



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE  
ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA Y  
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA  
EFICIENCIA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE  
CEFADROXILO EN CÁPSULAS**

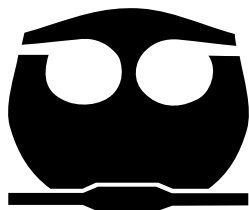
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACO-BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**VERÓNICA RAMOS CORZO**



**MÉXICO, D. F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Jurado asignado**

<b>Presidente</b>	Prof. Adolfo García Osuna
<b>Vocal</b>	Profa. María del Socorro Alpízar Ramos
<b>Secretario</b>	Profa. Georgina Artemisa Duarte Lisci
<b>1<sup>er</sup>. Suplente</b>	Prof. Ricardo Rodríguez Sáenz
<b>2<sup>o</sup>. Suplente</b>	Prof. Raúl Lugo Villegas

### **Sitio en el que se desarrolló el tema:**

Departamento de Química Analítica  
Edificio "A" Laboratorio 3B, 3E y 3F  
Facultad de Química Cd. Universitaria

### **Asesor del tema**

-----  
Q. Adolfo García Osuna

### **Supervisor técnico**

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

### **Sustentante**

-----  
Verónica Ramos Corzo

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICACIONES

Dedico y agradezco esta tesis a mis padres el Sr. Fernando Ramos Mercado y la Sra. Rebeca Corzo Zamudio, quienes me han criado y apoyado en todo momento de mi vida y porque gracias a ellos estudié y logré una carrera universitaria.

Agradezco a mis hermanos; Odevia, Fernando y Alejandra porque siempre podré contar con ellos en todo momento y porque siempre me apoyaron durante mis estudios en los momentos más difíciles; también agradezco a mis cuñados, Rafael e Itzel por ser parte de la familia y apoyarnos siempre.

Agradezco a mi perrita Manchitas porque aunque ella sin saberlo, me ha ayudado a entender muchas cosas que el humano pocas veces puede entender y porque cuando miro sus ojos, sé que Dios existe.

Agradezco a mis amigos Rubén Ángel Albor Avendaño (Q.A) porque con su amistad terminé la carrera y porque me impulsó a creer en mí cuando pensé que ya no podía, a Berenice, Agustín Maldonado, Adriana Daniel, Luis Ignacio, Oscar Luqueño, Alejandra Herrera, Luzdei, Nadia Vera, Humberto, Pavel y Paulina.

Agradezco a mis profesores de toda la carrera de Q.F.B por los conocimientos aprendidos y por su apoyo incondicional así como por sus enseñanzas de vida.

Agradezco a mi tutor de tesis el Q. Adolfo García Osuna y a su esposa Q.F.B Silvia Mendoza Arellano porque gracias a ellos logré aprender muchas cosas que son importantes y creo que esta tesis es un pequeño paso, pero una puerta grande al mundo de la industria y porque sé que siempre podré contar con ellos y seguir aprendiendo mucho.

Agradezco a mi novio Armando Benavides Kuri, porque aún cuando lo conocí afuera, quiero que sepa que me alegra que haya llegado a mi vida y que hoy tengo grandes motivos para seguir viviendo y trabajando, porque espero que en mi caminar en esta vida y al final de ella, se encuentre allí y se quede para siempre.

*Los sentimientos no se gobiernan, no son cosas de quitar y poner  
de acuerdo con las conveniencias del momento, menos todavía si,  
por la edad, es un corazón desprevenido y exento  
lo que llevamos dentro del pecho.*

Las pequeñas memorias, José Saramago.

*“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso.”*

Louis Pasteur (1822-1895)  
Químico y biólogo francés.

*“Las cosas en las cuales hay algo, aunque no estén determinadas para la eternidad, llegan, aún con retraso, a tiempo.”*

Martin Heidegger.

# ÍNDICE

	<b>Páginas</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>OBJETIVOS</b>	4
<b>CAPÍTULO I.ANTECEDENTES TEÓRICOS</b>	
CEFALOSPORINAS	6
CEFADROXILO	12
➤ Propiedades físicas y químicas	12
➤ Mecanismo de acción	13
➤ Reacciones secundarias y adversas	14
ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA	16
➤ Instrumentación	18
➤ Análisis Cualitativo	23
➤ Análisis Cuantitativo	24
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)	27
➤ Clasificación de técnicas cromatográficas	28
➤ Instrumentación	29
➤ Análisis Cualitativo	40
➤ Análisis Cuantitativo	41
VALIDACIÓN DE MÉTODOS	43
<b>CAPÍTULO II.METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	<b>53</b>
➤ Equipos y materiales	53
➤ Reactivos	53
➤ Condiciones óptimas de trabajo en UV	56
➤ Validación	56
➤ Condiciones óptimas de trabajo en HPLC	58
➤ Validación	59

<b>CAPÍTULO III.RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	71
VALIDACIÓN EN ESPECTROSCOPIA UV	
➤ Linealidad de sistema	71
➤ Precisión de sistema	74
➤ Precisión de método	76
✓ Repetibilidad con muestra preparada	76
✓ Repetibilidad con muestra comercial	78
➤ Recobro	79
VALIDACIÓN EN HPLC	
➤ Linealidad de sistema	81
➤ Precisión de sistema	85
➤ Precisión de método	87
✓ Repetibilidad con muestra sintética	87
✓ Repetibilidad con muestra comercial	89
➤ Recobro	91
<b>CAPÍTULO IV.CONCLUSIONES</b>	94
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	100
<b>ANEXO 1</b>	103
<b>ANEXO 2</b>	105
<b>ANEXO 3</b>	111

# **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



## INTRODUCCIÓN

Fue en 1948 cuando el doctor Giuseppe Brotzu aisló un microorganismo de las aguas del golfo de Cagliari, dicho microorganismo es el hongo microscópico *Cephalosporium acremonium* procedente de las aguas negras descargadas al mar.

El doctor Brotzu realizó pruebas con el hongo aislado utilizando diferentes microorganismos para establecer si había o no actividad antimicrobiana. Después de realizar las pruebas Brotzu verificó que el hongo tenía actividad antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, se podía utilizar además para el tratamiento de fiebre tifoidea e infecciones por estafilococos. Cuando el doctor Brotzu realizó el análisis del líquido donde se cultivó el hongo logró identificar tres compuestos diferentes, los tres tenían actividad como antibióticos. Estos tres antibióticos los llamó cefalosporinas P, N y C. De estos compuestos además, identificó la porción de la estructura que era responsable de la actividad antimicrobiana de las cefalosporinas.

Una vez que se logró determinar la estructura de la cefalosporina C se inició el auge de las cefalosporinas, realizando modificaciones en la estructura de dicha cefalosporina.

El cefadroxilo monohidratado es un antibiótico semisintético que pertenece al grupo de cefalosporinas de primera generación, el cual se caracteriza por ser un polvo blanco, soluble en agua y etanol que absorbe en el espectro ultravioleta a 263nm, posee un peso molecular de 363.4g/mol, un punto de ebullición de 197°C y es utilizado ampliamente en el tratamiento de enfermedades causadas por cocos grampositivos, ya sea en infecciones de la piel o tejido blando. Su mecanismo de acción es la inhibición de la pared celular bacteriana.

A nivel mundial se ha buscado desarrollar métodos analíticos adecuados para el análisis de medicamentos con el fin de asegurar la calidad y confianza de los mismos.

Para cumplir el propósito, todos los métodos deben ser sometidos a validación; mediante este proceso se comprueba si el método es confiable para su uso.

En la NOM-059-SSA1-1993 “Buenas Prácticas de Fabricación de medicamentos para establecimientos de la industria farmacéutica” estipula que

todos los métodos analíticos deben ser validados, así como la técnica, instrumentos, software y analista. La NOM-164-SSA1-1998 “Buenas Prácticas de Fabricación para fármacos” establece los controles de laboratorio e inspecciones deben apoyarse en PNO’s (Procedimientos Normalizados de Operación).

La NOM-173-SSA1-1993 “Estabilidad de Medicamentos” establece que cuando se modifique un método analítico durante los estudios de estabilidad, se debe demostrar que los métodos son equivalentes mediante el proceso de validación, así como la información de linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, repetibilidad y especificidad del método analítico.

La química analítica instrumental es actualmente una herramienta útil para el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos, entre las técnicas más utilizadas se encuentra la espectroscopia ultravioleta visible y la cromatografía de líquidos de alta eficiencia CLAE, los cuales servirán para el análisis de cefadroxilo en cápsulas para este trabajo. La información obtenida se utilizará para comparar y conocer las ventajas y desventajas en el análisis de cefadroxilo mediante estas dos técnicas.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Comparar la validación de las dos técnicas; la de espectroscopia ultravioleta visible y la de cromatografía de líquidos de alta eficiencia, así como el estudio de repetibilidad y recobro al análisis de cefadroxilo en la forma farmacéutica de cápsula, optimizando las condiciones en la metodología base que se utiliza.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Explicar las etapas de la metodología optimizada para extraer el principio activo de las cápsulas comerciales de cefadroxilo para su análisis por las dos técnicas mencionadas.
- Plantear las diferencias entre ambas técnicas para conocer las ventajas y desventajas al utilizar una u otra técnica para el análisis de cefadroxilo en cápsulas.

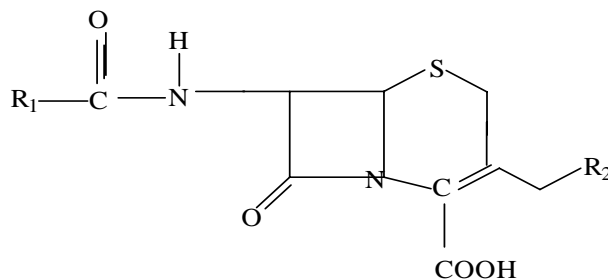
# **CAPÍTULO I**

## **ANTECEDENTES TEÓRICOS**

## ANTECEDENTES TEÓRICOS

### CEFALOSPORINAS<sup>1, 2, 3, 4</sup>

Las cefalosporinas son un grupo de antibióticos que se clasifican como betalactámicos debido a que su estructura es muy semejante al de las penicilinas. Las cefalosporinas deben su nombre a la fuente de la cual se obtuvieron inicialmente. El núcleo activo era el ácido 7-aminocefalosporánico (figura 1).

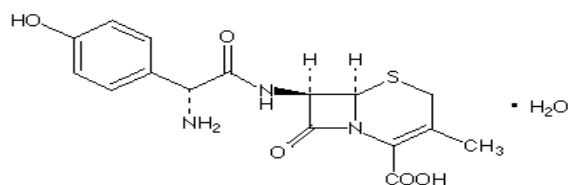


**Fig 1.- Estructura del núcleo ácido 7-aminocefalosporánico que compone a las cefalosporinas.**

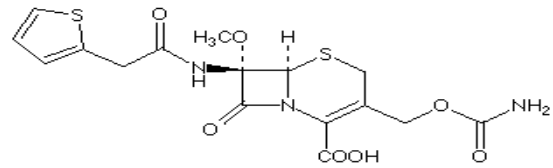
Los hongos del género *Cephalosporium* producen varios antibióticos que se asemejan a las penicilinas, pero que son resistentes a la beta-lactamasa y activos contra bacterias tanto gramnegativas como grampositivas.

El desarrollo de las cefalosporinas tuvo gran auge pues sobre el núcleo activo solamente se realizaron modificaciones en los sustituyentes, obteniendo una gran variedad de compuestos semisintéticos. Además del hecho de que las cefalosporinas eran resistentes a las penicilasas lo que les confería ventaja para ser utilizadas en lugar de las penicilinas.

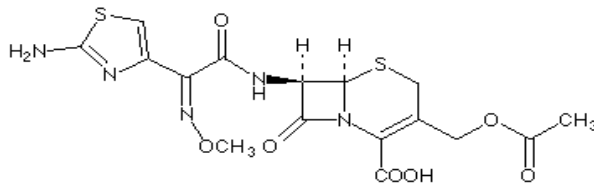
La actividad antimicrobiana intrínseca de las cefalosporinas naturales es baja, pero la fijación a diversos grupos  $R_1$  y  $R_2$  ha producido medicamentos de buena actividad terapéutica y baja toxicidad. En los siguientes esquemas se presentan algunos ejemplos de cefalosporinas modificadas en  $R_1$  y  $R_2$ , pertenecientes a cada generación de cefalosporinas clasificadas:



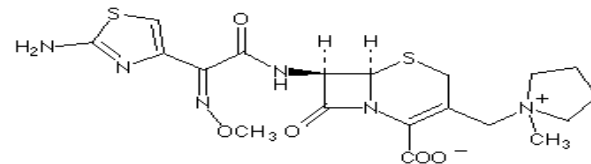
Cefadroxilo monohidratado.  
(PRIMERA GENERACIÓN)



Cefoxitina  
(SEGUNDA GENERACIÓN)



Cefotaxima  
(TERCERA GENERACIÓN)



Cefepima  
(CUARTA GENERACIÓN)

Las cefalosporinas tienen pesos moleculares de 400 a 450u, son hidrosolubles y relativamente estables a los cambios de temperatura y pH. Las cefalosporinas varían de acuerdo a la resistencia a la beta-lactamasa.

Las cefalosporinas son un grupo de antibióticos que se clasifican como agentes que inhiben la síntesis de la pared celular, de acuerdo a su espectro de actividad antimicrobiana se dividen en cuatro categorías:

### CEFALOSPORINAS DE PRIMERA GENERACIÓN

Este grupo incluye cefadroxilo, cefalexina, cefazolina, cefapirina y cefadrina.

Las de primera generación no penetran al sistema nervioso central y no pueden utilizarse para el tratamiento de la meningitis. Tienen actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas y actividad antimicrobiana moderada contra bacterias gramnegativas.

Los medicamentos orales pueden utilizarse para el tratamiento de las infecciones de las vías urinarias, lesiones estafilocócicas menores, o infecciones polimicrobianas menores como la celulitis o abscesos de los tejidos suaves.

Las cefalosporinas orales no deben utilizarse en las infecciones sistémicas graves.

El cefadroxilo es el análogo para-hidroxi de la cefalexina. Las concentraciones de éste en plasma y orina son un poco mayores que las observadas con la cefalexina. El fármaco puede administrarse por vía oral, una o dos veces al día, para tratar infecciones de vías urinarias.

Las cefalosporinas de primera generación administrada por vía intravenosa penetran mejor en los tejidos y son los medicamentos de elección para la profilaxia quirúrgica, las de vía intravenosa son la elección en infecciones para las cuales los medicamentos resulten menos tóxicos.

### SEGUNDA GENERACIÓN

Este grupo lo conforman las cefalosporinas semisintéticas cefoxitina, el cefotetán y cefaclor, estos compuestos son mucho más eficaces contra bacterias gramnegativas, que es lo que los diferencia con los fármacos que pertenecen a la primera generación; pero no son tan eficaces como las cefalosporinas de la tercera generación.

### TERCERA GENERACIÓN

Las cefalosporinas de la tercera generación por su parte, son menos activas que las cefalosporinas de primera generación contra bacterias grampositivas, sin embargo; éstas son mucho más activas como antimicrobianos sobre microorganismos de la familia Enterobacteriaceae incluyendo cepas productoras de betalactamasas. A esta tercera generación de cefalosporinas pertenecen la cefotaxima, cefoperazona y la ceftriaxona.

### CUARTA GENERACIÓN

Las cefalosporinas que pertenecen a la cuarta generación como la cefepima, la cefpiroma y la cefquinona; presentan un amplio espectro de acción antimicrobiana. Son mucho más útiles en el tratamiento de infecciones causadas por bacilos gramnegativos aerobios que resisten las cefalosporinas de tercera generación.

Otras ventajas terapéuticas de las cefalosporinas de cuarta generación son:

- ✓ Grupo betalactámico más estable.
- ✓ Mayor resistencia a betalactamasas.
- ✓ Mayor penetración celular.
- ✓ Mayor actividad antipseudomona.

Algunas cefalosporinas penetran en el líquido cefalorraquídeo a concentración suficiente para ser útiles en el tratamiento de meningitis; las cefalosporinas también cruzan la placenta; aparecen en grandes concentraciones en el líquido sinovial y en el pericárdico.

Las cefalosporinas pueden ser bactericidas solo si hay síntesis activa de peptidoglucanos. Las células metabólicamente inactivas no son afectadas.

#### MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS CEFALOSPORINAS EN GENERAL

- ✓ Fijación a las proteínas fijadoras de penicilina específicas (PBP por sus siglas en inglés) que sirven como receptores del medicamento en las bacterias.
- ✓ Inhibición de la síntesis de la pared celular al bloquear la transpeptidación de peptidoglucanos.
- ✓ La activación de las enzimas autolíticas en la pared celular, provocan lesiones y la muerte bacteriana.

#### FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DE LAS CEFALOSPORINAS

Se absorbe rápidamente después de administrarse oralmente, a dosis única de 500 y 1000 mg, alcanza concentraciones séricas máximas de 16 y 28  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Se obtienen niveles detectables hasta 12 horas después de administrarse. Las características en la absorción no son diferentes entre los individuos en ayunas y quienes no se encuentran en ayuno.

Más del 90% del medicamento es excretado sin cambios por la orina dentro de las 24 horas posteriores a su toma, las concentraciones máximas en orina son aproximadamente de 1800  $\mu\text{g/mL}$  durante el periodo siguiente a la administración única de 500 mg.

Los incrementos en la dosis generalmente producen un aumento proporcional en la orina.

El cefadroxilo se absorbe a partir del intestino en grado variable, después de dosis de 500 mg las concentraciones séricas son de 15 a 20  $\mu\text{g/mL}$ .



La excreción es principalmente por filtración glomerular y secreción tubular en la orina. En pacientes con una función renal alterada, las dosis deben reducirse. Es activo contra los siguientes organismos in vitro:

- ✓ Estreptococo beta hemolítico.
- ✓ Estafilococo, incluyendo coagulasa-positivo y cepas productoras de penicilinasas.
- ✓ *Streptococcus pneumoniae*.
- ✓ *Escherichia coli*.
- ✓ *Proteus mirabilis*.
- ✓ *Klebsiella sp*
- ✓ *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*.

### EFFECTOS ADVERSOS DE LAS CEFALOSPORINAS

**Alergias:** Los núcleos químicos de las cefalosporinas son suficientemente diferentes al de las penicilinas de modo que, algunas personas con alergia a las penicilinas pueden tolerar las cefalosporinas.

**Toxicidad:** La irritación local puede producir dolor intenso luego de la inyección intramuscular y después de la inyección intravenosa. Se ha demostrado toxicidad renal, incluyendo necrosis tubular.

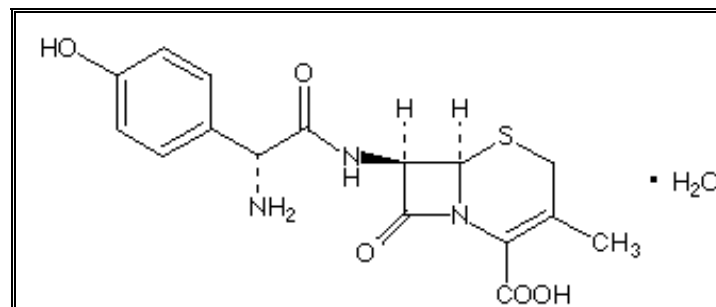
Las cefalosporinas con un grupo metiltiotetrazol causan frecuentemente hipoprotrombinemia y trastornos hemorrágicos.

## CEFADROXILO<sup>4, 5</sup>

### ESTRUCTURA Y PROPIEDADES QUIMICAS

El cefadroxilo es un polvo fino de color blanco que puede encontrarse como cefadroxilo monohidratado y como cefadroxilo anhidro, es soluble en agua (su solubilidad en agua es de 1 110mg/L) además de ser ligeramente soluble en metanol, tiene un peso molecular de 381,4g/mol en su forma monohidratada, un punto de ebullición de 197°C. Tiene tres valores de pKa, 2,64 (que corresponde al ácido carboxílico), 7,30 (que corresponde al grupo  $\alpha$  amino) y 9,69 (correspondiente al grupo fenólico); se clasifica como agente antimicrobiano. Su fórmula molecular es  $C_{16}H_{17}N_3O_5S$  y su nombre químico IUPAQ es: ácido-8-[2-amino-2-(4-hidroxifenil)-acetil]-amino-4-metil-7-oxo-2-tia-6-azabicyclo-[4.2.0]-oct-4-ene-5-carboxílico, el intervalo de pH es de 2 a 10.

Además de lo anterior, el cefadroxilo absorbe en la región ultravioleta del espectro electromagnético a 263nm y a 229nm utilizando como disolvente agua destilada. Por otra parte, el cefadroxilo generalmente sufre catálisis ácida o básica utilizando buffer de citrato o buffer de fosfatos. En la (figura 2) se muestra la estructura química de cefadroxilo monohidratado según la literatura.



**Fig. 2.- Estructura química de cefadroxilo monohidratado.**

El nombre genérico es cefadroxilo y tiene como sinónimos del medicamento los siguientes:

- ✓ Bidocef.
- ✓ Cefa-drops.
- ✓ Cefamox.
- ✓ Duracef, entre otros.

## PRESENTACIONES EN LAS QUE SE ENCUENTRA EL CEFADROXILO

El cefadroxilo monohidratado se encuentra en las siguientes presentaciones comerciales en México con el nombre de Duracef®: cápsulas, tabletas y suspensión. En esta tesis se trabajó con cápsulas de 250mg de cefadroxilo monohidratado, en blister PVC-Al.

## MECANISMO DE ACCIÓN DEL CEFADROXILO

El mecanismo de acción del cefadroxilo como antibiótico betalactámico es la inhibición de la D-alanina transpeptidasa en la formación de cadenas de péptidoglicano que se sintetiza, esto conlleva a disminuir la estabilidad de la célula. Se produce un aumento en la permeabilidad celular se causa plasmólisis y con ello muerte celular. Durante la biosíntesis de la pared celular, el ácido N-acetilmurámico y el dipéptido D-alanina-D-alanina se unen con uridin-difosfato (UDP por sus siglas) en el citoplasma formando así un polipéptido que conforma la mayor parte de la estructura de la pared celular.

## FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA

El cefadroxilo se absorbe rápidamente después de su administración oral. A dosis única de 500mg y 1 000mg alcanza concentraciones en suero máximas aproximadas de 16 y 28 microgramos por mililitro respectivamente. Se obtienen niveles detectables hasta 12 horas después de administrarse. Las características en la absorción no son diferentes entre los individuos en ayunas y quienes no se encuentran en ayuno. Más del 90% del medicamento es excretado sin cambios por la orina (el riñón es la vía por la cual se excreta mayoritariamente) dentro de las 24 horas.

Pruebas in vitro demuestran que las cefalosporinas son bactericidas, debido a que inhiben la síntesis de la pared celular de las bacterias. Es activo contra los siguientes organismos in vitro.

- ✓ Estreptococo betahemolítico.
- ✓ Estafilococo, incluyendo coagulasa-positivo y cepas productoras de penicilinas.
- ✓ Streptococcus pneumoniae.
- ✓ Escherichia coli.

- ✓ *Proteus mirabilis*.
- ✓ *Klebsiella sp.*
- ✓ *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*.

### INDICACIONES TERAPÉUTICAS

El cefadroxilo está indicado en el tratamiento de infecciones bacterianas, entre las que se encuentran:

- ✓ Infecciones en vías respiratorias altas y bajas.
- ✓ Infecciones de la piel y tejidos blandos.
- ✓ Infecciones del tracto genito-urinario causadas por *E. coli*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella sp.*
- ✓ Artritis séptica.

El cefadroxilo no puede utilizarse en el tratamiento de fiebre reumática pues no se ha demostrado su efectividad en este padecimiento.

### REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS

**Gastrointestinales:** Pueden aparecer durante el tratamiento síntomas de colitis pseudomembranosa. Se han reportado raramente náuseas y vómito. También puede ocurrir diarrea.

**Hipersensibilidad:** Se presenta en forma de prurito urticaria y angioedema.

Las reacciones al parecer son idénticas a las generadas por las penicilinas y ello depende de la estructura betalactámica compartida por ambos grupos de antibióticos. Debido al parecido estructural puede presentarse también una reacción cruzada con un miembro de otra clase.

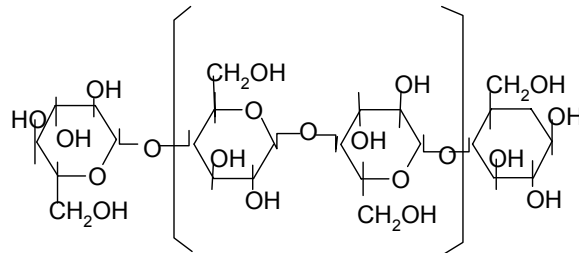
## **AVICEL COMO EXCIPIENTE**

### CARACTERÍSTICAS GENERALES

La Farmacopea Británica reporta como nombre al excipiente utilizado en esta tesis como Celulosa microcristalina, un sinónimo asignado a este es avicel, gel de celulosa, celulosa cristalina, emcocel, fibrocel, etc., su fórmula empírica es  $(C_6H_{10}O_5)_n$  donde  $n = 220$  y su peso molecular es de 36 000g/mol, es un polvo fino, color blanco,

cristalino, sin sabor, sin olor, y se encuentra disponible en diferentes tamaños de partícula, los cuales tienen diferentes propiedades y aplicaciones.

Tiene un pH de trabajo entre 5-7,5, un punto de fusión de 260-270°C, es prácticamente insoluble en agua y más soluble en disolventes orgánicos, es incompatible con agentes fuertemente oxidantes, no tóxico ni irritante a la piel, pero sí lo es en los ojos.



**Fig 3.- Estructura Química de la celulosa microcristalina o avicel.**

### FUNCIÓN DEL EXCIPIENTE

Su función es como agente suspensor, diluyente para cápsulas y tabletas así como agente desintegrante de tabletas.

### APLICACIONES FARMACÉUTICAS DEL EXCIPIENTE

La celulosa microcristalina es ampliamente usada como diluyente en formulaciones orales como tabletas y cápsulas, también es utilizado como lubricante y desintegrante, esto último para la elaboración de tabletas. La celulosa microcristalina también se aplica en la elaboración de alimentos y cosméticos.

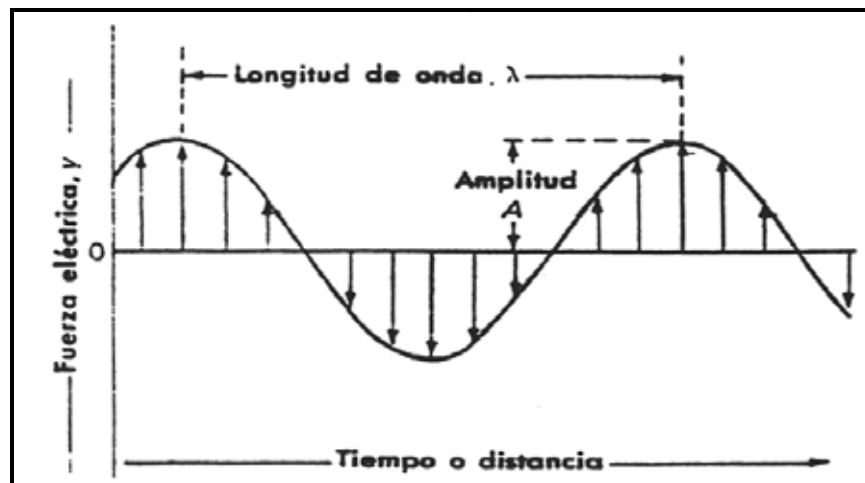
Como diluyente en cápsulas y tabletas se utiliza en la fabricación de medicamentos concentraciones de 20-90%.

## ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA <sup>6, 7, 8, 9</sup>

La espectroscopia estudia la interacción de la materia con la energía electromagnética; esta es una herramienta útil en analítica para la cuantificación de diversas sustancias químicas a través de su interacción con la materia.

La radiación electromagnética es un tipo de energía a gran velocidad que no requiere de un medio que lo soporte, es decir que puede viajar en el vacío en forma de ondas.

La radiación electromagnética explicada como onda da una serie de parámetros entre las que se cuentan la amplitud, la frecuencia ( $\nu$ ), el periodo ( $p$ ), la longitud de onda ( $\lambda$ ), número de onda ( $\bar{\nu}$ ), etc. La representación gráfica de una onda se encuentra descrita en la figura 4.



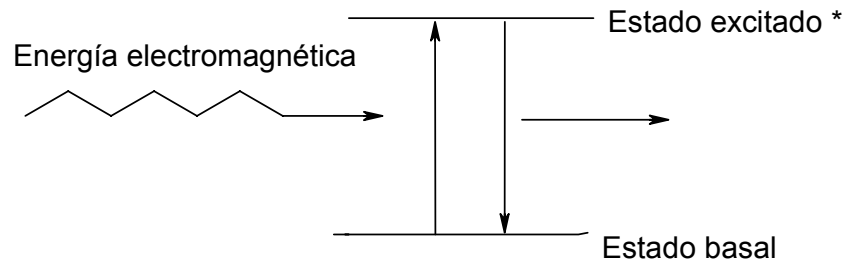
**Fig. 4.- Representación de los parámetros utilizados por la teoría ondulatoria.**

La relación que tiene la velocidad de la luz con la frecuencia y la longitud de onda es directamente proporcional a ambas propiedades. Esta teoría ondulatoria sirve para explicar los fenómenos de la luz como son la reflexión, refracción, difracción, dispersión, etc.

Además de la teoría ondulatoria para explicar el comportamiento de la radiación electromagnética existe la teoría corpuscular, la cual es útil para explicar los fenómenos de absorción y emisión considerando a la radiación electromagnética como paquetes (cuantos o fotones) de energía.

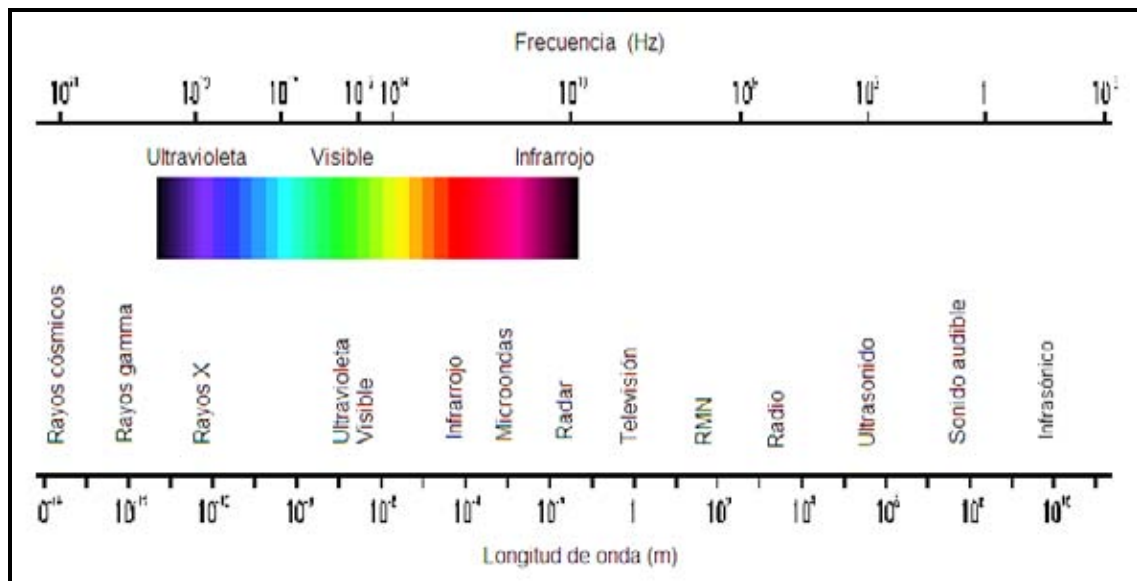
Cuando a una molécula se le aplica energía electromagnética la absorbe y sus electrones pasan de un estado basal a un estado excitado el cual no es permanente,

a esto se reconoce como fenómeno de absorción; los electrones pueden emitir toda o parte de la energía electromagnética que absorbieron al regresar a su estado basal, esto último es el fenómeno de emisión (figura 5).



**Fig. 5.- Transición electrónica del estado basal al estado excitado (absorción) y del estado excitado al basal (emisión).**

La radiación electromagnética para su estudio se clasificó en zonas en el llamado espectro electromagnético (figura.6).



**Fig. 6.- Espectro electromagnético.**

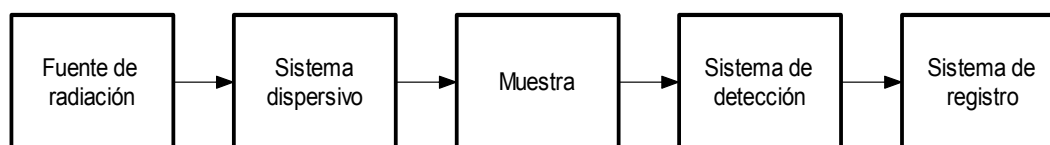
La zona donde se localiza la espectroscopia ultravioleta-visible aplicable instrumentalmente comprende el intervalo de los 800-200nm, la región visible de 800-400nm y la región ultravioleta se ha dividido en ultravioleta cercano (400-200nm).



La radiación en esta zona ejerce su efecto sobre los electrones más externos de las moléculas. Para los compuestos orgánicos (como el cefadroxilo) las transiciones electrónicas que se presentan son de orbitales moleculares de enlace a orbitales moleculares de antienlace, los compuestos orgánicos que presentan longitudes de onda en la región ultravioleta-visible son los compuestos que presentan dobles ligaduras conjugadas y sistemas aromáticos, esto es; transiciones electrónicas de  $\pi$  a  $\pi^*$ , además de transiciones electrónicas de  $n$  a  $\pi^*$ , por otro lado para los compuestos inorgánicos son transiciones electrónicas que para los aniones son de  $\pi$  a  $\pi^*$ , y para cationes y metales de transición son transiciones electrónicas de orbitales  $d$  y  $f$  a  $d^*$  y  $f^*$ .

### INSTRUMENTACIÓN

El equipo utilizado en UV-Vis puede ser dispersivo o monocromático y arreglo de diodos, con fines de este estudio se utilizó el tipo dispersivo o monocromático (figura 7).



**Fig. 7.- Instrumentación general de un equipo de tipo dispersivo o monocromático.**

### FUENTE DE RADIACIÓN

La fuente es la que suministra la radiación electromagnética que va a generar la excitación de los electrones en los compuestos analizados. Para la región ultravioleta la lámpara de deuterio y para la región visible la lámpara de tungsteno o wolframio son las usadas (figura 8).



**Fig. 8.- Lámpara de tungsteno/halógeno (izquierda) y lámpara de deuterio (derecha).**



**Fig. 9.- Lámparas en el instrumento.**

### SISTEMA DISPERSIVO Ó SISTEMA MONOCROMÁTICO

El sistema dispersivo tiene la finalidad de descomponer la radiación electromagnética en sus diferentes valores energéticos. Para lograr este fenómeno el sistema dispersivo se auxilia en diferentes aditamentos como son las rendijas de entrada y salida que permiten el paso de la radiación electromagnética a lo largo de todo el sistema, a estas rendijas se les conoce comúnmente con su nombre en inglés "slit". Además de estas rendijas el sistema dispersivo se encuentra constituido por espejos que son los encargados de dirigir la radiación electromagnética, además por lentes que se encargan de concentrar (colimar) lo más posible la radiación electromagnética; los filtros se encargan de darle paso a la radiación electromagnética que interesa, esto lo realiza por medio del fenómeno de absorción, es decir que solo deja pasar un intervalo de radiación y absorbe las otras.

Finalmente esta la rejilla de difracción que es una superficie finamente rayada, que se encarga de separar la radiación electromagnética en las diferentes longitudes de onda que la componen (figura 10).



**Fig. 10.- Espejos holográficos o rejillas de reflexión.**

### MUESTRA

Como contenedor de las muestras para espectroscopia se utilizan las llamadas celdas(o cubetas) que para la región visible pueden ser de plástico o vidrio, y si se quiere abarcar tanto la región ultravioleta y visible necesariamente deben ser de cuarzo o sílice fundida. Generalmente las celdas tienen una longitud de paso óptico de 1cm (figura.11).



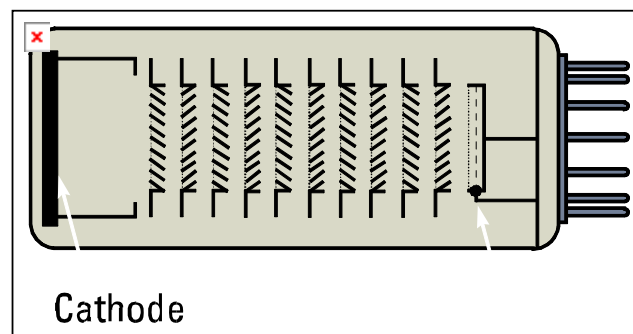
**Fig. 11.- Celdas que pueden utilizarse en espectroscopia ultravioleta en prisma rectangular.**

## SISTEMA DE DETECCIÓN

La radiación no absorbida por la muestra llega al detector y es convertida en una señal eléctrica. El detector utilizado normalmente en los equipos de tipo dispersivo es el fotomultiplicador. Para entender el funcionamiento se explicará primero el funcionamiento de un fototubo que es el detector del que se generó el fotomultiplicador.

Cuando la radiación electromagnética llega al fototubo, este emite electrones desde una superficie emisora (cátodo) de los mismos. Los electrones son atraídos del cátodo al ánodo produciéndose con este paso una corriente que es directamente proporcional a la potencia de la radiación que incide sobre la superficie emisora.

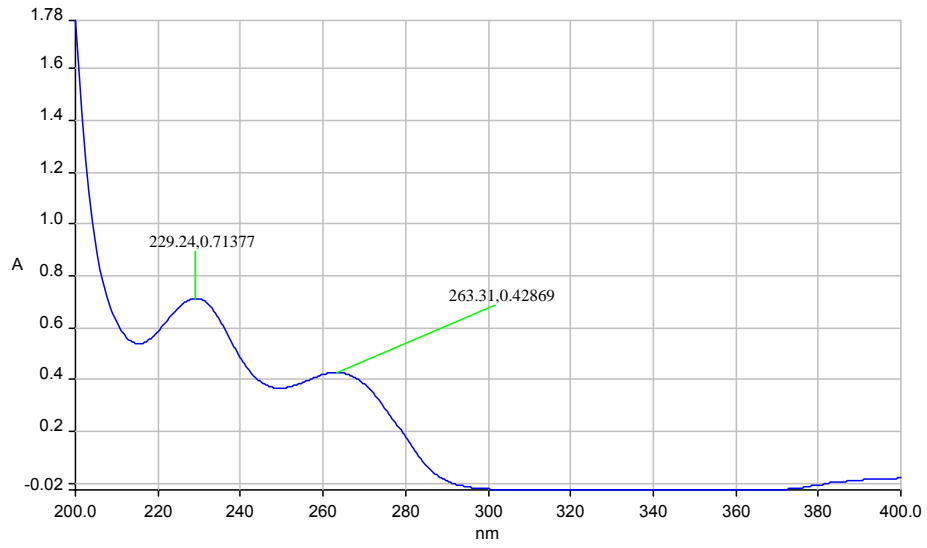
Al igual que el fototubo, el fotomultiplicador consta además de una superficie emisora de electrones, de otras superficies emisoras de electrones llamados dínodos. Cuando la radiación incide sobre la primera superficie, emite electrones los cuales van e interaccionan contra un dínodo generando la emisión de más de un electrón, y así este proceso se repite con cada uno de los dínodos, finalmente todos los electrones son recolectados en el ánodo, la corriente total generada se amplifica y se mide (figura 12).



**Fig. 12.- Fotomultiplicador.**

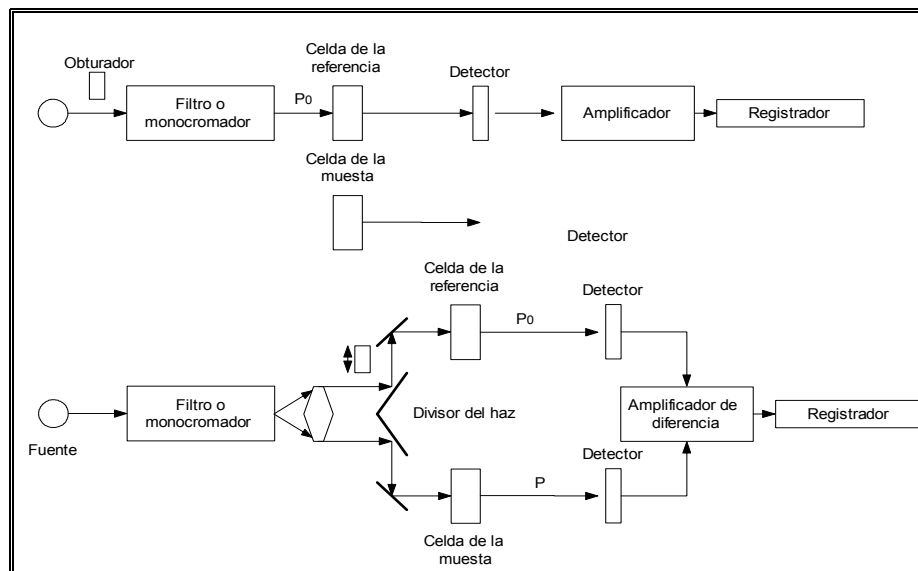
## SISTEMA DE REGISTRO

El sistema de registro o transductor de salida convierte las señales eléctricas que se generaron en el detector en algo que se puede entender que en este caso es un gráfico conocido como espectro. El espectro es un gráfico que representa la respuesta analítica elegida (absorbancia o transmitancia) contra la longitud de onda (figura 13).



**Fig. 13.- Espectro UV de cefadroxilo.**

Los espectrofotómetros de tipo dispersivo se pueden encontrar en el mercado con la opción de un solo haz y doble haz. En el de doble haz la luz pasa de manera alterna por el contenedor de la muestra y de la referencia. De manera instantánea el equipo compara la potencia de la muestra y la referencia (figura 14).



**Fig. 14.- Representación esquemática de un espectrofotómetro de un solo haz y doble haz.**

Tanto compuestos orgánicos como inorgánicos absorben la radiación ultravioleta-visible y esta característica se puede utilizar para realizar un análisis cualitativo y cuantitativo.

### **ANÁLISIS CUALITATIVO**

La longitud de onda a la que va a absorber una molécula depende de su estructura por sí misma o bien, por el tipo de enlaces presentes en la molécula. Los electrones que se encuentran formando enlaces dobles o triples son fácilmente excitables y absorben radiación electromagnética en la región ultravioleta.

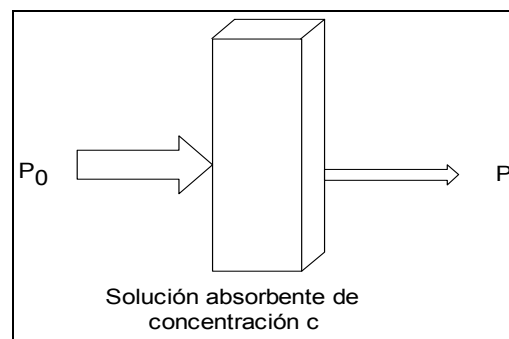
A estos enlaces y grupos funcionales de las moléculas que absorben en la región ultravioleta-visible se les conoce como cromóforos. La longitud de onda de absorción también se puede ver modificada por el tipo de insaturación (si está o no conjugado el doble enlace) y por el disolvente utilizado en la muestra.

Pero esta información es muy pobre desde el punto de vista de querer conocer al compuesto o la estructura del compuesto por lo que el análisis cualitativo no es el mayor uso que se le da a la técnica.

### **ANÁLISIS CUANTITATIVO**

Ésta es la mayor aplicación que se le da a esta técnica analítica, por lo que es importante entender el manejo de este proceso de análisis.

Si definimos como  $P_0$  a la potencia con la que un haz incide sobre una muestra y consideramos además que cuando este haz pasa a través de la muestra disminuye su potencia representada ahora como  $P$  entonces podemos decir que la muestra absorbió parte de la potencia radiante y que  $P_0$  es mayor a  $P$ . A través de esta potencia podemos definir la relación de la absorbancia y la transmitancia con la potencia radiante.



La transmitancia ( $T$ ), se define como la fracción de luz incidente que pasa a través de la muestra, la ecuación matemática que la describe se muestra a continuación:

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

La absorbancia por su parte se define como:

$$A = -\log_{10}\left(\frac{P}{P_0}\right) = -\log T$$

La absorbancia toma valores de 0 a infinito, mientras que la transmitancia lo hace de 0 a 1.

Para realizar el análisis cuantitativo en los fenómenos de absorción espectroscópicos se aplica una ecuación conocida como la ley de Lambert y Beer. Para explicar como se llegó al establecimiento de la ley de Lambert y Beer se tiene

que hacer mención de lo siguiente, tanto Lambert como Beer realizaron determinaciones importantes. Lambert determinó que la transmitancia es una función exponencial que se describe mediante la siguiente ecuación matemática:

$$T = \frac{P}{P_0} = e^{-kl}$$

Por su parte, Beer describió a la transmitancia de la siguiente manera:

$$T = \frac{P}{P_0} = e^{-kC}$$

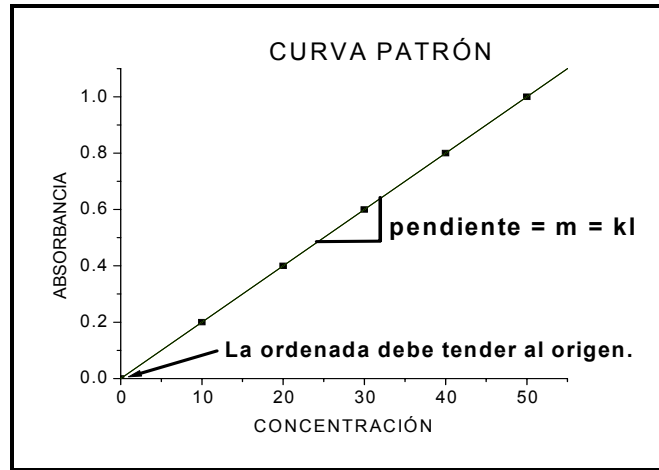
Beer encontró que la transmitancia varía en forma exponencial al variar la concentración del analito y dejando la longitud de paso óptico constante, de esta forma la transmitancia varía en forma exponencial al variar la concentración y eso se describe en la ecuación anterior.

Ambas son funciones complementarias, quedando finalmente como la ley de Lambert y Beer en la que tanto la longitud de paso óptico ( $l$ ) se mantiene constante. Por otro lado  $k$  es una constante que se llama coeficiente de absorptividad (coeficiente de absorptividad molar si las concentraciones con las que se trabajan son molares). Finalmente la ley de Lambert y Beer queda expresada como:

$$A = klc$$

Donde  $A$  es la absorbancia,  $k$  el coeficiente de absorptividad y  $l$  la longitud del paso óptico. El coeficiente de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) es característica para cada sustancia. Para utilizar la ecuación de la ley de Lambert y Beer se debe realizar una curva patrón (Absorbancia vs Concentración) que demuestre una tendencia lineal de por lo menos cinco muestras estándar con diferente concentración, y cuya pendiente estará dada por el coeficiente de absorptividad ( $k$ ) y la longitud de paso óptico ( $l$ ), además se deberá demostrar que la ordenada al origen tiende a cero, de esta manera, la ecuación de la ley de Lambert y Beer se puede aplicar para análisis cuantitativo y se pueden calcular los coeficientes de absorptividad de las sustancias (figura 15).





**Fig. 15.- Características ideales de una curva patrón para aplicar la ley de Lambert y Beer.**

## CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)<sup>10, 11, 12</sup>

### DEFINICIÓN DE CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una técnica física y/o fisicoquímica que permite separar, aislar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. Los componentes de la muestra se distribuye entre dos fases: una fase estacionaria y otra móvil de tal manera que la separación de los compuestos químicos está en función de su interacción con estas 2 fases, siendo retenidos de manera selectiva de la fase estacionaria. Se dice que es fisicoquímica porque existe una constante de equilibrio por parte de los compuestos entre estas 2 fases, que está dada por la cantidad de analito retenido en la fase estacionaria (FE) y la cantidad de analito en la fase móvil (FM).

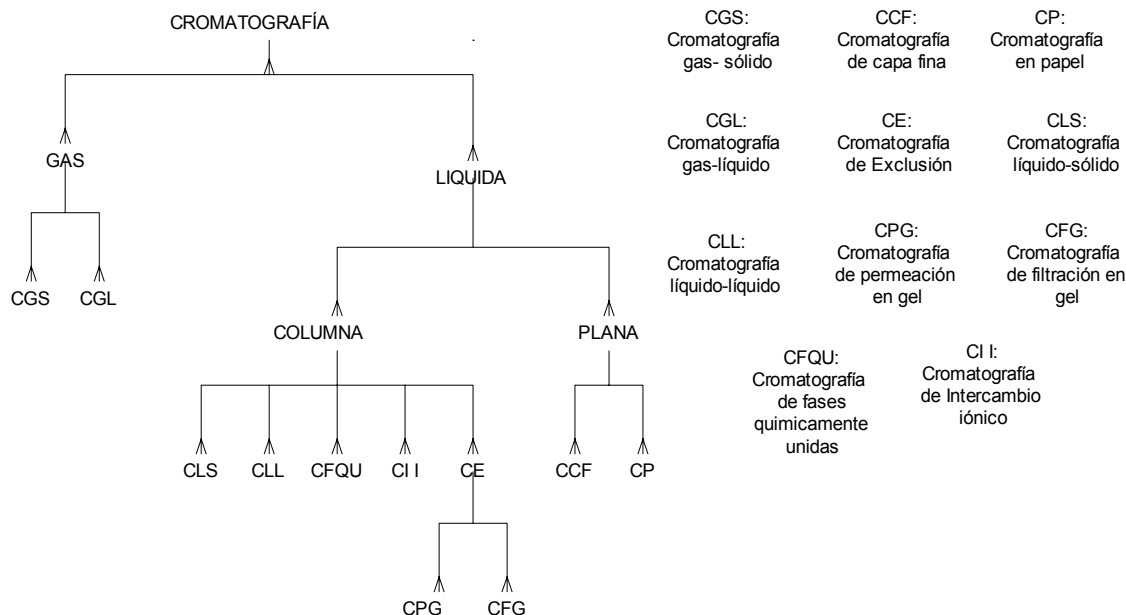
$$K_{eq} = \frac{[analito]_{FE}}{[analito]_{FM}}$$

La separación se lleva a cabo en una columna tubular rellena de un sólido poroso finamente dividido, el cual puede actuar como fase estacionaria propiamente dicha o como soporte de una fase estacionaria líquida.

En la cromatografía en columna, la fase móvil puede ser un líquido o un gas, y según el caso se denominan respectivamente “cromatografía líquida” y “cromatografía de gases”. Esta fase móvil fluye a través del relleno de la columna, arrastrando los componentes de la mezcla, que son selectivamente retenidos por la fase estacionaria.

### CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

De acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas y con los mecanismos de separación, es posible distinguir diferentes tipos de cromatografía como se muestra en el siguiente diagrama:



**Fig. 16.- Representación de los diferentes tipos de cromatografía.**

En este caso; el tipo de cromatografía utilizada fue la cromatografía de líquidos, la cual recibe los siguientes nombres cuando es de tipo instrumental:

- ✓ Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE por sus siglas en español).
- ✓ Cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP por sus siglas en español).
- ✓ Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR por sus siglas en español).

Por sus siglas en inglés es comúnmente conocida como HPLC (High Performance Liquid Chromatographic).

Como es posible observar, existen diversos tipos de fases estacionarias pero en este caso se describirá la cromatografía de líquidos con fases químicamente unidas, ya que es el método que se ocupó para el desarrollo experimental de esta tesis.

### CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON FASES QUÍMICAMENTE UNIDAS

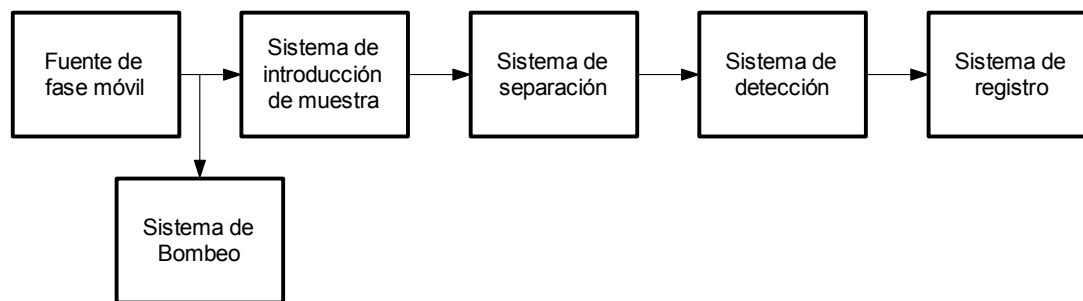
Consiste en unir químicamente la fase estacionaria a una partícula sólida mediante enlaces covalentes, la partícula sólida puede ser sílice (la más usada), alúmina o florisil. Dependiendo de la polaridad del grupo funcional que posea el compuesto que se une a la partícula soporte, se puede trabajar sobre dos tipos de cromatografía, fase normal o en fase inversa.

**Cromatografía de fase normal:** La fase estacionaria se caracteriza por ser de naturaleza polar (por ejemplo, sílica) y la fase móvil se caracteriza por ser de tendencia no polar (por ejemplo, n-hexano o tetrahidrofurano). De acuerdo con lo anterior, las muestras polares son más retenidas en la superficie polar de la fase estacionaria de la columna que aquellas sustancias menos polares las cuales interaccionan más con la fase móvil.

**Cromatografía de fase inversa o reversa:** Contraria a la anterior, se caracteriza por tener una fase estacionaria de naturaleza no polar (hidrofóbica) y la fase móvil es un líquido de tendencia polar, tal como el agua, metanol, acetonitrilo o mezclas de éstos, por lo tanto las sustancias no polares son las que serán retenidas por la fase estacionaria.

En este trabajo el tipo de cromatografía utilizada fue de fase inversa.

### **INSTRUMENTACIÓN**



**Fig. 17.- Instrumentación en CLAE.**

### **FUENTE DE FASE MÓVIL**

La fase móvil se coloca en un contenedor para líquidos, normalmente en recipientes de vidrio (figura 18), de acero inoxidable o plástico inerte los cuales pueden ser de diferente capacidad. Los disolventes utilizados como fase móvil deben cumplir con las siguientes características:

- ✓ Alta pureza (grado cromatográfico o grado espectroscópico).
- ✓ Inerte.
- ✓ Baja viscosidad para tener mejor eficiencia en la separación, ya que puede afectar en la transferencia de masa entre la fase móvil y la estacionaria.
- ✓ Polaridad adecuada.

- ✓ Ser compatible con el detector.
- ✓ Disolver a la muestra para ser transportada a través de la columna.
- ✓ No tóxico.
- ✓ Ser barato y accesible.
- ✓ No degradar o disolver la fase estacionaria.

En general las fases móviles con tendencia no polar se utilizan con las fases estacionarias polares (por ejemplo: hexano, ciclohexano, disulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y benceno) para el modo de fase normal. Las fases móviles para las fases estacionarias no polares se seleccionan de entre los disolventes polares (por ejemplo: agua, metanol, propanol y acetonitrilo) para el modo de fase inversa o reversa.

La fase móvil antes de usarla debe ser desgasificada y filtrada (figura 18). Es filtrada para eliminar partículas que pudieran existir en la fase móvil y evitar que se tape la tubería y filtros del instrumento, evitando también el desgaste de los sellos y rotores del inyector, etc. Los disolventes se filtran en membranas de 0,45 o 0,22 micras de porosidad en equipos de filtración Millipore y es útil para eliminar tanto las partículas como las bacterias.

La desgasificación es que los gases disueltos en la fase móvil ( $N_2$  y  $O_2$ ) pueden producir:

- ✓ Liberación de burbujas en la cabeza de la bomba.
- ✓ Liberación y formación de burbujas en la celda del detector.
- ✓ Aumento en la línea base del detector de UV debido al oxígeno disuelto.

Los métodos de desgasificación son:

- ✓ Filtración o ultrasonido.
- ✓ Vacío.
- ✓ Burbujeo con gas inerte.
- ✓ Filtración con membrana de teflón.

Además dependiendo del manejo de la fase móvil durante el análisis se pueden tener dos tipos de elución:

**Isocrática:** El poder de elución se mantiene constante, es decir la composición de la fase móvil que es bombeada hacia la columna permanece constante durante todo el tiempo de análisis en el sistema cromatográfico.

**Gradiente de elución:** El poder de elución se varía de un poder de elución bajo a uno alto, es decir la composición de la fase móvil es cambiada durante el tiempo de análisis.



**Fig. 18.- Recipiente de vidrio (izquierda) y filtro de teflón (derecha).**

### SISTEMA DE BOMBEO

Las bombas son necesarias para introducir a la fase móvil a través de la fase estacionaria (que se encuentra como pequeñas partículas empacadas, lo cual hace que la resistencia al flujo sea muy elevada). La estabilidad del tiempo de flujo es otra importante función que deben desempeñar las bombas, aunque una gran estabilidad de tiempo de flujo no es esencial para la cromatografía analítica, aunque deben permitir que el flujo de la fase móvil sea razonable para que el análisis no sea excesivamente lento.

Ahora, es posible encontrar bombas de control electrónico externo, siendo una característica deseable cuando se trabaja con la técnica de elución por gradiente, sin embargo esta característica no es necesaria cuando se trabaja por la técnica de elución isocrática.

Las bombas modernas deben cumplir los siguientes parámetros:

- ✓ Intervalo de flujo: 0,01 a 10 mL/ min.

- ✓ Estabilidad del tiempo de flujo no más del 1%.
- ✓ Presión máxima: hasta 400 atm.
- ✓ Resistencia a líquidos corrosivos y facilidad de limpieza.
- ✓ Flujos continuos (no pulsados).

De acuerdo a las características de funcionamiento y diseño se tienen dos tipos de bombas:

- ✓ *Bombas mecánicas.*
- ✓ *Bombas neumáticas.*

Las *bombas mecánicas* se dividen en dos tipos:

Bombas recíprocas (piston o diafragma).

Las bombas recíprocas desplazan flujos de volumen constante en forma pulsante, la máxima presión que se obtiene es de aproximadamente 600 atm. La forma en la que operan consiste en el movimiento de un pistón o diafragma y a través de un sistema de válvulas que alternadamente se abren y se cierran, llenan y vacían, de modo alternativo en una pequeña cámara. El volumen que envía la bomba en cada pulso se ajusta variando la distancia a la que se desplaza el pistón o diafragma; el flujo total se ajusta variando el número de desplazamientos por unidad de tiempo. La desventaja de este tipo de bombas es que el flujo se obtiene como pulsos y no en forma continua lo que puede ocasionar pérdida de la eficiencia de la columna e inestabilidad del detector; esto se corrige mediante un sistema amortiguador.

La principal ventaja es el flujo a volumen constante lo que trae como consecuencia una capacidad de alimentar de modo continuo al sistema (figura 19).

Bombas de desplazamiento continuo.

Las bombas de desplazamiento continuo son aquellas en las que un pistón o émbolo es desplazado en forma continua por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de cierto volumen; así el líquido fluye a través de una abertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volumen constante que puede variar según como se desplace el émbolo. Por las características anteriores el flujo desplazado por estas bombas es uniforme y continuo aunque la desventaja es

que la capacidad de la bomba es limitada y para rellenar la cámara es necesario suspender momentáneamente la operación de la bomba.

En las *bombas neumáticas*, el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión, ya sea en forma directa sobre el líquido o sobre el recipiente comprimible que lo contiene. La ventaja de este tipo de bombas, es que se obtienen flujos libres de pulsaciones y de presión constante, las desventajas son que la presión máxima obtenible está limitada por la presión del gas mismo y por el material de fabricación del sistema; además poseen una capacidad limitada en el volumen total que pueden bombear y la difusión que presenta el gas en el líquido.



**Fig. 19.- Sistema de bombeo del cromatógrafo de líquidos marca Knauer y cabezales de los pistones de la bomba (derecha).**

### SISTEMA DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA O INYECCIÓN

La introducción de la muestra al sistema más común es a través de una válvula de inyección o válvula de seis pasos, la cual consiste en un cuerpo fijo con un rotor de sello que gira y un bucle (“loop” en inglés) de muestra externo en el que se introduce la muestra, cuya capacidad puede ser de 5 a 200 microlitros cuando se usan válvulas manuales y menores a 5 microlitros cuando son automáticas.

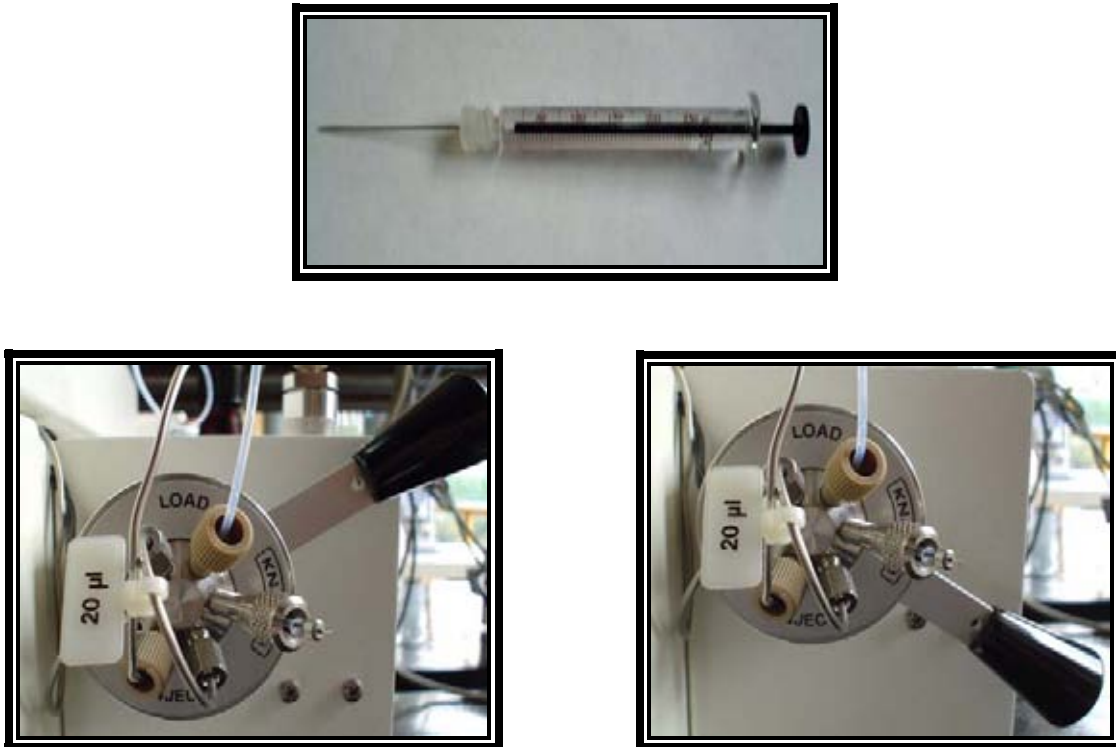
En cromatografía de líquidos, las muestras líquidas, sólidas y semisólidas necesitan disolverse en la fase móvil ya sea directamente en éste o en alguno de los disolventes que forme la fase móvil en caso de ser una mezcla de varios disolventes.

El funcionamiento de la válvula de inyección es el siguiente:

La válvula debe encontrarse en posición de carga toda vez que se desee introducir la jeringa con la muestra y llenar el loop (figura 20), en esta posición la fase móvil



pasa directamente a la columna, se recomienda inyectar más cantidad de muestra de la capacidad del loop, ya que de esa forma se asegura que el loop está lleno y el exceso pasa a la tubería de desechos. Posteriormente se gira la palanca de la válvula a la posición de inyección para permitir el paso de la muestra a la columna junto con la fase móvil.



**Fig. 20.- Jeringa de vidrio de capacidad de 250µl y válvula de inyección en posición de carga (izquierda) y en posición de inyección (derecha).**

### SISTEMA DE SEPARACIÓN

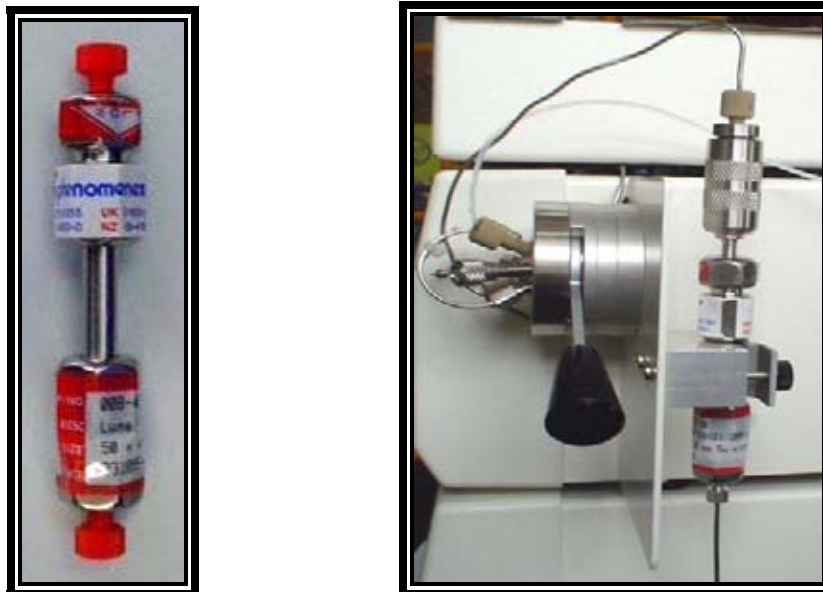
En el sistema de separación se encuentra la columna empacada que contiene a la fase estacionaria (figura 21). Las columnas más comunes para cromatografía de líquidos son de 10, 15 y 25cm de longitud y son empacadas con partículas de un diámetro extremadamente pequeño: 3, 5 o 10µm. El diámetro interno de las columnas es usualmente de 4 a 4.6mm, estas características son consideradas como las más comprometidas entre el volumen de muestra que pasa por la columna, (capacidad de la columna) el consumo de fase móvil, velocidad y resolución. Sin embargo, si son colectadas sustancias puras (escala preparativa), un diámetro interno de columna más grande es necesario.

En general, las columnas utilizadas en cromatografía de líquidos son bastante durables, a menos que se utilicen de una manera intrínsecamente destructiva, como por ejemplo: eluyentes demasiado ácidos o básicos, o continuas inyecciones de material sucio (eluyentes con partículas muy grandes).

Las separaciones por cromatografía de líquidos de alta eficiencia están basadas en las interacciones de las moléculas de analito en la superficie de la fase estacionaria y dependen de los sitios de equilibrio.

Las fases estacionarias más modernas para la CLAE poseen pequeñas partículas rígidamente empacadas con una gran área superficial.

- ✓ Tamaño de partícula: 3 a 10 $\mu$ m
- ✓ Tamaño de poro: 70 a 300 $\text{Å}$
- ✓ Área de la superficie: 50 a 250m<sup>2</sup>/g
- ✓ Densidad de la fase estacionaria (número de sitios de adsorción por unidad de superficie): 1 a 5 por nm<sup>2</sup>.



**Fig. 21.- Columna analítica de 50 mm Phenomex y columna analítica conectada a la válvula de inyección y al detector.**

Cabe mencionar, que la inmensa mayoría de los adsorbentes son de sílice. El mecanismo principal en la adsorción es la interacción de los grupos hidrófilo del gel de sílice con el grupo funcional polar de una molécula de soluto (o de disolvente). Los grupos silanol (Si-OH) se encuentran en la superficie y se extienden por ella en los canales internos de la estructura del poro. El número y el arreglo topográfico de los varios tipos de hidrófilo determinan la actividad del adsorbente y por lo tanto la retención de los solutos.

Los modelos actuales del proceso de adsorción suponen que los sitios de adsorción se encuentran completamente cubiertos ya sea por las moléculas del soluto o las del

disolvente. Las moléculas del soluto o del disolvente se adsorben dependiendo de su fuerza relativa en esta interacción competitiva. La competencia entre la molécula del soluto y la de la fase móvil por un sitio activo proporciona la fuerza motriz y la selectividad de las separaciones.

En la cromatografía de líquidos con fases químicamente unidas se requiere unir químicamente un radical orgánico que será la fase estacionaria a una partícula sólida (como la sílica gel comúnmente empleada), y dependiendo de la polaridad del radical unido se tendrá la interacción.

Dentro de las fases estacionarias más utilizadas se encuentran:

- ❖  $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
- ❖  $-(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$
- ❖  $-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$
- ❖  $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$
- ❖  $-(\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_5$

### SISTEMA DE DETECCIÓN

El sistema de detección es la parte del equipo cromatográfico que debe generar algún fenómeno físico y convertir éste en algo manejable para que permita ver y ubicar en tiempo la elución de cada componente de una muestra a la salida de la columna analítica. Los detectores cumplen estas características:

- **Respuesta universal o selectiva.** Los detectores universales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene al analito en comparación con la fase móvil pura y los detectores selectivos son sensibles a alguna propiedad del analito.
- **Linealidad.** El detector debe medir alguna propiedad del analito que se incremente proporcionalmente al aumentar la concentración.
- **Ruido.** Variaciones que se producen en la línea base del detector que se originan por pequeñas fallas en el sistema eléctrico, variaciones en el flujo eléctrico o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, etc. El ruido nunca se atribuye a la muestra.
- **Sensibilidad.** Es la concentración mínima de un analito que puede ser detectada, la cuál debe producir una señal igual al doble del ruido del instrumento.

- **Estabilidad.** Debe soportar cambios de temperatura y variaciones de flujo.

Los detectores más utilizados en CLAE se dividen en 2 tipos tomando en cuenta la propiedad física que miden:

- **Espectroscópicos:** Espectrofotómetro UV-Visible, espectrofotómetro de fluorescencia, refractómetro, espectrómetro de masas.
- **Electroquímicos:** Conductímetro, amperímetro, voltamperímetro y coulombímetro.

El detector que se utilizó en este trabajo fue el de UV-Visible por lo que se ampliará un poco más su explicación.

Su funcionamiento se basa en los mismos principios que se explicaron en este capítulo para la técnica de espectroscopia UV-Vis. Pero como detector para la cromatografía de líquidos este detector es de tipo selectivo, permite detectar analitos en el orden de los ppm, no es destructivo y puede emplearse con gradientes de elución.

Existen a la venta dos tipos de detectores de UV-Visible para la cromatografía de líquidos, los de tipo dispersivo (que pueden ser de longitud de onda fija y de longitud de onda variable) y los de arreglo de diodos, cuyas características son las siguientes:

- ✓ Los espectrómetros de longitud de onda fija, utilizan filtros como sistema dispersivo o monocromático y normalmente trabajan a 254, 275 y 284 nm.
- ✓ Los espectrómetros de longitud de onda variable cuentan con un sistema dispersivo o monocromático que permite variar la longitud de onda a la que se quiere trabajar, lo cual permite aumentar la sensibilidad ya que se puede trabajar a la longitud de máxima absorción del analito de interés.
- ✓ Los espectrofotómetros de arreglo de diodos emplean un sistema óptico invertido, utilizan un espejo holográfico que realiza una primera dispersión de la radiación electromagnética y la dirige al detector conocido como arreglo de diodos, estos diodos responden de manera específica para cada fotón por lo que se tiene una respuesta inmediata, por lo que se puede obtener el espectro de UV-Visible completo como se va generando el cromatograma por lo que se puede tener el espectro de cada uno de los picos cromatográficos y

también se puede generar varios cromatogramas a diferentes longitudes de onda al mismo tiempo, lo cuál no es posible realizar con los sistemas dispersivos; debido a la gran cantidad de información que se obtiene es necesario contar con una computadora como sistema de registro para poder almacenarla y procesarla.



**Fig. 22.- Detector UV para cromatografía líquida.**

### SISTEMA DE REGISTRO

Es un dispositivo que tiene como función representar en forma gráfica la señal que generan los analitos en el detector con respecto al tiempo al que van fluyendo de la columna y llegan al detector, este gráfico se conoce con el nombre de cromatograma (figura 24) y se puede obtener con un integrador electrónico o una computadora (figura 23).



**Fig.23.- Integrador (izquierda) y Computadora (derecha).**

La IUPAC define a un cromatograma como “un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente, versus el volumen de efluente o tiempo”.

El cromatograma se empieza a generar desde el momento en que la muestra es inyectada, las señales que aparecen serán de importancia para realizar análisis cuantitativos y cualitativos de las señales que más interesen, de éste se obtienen varios parámetros de importancia en el trabajo cromatográfico.

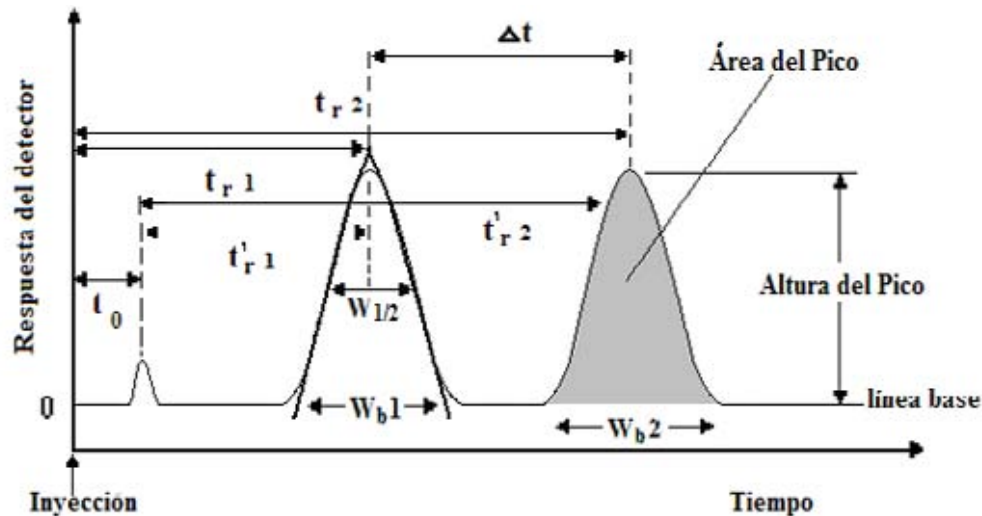


Fig. 24.- Cromatograma y parámetros medibles en el mismo.

### ANÁLISIS CUALITATIVO

El análisis cuantitativo está basado en la medición de los tiempos de retención ( $t_r$ ) de los picos cromatográficos de los compuestos que eluyen en el sistema y que son obtenidos en el cromatograma.

Se pueden trabajar las siguientes opciones:

- La comparación entre los  $t_r$  de los compuestos obtenidos en la muestra con los de estándares de éstos inyectados de manera separada a las mismas condiciones cromatográficas.
- La adición de estándares a la muestra se realiza en el caso de que se tengan más de 2 compuestos que dan  $t_r$ 's muy semejantes pero no iguales a la muestra.

- Comparación en 2 ó más fases estacionarias. Esto se realiza cuando aún realizando las 2 técnicas anteriores se tienen 2 ó más compuestos que dan los mismos tr.

### **ANÁLISIS CUANTITATIVO**

Basado en la medición de las áreas o alturas de los picos cromatográficos dados por los compuestos que eluyen en el sistema cromatográfico y que son obtenidos en el cromatograma.

Se trabajan los siguientes métodos cuantitativos.

- ✓ Método de Normalización.
- ✓ Método de Normalización con Fr.
- ✓ Método de Estándar Externo.
- ✓ Método de Estándar Interno.
- ✓ Método de Adición Patrón.

En este trabajo se aplicó el método de estándar externo, por lo que se dará una explicación de ésta.

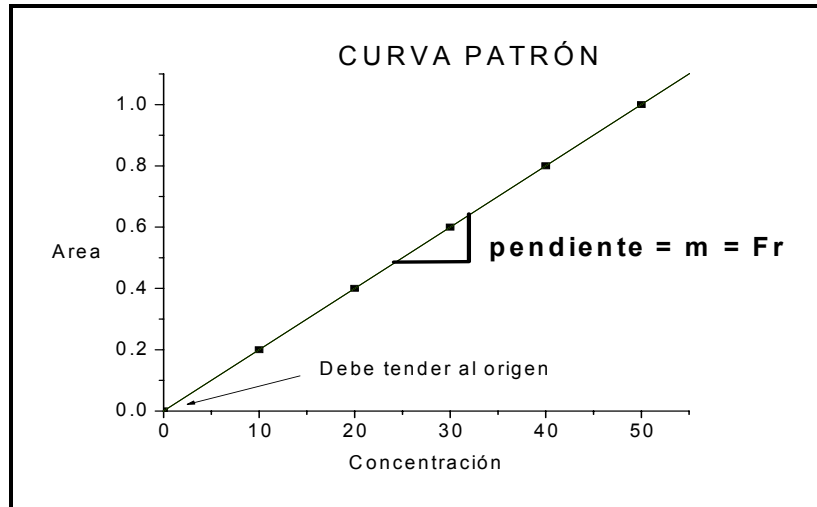
#### **Método de Estándar Externo.**

Se basa en la ecuación  $Fr = \text{Área} / \text{Conc.}$

Si la ecuación anterior se reordena en la ecuación  $\text{Área} = Fr \times \text{Conc.}$

Lo anterior dice que si se gráfica Área vs Conc. se deberá obtener una curva de calibración que deberá tener una tendencia lineal, con tendencia al origen y cuya pendiente es el Fr (figura 25).





**Fig. 25.- Características ideales de la curva patrón para aplicar la ecuación del método de estándar externo.**

## VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO<sup>13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,23,24</sup>

La validación se define como el grado de validez de un proceso de medición. La validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad de un método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, es decir cumple con un propósito establecido.

Las pruebas que se evalúan en una validación son: condiciones óptimas de trabajo, linealidad, precisión, reproducibilidad, repetibilidad, exactitud, cantidad mínima detectable, tolerancia del sistema, estabilidad de la muestra, etc.

Para el caso de la industria farmacéutica la regulación de la validación esta descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993 que de manera general en los puntos 5.6, 5.7 y 9.11 así como en el 9.12 establece los parámetros necesarios para dar validez a los procesos de fabricación, sistemas; así como los métodos analíticos (de materias primas y de granel).

Para realizar la validación de la metodología en ultravioleta visible y cromatografía de líquidos de alta eficiencia en este trabajo se realizaron las siguientes pruebas:

### Para el sistema:

- ✓ Condiciones óptimas de trabajo.
- ✓ Linealidad de sistema.
- ✓ Precisión de sistema.

### Para el método:

- ✓ Condiciones óptimas de trabajo.
- ✓ Precisión de método. Repetibilidad.
- ✓ Recobro.
- ✓ Linealidad de método.

A continuación se dará una explicación de las pruebas mencionadas anteriormente.

### **CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO**

Antes de iniciar la realización de pruebas estadísticas siempre es necesario encontrar las mejores condiciones de trabajo en la instrumentación para realizar el análisis del analito de interés, en el caso de esta tesis se buscaron las condiciones

ideales para la técnica de UV-VIS y CLAE. Posteriormente es importante encontrar las condiciones óptimas de la metodología de preparación de muestra que con la adición de las condiciones óptimas de trabajo en el instrumento se desarrolla la metodología completa del trabajo.

## **LINEALIDAD**

La linealidad es la medida de la relación que existe entre una variable dependiente y una variable independiente, al ser estas variables directamente proporcionales se espera que tiendan a dar a una línea recta. Se puede obtener la linealidad del sistema (cuando se usan estándares) así como la linealidad del método (cuando se adicionan estándares a los excipientes o placebos).

### **LINEALIDAD DEL SISTEMA**

La linealidad del sistema permite ver la relación que mantienen la variable dependiente (absorbancia en UV-VIS y Áreas en HPLC) con la variable independiente (concentración de cefadroxilo). En el caso de linealidad del sistema lo ideal es que tanto la variable dependiente como la variable independiente sean directamente proporcionales y que el gráfico (conocida como curva patrón) se aproxime a una línea recta. La linealidad puede evaluarse mediante la inspección visual de una gráfica de las señales como función de la concentración o contenido del analito. Si hay una relación lineal, los resultados de la prueba pueden evaluarse mediante los métodos estadísticos apropiados. Se recomienda un mínimo de cinco concentraciones para establecer la linealidad.

Los métodos de correlación se utilizan para medir la asociación de dos o más variables. En el caso de procedimientos analíticos se hacen dos observaciones para cada unidad de muestreo. El coeficiente de correlación ( $r$ ) es una medida cuantitativa de la relación o correlación entre dos variables. Los coeficientes  $+1$  o  $-1$  indican una correlación estrictamente lineal, mientras que cuando el coeficiente se aproxima a cero, significa que no existe ninguna relación entre las variables.

El criterio internacional normal para aceptar la linealidad del sistema es que los datos experimentales al momento de graficarse deben tener una tendencia lineal y además, tener un valor de coeficiente de correlación igual o mayor a 0.98. Si se

cumple con estos puntos se realizan pruebas de hipótesis sobre la pendiente y la ordenada al origen, y se utiliza la siguiente ecuación:

$$y = mx + b$$

La ecuación anterior según cada técnica puede variar en su ordenada ya que en la mayoría de ellas la ecuación lineal base del análisis cuantitativo plantea que el valor de la ordenada es cero; como se planteó en secciones anteriores en este capítulo, para la técnica de espectroscopia UV-Vis se utiliza la ecuación de Lambert y Beer que es:

$$A = aC + 0 \text{ por lo que sólo se escribe como } A = aC$$

Y en el caso de de la cromatografía de líquidos es:

$$Fr = (\text{Área/Conc}) + 0 \text{ por lo que sólo se escribe como } Fr = (\text{Área/Conc})$$

Por lo anterior para elegir el utilizar estas ecuaciones base de las técnicas o la general de la ecuación de una recta (en la que se tomará un valor de ordenada diferente a 0) se realiza una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen que se explicará a continuación.

La prueba de hipótesis que se plantea 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 que se utiliza es la “t de student” y para obtener la “ $t_{cal.}$ ” a partir de los datos experimentales se utiliza la siguiente ecuación:

$$t_{cal.} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nSxx}{Sxx + (n\bar{x})^2}}$$

donde:

$b$  = ordenada al origen

$\beta$  = ordenada la origen poblacional ( $\beta = 0$ )

$Se$  = error típico de estimación

$Sxx$  = suma de cuadrados de la variable independiente

$n$  = número de determinaciones

$\bar{X}$  = media experimental

El error típico de estimación se calcula, de acuerdo a la siguiente ecuación con n-2 grados de libertad:

$$Se = \sqrt{\frac{SxxSyy - (Sxy)^2}{(n-2)nSxx}}$$

donde:

$$Sxx = n \sum_{t=1}^n X_t^2 - \left( \sum_{t=1}^n X_t \right)^2$$

$$Syy = n \sum_{t=1}^n Y_t^2 - \left( \sum_{t=1}^n Y_t \right)^2$$

$$Sxy = n \sum_{t=1}^n X_t Y_t - \left( \sum_{t=1}^n X_t \right) \left( \sum_{t=1}^n Y_t \right)$$

La  $t_{cal.}$  se comparará con la “t” de tablas considerando un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0,05$ ) y con n-2 grados de libertad, tomando en cuenta que es una prueba de dos colas. El criterio que se utiliza para rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ) es el siguiente:

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

En caso de que el sistema sea lineal se calcula el intervalo de confianza para la ordenada al origen y para la pendiente con el mismo nivel de significancia. Se utilizan las siguientes ecuaciones:

Ordenada al origen

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

Pendiente

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

## PRECISIÓN

La precisión se define como el grado de concordancia entre resultados de pruebas individuales cuando el procedimiento se aplica de manera repetida a muestreos múltiples de una muestra homogénea. Se puede determinar la precisión tanto del sistema como del método.

## PRECISIÓN DEL SISTEMA

La precisión del sistema se define como el grado de concordancia de varias mediciones de una misma concentración. A los datos obtenidos en este ensayo se les realiza una prueba de hipótesis sobre la varianza:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2$$

donde  $\sigma_0^2$  se calcula de la varianza obtenida del C.V. tomando un valor del 5% de éste.

Como se trata de muestras aleatorias que provienen de una población de varianza  $\sigma_0^2$ , se utiliza la prueba estadística de  $\chi^2$  y para obtener la  $\chi^2_{cal.}$  a partir de los datos experimentales se utiliza la siguiente ecuación:

$$\chi^2_{cal.} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2}$$

donde:

n = número de determinaciones.

s = desviación estándar muestral (experimental).

$\sigma_o$  = desviación estándar máxima aceptada.

La  $\chi^2_{cal.}$  se comparará con la  $\chi^2$  de tablas considerando un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0,05$ ) y con n-1 grados de libertad.

El criterio que se utiliza para rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ) es el siguiente:

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{\alpha}$$

Hay que indicar que la conclusión que llevará la realización de esta prueba es que en caso de aceptarse la hipótesis nula la técnica instrumental de medición se

mantiene estable y los valores que reporta para una misma población se encuentran en el intervalo de error establecido para sus mediciones por la instancia administrativa respectiva.

Para realizar el intervalo de confianza sobre la desviación estándar se utiliza la siguiente ecuación:

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

### PRECISIÓN DE MÉTODO

Es el grado de concordancia entre los valores obtenidos individuales que provienen de una misma población o muestra. Esta prueba en el caso de método según el procedimiento de cómo se realice el estudio se conoce como repetibilidad y reproducibilidad.

En este trabajo aunque sólo se realizó la prueba de repetibilidad se explicarán las 2 opciones.

#### ➤ *REPETIBILIDAD*

Es el grado de concordancia entre las mediciones independientes que se efectúan cuando se aplica el método analítico desarrollado a las muestras por el mismo analista y utilizando la misma instrumentación.

La prueba de hipótesis así como el procedimiento estadístico a seguir es el mismo que se explicó para precisión del sistema. En este caso se trabajan muestras reales o sintéticas aplicándoles la metodología desarrollada, es decir, esta prueba incluye las diferentes técnicas de preparación de muestra, instrumentales, etc. La conclusión a diferencia de la de precisión del sistema será la indicación en caso de aprobar la hipótesis nula que la metodología aplicada o desarrollada cumple o se encuentra abajo del error planteado por las instancias administradoras que lo hayan establecido (en este trabajo es del 95%), o en caso contrario al rechazarse la hipótesis nula que está arriba de ese error planteado.

#### ➤ *REPRODUCIBILIDAD*

Es el grado de concordancia entre las mediciones independientes realizadas por la metodología analítica establecida pero en la que se realizan variaciones con

respecto a las condiciones originales planteadas en la prueba de repetibilidad y que pueden ser: diferentes analistas, instrumento, etc..

La reproducibilidad del método se determina realizando dos etapas en el estudio estadístico el primero es realizar una prueba de hipótesis a las varianzas obtenidas por la metodología aplicada con la variación respectiva y posteriormente una prueba de hipótesis a las medias obtenidas con la variación respectiva.

Para la prueba de hipótesis sobre las varianzas se plantea que:

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_1: s_1^2 \neq s_2^2$$

Como se trata de determinar si las dos muestras provienen de poblaciones iguales, para la comparación de varianzas se utiliza el estadístico F de Fisher o Snedecor, por lo que se realiza el análisis de los datos para obtener la F experimental o calculada con la siguiente ecuación:

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

donde:

$s_1^2$  = 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.

La  $F_{cal.}$  se comparará con la F de tablas considerando un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0,05$ ) y con grados de libertad  $n_M-1$ ,  $n_m-1$ , y tomando en cuenta que es una prueba de dos colas.

Para rechazar la hipótesis nula, se utiliza el siguiente criterio:

$$F_{cal.} > F_{\alpha/2}$$

Dependiendo del resultado obtenido sobre las varianzas se procede a realizar la prueba de hipótesis sobre las medias la cual cambiará las ecuaciones que se utilizan para realizar los cálculos experimentales y grados de libertad en la prueba estadística "t de student" que se aplica, para ello la prueba de hipótesis que se establece es:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$



Si en la prueba de las varianzas se demuestre que las varianzas son semejantes, la ecuación que se utiliza para procesar los datos y obtener la  $t_{cal.}$  o experimental es:

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

y los grados de libertad se calculan como  $(n_1 + n_2) - 2$ .

En caso de que en la prueba de las varianzas se demuestre que las varianzas no son semejantes, la ecuación que se utiliza para procesar los datos y obtener la  $t_{cal.}$  o experimental es:

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

y los grados de libertad se calculan con la siguiente 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, para rechazar la hipótesis nula, se utiliza el siguiente criterio:

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

En el caso de que al realizar esta prueba se acepte la hipótesis nula de las medias y por lo tanto se acepte que los datos pertenecen a la misma población sabremos que el método es reproducible a pesar del cambio que se le haya realizado a la metodología, lo que dice que el método es confiable a pesar del cambio. En el caso de rechazarse la hipótesis nula indicará que el cambio que se haya efectuado a la metodología si causa variaciones importantes en la obtención de los datos y que deberá optimizarse éste si se desea que el método sea reproducible.

## **RECOBRO**

El recobro es el resultado expresado en porcentaje de la comparación entre la concentración del analito problema que se obtiene y la concentración que debe obtenerse después de tratar con el método una muestra a la cual se le adiciona una concentración conocida del analito. El cálculo se realiza con la siguiente ecuación y se reporta en porcentaje:

$$\% R = \frac{[Concentración]_{obtenida}}{[Concentración]_{teórica}} \times 100$$

Este proceso se puede realizar de dos maneras:

Una es fabricando una muestra preparada o sintética lo más parecida a la muestra que se va a trabajar, en la que se le adicionaron cantidades conocidas y precisas del o los analito(s) a analizar y a la que se le aplicará la metodología desarrollada, esto se realiza normalmente en la industria maquiladora (como la farmacéutica) ya que se cuenta con todos los compuestos que se utilizan para fabricar a la muestra, siendo ésta la que se realizó en este trabajo.

Otra es por medio de la manera conocida como “adición a la muestra”, en la cual a una muestra que ya fue analizada con la metodología se le adicionan cantidades conocidas y precisas del (o los) analito(s) a analizar y a la que se le aplicará de nuevo la metodología desarrollada.

# **CAPÍTULO II**

## **METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

## EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS.

### EQUIPOS

Para Ultravioleta-Visible:

- Espectrofotómetro UV-Vis de la marca Perkin-Elmer modelo Lambda 25 de doble haz.

Para la técnica de CLAE:

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia de la marca Knauer modelo Smartline con los siguientes módulos:
  - ✓ Bomba de doble pistón modelo Smartline 1000.
  - ✓ Válvula de inyección de 20 microlitros.
  - ✓ Columna Luna con fase estacionaria inversa C-18 (tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro de 100Å) con una longitud de columna de 50mm x 4.6mm de d.i.
  - ✓ Detector UV marca Knauer modelo Smartline 2500.
  - ✓ Computadora con programa de procesamiento Eurochrom.

### MATERIALES Y APARATOS

- Celdas de cuarzo para equipo UV-Vis de 1cm de longitud, de paso óptico, marca Beckman.
- Probeta graduada de 50mL.
- Navecillas para pesar.
- Espátula cromo-níquel.
- Matraz volumétrico tipo A de 10mL.
- Matraz volumétrico tipo A de 50mL.
- Matraz volumétrico tipo A de 100mL.
- Vasos de precipitados de 100mL.
- Micropipeta marca Transferpette de 0.5-5mL.
- Pipetas pasteur.
- Frasco de 1.5L para colocar la fase móvil.

- Equipo de filtración Millipore.
- Jeringa para cromatografía de líquidos de 250 microlitros, marca Hamilton.
- Matraces Erlenmeyer con capacidad de 250mL.
- Matraz kitasato con capacidad de 250mL.
- Embudo de filtración al vacío Fisher.
- Papel filtro de poro mediano.
- Parrilla de agitación magnética.
- Agitadores magnéticos.
- Balanza analítica Sartorius modelo BL-120S de peso máximo 120g y con una sensibilidad de 0.1mg.

### **REACTIVOS Y MUESTRA**

- Agua ASTM tipo I.
- Estándar secundario de Cefadroxilo monohidratado:
  - ✓ No. de Lote: 3334035
  - ✓ Proveedor: Fersinsa G.B
  - ✓ No. de estandarización: STD-021-04
  - ✓ % Base Húmeda: 94.57
- Cápsulas de Cefadroxilo monohidratado (DURACEF)
  - ✓ No. Lotes: 7 A 31106 3 (para UV) y 7 B 20132 3 (para HPLC) de Bristol Myers Squibb.
  - ✓ Fabricadas en México por Mead Johnson de México, S. de R.L. de C.V.
  - ✓ Dosis: Cada cápsula contiene Cefadroxilo monohidratado equivalente a 250mg de cefadroxilo.
  - ✓ Contenido: 20 cápsulas.
- Celulosa Microcristalina (Avicel pH101) como excipiente, el cual fue proporcionado por el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química UNAM.
- Ácido acético glacial marca JTBaker lote C02C57.
- Acetonitrilo grado HPLC Mallindcroft lote H076M51D56.

En este proyecto para realizar la validación de la metodología se desarrollaron experimentalmente las siguientes pruebas en cada una de las técnicas a estudiar:

Para sistema:

- Condiciones óptimas de trabajo.
- Linealidad de sistema.
- Precisión de sistema.

Para método:

- Condiciones óptimas de trabajo.
- Precisión de método. Repetibilidad.
- Recobro.

Lo primero que se realizó en este trabajo fue encontrar las condiciones óptimas de trabajo, linealidad y precisión de los sistemas para posteriormente pasar a la validación de la metodología en cada una de ellas, por lo anterior explicaremos primero la validación de los sistemas y posteriormente la del método en cada una de los sistemas.

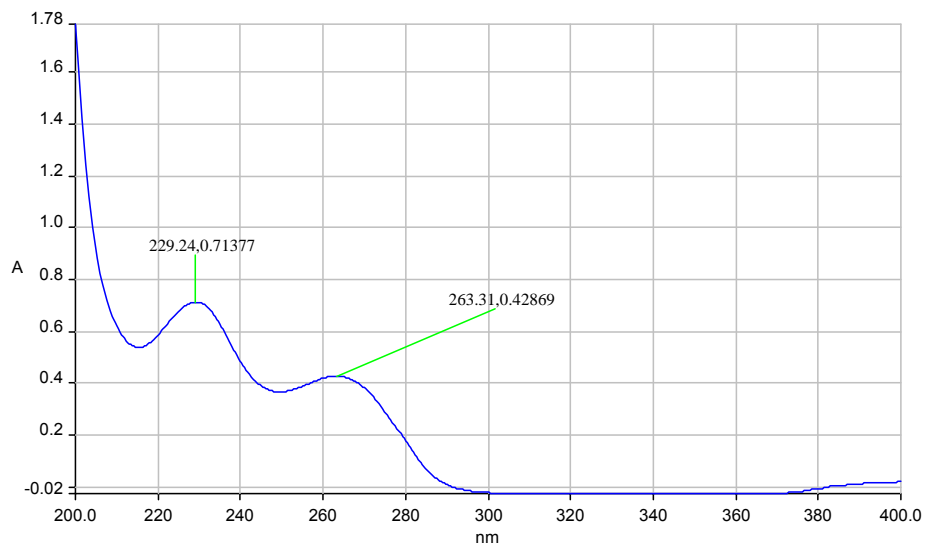
## VALIDACIÓN DEL SISTEMA

### ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

#### CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

Después de haber buscado en la bibliografía las características fisicoquímicas del cefadroxilo y tomando en consideración que es soluble en agua, así como la información en un trabajo previo realizado en el laboratorio <sup>21</sup> se procedió a realizar el espectro UV para comprobar que se mantenía estable en el instrumento las longitudes de onda reportadas en la literatura. Para ello se preparó una disolución con una concentración de 10 ppm respectivamente en agua ASTM tipo I. A esta disolución se le realizó su espectro en el espectrofotómetro a las siguientes condiciones de trabajo:

- ✓ Intervalo de longitud de onda: 400-200nm.
- ✓ Velocidad de barrido: 240nm/min.
- ✓ Resolución: 1nm.
- ✓ “Smooth”: 4.



**Fig. 26.- Espectro UV de cefadroxilo.**

Como se puede observar en el espectro la longitud de onda es la reportada en la literatura así como en el trabajo previo de un estudio del cefadroxilo en tabletas, por lo que se concluye que las condiciones óptimas de operación en el

sistema para correr espectros son las indicadas anteriormente en este punto y en el caso de realizar lecturas fijas la longitud de onda de máxima absorción que se utilizará será la de 263nm, permitiendo proceder a realizar el estudio de validación del método por espectroscopia.

### LINEALIDAD DEL SISTEMA

En este estudio se prepararon 5 soluciones estándar que se tuvieron en un intervalo entre 5-50ppm, para ello se preparó una solución madre de aprox. 100ppm, que se preparó de la siguiente manera:

Se pesaron 5mg del estándar (se tienen 4,49mg de cefadroxilo) y se llevaron a un matraz aforado de 50mL, por lo tanto se obtuvo una solución madre con una concentración de 89,9ppm de cefadroxilo.

De la solución madre se tomaron las siguientes alícuotas para preparar las disoluciones estándar:

<b>Alícuota de solución madre (mL)</b>	<b>Volumen de aforo(mL)</b>	<b>Concentración del estándar (ppm)</b>
1	10	9,0
2	10	18,0
3	10	27,0
4	10	36,0
5	10	45,0

Una vez preparados los estándares se leyeron por triplicado (lecturas independientes) cada uno de ellos a las condiciones óptimas de trabajo en el sistema, se utilizó como blanco el agua utilizada para preparar las soluciones.

### PRECISIÓN DEL SISTEMA

Para la precisión del sistema se utilizó la misma solución madre de la prueba de linealidad; de esta solución madre se prepararon 9 soluciones estándar de cefadroxilo a una concentración aprox. de 30ppm, que es el valor de concentración que cae en el centroide de la curva patrón del sistema.



Las nueve soluciones estándar se prepararon de la siguiente manera obteniéndose la siguiente concentración:

<b>Alicuota (mL)</b>	<b>Volumen de aforo (mL)</b>	<b>Concentración de los estándares (ppm)</b>
3	10	27,0

Posteriormente se hizo la lectura por triplicado de cada una de los nueve estándares en las condiciones óptimas de trabajo planteadas.

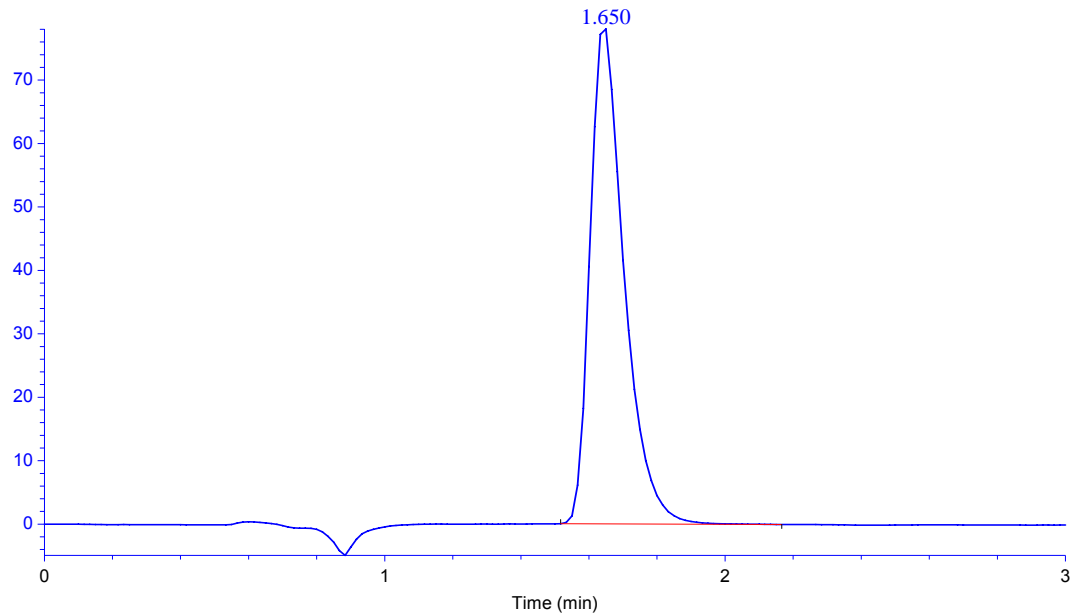
### **CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)**

#### CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

Después de haber revisado en la literatura las características físicas y fisicoquímicas del cefadroxilo, así como la información en un trabajo previo realizado en el laboratorio<sup>22</sup> se procedió a realizar en esta parte la inyección del estándar de cefadroxilo que se iba a utilizar, para obtener su cromatograma y encontrar las condiciones de trabajo adecuadas de fase móvil y flujo para lograr el menor tiempo de análisis; y como se utiliza como detector un espectrofotómetro UV-Vis la longitud de onda de trabajo fue de 263nm. Tomando en cuenta lo anterior y al realizar las pruebas se obtuvo que las mejores condiciones de trabajo en el cromatógrafo eran:

- ✓ Flujo: 1mL/min.
- ✓ Columna de fase inversa químicamente unida de C<sub>18</sub> (tamaño de partícula de 5µm y tamaño de poro de 100Å) con dimensiones de 50mm de longitud x 4.6mm de d.i.
- ✓ Longitud de trabajo del detector: 263nm.
- ✓ Se trabaja en modo isocrático con una fase móvil que contiene 95% agua (con 0.1% de ácido acético) y 5% Acetonitrilo.

Y se obtuvo a estas condiciones el siguiente cromatograma:



**Fig. 27.- Cromatograma del cefadroxilo.**

Como se puede observar en el cromatograma las condiciones planteadas en el trabajo previo de un estudio del cefadroxilo en tabletas es adecuado para obtener un análisis rápido, por lo que se concluye que las condiciones óptimas de operación en el sistema para correr los cromatogramas de las muestras son las indicadas anteriormente en este punto, permitiendo proceder a realizar el estudio de validación del método por CLAE.

#### LINEALIDAD DEL SISTEMA

En este estudio se prepararon 5 soluciones estándar que se tuvieron en un intervalo entre 4-50ppm, para ello se preparó una solución madre de aprox. 100ppm, que se preparó de la siguiente manera:

Se pesaron 5,3mg del estándar de cefadroxilo monohidratado (4,8mg de cefadroxilo) y se llevaron a un volumen de 50mL con agua para obtener una solución madre de concentración equivalente a 95.5ppm de cefadroxilo.

De la solución madre se tomaron las siguientes alícuotas para preparar los estándares:

<b>Concentración de cefadroxilo en la solución madre (ppm)</b>	<b>Alícuota (mL)</b>	<b>Volumen de aforo (mL)</b>	<b>Concentración de cefadroxilo en los estándares (ppm)</b>
95,5	0,5	10	4,8
95,5	0,7	10	6,7
95,5	0,9	10	8,6
95,5	1,2	10	11,5
95,5	1,5	10	14,3

Una vez preparados los estándares se inyectaron cada uno de ellos por triplicado a las condiciones óptimas de trabajo en el cromatógrafo.

Previamente se realizaron un blanco del sistema (corrida sin inyección alguna) y un blanco inyectando sólo agua y corresponde al solvente utilizado en los estándares.

#### PRECISIÓN DEL SISTEMA

Para la precisión del sistema se utilizó la misma solución madre utilizada para la linealidad (95,5ppm), de ésta se prepararon 9 soluciones estándar de cefadroxilo a una concentración aprox. a 9ppm que es un valor de concentración que cae en el centroide de la curva patrón del sistema.

Las soluciones estándar se prepararon de la siguiente manera obteniéndose la siguiente concentración:

<b>Concentración de cefadroxilo en la solución madre (ppm)</b>	<b>Alícuota (mL)</b>	<b>Volumen de aforo(mL)</b>	<b>Concentración de cefadroxilo en los estándares (ppm)</b>
95,5	0,9	10	8,6

Posteriormente se inyectaron por triplicado cada uno de los estándares en las mismas condiciones óptimas de trabajo planteadas en el cromatógrafo y se inyectaron los mismos blancos indicados en la linealidad del sistema.

Con lo anterior se tenían validados los sistemas indicados para este trabajo, por lo que se procedió a pasar al punto de validar la metodología.

## VALIDACIÓN DE MÉTODO

### CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

Después de realizar la revisión bibliográfica del producto a cuantificar (cefadroxilo), se encontró que debido a las características fisicoquímicas de éste, se podía diseñar una metodología apropiada para su extracción de la muestra comercial (cápsulas de cefadroxilo marca Duracef®).

Para esta parte del proyecto se busco establecer una metodología que se pudiera aplicar tanto para Espectroscopia UV como para la CLAE y que sólo variara en la parte final de la dilución de ésta para ser llevada al instrumento.

Para ello después de realizar varias pruebas se planteó la siguiente metodología:

### **METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CEFADROXILO EN CÁPSULAS**

El procedimiento para la extracción del principio activo (cefadroxilo) de muestras de cápsulas es el siguiente:

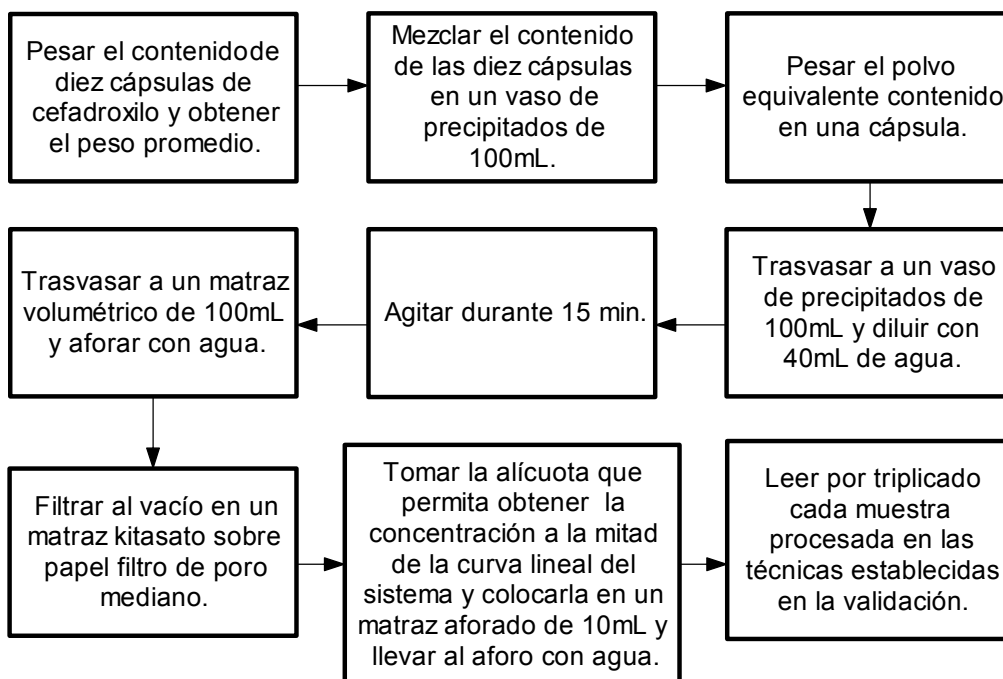
- 1.-** Pesar diez cápsulas llenas con el polvo del fármaco y luego vacías (después de haber sacado el fármaco), obteniéndose el peso promedio del contenido de las cápsulas. El polvo se mezcla en un vaso de precipitados de 100mL (muestra primaria).
- 2.-** Se muestrea nueve veces la muestra de polvo anterior (muestra primaria), tratando de tomar el peso equivalente al contenido de una cápsula (muestras secundarias).
- 3.-** Trasvasar cada muestra secundaria a un vaso de precipitados de 100mL, adicionar 40mL de agua, agitar de manera constante por medio de una parrilla de agitación magnética durante 15 minutos.
- 4.-** Se trasvasa a un matraz volumétrico de 100mL y se lleva al aforo con agua.

5.- Se filtra la disolución al vacío por medio de un embudo Fisher de tallo largo, con papel filtro de poro mediano y con ayuda de un matraz kitasato de 250mL.

6.- Se toma del matraz kitasato la alícuota que permita obtener la concentración a la mitad de la curva lineal (para UV son aprox. 100µL y para HPLC 36µL) obtenida para el sistema en cada técnica utilizada (UV-Vis y HPLC). Colocando la alícuota en un matraz volumétrico de 10mL y se lleva al aforo con agua.

8.- Se realizan lecturas o inyecciones por triplicado de cada muestra secundaria procesada en cada técnica.

### DIAGRAMA GENERAL DEL MÉTODO



## METODOLOGÍA POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

### REPETIBILIDAD

Para esta parte de la validación la metodología explicada en el punto anterior se realizó en dos etapas, la primera fue realizando este estudio con una muestra preparada en el laboratorio y la segunda fue realizándola con muestras comerciales.

Lo anterior permite visualizar la importancia que tiene el excipiente en la muestra comercial ya que debido a que no se cuenta con la información por parte de la empresa de que tipo de excipiente utilizan en su formulación se trabajó con una de las opciones de excipiente que es muy común en formulaciones de este tipo de antibióticos.

#### ➤ Repetibilidad con muestra preparada con avicel como excipiente

Para esta prueba se preparó un lote de muestra preparada tomando en cuenta el peso promedio del polvo contenido en las cápsulas de cefadroxilo y considerando el equivalente a muestrear en 10 cápsulas.

Se consideró un peso promedio por cápsula de 267,7mg, por lo que se pesaron del estándar de cefadroxilo monohidratado (CMH) 2 502,5mg y 210,5mg de excipiente (avicel), esta mezcla pesó en total 2 713mg que es el equivalente aproximado al contenido en 10 cápsulas y que da una concentración de 222,5mg/cápsula como se muestra en el siguiente cálculo:

$$\text{Peso de CMH} = 2\ 502,5\text{mg} = 2\ 254,9\text{mg Cef.} + 210,5\text{mg excip.} = 2\ 713\text{mg de mezcla experimental.}$$

$$2\ 713\text{mg totales corresponden a } 10,134\text{cápsulas.}$$

$$2\ 254,9\text{mg Cef.}/10,134\text{ cap.} = 222,51\text{ mg Cef./cap.}$$

Se pesaron y colocaron las cantidades mencionadas de principio activo y excipiente en un vaso de precipitados de 100mL el cual fue tapado con papel aluminio y agitado manualmente hasta completa homogenización.

La mezcla anterior se muestreó 9 veces tratando de tomar cantidades equivalentes al peso promedio contenido en una cápsula (267,7mg), y se procesaron bajo la metodología antes mencionada (excepto el paso 1).

Para esta prueba se preparó un blanco de reactivos utilizando sólo el avicel, por lo que se pesó de avicel la misma cantidad (peso promedio) que contiene la cápsula tanto de principio activo como de excipiente, es decir aprox. 267,7mg. Al blanco de reactivos se le aplicó la metodología descrita (excepto el paso 1). El peso de los muestreos equivalentes de la muestra preparada son las siguientes:

Muestra	Peso(g)
1	0,2709
2	0,2707
3	0,2707
4	0,2707
5	0,2707
6	0,2707
7	0,2707
8	0,2707
9	0,2707

Para el blanco de reactivos se pesó de avicel lo siguiente:

Peso del excipiente (g)
0,2725

➤ Repetibilidad con muestra comercial (cápsulas de cefadroxilo monohidratado)

Se pesaron 10 cápsulas llenas y luego vacías para obtener el peso promedio de su contenido y que equivale a 267,7mg (muestra primaria) para esta prueba. El polvo obtenido de las 10 cápsulas se puso en un vaso de precipitados de 100mL y se homogenizó, posteriormente se tomaron 9 muestreos de cantidades equivalentes al peso promedio de una cápsula y se procesaron con la metodología desarrollada.



El peso de los muestreos equivalentes de la muestra comercial son las siguientes:

<b>Muestras</b>	<b>Peso (g)</b>
1	0,2700
2	0,2670
3	0,2672
4	0,2670
5	0,2670
6	0,2670
7	0,2670
8	0,2670
9	0,2670

#### RECOBRO

Para esta prueba se trabajó con las mismas disoluciones que se trabajaron en la prueba de repetibilidad con muestra preparada.

## CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA

### REPETIBILIDAD

Para esta parte de la validación la metodología explicada en el punto anterior se realizó en dos etapas, la primera fue realizando este estudio con una muestra preparada en el laboratorio y la segunda fue realizándola con muestras comerciales.

Lo anterior permite visualizar la importancia que tiene el excipiente en la muestra comercial ya que debido a que no se cuenta con la información por parte de la empresa del tipo de excipiente que utilizan en su formulación se trabajó con una de las opciones de excipiente frecuente para su uso en formulaciones de este tipo de antibióticos.

#### ➤ Repetibilidad con muestra preparada con avicel como excipiente

Para esta prueba se preparó un lote de muestra preparada tomando en cuenta el peso promedio del polvo contenido en las cápsulas de cefadroxilo y considerando el equivalente a muestrear en 10 cápsulas.

Se consideró un peso promedio de cápsula de 270,7mg, por lo que se pesaron del estándar de cefadroxilo monohidratado (CMH) 2 506,5mg y 205,8mg de excipiente (avicel), esta mezcla pesó en total 2 712,3mg que es el equivalente aproximado al contenido en 10 cápsulas y que da una concentración de 225,413 mg/cápsula como se muestra en el siguiente cálculo:

$$\text{Peso de CMH} = 2\ 506,5\text{mg} = 2\ 258,5\text{mg Cef} + 205,8\text{mg excip} = 2\ 712,3\text{mg de mezcla experimental.}$$

$$2\ 712,3\text{mg totales corresponden a } 10,0195\text{cápsulas.}$$

$$2\ 258,5\text{mg Cef.}/10,0195\text{cáp.} = 225,413\ \text{mg Cef.}/\text{cáp.}$$

Se pesaron y colocaron las cantidades mencionadas de principio activo y excipiente en un vaso de precipitados de 100mL el cual fue tapado con papel aluminio y agitado manualmente hasta completa homogenización.

La mezcla anterior se muestreó 9 veces tratando de tomar cantidades equivalentes al peso promedio contenido en una cápsula (270,7mg), y se procesaron bajo la metodología antes mencionada (excepto el paso 1).

Para esta prueba se preparó un blanco de reactivos utilizando sólo el avicel, por lo que se pesó de avicel la misma cantidad (peso promedio) que contiene la cápsula tanto de principio activo como de excipiente, es decir aprox. 270,7mg. Al blanco de reactivos se le aplicó la metodología descrita (excepto el paso 1). También se inyectó un blanco de sistema.

Cada muestra secundaria se inyectó por triplicado en el equipo Cromatográfico a las condiciones óptimas de trabajo ya descritas en el sistema.

Se pesó de cefadroxilo monohidratado con avicel en cada muestra secundaria, las siguientes cantidades:

<b>Muestras secundarias</b>	<b>Peso (g)</b>
1	0,2702
2	0,2705
3	0,2704
4	0,2703
5	0,2704
6	0,2706
7	0,2705
8	0,2704
9	0,2702

Para el blanco de reactivos se pesó de avicel lo siguiente:

<b>Peso de excipiente (g)</b>
0,2702

Repetibilidad con muestra comercial (cápsulas de cefadroxilo monohidratado)

Se pesaron 10 cápsulas llenas y luego vacías para obtener el peso promedio de su contenido y que equivale a 270,7mg (muestra primaria) para esta prueba. El polvo obtenido de las 10 cápsulas se puso en un vaso de precipitados de 100mL y se mezcló, posteriormente se tomaron 9 muestreos de cantidades equivalentes al peso promedio de una cápsula y se procesaron con la metodología desarrollada.

El peso de los muestreos equivalentes de la muestra comercial son las siguientes:

<b>Muestras secundarias</b>	<b>Peso (g)</b>
1	0,2672
2	0,2674
3	0,2671
4	0,2674
5	0,2672
6	0,2672
7	0,2674
8	0,2674
9	0,2670

RECOBRO

Para esta prueba se trabajó con las mismas disoluciones que se trabajaron en la prueba de repetibilidad con muestra preparada.

## **CAPÍTULO III**

# **RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Hay que indicar que en el Anexo 2 y 3 de esta tesis se encuentran las impresiones de las hojas Excel con los datos y cálculos completos obtenidos para cada una de las pruebas que se discuten en este capítulo para su consulta y los resultados necesarios para entender su obtención general.

También hay que indicar que para un mejor entendimiento de este trabajo es mejor que junto con los resultados que se obtienen en cada parte se realice el análisis de éstos al mismo tiempo, de ahí el nombre del capítulo.

## ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA VALIDACIÓN DEL SISTEMA

### CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

Como se explicó en el capítulo II las condiciones de trabajo en la Técnica de UV-Vis fueron:

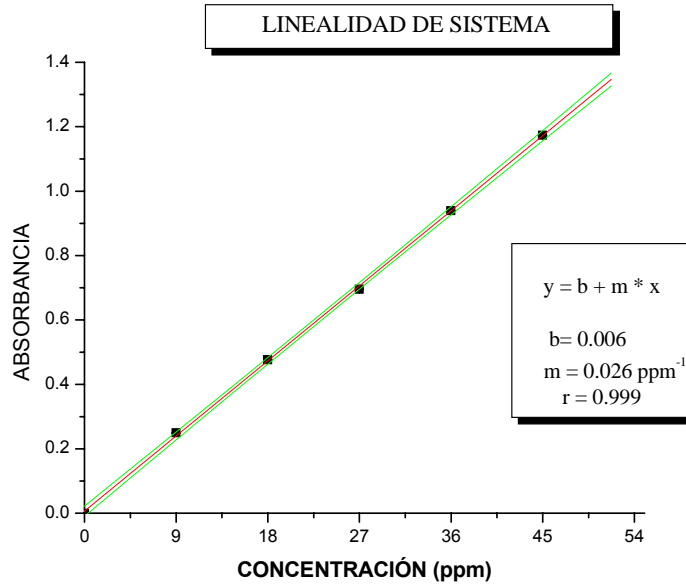
- ✓ **Región de trabajo: UV**
- ✓ **Velocidad de barrido: 240nm/min.**
- ✓ **“Smooth”: 4.**
- ✓ **Corrección de línea base a 340nm.**
- ✓ **Intervalo de longitud de onda: 400-200nm.**
- ✓ **Resolución: 1nm.**
- ✓ **Longitud de máxima absorción: 263nm.**

### LINEALIDAD DEL SISTEMA

El gráfico de la curva patrón obtenida en este experimento presenta una tendencia lineal que parece empieza en el origen (0,0), sin embargo, debemos comprobarlo realizando una prueba de hipótesis a la ordenada para saber si pasa por cero o no.

Concentración (ppm)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
0	0	0	0
9,0	0,2491	0,2497	0,2502
18,0	0,4761	0,4772	0,4766
27,0	0,6955	0,6955	0,6954

36,0	0,9399	0,9390	0,9390
45,0	1,1734	1,1748	1,1737



**Gráfica 1. Curva patrón de cefadroxilo en agua en un intervalo de concentración de 9-45ppm tomando el valor al origen.**

Las hipótesis planteadas a la ordenada son:

$$H_0: b = \beta, \beta = 0$$

$$H_1: b \neq 0$$

El estadístico de prueba es la "t student", se va a trabajar a un nivel de significancia del 95%, con 16 grados de libertad (n-2 ó 18-2) lo que da una  $t_{tablas}$  con  $t_{(\alpha/2, n-2)}$  de:

$$t_{(0,025,16)} = 2,120$$

El valor que se obtiene para la  $t_{calculada}$  es:

$$t_{cal.} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nSxx}{Sxx + (n\bar{x})^2}} = 0,035$$

donde:

$$b = 0.006$$

$$\beta = 0$$

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^{i=n} x^2 - \left( \sum_{i=1}^{i=n} x \right)^2 = 76452,6897$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^{i=n} y^2 - \left( \sum_{i=1}^{i=n} y \right)^2 = 5,14E+01$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^{i=n} xy - \left( \sum_{i=1}^{i=n} x \right) \left( \sum_{i=1}^{i=n} y \right) = 1,98E+03$$

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)nS_{xx}}} = 0,415670820$$

$$\bar{x} = 22.485$$

El criterio de rechazo de la hipótesis nula ( $H_0$ ) es:

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

Como la t calculada es menor que la t de tablas la  $H_0$  no se rechaza, por lo que la recta tiende a pasar por la ordenada al origen, y la ecuación a utilizar para el análisis cuantitativo es la ecuación de la ley de Lambert y Beer:

$$A = aIC$$

Una vez dicho lo anterior se realiza el cálculo del intervalo de confianza (al 95% de significancia) para la ordenada al origen y la pendiente:

#### Sobre la ordenada

$$IC_b = 0,006 \pm t_{\alpha/2} \cdot Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n \bar{x})^2}{nS_{xx}}} = 0,006 \pm 0,36821$$

$$-0,362 < 0,006 < 0,374$$

#### Sobre la pendiente

$$IC_m = 0,026 \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}} = 0,026 \pm 0,0135215$$

$$0,012 < 0,026 < 0,039$$



PRECISIÓN DE SISTEMA

En el caso de este experimento se obtuvieron los siguientes resultados:

No. solución	Concentración (ppm)	Absorbancia
1	27,0	0,6999
		0,7019
		0,7007
2		0,701
		0,6963
		0,6964
3		0,6945
		0,6953
		0,6955
4	0,6985	
	0,6974	
	0,6974	
5	0,7037	
	0,703	
	0,7076	
6	0,7095	
	0,7121	
	0,7128	
7	0,7045	
	0,7098	
	0,7093	
8	0,7051	
	0,7076	
	0,7066	
9	0,6954	
	0,6969	
	0,6981	

RESULTADOS ESTADÍSTICOS	
<b>C.V.</b>	0,81
<b>Media</b>	0,7021
<b>s</b>	0,0057
<b>s<sup>2</sup></b>	3,25*10 <sup>-5</sup>

Las pruebas de hipótesis que se proponen son:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2$$

Donde el valor de  $\sigma_0^2$  sale del despeje de la desviación estándar de la ecuación de C.V:

$$C.V = S / \bar{x} * 100 \quad \%$$

tomando en cuenta que, la precisión debe ser por lo menos del 95% (C.V.=5%) y utilizando los datos experimentales se obtiene un valor de  $\sigma_0^2 = 1,233 * 10^{-3}$

El estadístico de prueba para realizar el estudio de la precisión del sistema es la  $\chi^2$ , ya que se trata de comparar varianzas provenientes de una misma población.

La  $\chi^2$  calculada se obtiene de la siguiente forma:

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = 0,686$$

El criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

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

La  $\chi^2$  de tablas nos da para un nivel de significancia del 95%,  $\chi_{\alpha}^2 (\chi_{0,05}^2)$  y 26 grados de libertad 38,885.

Como 0,686 es menor que 38,885, la hipótesis nula ( $H_0$ ) se acepta, y por lo tanto el sistema tiene una precisión de por lo menos el 95%.

Como puede observarse el C.V. obtenido en esta parte del trabajo fue menor del 3% lo que indica que además de cumplir el valor mínimo planteado para este trabajo se cumpliría también el indicado por la industria farmacéutica.

Posteriormente se realizó el cálculo del intervalo de confianza de la desviación estándar con la siguiente expresión matemática. El intervalo de confianza se muestra a continuación:

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

$$4,49 \times 10^{-3} < 5,63 \times 10^{-3} < 7,82 \times 10^{-3}$$

## VALIDACIÓN DEL MÉTODO

REPETIBILIDAD*Muestra preparada con avicel como excipiente*

Muestra secundaria	Réplica	mg Cef/cápsula
1	1	219,8241
	2	220,1798
	3	219,9031
2	1	215,2689
	2	215,3481
	3	215,3481
3	1	216,0996
	2	215,7436
	3	215,6250
4	1	215,8623
	2	215,9018
	3	215,6250
5	1	216,8117
	2	216,8908
	3	216,8908
6	1	221,6772
	2	221,8354
	3	222,2705
7	1	216,4952
	2	216,8512
	3	216,8117
8	1	217,2072
	2	216,6534
	3	216,6534
9	1	217,4841
	2	217,4050
	3	217,1677

RESULTADOS ESTADÍSTICOS	
C.V.	0,98%
Media	217,4
s	2,1
s <sup>2</sup>	4,5

Las pruebas de hipótesis planteadas son:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2$$

Donde el valor de  $\sigma_0^2$  sale del despeje de la desviación estándar de la ecuación de C.V:

$$C.V. = S / \bar{x} * 100 \quad \%$$

tomando en cuenta que, la repetibilidad debe ser por lo menos del 95% (C.V.=5%) y utilizando los datos experimentales se obtiene un valor de  $\sigma_0^2 = 118,158$ .

El estadístico de prueba para realizar el estudio de la repetibilidad del método es la  $\chi^2$ , ya que se trata de comparar varianzas provenientes de una misma población.

La  $\chi^2$  calculada se obtiene de la siguiente forma:

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = 0,997$$

El criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

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

La  $\chi^2$  de tablas nos da para un nivel de significancia del 95%,  $\chi_{\alpha}^2 (\chi_{0.05}^2)$  y 26 grados de libertad 38,885.

Como 0,997 es menor que 38,885, la hipótesis nula ( $H_0$ ) se acepta, y por lo tanto el método tiene una repetibilidad de por lo menos el 95% para las muestras preparadas.

Como puede observarse el C.V. obtenido en esta parte del trabajo fue menor del 3% lo que indica que además de cumplir el valor mínimo planteado para este trabajo se cumpliría también el indicado por la industria farmacéutica.

Posteriormente se realizó el cálculo del intervalo de confianza de la desviación estándar con la siguiente expresión matemática. El intervalo de confianza se muestra a continuación:

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

$$1,7 < 2,1 < 2,9$$

Muestra comercial de cefadroxilo monohidratado en cápsulas

Muestra secundaria	Réplica	mg Cef/ cápsula
1	1	236,8830
	2	236,6845
	3	236,6448
2	1	239,6230
	2	239,4626
	3	239,4626
3	1	239,7755
	2	239,8958
	3	239,8557
4	1	237,5777
	2	237,2568
	3	237,2568
5	1	236,3745
	2	236,9360
	3	236,9761
6	1	228,9553
	2	229,2761
	3	229,1157
7	1	240,4251
	2	240,7058
	3	240,7459
8	1	236,1339
	2	236,5750
	3	236,5750
9	1	230,2386
	2	230,3589
	3	229,9177

RESULTADOS ESTADÍSTICOS	
<b>C.V.</b>	1,65%
<b>Media</b>	236,23
<b>s</b>	3,9
<b>s<sup>2</sup></b>	15,3

Las pruebas de hipótesis planteadas son:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2$$

tomando en cuenta que, la repetibilidad debe ser por lo menos del 95% (C.V.=5%) y utilizando los datos experimentales se obtiene un valor de  $\sigma_0^2 = 139,5762$ .

El estadístico de prueba para realizar el estudio de la repetibilidad del método es la  $\chi^2$ , ya que se trata de comparar varianzas provenientes de una misma población.

La  $\chi^2$  calculada se obtiene de la siguiente forma:

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = 2,849$$

El criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

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

La  $\chi^2$  de tablas nos da para un nivel de significancia del 95%,  $\chi_{\alpha}^2(\chi_{0,05}^2)$  y 26 grados de libertad 38,885.

Como 2,849 es menor que 38,885, la hipótesis nula ( $H_0$ ) se acepta, y por lo tanto el método tiene una repetibilidad de por lo menos del 95% para las muestras reales.

Como puede observarse el C.V. obtenido en esta parte del trabajo fue menor del 3% lo que indica que además de cumplir el valor mínimo planteado para este trabajo se cumpliría también el indicado por la industria farmacéutica.

Posteriormente se realizó el cálculo del intervalo de confianza de la desviación estándar con la siguiente expresión matemática. El intervalo de confianza se muestra a continuación:

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

$$3,1 < 3,9 < 5,4$$

### RECOBRO

Considerando que el valor en la mezcla preparada es de 222,5mg de cefadroxilo por cápsula, el porcentaje de recobro se obtiene con el cálculo siguiente:

$$R = \frac{[Concentrac i \acute{o}n]_{obtenida}}{[Concentrac i \acute{o}n]_{te \acute{o}rica}} \times 100$$

Por lo tanto los resultados obtenidos de recobro son:

<b>Muestra secundaria</b>	<b>Réplica</b>	<b>(%) Recobro</b>
1	1	98,793
	2	98,952
	3	98,828
2	1	96,745
	2	96,781
	3	96,781
3	1	97,118
	2	96,958
	3	96,905
4	1	97,012
	2	97,029
	3	96,905
5	1	97,438
	2	97,474
	3	97,474
6	1	99,625
	2	99,696
	3	99,892
7	1	97,296
	2	97,456
	3	97,438
8	1	97,616
	2	97,367
	3	97,367
9	1	97,741
	2	97,705
	3	97,598

<b>RESULTADOS ESTADÍSTICOS</b>	
<b>C.V.</b>	0,96%
<b>media</b>	97,7
<b>s</b>	0,9
<b>s<sup>2</sup></b>	0,9

Recordando que la Farmacopea Europea indica no menos del 95% y no más de 101% y la USP 28 indica no menos de 90% y no más de 120% del contenido de

cefadroxilo en cápsulas, podemos indicar que se cumple con lo establecido en ambas Farmacopeas, teniéndose un recobro de 96- 99% en nuestro método.

## **CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE) VALIDACIÓN DEL SISTEMA**

### CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

Como se explicó en el capítulo II las condiciones de trabajo en la Técnica de CLAE fueron:

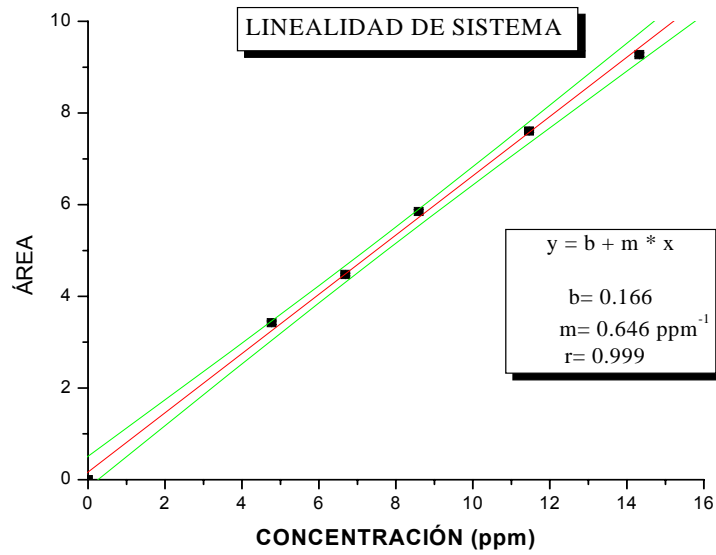
- ✓ **Flujo: 1mL/min.**
- ✓ **Columna de fase inversa químicamente unida de C<sub>18</sub> (tamaño de partícula de 5µm y tamaño de poro de 100Å) con dimensiones de 50mm de longitud x 4.6mm de d.i.**
- ✓ **Longitud de trabajo del detector: 263nm.**
- ✓ **Se trabaja en modo isocrático con una fase móvil que contiene 95% agua (con 0.1% de ácido acético) y 5% Acetonitrilo.**
- ✓ **El disolvente utilizado para la preparación de las soluciones fue agua ASTM tipo I.**

### LINEALIDAD DEL SISTEMA

El gráfico de la curva patrón obtenida en este experimento presenta una tendencia lineal que parece tiende al cero en la ordena, sin embargo debemos comprobarlo realizando una prueba de hipótesis a la ordenada para saber si pasa por cero o no.

<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>
0	0	0	0
4,8	3,44327	3,35343	3,4788
6,7	4,44144	4,45585	4,53224
8,6	5,90258	5,88406	5,76676
11,5	7,65387	7,56767	7,59673
14,3	9,24712	9,34899	9,22136





**Gráfica 3. Curva patrón de cefadroxilo en agua en un intervalo de concentración de 5-15ppm tomando el valor al origen.**

Las hipótesis planteadas a la ordenada son:

$$H_0: b = \beta, \beta = 0$$

$$H_1: b \neq 0$$

El estadístico de prueba es la "t student", se va a trabajar a un nivel de significancia del 95%, con 16 grados de libertad (n-2 ó 18-2) lo que da una  $t_{tablas}$  con  $t_{(\alpha/2, n-2)}$  de:

$$t_{(0,025,16)} = 2,120$$

El valor que se obtiene para la  $t_{calculada}$  es:

$$t_{cal.} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nSxx}{Sxx + (n\bar{x})^2}} = 2,528$$

$$b = 0,16634$$

$$\beta = 0$$

$$Sxx = n \sum_{i=1}^{i=n} x^2 - \left( \sum_{i=1}^{i=n} x \right)^2 = 6896,8028$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^{i=n} y^2 - \left( \sum_{i=1}^{i=n} y \right)^2 = 2,89E+03$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^{i=n} xy - \left( \sum_{i=1}^{i=n} x \right) \left( \sum_{i=1}^{i=n} y \right) = 4,46E+03$$

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)nS_{xx}}} = 0,14428$$

$$\bar{x} = 7,64076$$

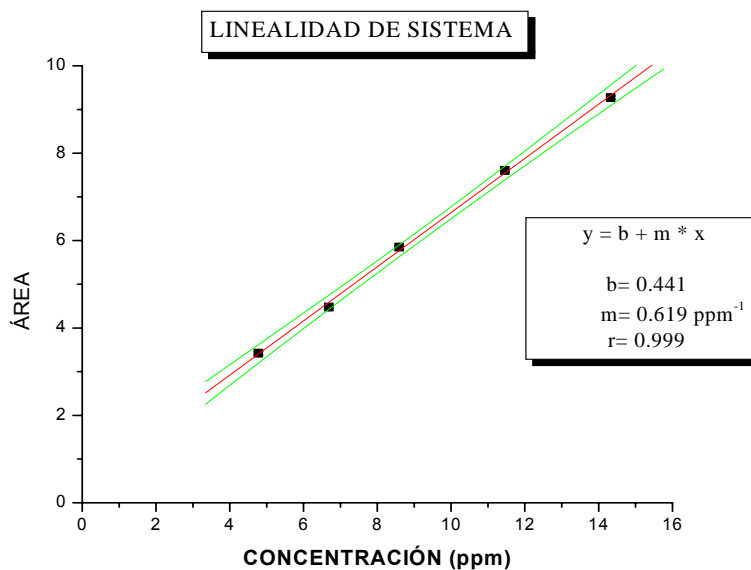
El criterio de rechazo de la hipótesis nula (H<sub>0</sub>) es:

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

Como la t calculada es mayor que la t de tablas (2,528 > 2,120) la H<sub>0</sub> se rechaza, por lo que la recta no tiende a pasar por la ordenada al origen, y la ecuación a utilizar para el análisis cuantitativo es la ecuación de una línea recta.

$$y = m x + b$$

Tomando en cuenta el resultado anterior la curva patrón que se trabaja es la siguiente:



**Gráfica 3. Curva patrón de cefadroxilo en agua en intervalo de concentración de 5-15ppm sin tomar el valor al origen.**

Una vez dicho lo anterior se realiza el cálculo del intervalo de confianza (al 95% de significancia) para la ordenada al origen y la pendiente:

**Sobre la ordenada**

$$IC_b = 0,44216 \pm t_{\alpha/2} \cdot Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{x})^2}{nS_{xx}}} = 0,44216 \pm 0,149289$$

$$0,293 < 0,442 < 0,591$$

**Sobre la pendiente**

$$IC_m = 0,61991 \pm t_{\alpha/2} \cdot Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}} = 0,61991 \pm 0,01527013$$

$$0,605 < 0,620 < 0,635$$

PRECISIÓN DE SISTEMA

En el caso de este experimento se obtuvieron los siguientes resultados:

No. Solución	Concentración (ppm)	Área
1	8,6	5,86103
		5,96518
		6,01723
2		5,95089
		5,79577
		5,67881
3		5,71018
		5,53057
		5,6259
4	5,58573	
	5,68788	
	5,65709	
5	5,87366	
	5,75865	
	5,86958	
6	5,93479	
	5,83573	
	5,80099	
7	5,72459	
	5,8725	
	5,70765	
8	5,81358	
	5,8388	
	5,79549	
9	5,80011	
	5,75999	
	5,83745	

RESULTADOS ESTADÍSTICOS	
<b>C.V.</b>	2,03%
<b>Media</b>	5,7885
<b>s</b>	0,12
<b>s<sup>2</sup></b>	0,014

Las pruebas de hipótesis que se proponen son:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2$$

Donde el valor de  $\sigma_0^2$  sale del despeje de la desviación estándar de la ecuación de C.V:

$$C.V. = \frac{s}{x} 100$$

tomando en cuenta que, la precisión debe ser por lo menos del 95% (C.V.=5%) y utilizando los datos experimentales se obtiene un valor de  $\sigma_0^2 = 0,08377$

El estadístico de prueba para realizar el estudio de la precisión del sistema es la  $\chi^2$ , ya que se trata de comparar varianzas provenientes de una misma población.

La  $\chi^2$  calculada se obtiene de la siguiente forma:

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = 4,268$$

El criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

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

La  $\chi^2$  de tablas nos da para un nivel de significancia del 95%,  $\chi_{\alpha}^2 (\chi_{0,05}^2)$  y 26 grados de libertad 38,885.

Como 4,268 es menor que 38,885, la hipótesis nula ( $H_0$ ) se acepta, y por lo tanto el sistema tiene una precisión de por lo menos el 95%.

Como puede observarse el C.V. obtenido en esta parte fue cercano al 2% lo que indica que además de cumplir el valor mínimo planteado para este trabajo se cumpliría también el indicado por la industria farmacéutica.

Posteriormente se realizó el cálculo del intervalo de confianza de la desviación estándar con la siguiente expresión matemática. El intervalo de confianza se muestra a continuación:

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

$$0,092 < 0,12 < 0,161$$

## VALIDACIÓN DEL MÉTODO

REPETIBILIDAD*Muestra preparada con avicel como excipiente*

Muestra secundaria	Réplica	mg Cef/cápsula
1	1	207,5068
	2	206,74
	3	207,193
2	1	217,634
	2	218,763
	3	220,92
3	1	220,4637
	2	218,0149
	3	219,1132
4	1	234,313
	2	232,9747
	3	238,96
5	1	218,569
	2	216,875
	3	218,046
6	1	216,594
	2	218,816
	3	219,391
7	1	238,379
	2	230,9098
	3	233,739
8	1	217,575
	2	219,544
	3	219,777
9	1	219,595
	2	218,648
	3	216,906

RESULTADOS ESTADÍSTICOS	
<b>C.V.</b>	3,89%
<b>Media</b>	220,9615
<b>s</b>	8,6
<b>s<sup>2</sup></b>	73,4

Las pruebas de hipótesis que se proponen son:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2$$

Donde el valor de  $\sigma_0^2$  sale del despeje de la desviación estándar de la ecuación de C.V:

$$C.V. = \frac{s}{x} 100$$

tomando en cuenta que, la precisión debe ser por lo menos del 95% (C.V.=5%) y utilizando los datos experimentales se obtiene un valor de  $\sigma_0^2 = 122,06$

El estadístico de prueba para realizar el estudio de la precisión del sistema es la  $\chi^2$ , ya que se trata de comparar varianzas provenientes de una misma población.

La  $\chi^2$  calculada se obtiene de la siguiente forma:

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = 15,639$$

El criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

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

La  $\chi^2$  de tablas nos da para un nivel de significancia del 95%,  $\chi_{\alpha}^2(\chi_{0.05}^2)$  y 26 grados de libertad 38,885.

Como 15,639 es menor que 38,885, la hipótesis nula ( $H_0$ ) se acepta, y por lo tanto el sistema tiene una precisión de por lo menos el 95%.

Posteriormente se realizó el cálculo del intervalo de confianza de la desviación estándar con la siguiente expresión matemática. El intervalo de confianza se muestra a continuación:

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

$$6,75 < 8,57 < 11,74$$

Muestra comercial de cefadroxilo monohidratado en cápsulas

Muestra secundaria	Réplica	mg Cef/ cápsula
1	1	249,206
	2	249,206
	3	245,757
2	1	239,975
	2	238,706
	3	248,178
3	1	236,269
	2	234,545
	3	230,459
4	1	233,899
	2	238,479
	3	234,534
5	1	236,179
	2	231,503
	3	229,325
6	1	238,086
	2	239,583
	3	234,181
7	1	250,864
	2	247,776
	3	246,233
8	1	230,815
	2	231,587
	3	229,592
9	1	234,165
	2	230,829
	3	232,238

RESULTADOS ESTADÍSTICOS	
<b>C.V.</b>	2,91%
<b>Media</b>	237,8581
<b>s</b>	6,9
<b>s<sup>2</sup></b>	48,0

Las pruebas de hipótesis que se proponen son:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2$$



Donde el valor de  $\sigma_0^2$  sale del despeje de la desviación estándar de la ecuación de C.V:

$$C.V. = \frac{s}{x} 100$$

tomando en cuenta que, la precisión debe ser por lo menos del 95% (C.V.=5%) y utilizando los datos experimentales se obtiene un valor de  $\sigma_0^2 = 141,44$

El estadístico de prueba para realizar el estudio de la precisión del sistema es la  $\chi^2$ , ya que se trata de comparar varianzas provenientes de una misma población.

La  $\chi^2$  calculada se obtiene de la siguiente forma:

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = 8,831$$

El criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

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

La  $\chi^2$  de tablas nos da para un nivel de significancia del 95%,  $\chi_{\alpha}^2 (\chi_{0,05}^2)$  y 26 grados de libertad 38,885.

Como 8,831 es menor que 38,885, la hipótesis nula ( $H_0$ ) se acepta, y por lo tanto el sistema tiene una precisión de por lo menos el 95%.

Posteriormente se realizó el cálculo del intervalo de confianza de la desviación estándar con la siguiente expresión matemática. El intervalo de confianza se muestra a continuación:

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

$$5,46 < 6,93 < 9,50$$

RECOBRO

Considerando que el valor en la mezcla preparada es de 225,41mg de cefadroxilo por cápsula, el porcentaje de recobro se obtiene con el cálculo siguiente:

$$R = \frac{[\text{Concentrac i ó n}]_{\text{obtenida}}}{[\text{Concentrac i ó n}]_{\text{te ó r i c a}}} \times 100$$

Por lo tanto los resultados obtenidos de recobro son:

Muestra secundaria	Réplica	(%) Recobro
1	1	92.056
	2	91.72
	3	91.92
2	1	96.55
	2	97.05
	3	98.01
3	1	97.8
	2	96.72
	3	97.2
4	1	103.95
	2	103.35
	3	106.01
5	1	96.96
	2	96.21
	3	96.73
6	1	96.08
	2	97.07
	3	97.32
7	1	105.75
	2	102.44
	3	103.69
8	1	96.52
	2	97.39
	3	97.49
9	1	97.42
	2	96.99
	3	96.23

RESULTADOS ESTADÍSTICOS	
C.V.	3,88%
Media	98,02

<b>s</b>	3,9
<b>s<sup>2</sup></b>	14,5

Recordando que la Farmacopea Europea indica no menos del 95% y no más de 101% y la USP 28 indica no menos de 90% y no más de 120% del contenido de cefadroxilo en cápsulas, podemos indicar que se cumple con lo establecido por la USP 28.

# **CAPÍTULO IV**

## **CONCLUSIONES**

### **Observaciones para Espectroscopia UV**

- ▲ Las condiciones de trabajo que se establecieron en el Espectrofotómetro en el desarrollo experimental son óptimas para el análisis cuantitativo de cefadroxilo, encontrando que *la longitud de onda de máxima absorción es de 263nm* lo que concuerda con lo establecido en la bibliografía.
- ▲ Se puede utilizar como disolvente agua destilada, lo que permite abaratar costos del análisis si se tuviera que utilizar otro disolvente.
- ▲ El sistema presenta tendencia lineal en el intervalo de 10 a 50ppm.
- ▲ Las pruebas de hipótesis realizadas a las curvas de calibración demostraron que la recta tiene tendencia al origen, por lo que la ecuación utilizada en la cuantificación con esta técnica es la conocida como ecuación de Lambert y Beer ( $A=aIC$ ).
- ▲ El coeficiente de correlación experimental para la linealidad de sistema es superior al que se pide en la industria farmacéutica ( $r$  mayor de 0.98) dando un valor experimental de 0.9999, la ordenada es igual a 0,006 y la pendiente 0,026.
- ▲ Se determinó el intervalo de confianza a la ordenada y a la pendiente del sistema lineal, lo cual permitirá llevar un correcto control de calidad del sistema en etapas posteriores.
- ▲ Para el caso de la prueba de precisión del sistema se cumplió con el requerimiento planteado de tener una precisión mayor al 95% pero además tenemos que el coeficiente de variación fue de 0,80% la cual es menor del 3% que es lo planteado por la Industria Farmacéutica para métodos espectroscópicos.
- ▲ El método propuesto para el tratamiento de las muestras analizadas (tanto las cápsulas comerciales como los estándares realizados en el laboratorio) fue repetible con una precisión mayor al 95%. Se obtuvo un valor de 1,7% para la muestra comercial y de 1%, cumpliéndose además en tener un valor menor al 3% como lo pide la NOM-177-SSA1-1998.
- ▲ La metodología empleada para la extracción de cefadroxilo presentó un recobro del 90-110%, respetando los lineamientos de la USP 28.

### **Observaciones para Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia**

- ▲ 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 acetonitrilo-agua (con adición de ácido acético).
- ▲ El análisis de cefadroxilo en este sistema se realiza en un tiempo máximo de 3 minutos a las siguientes condiciones óptimas de trabajo:
  - ✓ *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  $5\mu m$ , con un tamaño de poro de 100Å.*
  - ✓ *Fase móvil: 95% Agua(con 0,1% Acido Acético) y 5% Acetonitrilo.*
  - ✓ *Flujo: 1mL/min.*
  - ✓ *Detector UV-Vis a una longitud de máxima absorción de 263nm.*
- ▲ El sistema presenta tendencia lineal en un intervalo de concentraciones de 5 a 15ppm.
- ▲ Las pruebas de hipótesis realizadas a las curvas de calibración demostraron que la recta no tiene tendencia al origen, por lo que la ecuación utilizada en la cuantificación con esta técnica es la de una línea recta  $y=mx+b$ .
- ▲ El coeficiente de correlación experimental para la linealidad de sistema es superior al que se pide en la industria farmacéutica ( $r$  mayor de 0.98) dando un valor igual a 0.9991, la ordenada es igual a 0,4423 y la pendiente 0,6199.
- ▲ Se determinó el intervalo de confianza a la ordenada y a la pendiente del sistema lineal, lo cual permitirá llevar un correcto control de calidad del sistema en etapas posteriores.
- ▲ Para el caso de la prueba de precisión del sistema se cumplió con el requerimiento planteado de tener una precisión mayor al 95% pero además tenemos que el coeficiente de variación fue de 2,03% la cual cercano al valor de 2% que es lo planteado por la Industria Farmacéutica para técnicas cromatográficas.
- ▲ El método propuesto para el tratamiento de las muestras analizadas (tanto las cápsulas comerciales como los estándares realizados en el

laboratorio) fue repetible con una precisión mayor al 95%. Se obtuvo un valor de 2,1% para la muestra comercial y de 3,8%.

▲ La metodología empleada para la extracción de cefadroxilo presentó un recobro del 90-110%, respetando los lineamientos de la USP 28.

**Reflexiones sobre ventajas y desventajas de cada técnica para analizar el cefadroxilo en cápsulas**

- ▲ En cuanto al manejo de los equipos y su conocimiento teórico del fenómeno, la técnica de espectroscopia UV-Vis es más sencilla y más rápida para trabajar con ella 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 trabajar un número grande de muestras, 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.
- ▲ En el caso de presentarse impurezas la técnica de CLAE me permitiría el observarlas lo que sería más difícil por Espectroscopia UV-Vis.



### **Conclusiones**

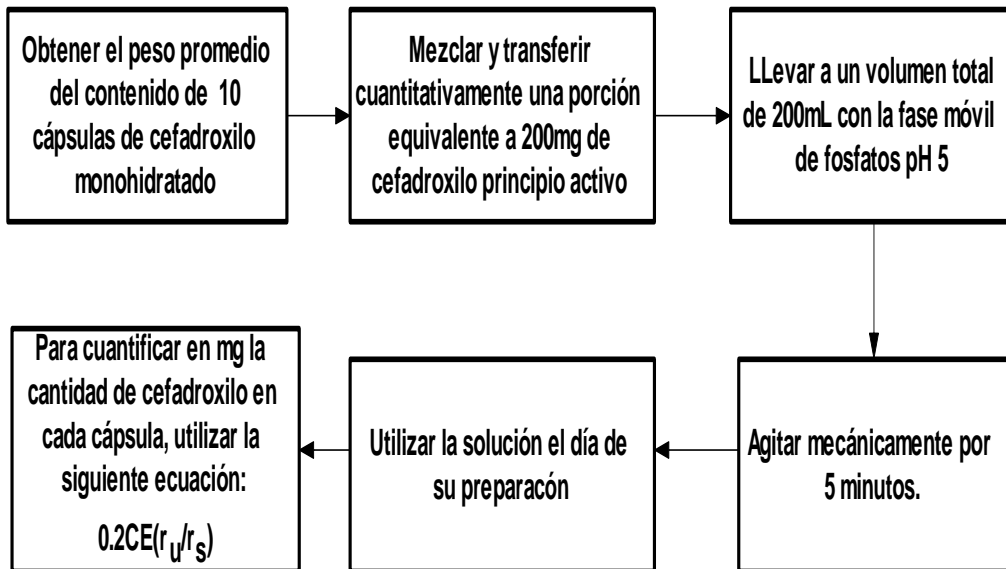
- ▲ Las 2 técnicas proporcionan una detección adecuada del cefadroxilo al nivel de concentraciones en que se encuentra en la forma farmacéutica.
- ▲ Las 2 técnicas presentan buena linealidad que cumple con los requisitos establecidos por la industria farmacéutica ( $r$  o  $r^2 > 0.98$ ), permitiendo aplicar las ecuaciones cuantitativas base de las respectivas técnicas.
- ▲ Las 2 técnicas presentan buena precisión de sistema así como de repetibilidad con un CV  $< 5\%$  y se pueden cumplir los planteados por la industria farmacéutica en el caso de la metodología por Espectroscopia UV-Vis y con un poco más de práctica por parte del analista se alcanzarían los indicados para Cromatografía de Líquidos.
- ▲ Por lo anterior las 2 técnicas utilizadas son adecuadas para la cuantificación de cefadroxilo en cápsulas para todas las muestras analizadas.
- ▲ La metodología aplicada para obtener al cefadroxilo de las cápsulas fue adecuada.
- ▲ Finalmente se concluye que se cumplieron los objetivos planteados en este trabajo.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- MUTSCHLER, E. Derendorf, H. "*Drug Actions. Basic Principles and Therapeutic Aspects*". Editorial MedPharm, Stuttgart Alemania, 1995. Pág. 519-543.
- 2.- BUDAVARI Susan; Index Merck "Encyclopedia of Chemicals, drugs and biological. Editorial Staff. 30 edición 2001.
- 3.- CORDIES, L. et.al. "*Principios generales de la terapéutica antimicrobiana*". Acta Médica. Vol. 8 Tomo 1, 1998. Pág. 13-27.
- 4.- GOODMAN L. S. "*Goodman and Gilman. Las bases Farmacológicas de la Terapéutica*". 9ª edición. Volumen II. Editorial McGraw Hill Interamericana, 1996.
- 5.- CONNORS, K. A. "*Chemical Stability of Pharmaceuticals, a Handbook for Pharmacist*". 2ª edición. Editorial John Wiley and Sons, 1986.
- 6.- HARRIS, D. "*Análisis Químico Cuantitativo*". 2ª edición. Editorial Reverté. México, 2001. Pág. 499-516 y 693-720.
- 7.- SKOOG, D. et.al. "*Química Analítica*". 7ª edición. Editorial McGraw Hill. México, 2000. Pág. 567-620.
- 8.- GÜNZLER H, Williams A. "*Handbook of Analytical Techniques*". Vol. I. Editorial Wiley-VCH. Alemania, 2001. Pág. 420-452.
- 9.- SILVERSTEIN, R.M. Clayton G. "*Spectrometric Identification of Organic Compounds*". 5ª edición. Editorial John Wiley and Sons. USA, 1991. Pág. 289-296.
- 10.- QUATTROCHI, O. A., "*Introducción al HPLC. Aplicación y Práctica*", Artes Gráficas Farro S.A. Argentina, 1992. Pág. 3-7, 10-36, 40-51, 66-87.
- 11.- McNAIR, H., Esquivel, B. "*Cromatografía Líquida de Alta Presión*". Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Monografía 10, Washington, D.C., USA 1973. Pág. 47-48.
- 12.- VALCARCEL, M., Gómez, H. "*Técnicas Analíticas de Separación*". Editorial Reverté, 1ª edición, España; 1990. Pág. 173-176, 209-211, 224-227.
- 13.- WILLARD, H., Meeritt, L. et al. "*Métodos Instrumentales de Análisis*". Grupo Editorial Iberoamericana. México; 1991. Pág. 611-616.
- 14.- MILLER, J. Miller, J. "*Estadística y Quimiometría para Química Analítica*". Prentice Hall, 4ª edición. España, 2000. Pág. 21-35, 65-68.
- 15.- KUEHL, R. "*Diseño de Experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*". Thomson Learning, 2ª edición. México, 2003. Pág. 148-164.

- 16.-** WALPOLE, R. Myers, R. Myers, S. *“Probabilidad y estadística para ingenieros”*. Pearson Educación. 6ª edición. México, 1999. Pág. 290-355.
- 17.-** SSA. NOM 059-1993. Buenas Prácticas de Fabricación.
- 18.-** Guía de Validación de métodos analíticos, editada por el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C., registro ante la DGP-032. Edición 2002.
- 19.-** European Pharmacopeia, 3ª Edición, editada por la convención de la Farmacopea Europea, 1997.
- 20.-** United States Pharmacopeia NF28, editada por The United Pharmacopeial Convention. 2005.
- 21.-** LÓPEZ, Serrano Lilia del Carmen, Tesis de Licenciatura; *“Validación de una metodología para la cuantificación de cefadroxilo en tabletas, utilizando la técnica de Espectroscopia UV-VIS”*. UNAM, México, D.F. (2007).
- 22.-** RENTERIA, Espinoza Alia, Tesis de Licenciatura; *“Validación de la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) para la cuantificación de cefadroxilo en tabletas”*. UNAM, México, D.F. (2008).
- 23.-** DEL CARMEN H.H, Angélica. Tesis de Licenciatura; *“Validación de metodologías instrumentales”*. UNAM, México, D.F. (2005).
- 24.-** [http://cofepris.salud.gob.mx/cis/tramites/regmed/mco\\_legal\\_pdf/NOM-177-SSA1-1998.pdf](http://cofepris.salud.gob.mx/cis/tramites/regmed/mco_legal_pdf/NOM-177-SSA1-1998.pdf). Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-1998 (rev:23-Enero-2009). Establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

# **ANEXO 1**

**MÉTODO GENERAL FARMACOPÉICO (USP 28, 2005)**

# **ANEXO 2**

## LINEALIDAD DEL SISTEMA ULTRAVIOLETA

CONCENTRACIÓN (ppm) X	ABSORBANCIA Y	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
8.99	0.2491	80.8201	0.06205081	2.239409
8.99	0.2497	80.8201	0.06235009	2.244803
8.99	0.2502	80.8201	0.06260004	2.249298
17.99	0.4761	323.6401	0.22667121	8.565039
17.99	0.4772	323.6401	0.22771984	8.584828
17.99	0.4766	323.6401	0.22714756	8.574034
26.98	0.6955	727.9204	0.48372025	18.76459
26.98	0.6955	727.9204	0.48372025	18.76459
26.98	0.6954	727.9204	0.48358116	18.76189
35.98	0.9399	1294.5604	0.88341201	33.81760
35.98	0.9390	1294.5604	0.88172100	33.78522
35.98	0.9390	1294.5604	0.88172100	33.78522
44.97	1.1734	2022.3009	1.37686756	52.76778
44.97	1.1748	2022.3009	1.38015504	52.83075
44.97	1.1737	2022.3009	1.37757169	52.78128

SUMAXi	404.73
SUMAYi	10.605100
SUMA Xi*Yi	348.516368
SUMA(Xi) <sup>2</sup>	13347.7257
SUMA (Yi) <sup>2</sup>	9.10100951
MEDIA Xi	22.485
NÚMERO DE MUESTRAS (n)	18
GRADOS DE LIBERTAD (g. l.=n-2,0.05/2)	16
(n-2)*n	288
n* media	404.73
(n* media) <sup>2</sup>	163806.3729
t TABLAS	<b>2.120</b>
Sxx	76452.6897
Syy	5.14E+01
Sxy	1.98E+03
ERROR ESTÁNDAR AL CUADRADO (Se) <sup>2</sup>	0.172782231
ERROR ESTÁNDAR (Se)	0.415670820
t CALCULADA	<b>0.035</b>
ORDENADA	6.00E-03
I.C A LA ORDENADA	MÁXIMO=0,374 MÍNIMO=0,362
PENDIENTE	0.026
I.C A LA PENDIENTE	MÁXIMO=0,039 MÍNIMO=0,012



**PRECISION DEL SISTEMA EN ULTRAVIOLETA**

<b>ABSORBANCIA</b>
0.6999
0.7019
0.7007
0.7010
0.6963
0.6964
0.6945
0.6953
0.6955
0.6985
0.6974
0.6974
0.7037
0.7030
0.7076
0.7095
0.7121
0.7128
0.7045
0.7098
0.7093
0.7051
0.7076
0.7066
0.6954
0.6969
0.6981

<b>NUMERO DE MUESTRAS (n)</b>	27
<b>MEDIA EXPERIMENTAL</b>	0.70210
<b>DESVIACIÓN ESTANDAR EXPERIMENTAL (s)</b>	0.00570
<b>VARIANZA EXPERIMENTAL (s<sup>2</sup>)</b>	0.000033
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN EXPERIMENTAL (%CV)</b>	0.81248
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN TEÓRICO (%CV)</b>	5
<b>DESVIACIÓN ESTANDAR TEÓRICA (s)</b>	0.03511
<b>VARIANZA TEÓRICA (s<sup>2</sup>)</b>	0.00123
<b>ALFA</b>	0.05
<b>JI CUADRADA AL 0.975</b>	13.8439
<b>JI CUADRADA AL 0.025</b>	41.9232
<b>JI CUADRADA AL 0.05</b>	38.8851
<b>JI CUADRADA CALCULADA</b>	0.68654
<b>INTERVALOS DE CONFIANZA</b>	MÁXIMO= 0.00782 MÍNIMO= 0.00449

### REPETIBILIDAD CON MUESTRA SINTÉTICA

mg de Cefadroxilo/cápsula
219.8241
220.1798
219.9031
215.2689
215.3481
215.3481
216.0996
215.7436
215.6250
215.8623
215.9018
215.6250
216.8117
216.8908
216.8908
221.6772
221.8354
222.2705
216.4952
216.8512
216.8117
217.2073
216.6535
216.6535
217.4842
217.4051
217.1677

NUMERO DE MUESTRAS (n)	27
MEDIA EXPERIMENTAL	217.40130
DESVIACIÓN ESTANDAR EXPERIMENTAL (s)	2.12934
VARIANZA EXPERIMENTAL (s <sup>2</sup> )	4.53408
COEFICIENTE DE VARIACIÓN EXPERIMENTAL (%CV)	0.97945
COEFICIENTE DE VARIACIÓN TEÓRICO (%CV)	5
DESVIACIÓN ESTANDAR TEÓRICA (s)	10.87007
VARIANZA TEÓRICA (s <sup>2</sup> )	118.15832
ALFA	0.05
JI CUADRADA AL 0.975	13.8439
JI CUADRADA AL 0.025	41.9232
JI CUADRADA AL 0.05	38.8851
JI CUADRADA CALCULADA	0.99770
INTERVALOS DE CONFIANZA	MÁXIMO= 2.91811 MÍNIMO= 1.67689

### REPETIBILIDAD CON MUESTRA COMERCIAL

mg de Cefadroxilo/cápsula
236.8830
236.6845
236.6448
239.6230
239.4626
239.4626
239.7755
239.8958
239.8557
237.5777
237.2568
237.2568
236.3745
236.9360
236.9761
228.9553
229.2761
229.1157
240.4251
240.7058
240.7459
236.1339
236.5750
236.5750
230.2386
230.3589
229.9177

NUMERO DE MUESTRAS (n)	27
MEDIA EXPERIMENTAL	236.28476
DESVIACIÓN ESTANDAR EXPERIMENTAL (s)	3.91087
VARIANZA EXPERIMENTAL (s <sup>2</sup> )	15.29487
COEFICIENTE DE VARIACIÓN EXPERIMENTAL (%CV)	1.65515
COEFICIENTE DE VARIACIÓN TEÓRICO (%CV)	5
DESVIACIÓN ESTANDAR TEÓRICA (s)	11.81424
VARIANZA TEÓRICA (s <sup>2</sup> )	139.57621
ALFA	0.05
JI CUADRADA AL 0.975	13.8439
JI CUADRADA AL 0.025	41.9232
JI CUADRADA AL 0.05	38.8851
JI CUADRADA CALCULADA	2.84910
INTERVALOS DE CONFIANZA	MÁXIMO= 5.35957 MÍNIMO= 3.07987

## RECOBRO

(%) DE CEFADROXILO RECUPERADO
98.793
98.952
98.828
96.745
96.781
96.781
97.118
96.959
96.905
97.012
97.029
96.905
97.438
97.474
97.474
99.625
99.696
99.892
97.296
97.456
97.438
97.616
97.367
97.367
97.741
97.705
97.598

NUMERO DE MUESTRAS (n)	27
MEDIA EXPERIMENTAL	97.7033
DESVIACIÓN ESTANDAR EXPERIMENTAL (s)	0.93867
VARIANZA EXPERIMENTAL (s <sup>2</sup> )	0.88109
COEFICIENTE DE VARIACIÓN EXPERIMENTAL (%CV)	0.96073
COEFICIENTE DE VARIACIÓN TEÓRICO (%CV)	5
DESVIACIÓN ESTANDAR TEÓRICA (s)	4.88517
VARIANZA TEÓRICA (s <sup>2</sup> )	23.86487

# **ANEXO 3**

## LINEALIDAD DEL SISTEMA HPLC

CONCENTRACIÓN (ppm)X	ÁREA (Y)	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY
4.7756	3.44327	22.8063554	11.8561	16.4437
4.7756	3.35343	22.8063554	11.2455	16.0146
4.7756	3.47880	22.8063554	12.1020	16.6134
6.6859	4.44144	44.7012588	19.7264	29.6950
6.6859	4.45585	44.7012588	19.8546	29.7914
6.6859	4.53224	44.7012588	20.5412	30.3021
8.5961	5.90258	73.8943106	34.8405	50.7396
8.5961	5.88406	73.8943106	34.6222	50.5804
8.5961	5.76676	73.8943106	33.2555	49.5721
11.4615	7.65387	131.365982	58.5817	87.7248
11.4615	7.56767	131.365982	57.2696	86.7368
11.4615	7.59673	131.365982	57.7103	87.0699
14.3269	9.24712	205.262442	85.5092	132.4833
14.3269	9.34899	205.262442	87.4036	133.9428
14.3269	9.22136	205.262442	85.0335	132.1143

SUMA Xi	137.538489
SUMA Yi	91.894170
SUMA Xi*Yi	949.8244
SUMA(Xi) <sup>2</sup>	1434.09105
SUMA (Yi) <sup>2</sup>	629.5520
MEDIA Xi	9.1692326
NÚERO DE MUESTRAS (n)	15
GRADOS DE LIBERTAD (g. l. =n-2,0.05/2)	13
(n-2)*n	195
n* media	137.538489
(n* media) <sup>2</sup>	18916.836
t TABLAS	<b>2.16</b>
Sxx	2594.52974
Syy	9.99E+02
Sxy	1.61E+03
ERROR ESTANDAR AL CUADRADO(Se) <sup>2</sup>	0.00864808
ERROR ESTANDAR (Se)	0.092995050
t CALCULADA	<b>6.401</b>
ORDENADA	4.42E-01
INTERVALO DE COFIANZA ORDENADA	MÁXIMO=0.59173675 MÍNIMO=0.29305925
PENDIENTE =	0.620
INTERVALO DE COFIANZA PENDIENTE	MÁXIMO=6.35E-01 MÍNIMO=6.05E-01

## LINEALIDAD DE SISTEMA HPLC CON CERO

CONCENTRACIÓN (ppm)X	ÁREA (Y)	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
4.7756	3.44327	22.80635536	11.8561083	16.4436802
4.7756	3.35343	22.80635536	11.2454928	16.0146403
4.7756	3.47880	22.80635536	12.1020494	16.6133573
6.6859	4.44144	44.70125881	19.7263893	29.6950237
6.6859	4.45585	44.70125881	19.8545992	29.7913675
6.6859	4.53224	44.70125881	20.5411994	30.3021034
8.59618	5.90258	73.89431059	34.8404507	50.7396401
8.59618	5.88406	73.89431059	34.6221621	50.5804389
8.59618	5.76676	73.89431059	33.2555209	49.5721070
11.4615	7.65387	131.3659823	58.5817260	87.724831
11.4615	7.56767	131.3659823	57.2696292	86.7368497
11.4615	7.59673	131.3659823	57.7103067	87.0699209
14.3269	9.24712	205.2624419	85.5092283	132.483331
14.3269	9.34899	205.2624419	87.4036140	133.942821
14.3269	9.22136	205.2624419	85.0334802	132.114268

SUMA Xi	137.538489
SUMA Yi	91.894170
SUMA Xi*Yi	949.8243798
SUMA(Xi) <sup>2</sup>	1434.091047
SUMA (Yi) <sup>2</sup>	629.5519565
MEDIA Xi	7.641027167
NÚERO DE MUESTRAS (n)	18
GRADOS DE LIBERTAD (g. l. =n-2,0.05/2)	16
(n-2)*n	288
n* media	137.538489
(n* media) <sup>2</sup>	18916.83596
t TABLAS	<b>2.12</b>
Sxx	6896.802884
Syy	2.89E+03
Sxy	4.46E+03
ERROR ESTANDAR AL CUADRADO(Se) <sup>2</sup>	0.020816758
ERROR ESTANDAR (Se)	0.144280138
t CALCULADA	<b>2,528</b>
ORDENADA	0,441
INTERVALO DE COFIANZA ORDENADA	MÁXIMO=0.591 MÍNIMO=0.293
PENDIENTE =	0.619

**PRECISIÓN DEL SISTEMA**

<b>ÁREAS</b>
5.86103
5.96518
6.01723
5.95089
5.79577
5.67881
5.71018
5.53057
5.62590
5.58573
5.68788
5.65709
5.87366
5.75865
5.86958
5.93479
5.83573
5.80099
5.72459
5.87250
5.70765
5.81358
5.83880
5.79549
5.80011
5.75999
5.83745

<b>NUMERO DE MUESTRAS (n)</b>	27
<b>MEDIA EXPERIMENTAL</b>	5.78851
<b>DESVIACIÓN ESTANDAR EXPERIMENTAL (s)</b>	0.11728
<b>VARIANZA EXPERIMENTAL (s<sup>2</sup>)</b>	0.01375
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN EXPERIMENTAL (%CV)</b>	2.02600
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN TEÓRICO (%CV)</b>	5
<b>DESVIACIÓN ESTANDAR TEÓRICA (s)</b>	0.28943
<b>VARIANZA TEÓRICA (s<sup>2</sup>)</b>	0.08377
<b>ALFA</b>	0.05
<b>JI CUADRADA AL 0.975</b>	13.8439
<b>JI CUADRADA AL 0.025</b>	41.9232
<b>JI CUADRADA AL 0.05</b>	38.8850
<b>JI CUADRADA CALCULADA</b>	4.26888
<b>INTERVALOS DE CONFIANZA</b>	MÁXIMO=0.16072 MÍNIMO=0.09236



### REPETIBILIDAD CON MUESTRA SINTETICA

mg de Cefadroxilo/cápsula
207.506
206.740
207.193
217.634
218.763
220.920
220.463
218.014
219.113
234.313
232.974
238.960
218.569
216.875
218.046
216.594
218.816
219.391
238.379
230.909
233.739
217.575
219.544
219.777
219.595
218.648
216.906

NUMERO DE MUESTRAS (n)	27
MEDIA EXPERIMENTAL	220.96149
DESVIACIÓN ESTANDAR EXPERIMENTAL (s)	8.56839
VARIANZA EXPERIMENTAL (s <sup>2</sup> )	73.41728
COEFICIENTE DE VARIACIÓN EXPERIMENTAL (%CV)	3.87777
COEFICIENTE DE VARIACIÓN TEÓRICO (%CV)	5
DESVIACIÓN ESTANDAR TEÓRICA (s)	11.04807
VARIANZA TEÓRICA (s <sup>2</sup> )	122.05994
ALFA	0.05
JI CUADRADA AL 0.975	13.8439
JI CUADRADA AL 0.025	41.9232
JI CUADRADA AL 0.05	38.8850
JI CUADRADA CALCULADA	15.63862
INTERVALOS DE CONFIANZA	MÁXIMO=11.74239 MÍNIMO=6.74775

### REPETIBILIDAD CON MUESTRA COMERCIAL

mg de Cefadroxilo/cápsula
207.5068
206.7400
207.1930
217.6340
218.7630
220.9200
220.4637
218.0149
219.1132
234.3130
232.9747
238.9600
218.5690
216.8750
218.0460
216.5940
218.8160
219.3910
238.3790
230.9098
233.7390
217.5750
219.5440
219.7770
219.5950
218.6480
216.9060

NUMERO DE MUESTRAS (n)	27
MEDIA EXPERIMENTAL	237.85811
DESVIACIÓN ESTANDAR EXPERIMENTAL (s)	6.93131
VARIANZA EXPERIMENTAL (s <sup>2</sup> )	48.04308
COEFICIENTE DE VARIACIÓN EXPERIMENTAL (%CV)	2.91405
COEFICIENTE DE VARIACIÓN TEÓRICO (%CV)	5
DESVIACIÓN ESTANDAR TEÓRICA (s)	11.89291
VARIANZA TEÓRICA (s <sup>2</sup> )	141.44120
ALFA	0.05
JI CUADRADA AL 0.975	13.8439
JI CUADRADA AL 0.025	41.9232
JI CUADRADA AL 0.05	38.8850
JI CUADRADA CALCULADA	8.83137
INTERVALOS DE CONFIANZA	MÁXIMO=9.49889 MÍNIMO=5.45852

## RECOBRO

(%)DE RECUPERACIÓN DE CEFADROXILO
92.056
91.720
91.920
96.550
97.050
98.010
97.800
96.720
97.200
103.950
103.350
106.010
96.960
96.210
96.730
96.080
97.070
97.320
105.750
102.440
103.690
96.520
97.390
97.490
97.420
96.990
96.230

NUMERO DE MUESTRAS (n)	27
MEDIA EXPERIMENTAL	98.02319
DESVIACIÓN ESTANDAR EXPERIMENTAL (s)	3.80084
VARIANZA EXPERIMENTAL (s <sup>2</sup> )	14.44640
COEFICIENTE DE VARIACIÓN EXPERIMENTAL (%CV)	3.87749
COEFICIENTE DE VARIACIÓN TEÓRICO (%CV)	5
DESVIACIÓN ESTANDAR TEÓRICA (s)	4.90116
VARIANZA TEÓRICA (s <sup>2</sup> )	24.02136