo: Un émbolo o pistón es desplazado en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el disolvente (fase móvil) contenido en un recipiente que contiene la fase móvil. El flujo está libre de pulsaciones.
- Bombas neumáticas: La fase móvil es desplazada mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión, que se aplica de manera directa o indirecta sobre ésta. Los flujos son libres de pulsaciones.



Figura. 18. Sistema de bombeo del equipo Knauer.

Sistema de introducción de muestra:

Es el mecanismo mediante el cual se introduce la muestra, esto se realiza mediante una válvula de inyección que puede ser manual o automática. Es necesario el uso de jeringas especiales en caso de ser inyección manual (figura 19). Los materiales con los que se deben elaborar estos dispositivos deben ser inertes, generalmente se utiliza acero inoxidable. Los volúmenes con los que se trabaja van de 2 a 1,000 μL .

La válvula de inyección (figura 20) cuenta con dos posiciones fundamentales para su funcionamiento; la posición de carga en la que la muestra se mantiene en el loop sin pasar a la columna; y la posición de inyección en la que la fase móvil arrastra la muestra hacia la columna de separación.



Figura. 19. Jeringa de inyección de 250 µL.

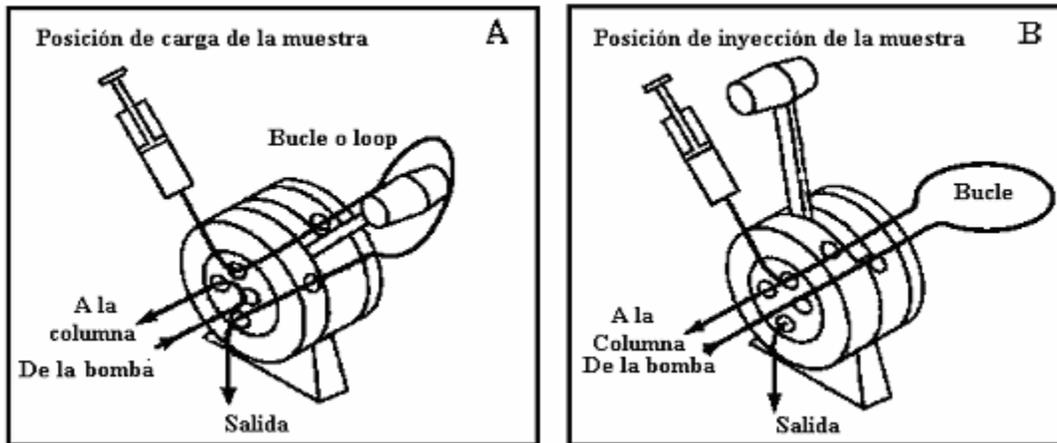


Figura. 20. Funcionamiento de la válvula de inyección.

Sistema de separación:

Son columnas de acero inoxidable (figura 21) de longitudes que van de los 5 a los 25 cm y diámetros internos de 2 a 5 mm, esta columna contiene a la fase estacionaria la cuál consiste en partículas empacadas. La fase estacionaria o partículas que contenga la columna depende del tipo de cromatografía líquida que se utilice para separar el compuesto de interés (fig. 4).

En cromatografía de fases químicamente unidas se usan fases estacionarias con grupos de naturaleza polar (amino, hidroxilo, nitrilo, etc.) y no polar (octilo, octadecilo, fenilo, etc.); dependiendo de la polaridad de la fase estacionaria existen dos formas de trabajo:

- a) Cromatografía en Fase Normal: La fase móvil es de tendencia no polar y la estacionaria polar.
- b) Cromatografía en Fase Inversa: La fase móvil es de tendencia polar y la estacionaria no polar.



Figura. 21. Columnas de separación en CLAE.

Sistema de detección:

Este aparato debe generar y medir alguna propiedad física de los compuestos separados o de la fase móvil, convirtiendo ésta a una propiedad eléctrica, esta medición la debe poder realizar de manera continua en el efluente de fase móvil que entra al detector.

Los detectores en CLAE se pueden dividir en dos tipos tomando en cuenta la propiedad física que miden de la materia, los de tipo espectroscópico y los de tipo electroquímico.

Espectroscópicos:

- ▲ Espectrofotómetro UV-Visible (figura 22).
- ▲ Espectrofotómetro de fluorescencia.
- ▲ Refractómetro.
- ▲ Espectrómetro de masas.

Electroquímicos:

- ▲ Amperímetro.
- ▲ Conductímetro.
- ▲ Voltamperímetro.
- ▲ Potenciómetro.



Figura. 22. Detector UV-Vis.

Sistema de registro:

Es el aparato que sirve para representar en forma gráfica la señal generada por el detector con respecto al tiempo en que dura la corrida, este gráfico es conocido como "cromatograma" (figura 23), y cada señal que aparece en este gráfico es conocido como "pico cromatográfico" y cada uno de estos picos representa (si se desarrolla bien la separación) un compuesto presente en la muestra.

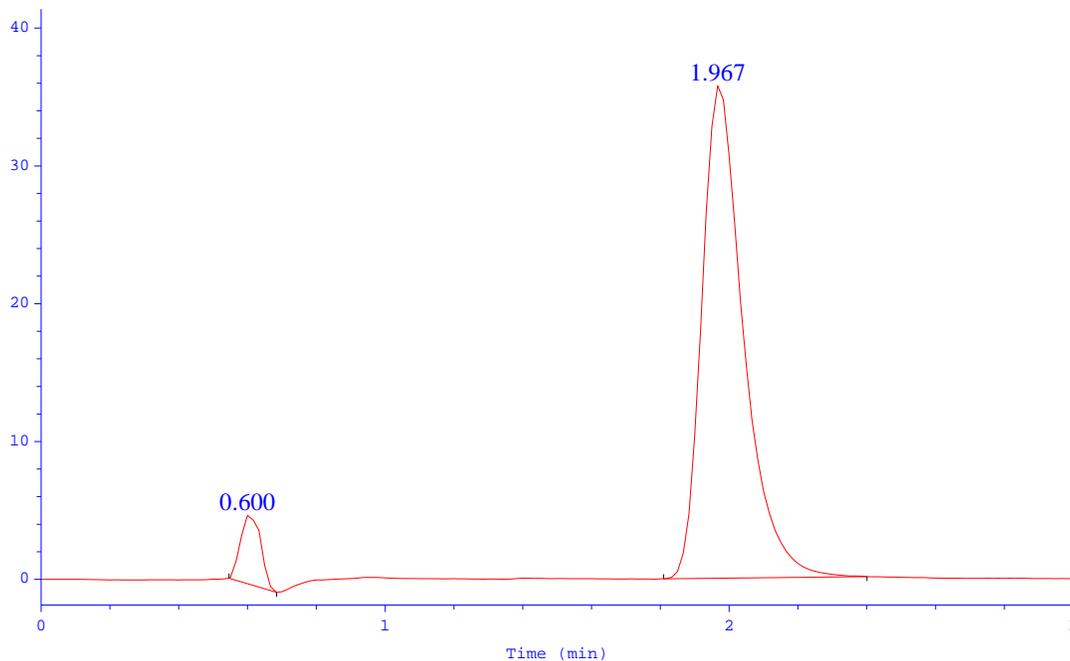


Figura. 23. Cromatograma.

Cada vez es más común que el registro sea efectuado por una computadora (figura 24), pero aún podemos encontrar integradores electrónicos.

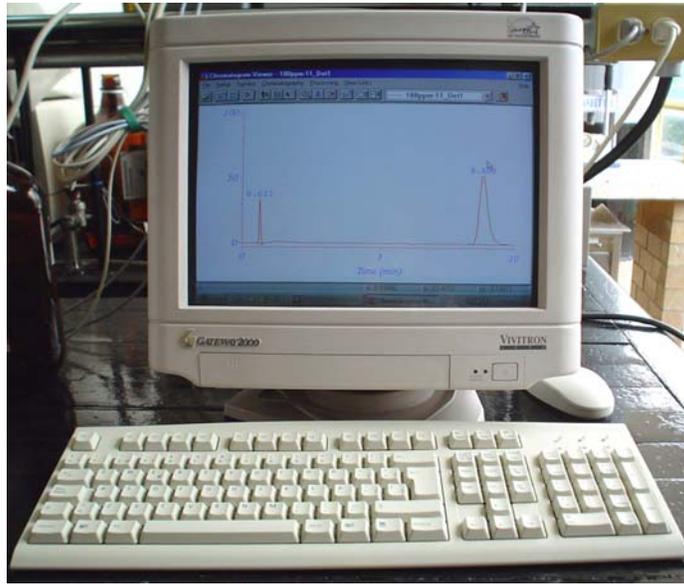


Figura. 24. Computadora de registro en CLAE.

Parámetros Cromatográficos^{9,13,14}

Como se indicó un cromatograma es una representación gráfica de la respuesta del detector en función del tiempo de elución, y de éste se pueden obtener ciertos parámetros de medición de los picos obtenidos. Un ejemplo de esto está en la figura 25:

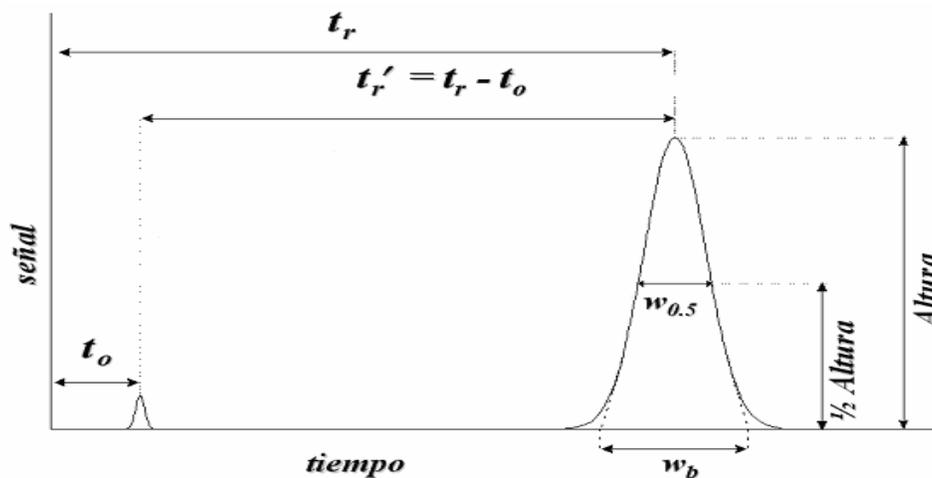


Figura. 25. Parámetros medibles en un cromatograma.

Del cuál se puede distinguir:

- * Tiempo de retención (t_r): Es el tiempo que transcurre desde que se introduce la muestra al sistema hasta el máximo del pico del compuesto analizado.

- * Tiempo muerto (t_m): Es el tiempo que se requiere para eluir un compuesto que no es retenido por la fase estacionaria.
- * Tiempo de retención corregido (tr'): Es el tiempo en que el compuesto permanece interaccionando con la fase estacionaria. Se obtiene con la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto.

$$tr' = tr - tm$$

- * Ancho de la base (W_b): Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de la señal.
- * Ancho a la mitad de la altura ($W_{1/2h}$): Es la porción de línea a la mitad de la altura de la señal interceptada por tangentes a ambos lados de ésta.

$$W_{1/2h} = tr * 0.9394$$

- * Factor de capacidad (k'): Se define como la masa del analito en la fase estacionaria entre la masa del analito en la fase móvil. Es el tiempo adicional que el analito tarda en eluir de la columna respecto a un analito que no es retenido por la fase estacionaria.

$$k' = \frac{tr'}{t_0}$$

- * Selectividad (α): Es una medida de solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria. Indica la afinidad de los analitos por la fase estacionaria.

$$\frac{k'_2}{k'_1} = \alpha = \frac{tr'_2}{tr'_1}$$

- * Eficiencia (N): Es el número de platos teóricos o de equilibrios que tiene el sistema y da la idea de que tan bueno es el sistema para separar un compuesto.

$$N = 5.545 \left(\frac{tr'}{W_{0.5}} \right)^2$$

* Resolución (R_s): Es una medida del grado de separación entre dos compuestos.

$$R_s = 1.18 * \frac{\Delta t_r}{W_{\frac{1}{2}h1} + W_{\frac{1}{2}h2}}$$

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} * \frac{\alpha - 1}{\alpha} * \frac{R_2'}{1 + R_2'}$$

VALIDACIÓN¹⁶

La validación se define como la evidencia documentada de que un proceso de medición sirve para lo que fue creado. En la industria farmacéutica es necesario hacer uso de la validación para asegurar la calidad del fármaco o del medicamento. Los parámetros que se evalúan normalmente en una validación analítica instrumental son: condiciones óptimas de trabajo de la técnica a utilizar, linealidad, precisión, reproducibilidad y repetibilidad del método, exactitud, cantidad mínima detectable, tolerancia del sistema y estabilidad de la muestra.

La USP (United States Pharmacopoeia) define validación de un método analítico como el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

En este trabajo se evaluaron los parámetros que se explican a continuación:

Condiciones óptimas de trabajo

De la información adquirida en la investigación bibliográfica, se razonó la fase móvil a utilizar de manera inicial, y al obtenerse el cromatograma se calcularon los parámetros cromatográficos que se pueden medir en el caso de una muestra que contiene un solo compuesto a ser eluido por el sistema, en este caso solo serían la eficiencia y el factor de capacidad obtenida por el pico de la cefalexina, la selectividad y la resolución no se calculan ya que para esto se requiere tener por lo menos dos compuestos que eluyan en el sistema.

Lo que nos va a importar más, será el hecho de lograr que el compuesto eluya lo más rápido posible del sistema cromatográfico y así se obtenga un tiempo de análisis corto más que la optimización de los otros parámetros, ya que en sus presentaciones farmacéuticas es el único principio activo presente.

En el caso de espectrofotometría UV-Visible, se investigó la longitud de onda de máxima absorción, la cuál deberá ser la misma obtenida experimentalmente, y ésta misma es la que se utilizará para determinar la respuesta del analito.

Pruebas de Hipótesis

Estas pruebas siempre se realizan usando dos hipótesis. Una llamada hipótesis nula que es la igualdad entre las variables comparadas y una llamada alterna que puede ser que las variables comparadas sean diferentes o que una sea mayor o menor que la otra. Como ejemplo tenemos las hipótesis relativas a una media:

Hipótesis relativas a una media

Utilizamos esta prueba cuando queremos demostrar que un resultado experimental es igual a un valor de referencia, o bien cuando queremos demostrar que es diferente,

mayor que o menor que el valor de referencia. Para ello calculamos el valor experimental de la variable t de student:

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x} - \mu_o}{s / \sqrt{n}}$$

Donde μ_o es el valor de la variable de referencia contra la que deseamos comparar nuestra media experimental \bar{x} y s es el estimador experimental de la desviación estándar.

La hipótesis nula es que nuestra media experimental es igual al valor contra el que estamos comparando. La decisión de aceptarla o rechazarla depende de cual sea la hipótesis alterna y para ello se utiliza la siguiente tabla:

Hipótesis alterna	Rechazamos la hipótesis nula si:
$\mu < \mu_o$	$t_{\text{exp}} < -t_{\alpha}$
$\mu > \mu_o$	$t_{\text{exp}} > t_{\alpha}$
$\mu \neq \mu_o$	$t_{\text{exp}} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{\text{exp}} > t_{\alpha/2}$

Donde α es el riesgo máximo que estamos dispuestos a correr, t_{α} es el valor de tablas de la t de student con n-1 grados de libertad.

También se pueden tener hipótesis relativas a dos medias, relativas a una variancia, relativas a dos variancias, etcétera.

El error del 5% con el que se va a realizar ésta prueba en este trabajo fue planteado por ser las primeras pruebas a realizar en las técnicas que se van a emplear, aunque la industria farmacéutica ya tiene establecido que para aceptar la precisión (coeficiente de variación) por la técnica de cromatografía de líquidos tiene que ser como máximo de 2% y para espectroscopia UV-Vis de 3%¹.

Linealidad^{2,17,18}

La linealidad de un procedimiento analítico es la habilidad de éste para obtener una respuesta directamente proporcional a la concentración del analito especificando el intervalo en el cuál se mantiene esa linealidad. También se puede definir como el grado al cual la curva de calibración analítica se aproxima o se ajusta a una línea recta.

En primer lugar, la linealidad debe ser evaluada por inspección visual de un gráfico de la respuesta como función de la concentración del analito, si se presenta una relación lineal, entonces se debe evaluar a través de un método estadístico apropiado

Se debe realizar también, una regresión lineal, en donde, en el caso de la linealidad del sistema la variable dependiente es la respuesta o señal y la variable

independiente es la concentración de los estándares. Los datos obtenidos de la regresión lineal proveen un estimado matemático del grado de linealidad.

En el caso de la linealidad del sistema el criterio de aceptación de la industria farmacéutica es que además de observarse gráficamente una tendencia lineal el valor de correlación de la regresión lineal aplicada a los datos de una curva patrón sea por lo menos:

$$r \text{ ó } r^2 \geq 0.98$$

De ser así, se realiza una prueba de hipótesis de la ordenada al origen, y el cálculo de los intervalos de confianza tanto de la ordenada al origen como de la pendiente.

Se establece una prueba de hipótesis para la ordenada al origen para comprobar si los resultados experimentales se ajustan a una línea recta con ordenada al origen 0 ó no, basados en la ecuación:

$$Y = \gamma X + \beta$$

La prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen es

Hipótesis nula $H_0: b = \beta$, donde $\beta = 0$

Hipótesis alterna $H_1: b \neq \beta$

El estadístico de prueba utilizado es la "t de Student" para n-2 grados de libertad; se realiza el análisis de los datos para obtener una "t calculada" con los datos experimentales, y estos datos experimentales se comparan con la "t de tablas":

$$t_{calc} = \frac{(b - \beta)}{Se \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}}}$$

dónde:

b = Ordenada al origen.

β = Ordenada al origen poblacional ($\beta = 0$)

Se = Error típico de estimación.

S_{xx} = Suma de cuadrados de la variable independiente.

n = Número de determinaciones.

\bar{x}^2 = Cuadrado de la media experimental.

El error típico de estimación se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n - 2)nS_{xx}}}$$

dónde:

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right)^2$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)^2$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right) \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)$$

El criterio para rechazar la hipótesis nula es que:

$$t_{\text{calculada}} < -t_{\alpha/2} \quad \text{o} \quad t_{\text{calculada}} > t_{\alpha/2}$$

Se trata de un ensayo bilateral o de dos colas, donde α es el nivel de significancia, que en este trabajo se considera como 5% ($\alpha=0.05$), que corresponde a un valor usual de riesgo de cometer un error tipo I.

Para calcular el intervalo de confianza para la ordenada al origen con el mismo nivel de significancia se utiliza la ecuación:

$$IC = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}}$$

Para calcular el intervalo de confianza para la pendiente con el mismo nivel de significancia se utiliza la ecuación.

$$IC = m \pm t_{\alpha/2} Se \frac{1}{\sqrt{S_{xx}}}$$

Precisión^{2,17,18}

La precisión se define como el grado en que concuerdan las diferentes mediciones de una misma propiedad y expresa la concordancia entre series de medidas obtenidas de muestreos múltiples de la misma muestra homogénea bajo las mismas condiciones. La precisión de un procedimiento analítico se expresa con la varianza, desviación estándar o coeficiente de variación. De acuerdo con la NOM-177-SSA1-1998 se establece un valor máximo de coeficiente de variación de 2% para CLAE y de 3% para espectroscopia UV-Visible.

Experimentalmente se calcula la precisión del sistema ensayando por triplicado por lo menos 6 soluciones estándar de la concentración central de la curva patrón.

Se puede evaluar la precisión del sistema y la precisión del método, la precisión del método se expresa como repetibilidad y reproducibilidad.

La repetibilidad se define como el grado de concordancia entre determinaciones independientes de soluciones que poseen la misma concentración, provenientes de una solución madre; estos ensayos son realizados por el mismo analista en las mismas condiciones de trabajo.

Para evaluar la reproducibilidad, los análisis los puede realizar el mismo analista en diferentes instrumentos, o diferentes analistas en el mismo instrumento o diferentes.

En las pruebas estadísticas utilizadas para evaluar precisión del sistema y repetibilidad del método, la hipótesis nula que se establece es:

Hipótesis nula	$H_0: s^2 = \sigma^2$, donde $\sigma^2 =$ se fija a un error del 5%.
Hipótesis alterna	$H_1: s^2 > \sigma^2$

Por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza σ^2_0 , se utiliza la prueba estadística de χ^2 con n-1 grados de libertad:

$$\chi^2_{calc} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$$

dónde:

n = Número de determinaciones.

s = Desviación estándar de la muestra.

σ_0 = Desviación estándar máxima aceptada.

Se rechaza la hipótesis nula, sí:

$$\chi^2_{calc} < \chi^2_{1-\alpha/2} \quad \text{o} \quad \chi^2_{calc} > \chi^2_{\alpha/2}$$

El intervalo de confianza para la variancia s^2 es:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{1-\alpha/2}}$$

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para la desviación estándar s:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{1-\alpha/2}}}$$

Estabilidad de estándares o muestras²

La estabilidad analítica de una muestra está definida como la propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas. En este ensayo se observa el efecto que tiene el disolvente sobre el compuesto y su objetivo es establecer las condiciones de almacenamiento de las muestras. Se recomienda un mínimo de 16 horas de almacenamiento.

Las pruebas de hipótesis que se establecen para evaluar la estabilidad, así como las que se establecen para evaluar reproducibilidad del método son primero sobre las varianzas y después sobre las medias:

Prueba de hipótesis sobre las varianzas:

Hipótesis nula $H_0 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$

Hipótesis alterna $H_1 = \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$

Se aplica la prueba F de Snedecor para determinar la precisión de trabajo del analista

$$F_{calc} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

dónde:

S_1^2 = es la varianza muestral mayor con $n_M - 1$ grados de libertad.

S_2^2 = es la varianza muestral menor con $n_m - 1$ grados de libertad.

Se rechaza la hipótesis nula, sí:

$$F_{calc.} > F_{\alpha/2}(n_M - 1, n_m - 1)$$

Prueba de hipótesis sobre las medias:

Hipótesis nula $H_0 = \mu_1 = \mu_2 = 0, \text{ osea, } \mu_1 = \mu_2$

Hipótesis alterna $H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$

Se aplica la prueba "t de student" tomando en cuenta si en la prueba anterior las varianzas fueron iguales o diferentes.

Si las varianzas fueron iguales y se trata de muestras pequeñas e independientes, el estadístico de prueba es:

$$t_{calc} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

-En el caso de que las varianzas no sean semejantes, el cálculo de la t_{cal} a utilizar es:

$$t_{calc} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

con ϕ grados de libertad, éstos se calculan con la ecuación:

$$\phi = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$$

en cualquiera de los 2 casos la hipótesis nula se rechaza sí:

$$t_{cal} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{cal} > t_{\alpha/2}$$

No debe haber diferencia significativa entre las medias antes y después del almacenamiento, para que las disoluciones de estándares o muestras se consideren estables durante ese tiempo.

CAPÍTULO II

**DESARROLLO
EXPERIMENTAL**

INSTRUMENTACIÓN

- ↗ Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia marca Knauer modelo Smartline con las siguientes partes:
 - ▲ Bomba de doble pistón, modelo Smartline 1000.
 - ▲ Válvula de inyección de 20µL.
 - ▲ Columna Luna con fase estacionaria inversa C-18 (fase químicamente unida, Octadecil), diámetro de partícula de 5µm, tamaño de poro de 100 Å y longitud de la columna 50mm x 4.6mm de d.i.
 - ▲ Detector UV marca Knauer, modelo Smartline 2500
 - ▲ Computadora con programa Eurochrom.
- ↗ Espectrofotómetro UV-Visible marca Perkin-Elmer, modelo Lambda 11 de un solo haz.
- ↗ Balanza analítica modelo Sartorius BL-120S de peso máximo de 120g y sensibilidad de 0.1mg.

MATERIAL

- ↗ Celdas de cuarzo para equipo UV-Visible de 1cm de longitud, de paso óptico, marca Beckman.
- ↗ Matraz volumétrico tipo A de 500mL.
- ↗ Probeta graduada de 250mL.
- ↗ Pipeta graduada de 10mL.
- ↗ Vaso de precipitado de 1L.
- ↗ Matraces volumétricos tipo A de 5mL.
- ↗ Matraces volumétricos tipo A de 10mL.
- ↗ Micropipeta marca Hamilton de intervalo de 10-100µL, calibrada.
- ↗ Pipetas pasteur.
- ↗ Vasos de precipitado de 50mL.
- ↗ Vasos de precipitado de 25mL.
- ↗ Frascos viales con capacidad para 5mL.
- ↗ Frasco para colocar la fuente de fase móvil de 1L.
- ↗ Equipo de filtración marca Millipore.
- ↗ Jeringa para cromatografía de líquidos de 250µL, marca Hamilton.

REACTIVOS

↗ Metanol nanogrado y grado HPLC.

↗ Agua ASTM tipo I.

↗ Ácido acético glacial, grado RA.

↗ Monohidrato de cefalexina estándar (usado para el trabajo en espectroscopia):

Número de Lote: 2433289

Fecha de análisis: 2 de Diciembre de 2003

Proveedor: Helm de México

Fecha de caducidad: 2 de Diciembre de 2004.

Pureza química: 92.70%

Número de estandarización: STD-025-04

↗ Monohidrato de cefalexina estándar (usado para el trabajo en cromatografía):

Número de Lote: 3385331

Fecha de análisis: 11 de Mayo del 2004

Proveedor: Helm de México

Fecha de caducidad: 11 de Mayo del 2005.

Pureza química: 94.78%

Número de estandarización: STD-010-04

ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

En este trabajo se evaluaron los siguientes parámetros: condiciones óptimas de trabajo, linealidad, y precisión. La estabilidad sólo se realizó por cromatografía de líquidos.

CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

Longitud de onda de trabajo

Para conocer la longitud de onda de máxima absorción para trabajar con el monohidrato de cefalexina y comprobar que esta longitud es la que se informa en la literatura (262nm ver figura. 26)⁶, se determinó primero la longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) del monohidrato de cefalexina en agua (disolvente ideal para su extracción de la forma farmacéutica), esto se hizo mediante la obtención de los espectros de UV-Visible en el Espectrofotómetro UV-Visible a las siguientes condiciones de trabajo:

Intervalo de longitud de onda:	200 a 400nm
Velocidad de barrido:	240nm/min
Resolución:	1nm

Se preparó una solución madre de aproximadamente 100ppm, como la absorción de esta disolución se salía del intervalo en el que normalmente se cumple la ley de Lambert y Beer (0.2-1.4 de absorbancia)¹⁴, se procedió a preparar una dilución, se tomó un volumen de 500 μ l de la solución madre y se diluyó a 5mL de agua lo que nos dio una disolución de concentración de aproximadamente 10ppm, con esta disolución se obtuvo el espectro de la figura. 27. En el espectro reportado en la literatura se obtiene una longitud máxima de absorción igual a la que se reporta en la literatura de 262nm.

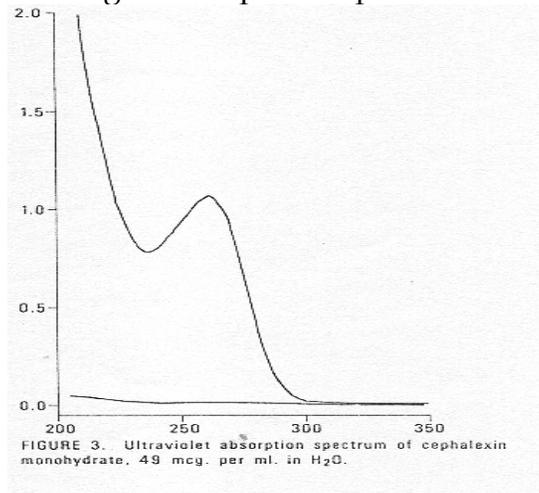


Figura. 26. Espectro UV de absorción reportado en la literatura para la cefalexina en agua.

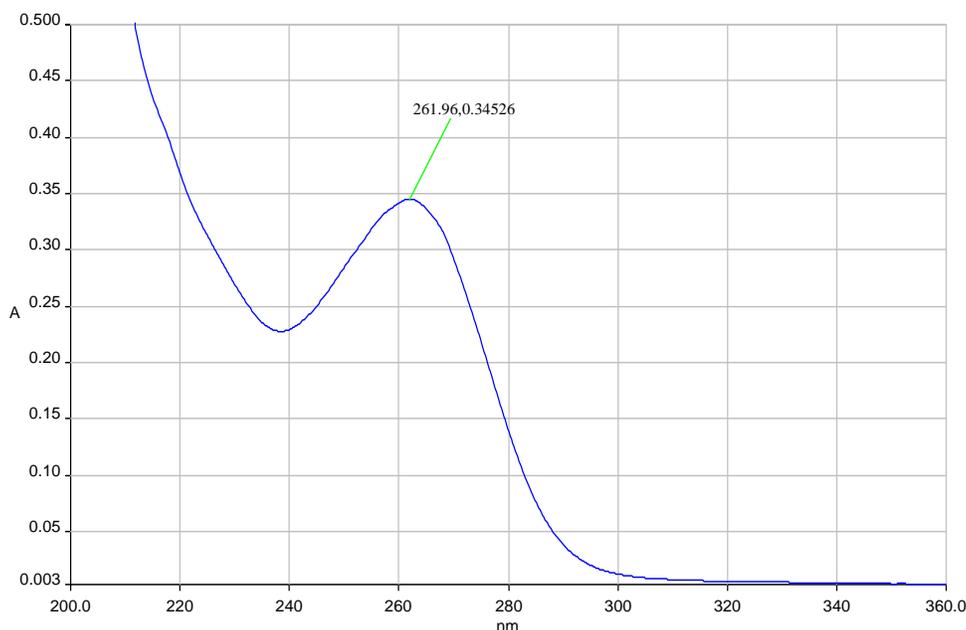


Figura. 27. Espectro UV experimental de cefalexina en agua en el equipo a utilizar.

VALIDACIÓN DEL SISTEMA

Linealidad

La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta) utilizando 5 niveles de concentración preparados a partir de una misma solución madre y haciendo el análisis espectroscópico por triplicado para cada dilución.

Se pesaron 113.44mg de monohidrato de cefalexina estándar, se disolvió en agua, la disolución se aforó a 100mL; se tomaron 10mL de esta disolución se diluyeron en un matraz aforado de 200mL con agua. Tomando en cuenta la pureza del estándar que es de 92.7% y el agua de hidratación que contiene la molécula, la concentración de cefalexina es de 49.99 μ g/mL. A partir de esta solución madre se prepararon las siguientes soluciones para la curva patrón:

Concentración (μ g/mL)	Alícuota (mL) de la solución madre	Volumen de aforo (mL)
15	15	50
20	20	50
25	25	50
30	30	50
35	35	50

Una vez preparadas estas soluciones, se leyeron en el espectrofotómetro UV-Visible por triplicado (lecturas independientes) y se obtuvieron las absorbancias de las

soluciones, con lo cuál se realizó la curva patrón y se obtuvieron los datos necesarios para el análisis de regresión lineal (pendiente, ordenada al origen, coeficiente de correlación) y sus respectivos cálculos estadísticos para realizar las pruebas de hipótesis respectivas y cálculos de intervalo de confianza.

Esta prueba de linealidad se volvió a realizar una segunda ocasión tiempo después para comprobar que el sistema era repetitivo en esta prueba. Los resultados de esta prueba y su procesamiento de información se encuentran en el anexo 1.

Precisión del sistema

La solución madre utilizada fue la misma preparada para la curva patrón con concentración de 49.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En este caso se prepararon 8 soluciones de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (se tomó un volumen de 25mL de la solución madre y se aforó con agua a 50mL).

Se analizó cada una en el espectrofotómetro UV-Visible tres veces de manera independiente y una vez obtenidas las absorbancias se calcularon los parámetros estadísticos indicativos de precisión (coeficiente de variación, desviación estándar, media) y las pruebas de hipótesis respectivas.

Esta prueba de precisión del sistema se volvió a realizar una segunda ocasión tiempo después. Los resultados de esta prueba y su procesamiento de información se encuentran en el anexo 2.

Estabilidad de estándares

Esta prueba sólo se realizó por Cromatografía de líquidos, como técnica de separación que permite determinar si la disolución estándar presentaba impurezas o degradaciones.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)

En este trabajo se evaluaron los siguientes parámetros: condiciones óptimas de trabajo, linealidad, precisión y estabilidad de estándares.

CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO^{16,19,20,21,22}

En condiciones óptimas de trabajo sólo se realizó el cálculo para eficiencia y factor de capacidad por tenerse sólo la presencia del pico de cefalexina.

Fundamento para la fase móvil

Analizando la información obtenida en: United States Pharmacopoeia 28; British Pharmacopoeia; European Pharmacopoeia; y del Journal of Chromatography A de 1995-1996; se observó que las posibles fases móviles a utilizar son:

- a) Mezcla de 2 volúmenes de metanol, 5 volúmenes de acetonitrilo, 10 volúmenes de una solución de difosfato de potasio a 13.6g/L y 83 volúmenes de agua.
- b) Agua, acetonitrilo, metanol y trietanolamina (850:100:50:15), ajustar el pH con ácido fosfórico a 3.
- c) (25:75) metanol – agua (con 1.25% de ácido acético glacial).

Debido a que la mezcla que contiene sales de fosfato corre el riesgo de dejar residuos sólidos dentro del sistema y causar diferentes problemas; y a la facilidad de preparar una disolución con ácido acético y no una con trietanolamina que tuviera que ser ajustada a un pH determinado, se eligió el uso de la mezcla (c) metanol y agua con ácido acético glacial.

Longitud de onda de trabajo

Para conocer las condiciones óptimas de trabajo en el cromatógrafo de líquidos a utilizar en este trabajo, se realizaron determinaciones previas entre ellas la de la longitud de onda de máxima absorción, esta parte ya fue explicada en las condiciones óptimas de trabajo de espectroscopia UV-Visible.

La longitud de onda de máxima de absorción (262nm) del monohidrato de cefalexina será la utilizada en el detector del equipo cromatográfico (figura. 27).

Condiciones cromatográficas^{21,22,23,24}

Una vez obtenida la longitud de onda de máxima de absorción, se procedió a encontrar las condiciones óptimas en el cromatógrafo de líquidos, aquí hay que recordar que en la mayoría de las formulaciones como tabletas y cápsulas la cefalexina es el único principio activo, se buscará el tener un tiempo de análisis corto para poder realizar una

mayor cantidad de muestras, aquí no es preocupante la resolución por no tenerse otros compuestos que se detecten en el instrumento.

Por lo tanto se procedió a inyectar la muestra bajo las siguientes condiciones:

- 1) Columna de acero inoxidable empacada con fase estacionaria químicamente unida Luna de C₁₈ de 50mm de longitud x 4.6mm de d.i. y tamaño de partícula de 5µm, con un tamaño de poro de 100Å.
- 2) Fase móvil: 25% Metanol y 75% Agua (con 1.25% de ácido acético glacial)
- 3) Flujo: 1mL/min
- 4) Longitud de máxima absorción: 262nm
- 5) Presión: 3.6 a 4.0MPa

Para realizar esto se preparó una solución madre de cefalexina de aproximadamente 100ppm y se diluyó a una concentración de aproximadamente 10ppm; esta última fue la que se inyectó en el cromatógrafo (estas soluciones fueron las mismas soluciones empleadas en la determinación de la longitud de máxima absorción); se obtuvo el cromatograma de la figura. 28 en el que solo se observa el pico de la cefalexina (tr=2min) y el del tiempo muerto del sistema (tr=0.6min)

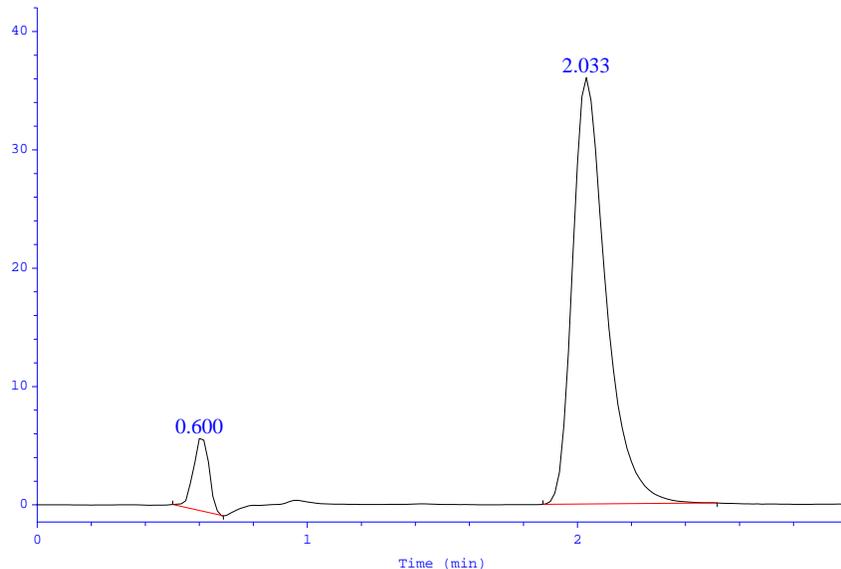


Figura. 28. Cromatograma de Cefalexina.

Debido a que el tiempo de análisis se consideró adecuado, ya no se realizó ninguna modificación sobre las condiciones cromatográficas, sin embargo, se realizaron los cálculos correspondientes a los siguientes parámetros cromatográficos:

Eficiencia cromatográfica de la figura 5:

$$N = 5.545 \left(\frac{tr'}{W_{0.5}} \right)^2$$

$$N = 5.545 \left(\frac{2.033\text{min}}{0.128\text{min}} \right)^2 = 1397.54$$

Factor de Capacidad para el cromatograma de la figura . 5:

$$k' = \frac{tr'}{t_0}$$
$$k' = \frac{(2.033\text{min} - 0.600\text{min})}{0.600\text{min}} = 2.3883$$

VALIDACIÓN DEL SISTEMA

Linealidad

Tomando en cuenta las siguientes consideraciones de control de calidad:

-Para realizar la curva patrón y realizar la prueba de linealidad se recomienda que el analista prepare por lo menos por triplicado cinco niveles de concentración (intervalo) de la solución de referencia ya sea por dilución (a partir de una misma solución concentrada) o por pesadas independientes (cuando no sea posible prepararlas por dilución).

La concentración central de estas soluciones debe ser igual a la que se prepara en la solución de referencia en el método o, en ciertos casos, la concentración que represente el 100% en la muestra procesada para su medición.

Se planteó que como las tabletas de cefalexina existen predominantemente en presentaciones de 500 y 250mg, se debía preparar una solución madre que contuviera aproximadamente 10mg/mL del monohidrato de cefalexina, se pesaría una cantidad equivalente a 500 ó 250mg de cefalexina, y se disolverían en aprox. 50mL y 25mL de agua respectivamente; se puede filtrar si fuera necesario. Partiendo de esta solución, se transferirán 10µl de una solución de 10mg/mL hacia un matraz volumétrico de 10mL para obtener una concentración final de 10µg/mL.

Se sabe que el criterio de aceptación de la cantidad contenida de cefalexina en sus formas farmacéuticas es de 90% al 120%; para abarcar estos porcentajes, se propone que si 10µg/mL es la concentración central (100%), el 80% sería 8 µg/mL, el 50% sería 5 µg/mL, el 120% sería 12 µg/mL, y 150% sería 15 µg/mL.

Con lo razonado anteriormente se prepararon las soluciones estándar de la curva patrón de la siguiente manera:

- Solución Madre: Se pesaron 13.2mg de monohidrato de cefalexina y se diluyó a 10mL con agua, tomando en cuenta la pureza (94.78%) y la molécula de hidratación, se obtuvo una solución de 1,189.37µg/mL de cefalexina.
- Niveles de concentración de las soluciones estándar preparadas en agua:

Concentración (µg/mL)	Alicuota (µL) de la solución madre.	Volumen del aforo (mL)
4.8	20	5
7.6	32	5
9.5	40	5
11.4	48	5
14.3	60	5

De las disoluciones estándar mencionadas arriba se prepararon 2 matraces de cada una.

Una vez preparadas estas soluciones, se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos por triplicado y se obtuvieron de los cromatogramas las áreas de los picos, con lo cuál se realizó la curva patrón y se obtuvieron los datos necesarios para el análisis de

regresión lineal (pendiente, ordenada al origen, coeficiente de correlación) y sus respectivos cálculos estadísticos para realizar las pruebas de hipótesis respectivas y cálculos de intervalo de confianza.

Esta prueba de linealidad se volvió a realizar una segunda ocasión tiempo después para comprobar que el sistema era repetitivo en esta prueba. Los resultados de esta prueba y su procesamiento de información se encuentran en el anexo 3.

Precisión del sistema

Para este estudio el analista debe preparar como mínimo por sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la solución de referencia utilizada, o en ciertos casos, la concentración que represente el 100% de la muestra procesada para su medición; preparadas por dilución o por pesadas independientes.

La solución madre utilizada fue la misma de la curva patrón con concentración de 1,189.37 μ g/mL.

En este análisis se prepararon ocho soluciones de 9.51 μ g/mL (éstas se obtuvieron tomando un volumen de 40 μ l de la solución madre y aforando a 5 mL con agua).

Se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos por triplicado y una vez obtenidas las áreas se calcularon los parámetros estadísticos indicativos de repetibilidad (coeficiente de variación, desviación estándar, media) y las pruebas de hipótesis respectivas.

Esta prueba de precisión del sistema se volvió a realizar una segunda ocasión tiempo después. Los resultados de esta prueba y su procesamiento de información se encuentran en el anexo 4.

Estabilidad de estándares

Para esta prueba se prepararon 6 soluciones frescas de 10 μ g/mL y se inyectaron por triplicado el mismo día en que fueron preparadas, siendo éste el día 0, se guardaron a las siguientes condiciones de almacenamiento: en viales ámbar y sellada la tapa con cinta de teflón y conservadas en refrigeración (aproximadamente. 4°C).

Se inyectaron por triplicado de nuevo después de 4 días, se realizaban las pruebas estadísticas necesarias que indicaran si se mantenían estables ese tiempo de almacenamiento, al aprobar éstas se procedió a inyectar de nuevo a los 12 días y al aprobar ésta, hasta los 20 días. No se procedió a realizar a más días por considerar suficiente este tiempo (se podría decir que hasta pasado) para almacenar muestras para su estudio.

Las soluciones preparadas para esta prueba se realizaron de la siguiente manera, se pesaron 14.3mg de monohidrato de cefalexina que fueron disueltos a un volumen de aforo de 10mL, tomando en cuenta la pureza (94.78%) se obtuvo una solución madre de 1,288.6 μ g/mL. De esta solución se tomaron 39 μ L y se diluyeron en un matraz volumétrico de 5mL, obteniéndose una concentración de 10 μ g/mL.

Los resultados de esta prueba y su procesamiento de información se encuentran en el anexo 5.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Y

ANÁLISIS DE

RESULTADOS

ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

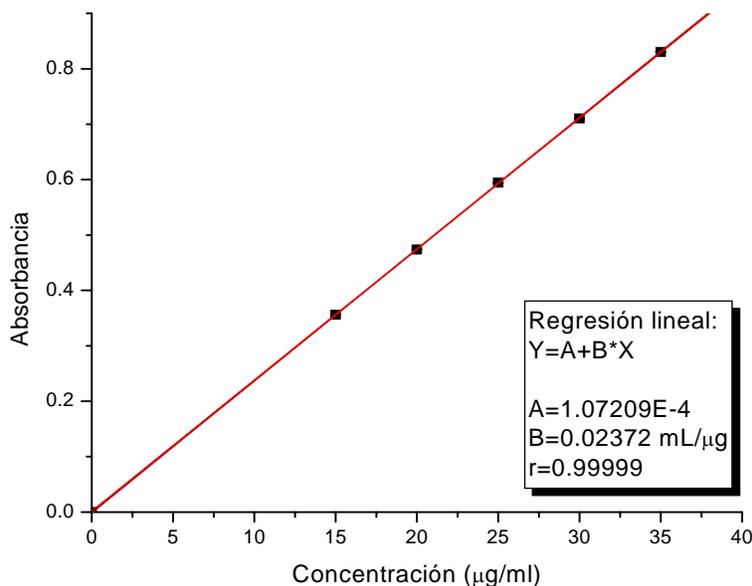
VALIDACIÓN DEL SISTEMA

Linealidad

Para demostrar que la respuesta es directamente proporcional a la concentración, se realizó la curva patrón a un intervalo de 15 a 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Concentración $\mu\text{g}/\text{mL}$	Absorbancia ($\lambda_{\text{max.}} = 262\text{nm}$)		
	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
0	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.3561	0.356	0.3561
20	0.4729	0.4742	0.4747
25	0.5944	0.5944	0.5942
30	0.7104	0.7107	0.7102
35	0.8305	0.8305	0.8304

Estos resultados dan la siguiente gráfica y la regresión lineal:



Gráfica No. 1. Curva patrón de Cefalexina por Espectroscopia UV-Vis.

Los resultados de la regresión lineal obtenidos de la curva patrón son:

Ordenada al origen	0.0001
Pendiente	0.02372mL/ μ g
Coefficiente de regresión	0.9999

En la gráfica No. 1 se puede observar que existe una tendencia lineal y los datos tienden al origen, para confirmar lo que se ha observado en la gráfica, es necesario realizar la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen.

Para esto se realiza la siguiente prueba de hipótesis:

Hipótesis nula $H_0: b = \beta$, donde $\beta = 0$

Hipótesis alterna $H_1: b \neq \beta$

Se aplica para esta prueba de hipótesis el estadístico de prueba "t de student", por lo que se realiza el cálculo de la t:

$$t_{calc} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + n\bar{X}^2}} = 1.050$$

donde:

$$\bar{X} = 20.833$$

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right)^2 = 2312.5$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)^2 = 1.30075$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right) \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right) = 54.845$$

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)nS_{xx}}} = 0.000206978$$

Como se trata de una prueba bilateral o de dos colas para un nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0.05$), y tomando en cuenta los grados de libertad (g. l. = $n - 2 = 16 - 2 = 14$), obtenemos que la t de tablas es:

$$t_{\alpha/2} = 2.145$$

Para rechazar la hipótesis nula (H_0) se tiene que cumplir la siguiente condición

$$t_{\text{cal.}} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{\text{cal.}} > t_{\alpha/2}$$

Con lo anterior se puede concluir, que como $2.145 > 0.665$, no se rechaza la hipótesis nula y por lo tanto la ordenada al origen es igual a cero.

Una vez hecho lo anterior se realiza el cálculo del intervalo de confianza al 95% de significancia para la ordenada al origen:

$$IC = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{Sxx + (n\bar{X})^2}{nSxx}}$$

$$IC = 0.0001 \pm 0.0002$$

$$-0.0001 < \beta < 0.0003$$

El cálculo del intervalo de confianza al 95% de significancia para la pendiente es:

$$IC = m \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{Sxx}}$$

$$IC = 0.02371 \pm 0.00001$$

$$0.02370 < \gamma < 0.02372$$

Las tablas excel que explican los cálculos anteriores con sus datos respectivos se encuentran en el anexo 1.

Precisión

Los resultados obtenidos en ésta prueba son:

Absorbancia ($\lambda_{\text{max.}} = 262\text{nm}$)			
Conc. $\mu\text{g/mL}$	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
25	0.5921	0.5915	0.5916
25	0.5922	0.5918	0.5919
25	0.5921	0.5919	0.5917
25	0.5917	0.5929	0.5916
25	0.592	0.5918	0.5921
25	0.5916	0.5917	0.5922
25	0.5917	0.5925	0.5915
25	0.5915	0.5919	0.5910
\bar{x}	0.59185		
s	0.00038		
C.V.	0.065%		

Para conocer el grado en que concuerdan las diferentes mediciones de absorbancia obtenida por el equipo de espectroscopia ultravioleta-visible de la misma

muestra homogénea del principio activo analizado, bajo las mismas condiciones y analista, es necesario utilizar la prueba estadística χ^2 para evaluar la precisión del sistema por lo tanto la prueba de hipótesis propuesta es:

Hipótesis nula $H_0: s^2 = \sigma_0^2$, donde σ_0^2 es de considerar 5% del coeficiente de variación lo que da un valor de 0.00088

Hipótesis alterna $H_1 = s^2 > \sigma_0^2$

Como el estadístico de prueba utilizado es la χ^2 se realiza el cálculo de ésta con los datos experimentales:

$$\chi_{calc}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = 0.004$$

Por ser una prueba de tipo unilateral y con un $\alpha = 0.05$ y con g. l. = 24 - 1 = 23; nos da una ji de tablas igual a:

$$\chi_{0.05}^2 = 35.172$$

La condición para rechazar H_0 es:

$$\chi_{calc}^2 > \chi_{\alpha}^2$$

$$\chi_{calc}^2 > \chi_{0.05}^2$$

Con lo cual podemos concluir que $0.004 < 35.172$, por lo tanto la hipótesis nula no se rechaza, el sistema es preciso, con un error máximo del 5%, con los resultados se logró obtener menos del 1%.

Posteriormente se calcula el intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia para s.

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_2^2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_1^2}}$$

donde:

$$\chi_1^2 = \chi_{0.975}^2 = 11.689$$

$$\chi_2^2 = \chi_{0.025}^2 = 38.076$$

Por lo que tenemos:

$$IC = 0.00030 < s < 0.00054$$

$$IC = 0.00030 < 0.00038 < 0.00054$$

Las tablas excel que explican los cálculos anteriores con sus datos respectivos se encuentran en el anexo 2.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)

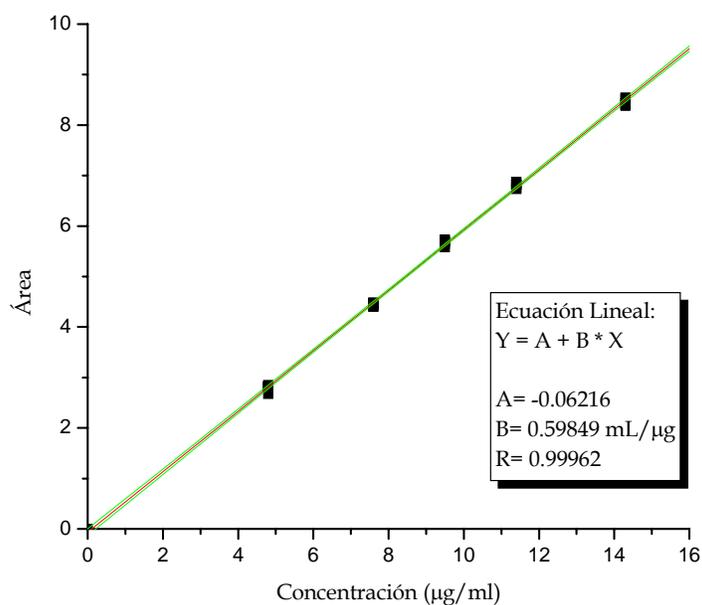
VALIDACIÓN DEL SISTEMA

Linealidad

Para demostrar que la respuesta es directamente proporcional a la concentración, se realizó la curva patrón a un intervalo de 5 a 15 μ g/mL. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Conc. ppm	Área	Conc. ppm	Área
0.0	0.000	9.5	5.58
4.8	2.673	9.5	5.581
4.8	2.818	9.5	5.642
4.8	2.811	11.4	6.736
4.8	2.848	11.4	6.813
4.8	2.805	11.4	6.85
4.8	2.817	11.4	6.75
7.6	4.469	11.4	6.874
7.6	4.473	11.4	6.817
7.6	4.486	14.3	8.431
7.6	4.405	14.3	8.521
7.6	4.432	14.3	8.523
7.6	4.406	14.3	8.384
9.5	5.694	14.3	8.546
9.5	5.688	14.3	8.400
9.5	5.728		

Estos resultados dan la siguiente gráfica y regresión lineal:



Gráfica No.2. Curva Patrón de Cefalexina por CLAE.

Los resultados de la regresión lineal obtenidos de dicha curva patrón son:

Ordenada al origen	-0.06216
Pendiente	0.59849mL/µg
Coefficiente de regresión	0.9996

En la gráfica No. 2 se puede observar que existe una tendencia lineal y que además los datos tienden al origen, para confirmar lo que se ha observado en la gráfica, es necesario realizar la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen.

Prueba de hipótesis:

Hipótesis nula $H_0: b = \beta$, donde $\beta = 0$

Hipótesis alterna $H_1: b \neq \beta$

Se aplica para esta prueba de hipótesis el estadístico de prueba "t de student", por lo que se realiza el cálculo de la:

$$t_{calc} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + nX^2}} = -1.940$$

$$\bar{X} = 9.21$$

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right)^2 = 402$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)^2 = 144$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right) \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right) = 240$$

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)nS_{xx}}} = 0.064934$$

Como se trata de una prueba bilateral o de dos colas para un nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0.05$), y tomando en cuenta los grados de libertad (g. l. = $n - 2 = 31 - 2 = 29$), obtenemos que la t de tablas es:

$$t_{\alpha/2} = 2.045$$

Para rechazar la hipótesis nula (H_0) se tiene que cumplir la siguiente condición

$$t_{\text{calc}} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{\text{calc}} > t_{\alpha/2}$$

Con lo anterior se puede concluir, que como $-1.940 > -2.045$ por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula y la ordenada es igual a cero.

Una vez hecho lo anterior se calculo el intervalo de confianza al 95% de significancia para la ordenada al origen:

$$IC = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$$

$$IC = -0.062 \pm 0.065$$

$$-0.127 < \beta < 0.003$$

El cálculo del intervalo de confianza al 95% de significancia para la pendiente es:

$$IC = m \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$$

$$IC = 0.598 \pm 0.006$$

$$0.592 < \gamma < 0.605$$

Las tablas excel que explican los cálculos anteriores con sus datos respectivos se encuentran en el anexo 3.

Precisión

Los resultados obtenidos en esta prueba son:

ÁREA			
Conc. ppm	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
9.51	5.50591	5.70338	5.75955
9.51	5.60246	5.6406	5.77414
9.51	5.6175	5.64592	5.69868
9.51	5.69358	5.58649	5.68118
9.51	5.68153	5.70739	5.7325
9.51	5.66307	5.38149	5.64918
9.51	5.7476	5.6933	5.69411
9.51	5.75031	5.78112	5.66008
\bar{x}	5.66879		
s	0.08829		
CV	1.56%		

Para conocer el grado en que concuerdan las diferentes mediciones de área obtenida por el equipo de cromatografía de líquidos de la misma muestra homogénea del principio activo analizado, bajo las mismas condiciones y analista, es necesario utilizar la prueba estadística χ^2 para evaluar la precisión del sistema por lo tanto la prueba de hipótesis propuesta es:

Hipótesis nula $H_0: s^2 = \sigma_0^2$, donde σ_0^2 es de considerar 5% del coeficiente de variación lo que da un valor de 0.08034

Hipótesis alterna $H_1 = s^2 > \sigma_0^2$

Como el estadístico de prueba utilizado es la χ^2 se realiza el cálculo de ésta con los datos experimentales:

$$\chi_{calc}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = 2.232$$

Por ser una prueba de tipo unilateral y con un $\alpha = 0.05$ y con g. l. = 24 - 1 = 23; nos da una j_i de tablas igual a:

$$\chi_{0.05}^2 = 35.172$$

La condición para rechazar la H_0 es:

$$\chi_{calc}^2 > \chi_{\alpha}^2$$
$$\chi_{calc}^2 > \chi_{0.05}^2$$

Con lo cual podemos concluir que $2.232 < 35.172$, por lo tanto la hipótesis nula no se rechaza, el sistema es preciso, con un error máximo del 5%. Lográndose obtener con mayor entrenamiento al analista, que sea menor al 2%.

Posteriormente se calcula el intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia para s .

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_2^2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_1^2}}$$

donde:

$$\chi_1^2 = \chi_{0.975}^2 = 11.689$$

$$\chi_2^2 = \chi_{0.025}^2 = 38.076$$

Por lo que tenemos:

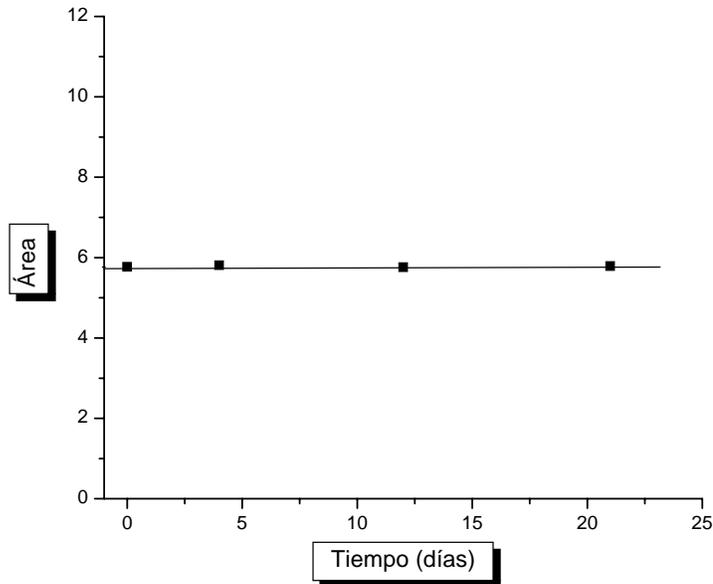
$$IC = 0.0686 < s < 0.1239$$

$$IC = 0.0686 < 0.08829 < 0.1239$$

Las tablas excel que explican los cálculos anteriores con sus datos respectivos se encuentran en el anexo 4.

Estabilidad de los estándares

Como se puede observar en la gráfica número 3 los datos obtenidos por las soluciones estándar en los diferentes días en que fueron analizados para ésta prueba se mantienen estables hasta los 20 días, pero para confirmar lo anterior se realizarán las pruebas estadísticas respectivas.



Gráfica No.3. Gráfica de Estabilidad de Soluciones de Cefalexina .

Para ésta prueba como se realizan en días diferentes se ejemplificarán los cálculos para el primer y último día siendo semejantes las pruebas para los otros días y los resultados de éstas pruebas se encuentran en el anexo 5.

Para conocer si las disoluciones estándar preparadas para este estudio de la cuantificación del principio activo (cefalexina) conservan su integridad fisicoquímica y su concentración, después de haberlas almacenado durante 0, 4, 12 y 20 días, a las condiciones indicadas en el capítulo de desarrollo experimental, se propone la siguiente prueba de hipótesis sobre las varianzas:

$$\text{Hipótesis nula} \quad H_0 = s_1^2 = s_2^2$$

$$\text{Hipótesis alterna} \quad H_1 = s_1^2 \neq s_2^2$$

Se aplica la prueba F de Fisher o Snedecor para determinar la precisión de trabajo del analista, por lo que realizamos el cálculo de:

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{0.0121}{0.0118} = 1.02$$

Calculando con un alfa igual a 0.05 (nivel de significancia del 95%) y tomando los grados de libertad tanto para n mayor-1 y n menor-1 = 18-1 = 17 se obtiene en tablas la siguiente:

$$F_{\alpha/2} = 2.27$$

Como la F_{cal.} (1.02) es menor a la F de tablas (2.27), no se rechaza la H₀ y las varianzas de ambos días de análisis son iguales, comprobando así la precisión de trabajo del analista, entre la determinación del día 0 al día 20 por lo anterior se realizará la prueba de medias considerando varianzas iguales.

Prueba de hipótesis sobre las medias:

$$\text{Hipótesis nula} \quad H_0 = \bar{x}_1 = \bar{x}_2$$

$$\text{Hipótesis alterna} \quad H_1 = \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$$

Se aplica la prueba "t de student", tomando en cuenta que en la prueba anterior las varianzas fueron iguales, se realiza el siguiente cálculo:

$$t_{cal} = \frac{\bar{X}_2 - \bar{X}_1}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n} + \frac{s_2^2}{n}}} = -0.52$$

Para un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05$) y con los grados de libertad n mayor+ n menor -2 = 18+18-2= 34, se obtiene en tablas:

$$t_{\alpha/2} = -2.03$$

Para rechazar la hipótesis nula (H₀) se tiene que cumplir la siguiente condición

$$t_{cal} < -t_{\alpha/2} \quad \text{ó} \quad t_{cal} > t_{\alpha/2}$$

Como -0.52 > -2.03 por lo tanto no se rechaza H₀ lo que indica que las muestras son de la misma población y que las disoluciones estándar se mantienen estables por lo menos 20 días bajo las condiciones de almacenamiento indicadas en este trabajo.

Las tablas excel que explican los cálculos anteriores con sus datos respectivos se encuentran en el anexo 5.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

Después del tratamiento estadístico de los datos obtenidos y el análisis de la información obtenida de estos cálculos se llegó a las siguientes conclusiones para cada técnica:

Espectroscopia UV-Visible:

- Experimentalmente se obtuvo la longitud de onda de máxima absorción de la sustancia monohidrato de cefalexina el cuál es de 262nm, que es el mismo reportado en la literatura.
- El sistema presenta tendencia lineal en el intervalo de 15 a 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y tiende al origen por lo que se puede aplicar la ecuación de Lambert -Beer.
- Las pruebas de hipótesis realizadas a las curvas de calibración demostraron tendencia al origen con un coeficiente de correlación mayor a 0.98, lo que indica que la variable dependiente (señal) es directamente proporcional a la independiente (concentración) obteniéndose buena linealidad.
- Se determinó el valor del intervalo de confianza a la ordenada (0.0001 ± 0.0002) y a la pendiente del sistema lineal ($0.02372\text{mL}/\mu\text{g}$), lo cual permitirá llevar un control de calidad del sistema en otras etapas posteriores.
- Presenta una precisión menor al 5% que es la que normalmente se establece en el desarrollo de metodologías y cumple ser menor al 3% como lo pide la NOM-177-SSA1-1998.

Cromatografía de Líquidos:

- Basados en la revisión bibliográfica que se realizó en este trabajo, en la que se encontró que la mayoría de las metodologías incluían para el análisis cualitativo y cuantitativo a la técnica de fase inversa con una fase C_{18} y disolventes polares que podían ir desde acetonitrilo, metanol y agua o mezcla de ellos, se eligió para este trabajo utilizar la mezcla metanol-agua.
- Al realizar las modificaciones del porcentaje de la mezcla de la fase móvil mencionada en el punto anterior y poder obtener el menor tiempo de análisis en el sistema para la cefalexina, se logró realizar éste en un tiempo máximo de 3 minutos a las condiciones óptimas de trabajo para el sistema y que son las siguientes:
 - 1) Columna de acero inoxidable empacada con fase estacionaria químicamente unida Luna de C_{18} de 50mm de longitud x 4.6mm de d.i. y tamaño de partícula de $5\mu\text{m}$, con un tamaño de poro de 100Å .
 - 2) Fase móvil: 25% Metanol y 75% Agua (con 1.25% de ácido acético glacial)
 - 3) Flujo: $1\text{mL}/\text{min}$
 - 4) Longitud de máxima absorción: 262nm
 - 5) Presión: 3.6 a 4.0MPa
- El sistema presenta tendencia lineal en el intervalo de 5 a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y además tiende al origen por lo que se puede aplicar la ecuación de:
$$\text{Área} = \text{Factor de respuesta} \times \text{Concentración}$$

Es decir, el método de estándar externo como tal.

- Las pruebas de hipótesis realizadas a las curvas de calibración demostraron tendencia al origen, con un coeficiente de correlación mayor a 0.99, lo que indica que la variable dependiente (señal) es directamente proporcional a la independiente (concentración) obteniéndose buena linealidad.
- Se determinó el valor del intervalo de confianza a la ordenada (-0.062 ± 0.065) y a la pendiente del sistema lineal ($0.59849 \text{ mL}/\mu\text{g}$), lo cual permitirá llevar un control de calidad del sistema en otras etapas posteriores.
- Presenta una precisión menor al 5% que es la que normalmente se establece en el desarrollo de metodologías y cumple de tener más experiencia el analista en el trabajo ser menor al 2% como lo pide la NOM-177-SSA1-1998.

Visualizando la información global podemos concluir de las dos técnicas que:

- Proporcionan una detección adecuada de la cefalexina al nivel de concentraciones en que se encuentra en la forma farmacéutica.
- Presentan buena linealidad que cumple con los requisitos establecidos por la industria farmacéutica (r o $r^2 > 0.98$) y tienden al origen, permitiendo aplicar las ecuaciones cuantitativas base de las respectivas técnicas.
- Presentan buena precisión $CV < 5\%$, lográndose por parte del analista cumplir con lo señalado por la industria farmacéutica, para Espectroscopia UV-Vis $< 3\%$ y CLAE $< 2\%$.

Después de concluir específicamente sobre las dos técnicas se llega a las siguientes conclusiones en cuanto a sus ventajas y desventajas de cada técnica para analizar Cefalexina:

- En cuanto al manejo de los equipos y su conocimiento teórico del fenómeno, la técnica de espectroscopia UV-Vis es más rápida que en el caso de la Cromatografía de líquidos y por lo tanto su aplicación.
- La cantidad de muestra que se utiliza para introducir a la Cromatografía de líquidos es menor (microlitros) a la analizada por UV-Visible, siendo posible disminuir la cantidad de reactivos utilizados en la preparación de muestras al utilizar la técnica cromatográfica.
- La adquisición de un equipo de HPLC resulta más cara que un equipo UV-Visible, pero esto se puede amortiguar al automatizar al equipo de CLAE lo que le permitirá a la industria la posibilidad de disminuir tiempos de análisis y mejorar la productividad del equipo dejándolo funcionando durante varios turnos de trabajo.
- El equipo UV-Visible no es fácilmente automatizable como con CLAE para este tipo de análisis, por lo que su uso requiere de más tiempo del analista al analizar un número grande de muestras por tiempo, y el analista debe permanecer activo frente a él por lo que no ahorra tiempo que podría ser utilizado para avanzar en otros análisis.

Observando las pendientes obtenidas por cada técnica, la sensibilidad de la técnica CLAE es mucho mayor a la que presenta la técnica Espectroscópica, lo que implica que la técnica CLAE es capaz de detectar cantidades más pequeñas de muestra.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.** Secretaría de Salud. NOM-177-SSA1-1998. "Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas."; publicada por el Diario Oficial de la Federación el 7 de mayo de 1999.
- 2.** Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos, Guía de Validación de Métodos Analíticos; editada por el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C., 2002.
- 3.** Goodman, L. S. Goodman and Gilman. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9ª edición. Vol. II. Editorial Mc-Graw-Hill-Interamericana. 1996.
- 4.** Mutschler, E., Derendorf, H. et al. Drug Actions. Basic Principles and Therapeutic Aspects. Editorial Medpharm Scientific Publishers. 1995.
- 5.** Goodman, L. S. Goodman and Gilman's. The Pharmacological Bases of Therapeutics. 10ª edición. Editorial Mc-Graw-Hill. Medical Publishing Division. 2001.
- 6.** Florey, K. Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. 4. Editorial Academy of Pharmaceutical Science. Nueva York. 1975
- 7.** Budavari, S. The Merck Index. 12ª edición. Nueva Jersey. 1996.
- 8.** Greenwood, D. Antimicrobial Chemotherapy. 3ª edición. Editorial Oxford Press. Nueva York. 1995.
- 9.** Rosenstein, S. E. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (PLM). 36ª Edición. Ediciones PLM. México, 1990.
- 10.** Skoog, D., Holler, J. y Nieman, T. A. Principios de Análisis Instrumental. 5ª edición. Editorial Mc-Graw-Hill. 2001.
- 11.** García, O. A. Estudio espectroscópico de esteroides. Tesis de licenciatura. UNAM. 1985.
- 12.** <http://www.shu.ac.uk/schools/sci/chem/tutorials/molspec/uwisab1.htm> (Febrero 2005)
- 13.** <http://html.rincondelvago.com/espectroscopia-de-absorción-molecular-uv-vis.html> (Febrero 2005)
- 14.** Harris, D. C. Análisis Químico Cuantitativo. 2ª edición. Editorial Reverté S.A. 2001.
- 15.** McNair, H. M. Cromatografía de líquidos de alta presión. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Monografía 10, Washington, D.C. 1973.
- 16.** United States Pharmacopoeia. NF28. Editorial The United Pharmacopoeial Convention. Inc. 2005.
- 17.** <http://www.fda.gov/cber/gdlns/ichq2bmeth.pdf> (Junio 2007)
- 18.** <http://www.fda.gov/cder/guidance/ichq2a.pdf> (Junio 2007)
- 19.** British Pharmacopoeia. Editorial Comission Office. Londres. 2004.
- 20.** European Pharmacopoeia. Editorial Council of Europe Strasbourg. 1997.
- 21.** Hsu, M. E., Lin, Y. S. y Chung, H. Journal of Chromatography A. Vol 692, páginas 67-72. Editorial Elsevier Science, 1995.

- 22.** Hsu, M. E., Lin, Y. S. y Chung, H. *Journal of Chromatography A*. Vol 727, páginas 239-244. Editorial Elsevier Science, 1996.
- 23.** Griffith, R. S. y Shedden, W. I. H. *The Lancet*. Volumen 297. Páginas 452-453. Editorial Elsevier Science. Febrero 1971.
- 24.** Gallo, M., Campíns, F. y Sevillano, C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Volumen 29. Páginas 405-423. Editorial Elsevier Science. Julio 2002.

ANEXO 1

CONC. $\mu\text{g/ml}(X_i)$	Absorbancia (Y_i)	$X_i * X_i$	$Y_i * Y_i$	$X_i * Y_i$
0	0	0	0.00000	0.0000
15	0.3561	225.00	0.12681	5.3415
15	0.356	225.00	0.12674	5.3400
15	0.3561	225.00	0.12681	5.3415
20	0.4729	400.00	0.2236	9.4580
20	0.4742	400.00	0.2249	9.4840
20	0.4747	400.00	0.22534	9.4940
25	0.5944	625.00	0.35331	14.8600
25	0.5944	625.00	0.35331	14.8600
25	0.5942	625.00	0.35307	14.8550
30	0.7104	900.00	0.50467	21.3120
30	0.7107	900.00	0.50509	21.3210
30	0.7102	900.00	0.50438	21.3060
35	0.8305	1,225.00	0.68973	29.0675
35	0.8305	1,225.00	0.68973	29.0675
35	0.8304	1,225.00	0.68956	29.06

$\Sigma X_i =$	375.000
$\Sigma Y_i =$	8.896
$\Sigma X_i * Y_i =$	240.172
$\Sigma X_i^2 =$	10,125
$\Sigma Y_i^2 =$	5.697
media $X_i =$	23.438
n =	16
g. l. =	14
$(n-2) * n =$	224
n * media =	375
$(n * media)^2 =$	140,625
$t_{\alpha/2}$	2.145
Sxx	1,335.938
Syy	0.75122
Sxy	31.679
Se	0.000234265
α	0.05

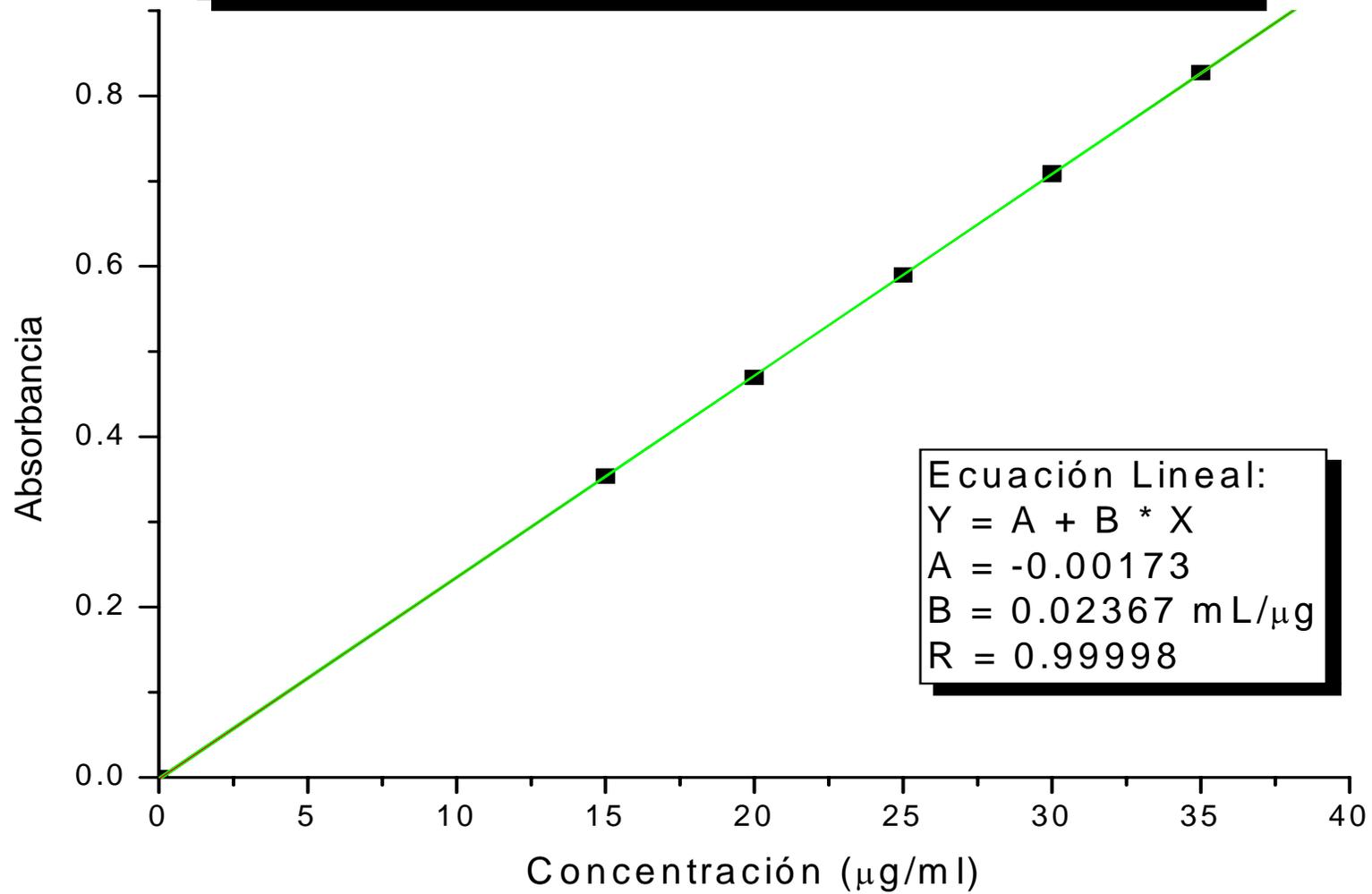
INTERVALO DE CONFIANZA	
ORDENADA	0.0001
MÍNIMO =	-0.0002
MÁXIMO =	0.0005

INTERVALO DE CONFIANZA	
PENDIENTE =	0.02371
MÁXIMO =	0.02372
MÍNIMO =	0.02369
tcal.	0.665

CONCLUSIÓN:
No rechazo H_0 con un nivel de significancia del 5%

CURVA PATRÓN POR UV-VIS MOSTRADA EN EL CAPÍTULO III

REPETICIÓN DE LA CURVA PATRÓN POR UV-VIS



CONC. µg/ml(Xi)	Absorbancia (Yi)	Xi*Xi	Yi*Yi	Xi*Yi
0	0	0	0.00000	0.0000
15	0.3535	225.00	0.12496	5.3025
15	0.3536	225.00	0.12503	5.3040
15	0.3541	225.00	0.12539	5.3115
20	0.4695	400.00	0.2204	9.3900
20	0.4694	400.00	0.2203	9.3880
20	0.4698	400.00	0.22071	9.3960
25	0.5898	625.00	0.34786	14.7450
25	0.5899	625.00	0.34798	14.7475
25	0.59	625.00	0.34810	14.7500
30	0.7074	900.00	0.50041	21.2220
30	0.7081	900.00	0.50141	21.2430
30	0.7102	900.00	0.50438	21.3060
35	0.8273	1,225.00	0.68443	28.9555
35	0.8272	1,225.00	0.68426	28.9520
35	0.8275	1,225.00	0.68476	28.96

$\Sigma Xi =$	375.000
$\Sigma Yi =$	8.847
$\Sigma Xi*Yi =$	238.976
$\Sigma Xi^2 =$	10,125
$\Sigma Yi^2 =$	5.640
media Xi =	23.438
n =	16
g. l. =	14
(n-2)*n =	224
n* media =	375
(n* media) ² =	140,625
t _{α/2}	2.145
Sxx	1,335.938
Syy	0.74828
Sxy	31.617
Se	0.00031732
α	0.05

INTERVALO DE CONFIANZA	
ORDENADA	-0.0017
MÍNIMO =	-0.0022
MÁXIMO =	-0.0013

INTERVALO DE CONFIANZA	
PENDIENTE =	0.02367
MÁXIMO =	0.02369
MÍNIMO =	0.02365
tcal.	-7.922

CONCLUSIÓN:
Rechazo H₀ con un nivel
de significancia del 5%

REPETICIÓN CURVA PATRÓN POR UV-VIS

ANEXO 2

Conc. $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia
25	0.5921
25	0.5922
25	0.5921
25	0.5917
25	0.592
25	0.5916
25	0.5917
25	0.5915
25	0.5915
25	0.5918
25	0.5919
25	0.5929
25	0.5918
25	0.5917
25	0.5925
25	0.5919
25	0.5916
25	0.5919
25	0.5917
25	0.5916
25	0.5921
25	0.5922
25	0.5915
25	0.591

$n = \bar{x}$	24
cal. =	0.59185
s =	0.0003822
s ² =	0.0000001461
%Cv cal. =	0.06457495
%CV =	5
$\sigma_0 =$	0.02959
$\sigma_0^2 =$	0.00088
α	0.05

$\chi^2_{0.975} = 1 - \alpha/2$	11.689
$\chi^2_{0.025} = \alpha/2$	38.076
$\chi^2_{0.05} = \alpha$	35.172

χ^2 cal. =	0.004
-----------------	-------

IC Máximo =	0.00054
IC Mínimo =	0.00030

CONCLUSIÓN :
No rechazo H_0 para un CV del 5%

PRECISIÓN POR UV-VIS MOSTRADA EN EL CAPÍTULO III

Conc. µg/mL	Absorbancia
25	0.588
25	0.5878
25	0.5878
25	0.5875
25	0.5875
25	0.5873
25	0.5911
25	0.5934
25	0.5934
25	0.5887
25	0.5885
25	0.5886
25	0.5894
25	0.5898
25	0.5946
25	0.5877
25	0.5876
25	0.5876
25	0.5917
25	0.5915
25	0.5915
25	0.5873
25	0.5875
25	0.5877

\bar{x}	n=	24
	cal.=	0.58931
	s =	0.0022549
	s ² =	0.000005085
	%Cv cal.=	0.38263402
	%CV=	5
	σ_0 =	0.02947
	σ_0^2 =	0.00087
	α	0.05

$\chi^2_{0.975} = 1-\alpha/2$	11.689
$\chi^2_{0.025} = \alpha/2$	38.076
$\chi^2_{0.05} = \alpha$	35.172

χ^2 cal.=	0.135
----------------	-------

IC MAXIMO =	0.00316
IC MINIMO =	0.00175

CONCLUSIÓN :
No rechazo H_0 para un CV del
5%

REPETICIÓN DE PRECISIÓN POR UV-VIS

ANEXO 3

CONC. µg/mL (Xi)	ÁREA (Yi)	Xi*Xi	Yi*Yi	Xi*Yi
0	0	0.00	0	0
4.8	2.67319	23.04	7	13
4.8	2.81792	23.04	8	14
4.8	2.81074	23.04	8	13
4.8	2.84821	23.04	8	14
4.8	2.80475	23.04	8	13
4.8	2.81698	23.04	8	14
7.6	4.46911	57.76	20	34
7.6	4.47299	57.76	20	34
7.6	4.48636	57.76	20	34
7.6	4.40511	57.76	19	33
7.6	4.43248	57.76	20	34
7.6	4.40606	57.76	19	33
9.5	5.6942	90.25	32	54
9.5	5.68837	90.25	32	54
9.5	5.72813	90.25	33	54
9.5	5.57991	90.25	31	53
9.5	5.5809	90.25	31	53
9.5	5.64179	90.25	32	54
11.4	6.73571	129.96	45	77
11.4	6.81335	129.96	46	78
11.4	6.84996	129.96	47	78
11.4	6.75019	129.96	46	77
11.4	6.87385	129.96	47	78
11.4	6.81652	129.96	46	78
14.3	8.43062	204.49	71	121
14.3	8.52056	204.49	73	122
14.3	8.52272	204.49	73	122
14.3	8.3836	204.49	70	120
14.3	8.54582	204.49	73	122
14.3	8.40046	204.49	71	120

$\Sigma Xi =$	286
$\Sigma Yi =$	169
$\Sigma Xi*Yi =$	1,797
$\Sigma Xi^2 =$	3,033
$\Sigma Yi^2 =$	1,065
media Xi =	9.21
n =	31
g. l. =	29
$(n-2)*n =$	899
n* media =	285.6
$(n* media)^2 =$	81,567
to/2	2.045
Sxx	402
Syy	144
Sxy	240
Se	0.064934
α	0.05

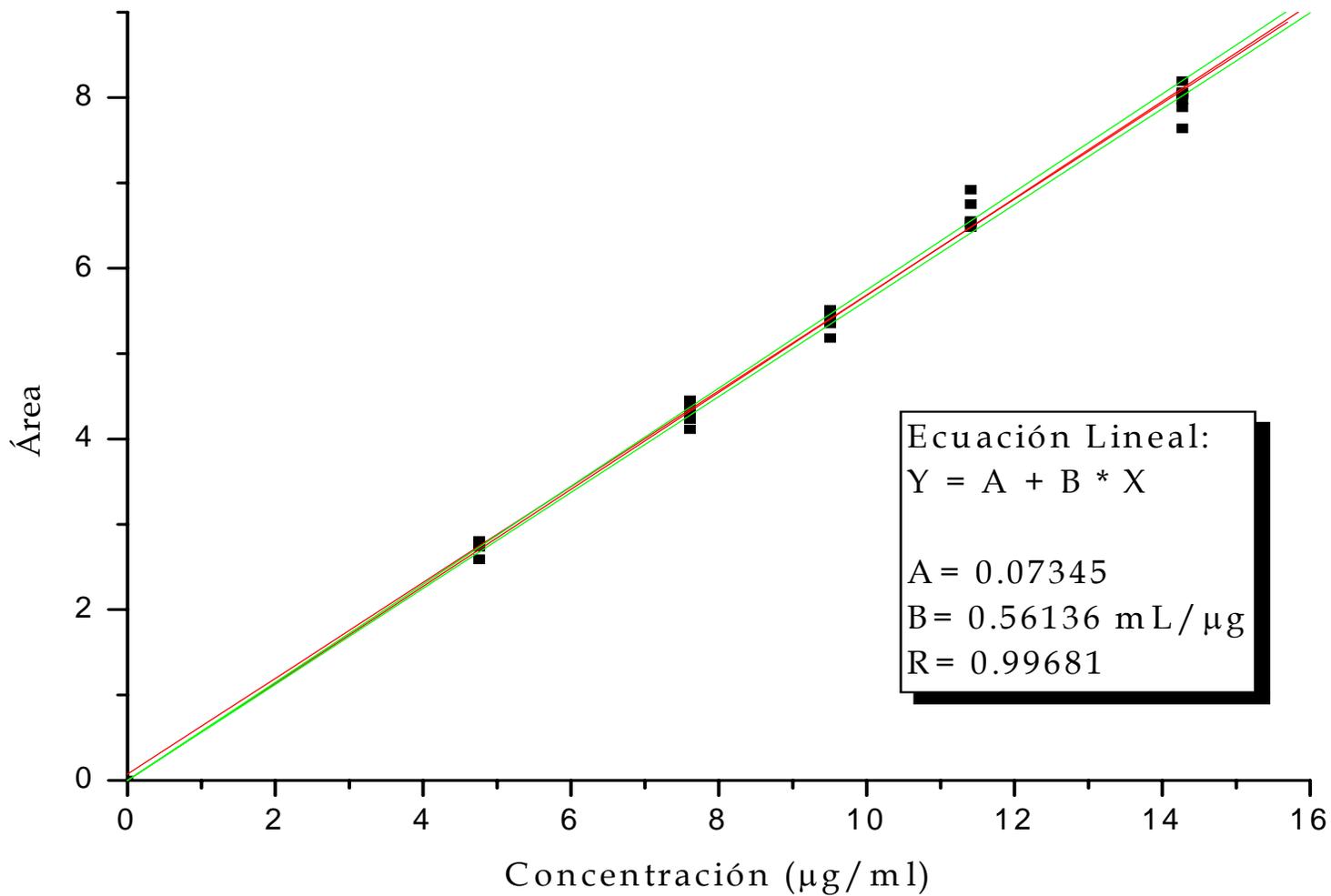
INTERVALO DE CONFIANZA	
ORDENADA	-0.062160
MÍNIMO =	-0.127695
MÁXIMO =	0.003375

INTERVALO DE CONFIANZA	
PENDIENTE =	0.59849
MÍNIMO =	0.6051154
MÁXIMO =	0.5918646
tcal.	-1.939916708

CONCLUSIÓN:
No rechazo H₀ con un nivel de significancia del 5%

CURVA PATRÓN POR CLAE MOSTRADA EN EL CAPÍTULO III

Repetición de Curva Patrón para CLAE de Cefalexina



CONC. μg/mL (Xi)	ÁREA (Yi)	Xi*Xi	Yi*Yi	Xi*Yi
0	0	0.00	0	0
4.8	2.7778	23.04	8	13
4.8	2.73516	23.04	7	13
4.8	2.75111	23.04	8	13
4.8	2.59033	23.04	7	12
4.8	2.80558	23.04	8	13
4.8	2.75985	23.04	8	13
7.6	4.11256	57.76	17	31
7.6	4.40683	57.76	19	33
7.6	4.3988	57.76	19	33
7.6	4.28888	57.76	18	33
7.6	4.45321	57.76	20	34
7.6	4.23202	57.76	18	32
9.5	5.47099	90.25	30	52
9.5	5.38638	90.25	29	51
9.5	5.47517	90.25	30	52
9.5	5.51463	90.25	30	52
9.5	5.34965	90.25	29	51
9.5	5.18295	90.25	27	49
11.4	6.919165	129.96	48	79
11.4	6.7507	129.96	46	77
11.4	6.75081	129.96	46	77
11.4	6.55367	129.96	43	75
11.4	6.48209	129.96	42	74
11.4	6.5331	129.96	43	74
14.3	8.03458	204.49	65	115
14.3	7.97391	204.49	64	114
14.3	8.1911	204.49	67	117
14.3	7.63883	204.49	58	109
14.3	7.88387	204.49	62	113
14.3	8.06419	204.49	65	115

$\Sigma Xi =$	286
$\Sigma Yi =$	162
$\Sigma Xi*Yi =$	1,722
$\Sigma Xi^2=$	3,033
$\Sigma Yi^2 =$	979
media Xi =	9.21
n =	31
g. l. =	29
$(n-2)*n =$	899
n* media =	285.6
$(n* media)^2=$	81,567
$t\alpha/2$	2.045
Sxx	402
Syy	128
Sxy	226
Se	0.171648
α	0.05

INTERVALO DE CONFIANZA	
ORDENADA	0.073450
MÍNIMO =	-0.099784
MÁXIMO =	0.246684

INTERVALO DE CONFIANZA	
PENDIENTE =	0.56136
MÍNIMO =	0.5788737
MÁXIMO =	0.5438463
tcal.	0.867162058

CONCLUSIÓN:
No rechazo H₀ con un nivel de significancia del 5%

REPETICIÓN DE LA CURVA PATRÓN POR CLAE

ANEXO 4

Conc. µg/mL	Área
9.51	5.50591
9.51	5.60246
9.51	5.6175
9.51	5.69358
9.51	5.68153
9.51	5.66307
9.51	5.7476
9.51	5.75031
9.51	5.70338
9.51	5.6406
9.51	5.64592
9.51	5.58649
9.51	5.70739
9.51	5.38149
9.51	5.6933
9.51	5.78112
9.51	5.75955
9.51	5.77414
9.51	5.69868
9.51	5.68118
9.51	5.7325
9.51	5.64918
9.51	5.69411
9.51	5.66008

n=	24
\bar{x} cal.=	5.66879
s =	0.08829
s ² =	0.00780
%Cv cal.=	1.557558084
%CV=	5
σ_0 =	0.28344
σ_0^2 =	0.08034
α	0.05

$\chi^2_{0.975} = 1-\alpha/2$	11.689
$\chi^2_{0.025} = \alpha/2$	38.076
$\chi^2_{0.05} = \alpha$	35.172

χ^2 cal.=	2.232
----------------	-------

IC MAXIMO =	0.1239
IC MINIMO =	0.0686

<p>CONCLUSIÓN : No rechazo H_0 para un CV del 5%</p>

PRECISIÓN POR CLAE MOSTRADA EN EL CAPÍTULO III

Conc. μg/mL	Área
9.51	5.20488
9.51	5.02911
9.51	5.19843
9.51	4.78376
9.51	5.08279
9.51	5.01173
9.51	4.81957
9.51	5.42859
9.51	5.28838
9.51	5.04653
9.51	4.96801
9.51	5.09051
9.51	4.6685
9.51	4.89705
9.51	5.07084
9.51	4.92267
9.51	4.94254
9.51	4.7711
9.51	4.64051
9.51	5.01857
9.51	5.17656
9.51	4.68434
9.51	5.14924
9.51	5.17831

n=	24
\bar{x} cal.=	5.00302
s =	0.20304
s ² =	0.04122
%Cv cal.=	4.058311052
%CV=	5
σ_0 =	0.25015
σ_0^2 =	0.06258
α	0.05

$\chi^2_{0.975} = 1-\alpha/2$	11.689
$\chi^2_{0.025} = \alpha/2$	38.076
$\chi^2_{0.05} = \alpha$	35.172

χ^2 cal.=	15.152
----------------	--------

IC Máximo =	0.2848
IC Mínimo =	0.1578

<p>CONCLUSIÓN : No rechazo H_0 para un CV del 5%</p>

REPETICIÓN DE PRECISIÓN POR CLAE

ANEXO 5

FECHA DÍA conc ppm	16-Jun-05 0 ÁREA	20-Jun-05 4 días ÁREA	28-Jun-05 12 días ÁREA	05-Jul-05 20 días ÁREA
10	5.67238	5.74484	5.58032	5.79536
10	5.79546	5.75366	5.62712	5.6947
10	5.60704	5.70527	5.60076	5.64293
10	5.58309	5.70642	5.70365	5.68475
10	5.61172	5.68208	5.60084	5.6728
10	5.61654	5.68967	5.66218	5.72134
10	5.87006	5.91698	5.82092	5.91137
10	5.87209	5.89416	5.83978	5.88589
10	5.89502	5.92713	5.89115	5.9336
10	5.87508	5.8156	5.90789	5.97024
10	5.79162	5.89439	5.8999	5.91926
10	5.88444	5.93754	5.89652	5.93504
10	5.71261	5.79091	5.78149	5.79818
10	5.80588	5.7398	5.79912	5.68325
10	5.87224	5.79669	5.76306	5.67176
10	5.83207	5.86721	5.75641	5.77388
10	5.84274	5.85899	5.77986	5.78414
10	5.78466	5.80148	5.83586	5.78427
n	18	18	18	18
\bar{x}	5.77	5.81	5.76	5.79
s	0.110	0.086	0.111	0.109
s²	0.0121	0.0075	0.0123	0.0118
c.v	1.90	1.49	1.92	1.88

Prueba de hipótesis sobre las varianzas del día 0 y 4 :

$$H_0 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1 = \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

n menor -1 =	17
n Mayor -1 =	17
F de tablas=	2.27
F calculada =	1.62

CONCLUSIÓN

F calculada < F tablas y no se rechaza H_0

Prueba de hipótesis sobre las medias del día 0 y 4 :

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = 0, \text{ es decir } , \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

nm =	18
nM =	18
nm + nM - 2 =	34
t de tablas =	2.03
t calculada =	-1.01

CONCLUSIÓN

t calculada > t tablas y la H_0 no se rechaza

ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENTRE EL DÍA 0 Y EL DÍA 4

Prueba de hipótesis sobre la varianza del día 0 y 12:

$$H_0 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1 = \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

n menor -1 =	17
n Mayor -1 =	17
F de tablas:	2.27
F calculada =	1.02

CONCLUSIÓN

F calculada < F tablas y no se rechaza H_0

Prueba de hipótesis sobre las medias del día 0 y 12:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = 0, \text{ es decir } , \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

G.L	34
t de tablas =	2.03
t calculada =	0.27

CONCLUSIÓN

t calculada < t tablas y la H_0 no se rechaza

ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENTRE EL DÍA 0 Y EL DÍA 12

Prueba de hipótesis sobre las varianzas del día 0 y 20:

$$H_0 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1 = \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

n menor -1 =	17
n Mayor -1 =	17
F de tablas=	2.27
F calculada =	1.02

CONCLUSIÓN

F calculada < F tablas y no se rechaza H_0

Prueba de hipótesis sobre las medias del día 0 y 20:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = 0, \text{ es decir } , \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

G.L	34
t de tablas =	2.03
t calculada =	-0.52

CONCLUSIÓN

t calculada > t tablas y la H_0 no se rechaza

ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENTRE EL DÍA 0 Y EL DÍA 20