



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**APLICACIÓN DEL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES
EN LA DETERMINACIÓN DE UNIFORMIDAD DE CONTENIDO
QUÍMICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA U.V., DE ACETAMINOFÉN
(APAP) Y NAPROXENO (NAP) PRESENTES EN TABLETAS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

OLIVID MARISOL HUERTA SÁNCHEZ

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PENSAMIENTOS

Hoy me encuentro aquí a la vista de quienes con agrado observan y reconocen mi triunfo. Un triunfo que no provino de la nada, si no que se fue construyendo día a día, al darme cuenta que el silencio y la soledad producen resultados. Usé el silencio y la soledad para liberar mi poder creativo, lo usé para encontrar soluciones, dediqué todos los días un poco de tiempo sólo para pensar, para hablar conmigo misma.

Si no hay silencio y soledad para pensar, se produce un apagón en la mente. Por momentos me convertía en el señor “no puedo estar solo” y simplemente quería llegar al triunfo por los atajos en donde fácilmente no se llega a nada importante. Edison descubrió los bombillos eléctricos después de fracasar en miles de experimentos. Moisés y su pueblo llegaron a la tierra prometida sólo después de pasar 40 años sufriendo en el desierto. Dios no vende sus triunfos a bajo precio. Se los ofrece a quienes no se cansan de luchar. Quien lucha obtiene el éxito y el éxito es sentirse realizado y poder hacer muchas cosas en favor de los demás. El triunfo no es para uno mismo.

Mi mente es una fábrica de pensamientos. Pero afortunada o desafortunadamente tiene 2 jefes: el señor triunfo y el señor derrota. El señor triunfo fabrica pensamientos positivos, pensamientos que me han guiado por el camino correcto para llegar hasta aquí. El sentimiento de superación y trabajo me enseñó que lo que importa no es cuánta inteligencia se tiene sino como se emplea.

Trabajar, proyectar, perseverar, sin desanimarse trae más premio que tener una poderosa inteligencia. Porque la constancia es el 95% de lo que después se llama habilidad.

Muchas veces tropecé y se apoderaba de mi el señor derrota. Tropecé con situaciones colmadas de estorbos y desalientos, pensaba de forma negativa, traje hacia mi, pensamientos y recuerdos negativos que produjeron un desgaste innecesario, dañaron mi motor mental y me trajeron complejo de inferioridad y

frustración. No tenía plan fijo, se pasaban las horas vagamente y hasta me alegraba de que el día acabara. Pero cuando tuve algo fijo y determinado para hacer, entonces pareció que las cosas se fueron haciendo a sí mismas.

Durante todo mi caminar encontré a valiosos amigos los cuales me enseñaron que el líder es una fábrica humana de decisiones. Pero para fabricarlas deben conseguirse los materiales, consultando, recibiendo sugerencias. Las soluciones no llegan hechas, pero se van formando al consultar a los que saben.

Falta mucho por aprender y mucho que recorrer, el conocimiento nunca se acaba, por ello pienso que debo continuar y seguir aportando lo poco que sé. Lo único que puedo decir es: Toda realización grande es una sucesión de realizaciones pequeñas. Los grandes no ganaron el éxito repentinamente; cada paso, aunque parezca pequeño es un acercamiento hacia la meta.

¡¡¡No dejemos un solo día sin hacer algo a favor del ideal que nos hemos propuesto, y cuando menos pensemos lo habremos alcanzado!!!

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco infinitamente a Dios por darme la oportunidad de vivir, de disfrutar, de conocer y aprender de este mundo. Por darme a personas maravillosas con quien compartir y a quien amar. Por nunca dejarme caer y por haberme permitido llegar hasta este día.

Mis palabras y agradecimientos son muy poco en comparación a lo que tu has hecho por mí. Gracias por darme la vida, por dar todo lo mejor de ti para que yo sea feliz y salga adelante. Gracias por tus desvelos y sacrificios por mí. Gracias por estar a mi lado, por tus consejos, por tu apoyo y tu amor. Gracias Mamita.

Te agradezco a ti Papá porque me has sabido guiar por el camino del bien. Porque con tu carácter y forma de ser he podido caminar de forma firme y responsable a lo largo de mi vida. Gracias por preocuparte por mí, por acompañarme en todo momento y por ser mi padre.

Le doy las gracias a quién es mi mejor ejemplo de superación, mi hermano. Gracias Erik porque siempre me has demostrado que se puede llegar a ser el mejor con trabajo, constancia e inteligencia.

Gracias a mis primos Saúl, Nelcy, Moni, Chio, Naomi, Marlem y Owen. A mis tías Rita, Bene, Estela, y Ana. Y a mi abuelita Esperanza, porque todos ustedes son mi mejor inspiración para forjarme nuevas y mejores metas cada día.

Juan Carlos, gracias por tus palabras de aliento, por dibujar siempre una sonrisa en mi rostro, por confiar en mí, por escucharme, por entenderme, por aceptar mis defectos, por hacerme ver mis errores, por apoyarme siempre y por ser mi mejor amigo.

Agradezco a quien ha crecido junto a mí, a quién me acepta y me quiere tal como soy. Gracias por disfrutar de los buenos momentos y por ser mi refugio en los malos. Muchas gracias Ivonne.

Les agradezco a ustedes amigas, por estar la mayor parte del tiempo conmigo en esta hermosa Facultad. Gracias por darme la oportunidad de ser parte de su vida, por

todas las anécdotas que compartimos y por todos los logros que obtuvimos juntas. Gracias Mara, siempre recordaré tu seriedad y la forma tan responsable de hacer las cosas. Citlalli, nunca voy a olvidar tus ocurrencias, tu apoyo, tu sinceridad y generosidad. Diana siempre te voy a recordar por tu gran inteligencia. Vero gracias por tus palabras de aliento. Iris, te admiro tanto por tu fortaleza y por las ganas que tienes de salir adelante aún en las dificultades, gracias por ser mi amiga.

Gracias a quienes estuvieron conmigo en una etapa nueva y difícil durante la Carrera, por tenderme la mano, por hacerme sentir querida, por confiar en mí, porque gracias a ustedes disfruté al máximo mis últimos dos semestres, y sobre todo gracias por convertirse en mis amigos. Maritza, te quiero muchísimo, eres una gran persona, dotada de una enorme inteligencia y carisma. Te agradezco por apoyarme durante la realización de este trabajo aún en la distancia, siempre serás una buena amiga. Ara, gracias por tu gran corazón, por tu apoyo incondicional y desinteresado y por todas las risas inolvidables. Darío, gracias por enseñarme que las cosas pueden hacerse de una forma divertida, sin olvidar claro, la responsabilidad.

Gracias Lizbeth Orozco por ser parte de este trabajo, por todo tu tiempo, por el apoyo ilimitado que me otorgaste en los momentos difíciles, por hacerme sentir fuerte aún en mis debilidades, gracias por tu compañía y por tu amistad.

Muchas gracias a mis amigos, Juan José, Ulises Peña, Julio César, Javier Francisco, Norma Sánchez, Carlos Maya, Sergio y Eduin, por compartir conmigo pensamientos, sentimientos y hermosos momentos.

También agradezco a dos grandes amigos, pues con sus consejos y experiencia me motivaron para seguir luchando y salir adelante. Gracias Yusvizareth (Gen. 30) y Marco Antonio (Gen. 29).

Infinitamente estoy agradecida con todos y cada uno de mis profesores. Gracias por que con sus conocimientos, experiencias y aportaciones lograron formar en mí a una profesionalista que ama su carrera. Por supuesto agradezco a mis sinodales por sus contribuciones para mejorar este trabajo y por su tiempo. Y le doy las gracias a mi asesor de tesis José Antonio Garduño Rosas, gracias por confiar en mí para llevar a cabo

este proyecto, gracias por enseñarme que los errores son la mejor forma de aprender y por reforzar la idea en mí, de que las cosas que se hacen con esfuerzo son las que realmente valen la pena.

Por último pero no en importancia, agradezco a mi Universidad por darme la oportunidad de ser parte de ella. Me siento muy orgullosa de haber asistido a las aulas de la mejor Universidad de habla hispana.

Gracias por compartir conmigo este logro. Mil gracias.

ÍNDICE GENERAL

	Página
INDICE	I
ABREVIATURAS	V
INTRODUCCIÓN	VII
OBJETIVOS	VIII
CAPITULO 1. GENERALIDADES	1
1.1 Métodos de Calibración Multivariante	2
1.1.1 Fundamento de los Métodos de Análisis de Multicomponentes.....	4
1.1.2 Mínimos Cuadrados Parciales (MCP).....	7
1.1.2.1 Algoritmo para MCP.....	8
1.1.3 Validación del Modelo de Calibración.....	14
1.1.3.1 Validación Cruzada.....	15
1.1.3.2 Selección de Número Óptimo de Factores: Análisis de SCERP.....	17
1.1.3.3 Calibración.....	19
1.1.3.4 Detección de muestras desechables.....	21
1.2 Características del Acetaminofén y del Naproxeno	23
1.2.1 Indicaciones terapéuticas de la mezcla APAP-NAP.....	24
1.2.2 Farmacocinética y Farmacodinamia.....	24
1.2.3 Acetaminofén: Descripción y Propiedades Físicas.....	26

1.2.4 Naproxeno: Descripción y Propiedades Físicas.....	27
1.2.5 Monografías de Uniformidad de Contenido.....	28
1.3 Validación de Métodos Analíticos.....	29
1.3.1 Tipos de métodos analíticos a ser validados.....	29
1.3.2 Procedimiento analítico.....	31
1.3.3 Linealidad.....	31
1.3.3.1 Linealidad del Sistema.....	31
1.3.3.2 Linealidad del Método.....	32
1.3.4 Precisión.....	32
1.3.5 Exactitud.....	33
1.3.6 Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	33
1.3.7 Repetibilidad.....	34
1.3.8 Reproducibilidad.....	35
1.3.9 Sensitividad.....	35
1.3.10 Sensibilidad.....	35
1.3.11 Estabilidad de la muestra.....	36
1.3.12 Selectividad.....	36
1.3.13 Tolerancia.....	37
1.3.14 Robustez.....	37
CAPITULO 2. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	38
2.1 Reactivos, Equipos y Softwares.....	39

2.1.1 Reactivos.....	39
2.1.2 Equipo.....	39
2.1.3 Softwares.....	39
2.2 Preparación de Soluciones.....	40
2.2.1 Preparación de la solución de NaOH 0.1 N.....	40
2.2.2 Preparación de la solución de NaOH 0.2 N.....	40
2.2.3 Preparación de la solución de Fosfato Monobásico de Potasio 0.2 M...40	
2.2.4 Preparación de la solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4.....	41
2.2.5 Preparación de las soluciones para la realización de los espectros de absorción.....	41
2.2.6 Preparación de la Calibración.....	43
2.2.7 Preparación de la muestra.....	46
2.3 Procedimientos analíticos realizados para el desarrollo del método analítico.....	47
2.3.1 Aditividad, interacción e interferencia.....	48
2.3.2 Selección del número óptimo de factores.....	50
2.3.3 Calibración.....	51
2.3.3.1 Elección de las soluciones estándar.....	51
2.3.3.2 Detección de muestras desechables.....	52
2.4 Condiciones finales de análisis.....	53

CAPITULO 3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	54
3.1 Criterios de aceptación	55
3.2 Validación del Sistema	56
3.2.1 Linealidad del sistema.....	58
3.2.2 Precisión y exactitud del sistema.....	61
3.3 Validación del Método	63
3.3.1 Linealidad del método.....	65
3.3.2 Precisión y exactitud del método.....	69
3.3.3 Repetibilidad y reproducibilidad.....	71
3.3.4 Estabilidad de la muestra.....	74
3.3.5 Tolerancia.....	77
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	81

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
ACP	Análisis del Componente Principal
APAP	Acetaminofén
b	Ordenada al origen (intercepto)
c, C	Concentración
Cal	Calculada
CP	Componente Principal
CV	Coefficiente de Variación.
Desv. Est	Desviación Estándar
DMS	Diferencia Mínima Significativa
e, E	Error
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
g	Gramos
λ	Longitud de onda
LC	Límite de Cuantificación
LIC	Límite Inferior de Confianza
LSC	Límite Superior de Confianza
LX	Límite de Detección
m	Pendiente

M	Molar
<i>m</i>	Número de componentes
MCC	Mínimos Cuadrados Clásicos
mcg	Microgramos
MCI	Mínimos Cuadrados Inversos
MCP	Mínimos Cuadrados Parciales
mg	Miligramos
ml	Mililitros
n	Número de muestras
NAP	Naproxeno
nm	Nanómetros
r	Coefficiente de correlación
r^2	Coefficiente de determinación
RCP	Regresión del Componente Principal
RLM	Regresión Lineal Múltiple
SCERP	Suma de Cuadrados de los Errores Residuales de Predicción
U, V	Ultravioleta
USP	Farmacopea de los Estados Unidos

INTRODUCCIÓN

La uniformidad de contenido químico para formas farmacéuticas sólidas orales, es utilizada cotidianamente para evaluar la calidad del producto farmacéutico y para determinar la variación de él o los principios activos presentes en una tableta o unidad de dosificación ⁽¹⁾. Es por ello, que se deben contar con métodos analíticos confiables que permitan cuantificar los principios activos presentes en las tabletas de una forma rápida y sencilla.

Sin embargo uno de los problemas fundamentales en este tipo de determinaciones, cuando los productos farmacéuticos contienen dos o más principios activos en su formulación, es la cuantificación de todos ellos. Por esta razón, normalmente en estos tipos de ensayos se realiza previamente un proceso de separación y posteriormente se cuantifican los principios activos de forma individual. Así mismo otro problema que se observa al determinar la uniformidad de contenido químico es que el análisis debe hacerse con toda la unidad de dosificación, lo que implica la realización de mayor número de diluciones. Como consecuencia de todos estos factores se observa un incremento en el costo y en el tiempo de análisis.

En años recientes, los métodos de calibración multivariante, como la Regresión del Componente principal (RCP) y el análisis por Mínimos Cuadrados Parciales (MCP), han llegado a ser importantes herramientas en la cuantificación simultánea de analitos en mezcla. Estos métodos son utilizados cada vez más frecuentemente en el análisis de medicamentos dentro de la industria farmacéutica ^(2, 3).

De ahí la importancia de establecer un método analítico que permita cuantificar confiablemente y de manera simultánea al Acetaminofén y Naproxeno presente en tabletas. En el siguiente trabajo se describe el desarrollo del método y las condiciones adecuadas a las cuales se prepara la tableta para determinar de forma confiable al APAP y al NAP, así como los resultados obtenidos al validar el método.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer un método Espectrofotométrico U. V. empleando técnicas de análisis de mínimos cuadrados parciales para determinar la uniformidad de contenido químico de Acetaminofén (APAP) y Naproxeno (NAP) en tabletas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar las condiciones espectrofotométricas adecuadas que permitan la cuantificación simultánea de Acetaminofén y Naproxeno presentes en las tabletas.

Establecer un ensayo analítico que pueda ser utilizado para determinar la uniformidad de contenido químico del Acetaminofén y del Naproxeno en tabletas.

Llevar a cabo la validación del método establecido mediante la determinación de la linealidad del sistema, precisión y exactitud del sistema, linealidad, precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y tolerancia del método.

CAPÍTULO 1: GENERALIDADES

1.1 MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE

La regresión es una valiosa técnica cuando se analiza la relación existente entre una variable dependiente (respuesta, variable Y) y varias variables independientes (predictivas, variable X). El análisis multivariante ayuda a determinar la dependencia de estas variables Y con respecto a una o varias variables X. ⁽²⁾

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

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

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

- En los casos en los que están presentes interferencias en las mezclas con él o los componentes de interés y no existe otro punto en el que puedan ser determinados selectivamente, tradicionalmente se recurre a procesos de separación de las sustancias interferentes. La calibración multivariante permite analizar sistemas con interferencias químicas, aunque no sean definidas, sin necesidad de manipular excesivamente la muestra.
- La calibración multivariante facilita la detección de muestras desechables (muestras mal preparadas) presentes en la matriz de calibración. Las muestras que no fueron correctamente preparadas durante la calibración empobrecen la capacidad predictiva de la misma, por tal razón, con la calibración multivariante se pueden identificar dichas muestras para separarlas posteriormente de la matriz de calibración.
- Es posible eliminar fácilmente los problemas ocasionados por el manejo de las muestras que provocan ciertos errores en las mediciones, por ejemplo, variaciones de temperatura en diversos instrumentos como espectrofotómetros, monocromadores mal ajustados, etc.

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

1.1.1 FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES

En el análisis cuantitativo se busca una relación lineal entre la medición y la concentración de un componente en particular. En espectroscopia, la Ley de Beer define la relación entre la absorbancia y la concentración a una longitud de onda (λ_1) de la siguiente manera:

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

Donde A_1 es la absorbancia a una λ_1 , c_1 la concentración del componente y k_1 la absorptividad del componente. Esto implica que es posible conocer la concentración de cualquier muestra tras medir simplemente la absorbancia en una muestra de concentración conocida y deducir la absorptividad, utilizando esta misma en cualquier cálculo posterior. Como se muestra, la ecuación puede resolverse estudiando una sola muestra; sin embargo, ante las limitaciones por ruido, error instrumental, error en la manipulación de las soluciones, etc., se recomienda analizar varias muestras de distinta concentración, realizar un gráfico de los resultados obtenidos y estimar la línea recta que mejor comprenda los puntos mediante lo que se conoce matemáticamente como ajuste por mínimos cuadrados, en donde el error total entre las absorbancias sea el mínimo.

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

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

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

Donde A_1 y A_2 son las absorbancias a dos longitudes de onda diferentes, k_1 y k_2 las absorptividades de los componentes a las respectivas longitudes de onda, e_1 y

e_2 los errores residuales obtenidos a partir de la línea ajustada por mínimos cuadrados y las absorbancias reales.

Nuevamente es factible dar solución a cada ecuación de manera independiente mientras la absorbancia de un componente no interfiera con la absorbancia del otro (bandas bien resueltas). Partiendo de que la Ley de Beer es aditiva, también es permisible resolver las ecuaciones simultáneamente y así manejar el caso donde existe interferencia entre las dos absorbancias dentro de un espectro (bandas solapadas):

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

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

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

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

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

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

Para el espectro 1:

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

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

Para el espectro 2:

$$A_{11} = k_{11} c_{11} + k_{21} c_{12} + e_{11} \quad (1.9)$$

$$A_{12} = k_{12} c_{11} + k_{22} c_{12} + e_{12} \quad (1.10)$$

O en notación matricial:

$$\mathbf{A} = \mathbf{KC} + \mathbf{E} \quad (1.11)$$

Utilizando álgebra matricial es fácil encontrar la solución de estas expresiones por computadora y plantear la matriz de calibración (o matriz de Coeficientes de Absortividad) que proporcionan la línea (o líneas) que se ajustan mejor a los datos por mínimos cuadrados.

Para resolver de manera práctica y confiable ecuaciones simultáneas utilizando álgebra matricial, se encuentran reportados en la literatura algunos métodos tales como ⁽³⁾:

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

El método de MCC aplicado a espectrofotometría, es un método de espectro completo y proporciona una buena sensibilidad al promediar varios resultados; pero se requiere conocer la concentración de todos los componentes de la mezcla, algo que comúnmente no ocurre en la realidad. El método de MCI tolera esta situación, pero no permite utilizar muchos puntos de análisis, ya que se encuentra limitado por el número de frecuencias del espectro que pueden ser incluidas en el análisis al igual que el método de RLM ⁽³⁾.

Por otra parte, RCP y MCP han sido los métodos de calibración multivariante más utilizados en el área de la química analítica, siendo aplicados exitosamente en el análisis cuantitativo de datos provenientes de estudios en Ultravioleta, Infrarrojo, y Cromatografía, entre otros. Así, ambos métodos utilizan los fundamentos y beneficios de la calibración inversa, donde es posible realizar una calibración para los componentes de interés, generando que estos sean métodos de análisis de espectro completo en lo que no se requiere conocer todos los componentes de la mezcla para no tener que realizar un proceso de separación ^(4, 5).

1.1.2 MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (MCP)

El método de Mínimos Cuadrados Parciales es comúnmente denominado como “la mayor técnica de regresión para datos multivariantes” y puede ser utilizado en diversas áreas de la Química como la Química Analítica, control de procesos industriales y en la elaboración de formulaciones para productos farmacéuticos, entre otras ^(2, 6, 7, 8, 9).

Aunque el MCP fue aplicado originalmente en el campo de la econometría por H. Wold, posteriormente se usó para aplicaciones químicas fue establecido por S. Wold y H. Martens, como un algoritmo para encontrar una solución para el coeficiente de regresión B_f en el modelo lineal $Y = X B_f + E$, en donde se conocen los datos de las matrices X y Y ^(8, 9)

En el método de MCP, se desea conocer la relación lineal que pueda existir entre las absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda y la concentración del componente de interés, de acuerdo al modelo lineal utilizado en la calibración inversa ⁽⁶⁾:

$$C = A k + E \quad (1.12)$$

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

$$A = TB + E_A \quad (1.13)$$

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

$$c = Tv + e_c \quad (1.14)$$

1.1.2.1 ALGORITMO PARA MCP ⁽⁸⁾

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

Así, en el algoritmo de MCP establecido por Haaland ^(10, 11), se realiza el análisis de la calibración y la predicción para solo un componente a la vez. Esto significa que solo la concentración de un solo componente de interés es usada en los datos de la calibración, mientras que las concentraciones de los demás componentes no son incluidas en el análisis. Sin embargo, si se desea conocer la concentración de algún otro componente presente en la mezcla, lo único que se debe hacer es realizar el análisis en donde solo se incluya este componente en los datos de calibración.

El algoritmo de MCP consta de dos etapas:

- Etapa de Calibración
- Etapa de Predicción.

A) ETAPA DE CALIBRACIÓN.

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

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

- PASO 1: Pretratamiento de los datos. Centrar A y c. La media del espectro de la calibración es sustraída a cada valor de la matriz (A) y la media de calibración de las concentraciones es restada de cada concentración (c).
- PASO 2: Formación del vector cargador de peso o “weight loading vector”, \mathbf{w}_h' :

$$\text{Modelo:} \quad A = c w_h' + E_A \quad (1.15)$$

$$\text{Solución:} \quad wh = A'c / c'c \quad (1.16)$$

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

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

$$\text{Modelo:} \quad A = t_h w_h' + E_A \quad (1.17)$$

$$\text{Solución:} \quad t_h = A w_h' \quad (1.18)$$

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

El vector t_1 representa la intensidad o cantidad del primer vector de carga (loading) en las muestras de calibración para el sistema coordinado de MCP. En MCP, cada vector t_h está relacionado tanto por \mathbf{A} como por \mathbf{c} . También, w_1 y t_1 son los datos normalizados del espectro puro y la concentración centrada del componente de interés en el nuevo sistema de coordenadas, respectivamente.

- PASO 4: Relación del “score”, t_h , con las concentraciones:

$$\text{Modelo:} \quad c = v_h t_h + e_c \quad (1.19)$$

$$\text{Solución:} \quad v_h = t_h' c / t_h' t_h \quad (1.20)$$

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

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

$$\text{Modelo:} \quad A = t_h b_h' + E_A \quad (1.21)$$

$$\text{Solución:} \quad b_h = A t_h' / t_h' t_h \quad (1.22)$$

Como se desea que los vectores t_h deban ser ortogonales para remover los problemas de colinealidad que son presentados en el método de MCI; los vectores ortogonales t_h pueden ser obtenidos para formar un nuevo modelo para A basado en la variable latente t_h . El nuevo modelo se obtiene en la ecuación 1.21, en donde b_h es el vector de carga $n \times 1$ para MCP.

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

$$\text{Espectros Residuales:} \quad E_A = A - t_h b_h' \quad (1.23)$$

$$\text{Concentraciones Residuales:} \quad e_c = c - v_h t_h' \quad (1.24)$$

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

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

Los dos primeros factores obtenidos por el método de MCP también pueden ser ilustrados gráficamente. Figura 1.1:

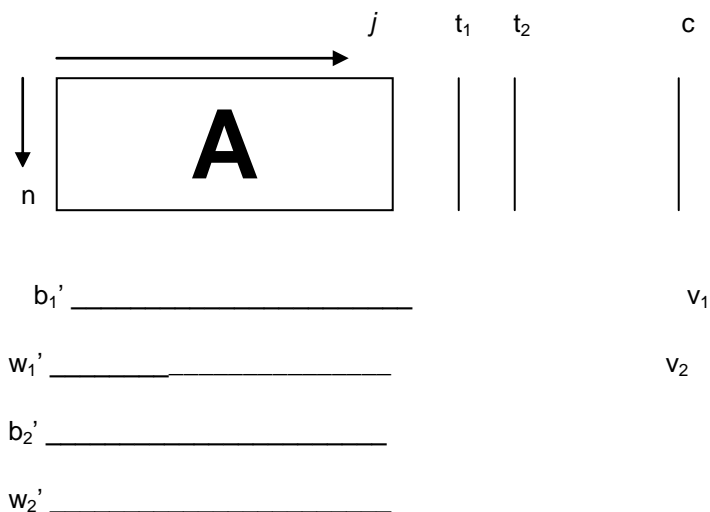


Figura 1.1: Representación gráfica de los dos primeros factores obtenidos por el método de MCP. En MCP, la matriz $T = [t_1 \ t_2]$, además se debe cumplir que: $t_1' t_2 = 0$, $w_1' w_2' = 0$ y $p_1' p_2 \neq 0$.

B) ETAPA DE PREDICIÓN

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

B.1) MÉTODO 1 ^(10, 11)

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

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

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

- PASO 1: Centrar “a” usando los datos de la calibración, es decir, sustraer la media de la calibración a cada uno de los valores espectrales.

- PASO 2: Cálculo de la variable latente t_h :

$$t_h = a w_h \quad (1.25)$$

- PASO 3: Cálculo de la concentración:

$$C_h = C_{h-1} + V_h t_h \quad (1.26)$$

- PASO 4: Cálculo de residuales:

$$e_h = e_{h-1} - t_h b_h' \quad (1.27)$$

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

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

B.2) MÉTODO 2 ^(9, 10)

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

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

$$\mathbf{k} = \mathbf{W} (\mathbf{B}' \mathbf{W})^{-1} \mathbf{v}' \quad (1.28)$$

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

$$\mathbf{e}_c = \mathbf{c}_0 - \mathbf{a}_0 \mathbf{k} \quad (1.29)$$

- PASO 3: Cálculo de la concentración:

$$\mathbf{c} = \mathbf{a} \mathbf{k} + \mathbf{e}_c \quad (1.30)$$

Se debe hacer notar que en el algoritmo de predicción por el Método 2, los valores de \mathbf{a} son centrados, mientras que \mathbf{W} y \mathbf{B} son las matrices obtenidas en la etapa de calibración que contienen todos los vectores w_h y b_h obtenidos hasta el número de factores óptimo para el modelo; \mathbf{v} es el vector obtenido utilizando todos los v_h óptimos calculados para el modelo y \mathbf{a}_0 = el vector de la media del espectro obtenida en la etapa de calibración.

1.1.3 VALIDACIÓN DEL MODELO DE CALIBRACIÓN ^(6, 12)

Uno de los aspectos más importantes de los métodos de calibración multivariante es el modelo de validación. Sin embargo, se debe hacer notar que

existe una gran diferencia entre “validar el modelo” que se está utilizando y “validar el método analítico”, ya que en el primer caso solo se demuestra que las condiciones establecidas para realizar el método de MCP son adecuadas, mientras que en el segundo caso, se demuestra que el método analítico desarrollado es confiable para su aplicación.

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

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

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

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

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

1.1.3.1 VALIDACIÓN CRUZADA

Una herramienta útil en los métodos de calibración multivariante es la “Validación Cruzada”. En este tipo de validación, los datos obtenidos de la calibración original son divididos en dos partes; una de las cuales contiene al número de

muestras y la otra parte solo contiene una o varias muestras separadas, es decir, se separan los datos espectrales de las muestras restantes, se realiza una calibración la se cual utiliza para estimar posteriormente la concentración de la o las muestras que fueron separadas, posteriormente se separan los datos de otra u otras muestras y se incorporan los datos de las primeras muestras separadas a la calibración y se repite el proceso hasta aplicarlo a cada una de las muestras de calibración ^(3, 6, 13, 14).

Así la validación cruzada tiene dos propósitos:

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

Se debe hacer notar que en la validación cruzada el dejar una o más muestras fuera de la calibración depende del número de replicas preparadas en la calibración, es decir, si las muestras de la calibración se preparan por duplicado, se deben dejar fuera los datos espectrales de la muestra y su réplica; si se preparan por triplicado, se dejan fuera las tres muestras y así sucesivamente. De no realizar la validación cruzada de esta forma, se pueden cometer errores al sobreestimar la capacidad predictiva del modelo ^(4, 6).

Utilizando la validación cruzada se puede utilizar varios gráficos y pruebas estadísticas que pueden ayudarnos a realizar la validación del modelo. Entre los principales tenemos ^(4, 10, 11).

- Gráfico del valor de la Suma de Cuadrados de los Errores Residuales de Predicción (SCERP) contra el número de factores calculados.
- Gráfico de Concentración Estimada contra Concentración Real.
- Gráfico de Porcentaje de desviación de la Concentración de cada muestra de la calibración.
- Gráfico de la Concentración Residual contra la Concentración Estimada de cada muestra de la calibración.

- Gráfico del SCERP contra la cantidad de Longitudes de onda utilizadas.
- Gráfico del SCERP contra el número de muestras utilizadas en la calibración.

1.1.3.2 SELECCIÓN DEL NÚMERO ÓPTIMO DE FACTORES:

ANÁLISIS DE SCERP

Una de la tarea más difícil en la aplicación de los métodos de MCP es la determinación del número óptimo de factores para modelar los datos. Si se utilizan muy pocos factores, la predicción de las concentraciones es pobre al no analizar todas las variaciones espectrales importantes. Conforme se incorporan más vectores al estudio, estos se ordenan en grado de importancia para el modelo.

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

La manera más efectiva para establecer el número óptimo de factores, es la aplicación del SCERP. En este método se utiliza la validación cruzada y se aplica la siguiente fórmula ⁽¹¹⁾:

$$\text{SCERP} = \sum_{i=1}^n (c_{i\text{est}} - c_{i\text{real}})^2 \quad (1.31)$$

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

Los valores de SCERP son un indicador de que tan bien se están estimando las concentraciones de las soluciones de la calibración con cada número de factores. En la figura 1.2 se muestra un gráfico típico del SCERP contra el número de factores, donde se puede observar que conforme aumenta el número de factores, disminuye el error en la predicción.

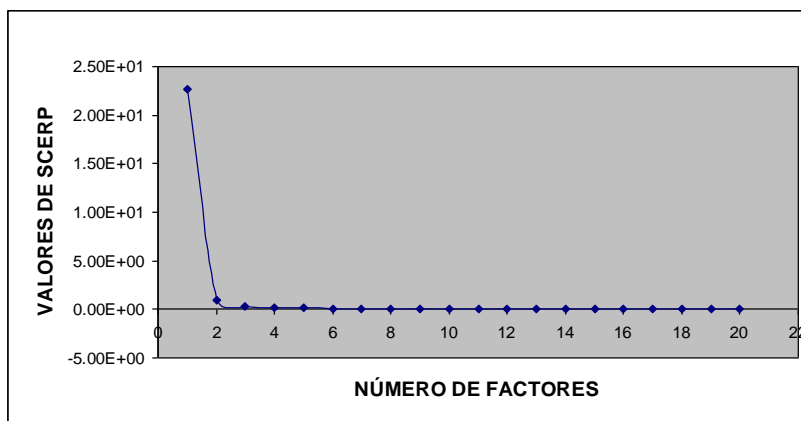
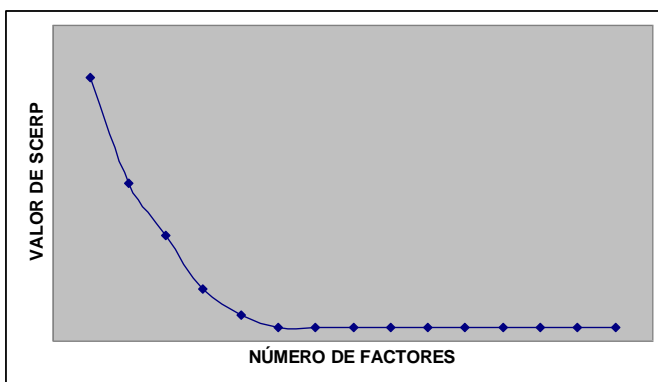


Figura 1.2: Gráfico del valor de SCERP contra el número de factores.

Al incluir vectores ruido en la matriz de calibración se conoce como “sobreajuste” (over fitting). Por eso, es recomendable elegir el menor número de factores donde el vector de SCERP alcance el mínimo para evitar el problema de sobreajuste ^(3, 14).

Al realizar el Gráfico del valor de SCERP contra el número de factores también permite describir si el modelo utilizado es adecuado o no, es decir, para saber si el algoritmo empleado es capaz de modelar la variación presente en los datos para poder estimar las concentraciones de las muestras. Si el algoritmo es adecuado, se observará el gráfico de SCERP un comportamiento similar al descrito en la figura 1.3 (a), mientras que si el algoritmo empleado no puede modelar los datos, se observará un comportamiento análogo al representado en la figura 1.3 (b).

(a)



(b)

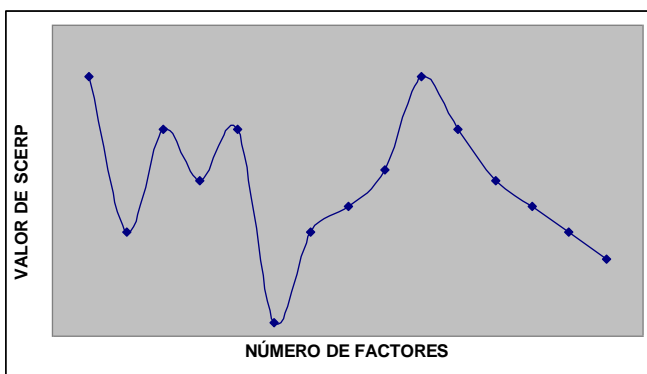


Figura 1.3: Posibles comportamientos observados en el Gráfico del valor de SCERP contra el número de factores: (a) Comportamiento más comúnmente observado; (b) Comportamiento que indica problemas con los datos o con el modelo.

1.1.3.3 CALIBRACIÓN

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

Se puede construir un buen modelo de predicción para los métodos de MCP en la medida que se cumpla con las siguientes condiciones ^(3, 15):

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

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

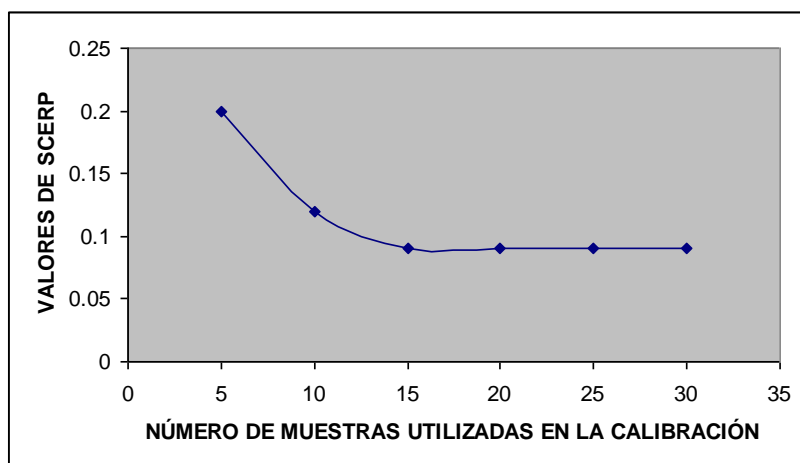


Figura 1.4: Gráfico del valor de SCERP contra el Número de muestras utilizadas en la calibración. En este gráfico, el valor de SCERP se debe estimar cuando el número de factores es el óptimo.

Como se muestra en la figura 1.4, a medida que se incluyen más muestras en la calibración, el valor del SCERP disminuye hasta un punto donde la diferencia entre cada valor del SCERP es muy pequeña. Para poder elegir el número de muestras a incluir en la calibración, se debe buscar un equilibrio razonable entre el mínimo valor del SCERP y la mínima cantidad de muestras que puedan proporcionar una buena capacidad predictiva al modelo.

Una vez que se han establecido el número óptimo de factores y el total de las muestras que deben ser incluidas en la calibración, una forma de demostrar la capacidad predictiva del modelo es realizar el gráfico de concentración estimada contra la concentración real, en el cual se espera que exista una relación lineal entre ambas concentraciones, indicando de esta forma, que el modelo tiene capacidad predictiva (figura 1.5) ⁽⁴⁾

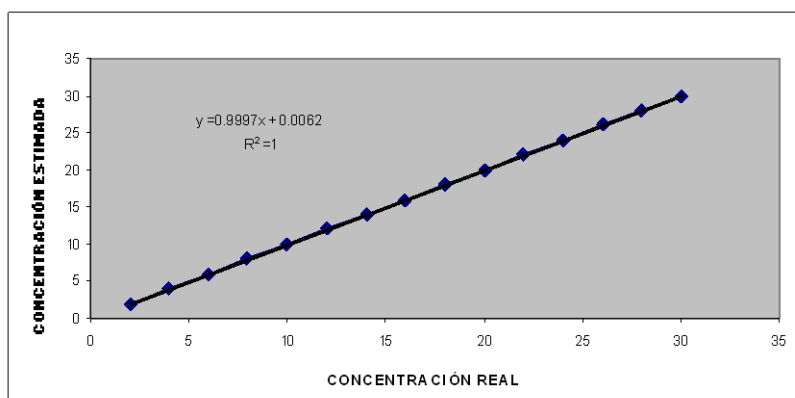


Figura 1.5: Gráfico de Concentración estimada contra la Concentración real. Las concentraciones estimadas deben ser obtenidas utilizando la validación cruzada y se debe cumplir que: el intercepto=0 y la pendiente=1 ⁽⁴⁾.

1.1.3.4 DETECCIÓN DE MUESTRAS DESECHABLES ^(3, 4)

La detección de muestras desechables resulta tan importante como el diseño de las disoluciones patrón, así como la elección del número de factores óptimos en el

método de MCP, ya que si una o más muestras son erróneas, darán lugar a enormes errores en la calibración y, finalmente, falsos resultados en la predicción de las concentraciones de los componentes de interés en las muestras reales o muestras problema.

Una o varias de las muestras de la calibración pueden tener su valor de concentración incorrecto debido a que las muestras se prepararon de una forma incorrecta o que se tuvo una manipulación inadecuada durante la medición del espectro u otros errores relacionados. En la figura 1.6 se observa el porcentaje de desviación de muestras que fueron bien y mal preparadas.

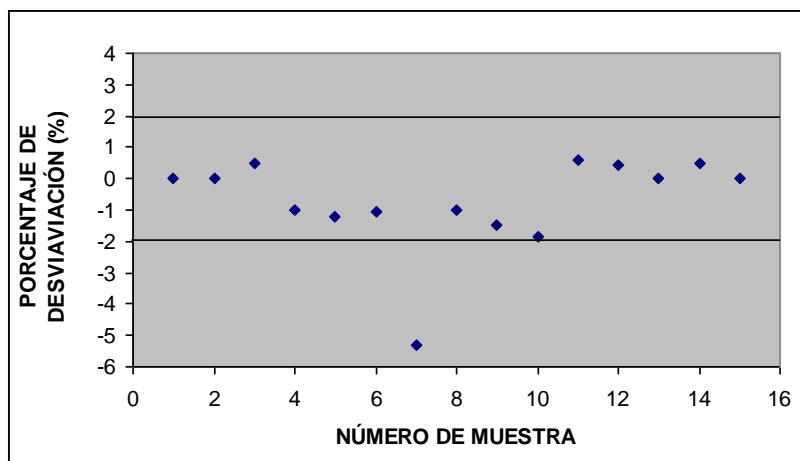


Figura 1.6: Gráfico del porcentaje de desviación de cada muestra de la calibración. En este gráfico los valores del porcentaje de desviación de la mayoría de las muestras están comprendidos dentro de un intervalo de error establecido ($\pm 2\%$). En este caso la muestra 7 es “desechable”.

Una poderosa herramienta para la detección de muestras desechables resulta ser la utilización de la validación cruzada. Así, tras elegir el número óptimo de factores, cada una de las muestras se separa del resto de las muestras de la calibración para posteriormente predecir la concentración de la muestra que quedó fuera. Tras repetir este procedimiento a todas las muestras de la calibración, se puede determinar el porcentaje de desviación de la concentración estimada con respecto a su concentración real:

$$\left(\frac{C_{\text{est}} - C_{\text{real}}}{C_{\text{real}}} \right) \times 100 \quad (1.32)$$

de esta manera, para determinar si una o más de estas muestras son desechables, se debe realizar el gráfico descrito en la figura 1.7

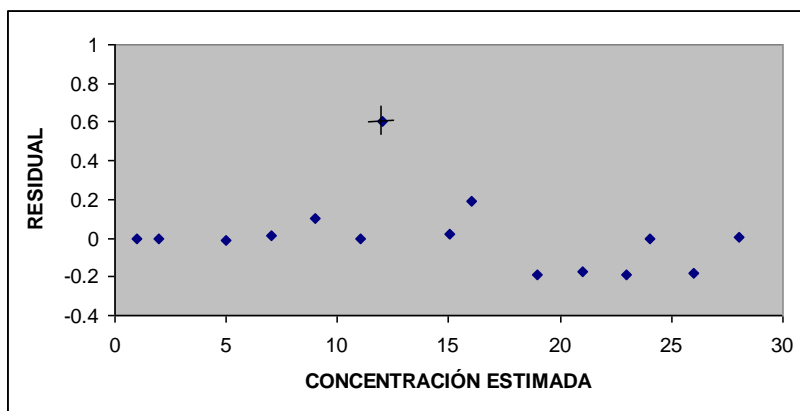


Figura 1.7: Gráfico de concentración residual contra concentración estimada de cada muestra de la calibración. En este gráfico, los datos deben agruparse cerca del valor de 0. Así, el valor marcado con una + puede ser considerado como desechable ⁽⁴⁾.

1.2 CARACTERÍSTICAS DEL ACETAMINOFÉN Y DEL NAPROXENO. ⁽¹⁶⁾

El Acetaminofén pertenece al grupo de los analgésicos no narcóticos, a diferencia de los AINES, tienen actividad antiinflamatoria escasa o nula. Posee una ventaja terapéutica sobre los analgésicos narcóticos: no ocasiona dependencia física o tolerancia. Es el producto de biotransformación activo de la fenacetina, un analgésico derivado de la anilina (alquitrán de hulla).

El Naproxeno, es un derivado del ácido propionico y se encuentra en el grupo de antiinflamatorios no esteroides. Este fármaco posee actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética, y ganó amplia aceptación para el tratamiento crónico de la artritis reumatoide y la osteoartritis.

1.2.1 INDICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA MEZCLA APAP-NAP

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

1.2.2 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA EN HUMANOS.

NAPROXENO:

El Naproxeno es un fármaco inhibidor reversible de las ciclo oxigenasas y por tanto inhibe la síntesis de prostaglandinas pero no la de leucotrienos.

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

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

Eliminación: el Naproxeno se somete a metabolismo hepático, por tanto los productos de biotransformación se excretan por completo en la orina. Cerca del 30% sufre 6-desmetilación y la mayor parte de este producto de biotransformación, así como el mismo Naproxeno, se excretan como glucorónidos o como conjugados.

Dosis: usualmente de 0.5 a 1 g al día.

ACETAMINOFÉN:

El Acetaminofén inhibe la síntesis de prostaglandina en el SNC. Esto explica sus propiedades antipiréticas y analgésicas. Tiene menos efecto sobre la ciclo oxigenasa en los tejidos periféricos, lo que da cuenta de su actividad antiinflamatoria débil.

El Acetaminofén es un sustituto adecuado de la aspirina por sus efectos analgésicos y antipiréticos tanto para los pacientes que sufren malestar gástrico por ésta como para aquellos en los que la prolongación del tiempo de sangrado sería una desventaja o que no requieren la acción antiinflamatoria de la aspirina.

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

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

Eliminación: bajo circunstancias normales el Acetaminofén se conjuga en el hígado para formar glucuronados (cerca del 60%), sulfatados (alrededor del 35%) o bien se conjuga con cisteína (cerca del 3%); también se detectan pequeñas cantidades de metabolitos hidroxilados y desacetilados. Un ejemplo de metabolito hidroxilado es el N-acetil-benzoquinona-imina, un metabolito altamente reactivo y peligroso que reacciona con los grupos sulfhidrilo; a dosis normales este producto de biotransformación reacciona con el grupo sulfhidrilo del glutatión y forma una sustancia atóxica. El Acetaminofén y sus productos de biotransformación se excretan en la orina.

Dosis: Arriba de 4 g al día.

1.2.3 ACETAMINOFÉN: DESCRIPCIÓN Y PROPIEDADES FÍSICAS. ⁽¹⁷⁾

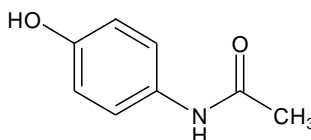
NOMBRE QUÍMICO: *N*-(4-Hidroxifenil)acetamida; 4'-hidroxiacetanilida.

SINÓNIMOS: *p*-hidroxiacetanilida; *p*-acetamidofenol; *p*-acetilaminofenol; *N*-acetil-*p*-aminofenol; acetaminofeno; paracetamol.

FÓRMULA CONDENSADA: C₈H₉NO₂

PESO MOLECULAR: 151.16 g/mol.

ESTRUCTURA QUÍMICA:



DESCRIPCIÓN: Cristales Blancos o polvo cristalino.

SOLUBILIDAD: Soluble en agua, metanol, dimetilformamida, etanol, acetona y etil acetato. Muy poco soluble en cloroformo. Prácticamente insoluble en éter y benceno.

RANGO DE FUSIÓN: 169-170.5° C.

NATURALEZA QUÍMICA Y CONSTANTE DE DISOCIACIÓN: Ácida, con un valor de pka de 9.5 (25° C)

ESPECTRO ULTRAVIOLETA: En solución acuosa ácida presenta un pico a 245 nm (A=668); en solución acuosa alcalina presenta un pico a 257 nm (A=715).

1.2.4 NAPROXENO: DESCRIPCIÓN Y PROPIEDADES FÍSICAS. ⁽¹⁷⁾

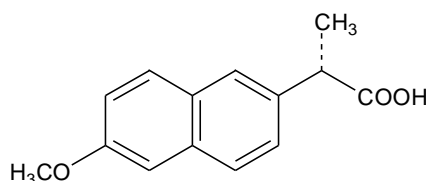
NOMBRE QUÍMICO: Ácido (+)-2-(6-metoxi-2-naftil) propiónico.

SINÓNIMOS: Equiproxén, Laser, Naproxén, Proxén, Xenar.

FÓRMULA CONDENSADA: C₁₄H₁₄O₃

PESO MOLECULAR: 230.26 g/mol.

ESTRUCTURA QUÍMICA:



DESCRIPCIÓN: Polvo blanco cristalino.

SOLUBILIDAD: Soluble en etanol y éter. Ligeramente soluble en cloroformo. Prácticamente insoluble en agua.

RANGO DE FUSIÓN: 152-154° C.

NATURALEZA QUÍMICA Y CONSTANTE DE DISOCIACIÓN: Ácida, con un valor de pka de 4.2 (25° C)

ESPECTRO ULTRAVIOLETA: En solución acuosa ácida presenta picos a 262 nm (A=208); a 272 nm (A=215); a 315 nm (A=52) y a 328 nm (A=63); en solución acuosa alcalina presenta picos a 261 nm (A=218) y a 271 nm (A=218).

1.2.5 MONOGRAFÍAS DE VARIABILIDAD DE CONTENIDO QUÍMICO. ⁽¹⁾

La combinación del Acetaminofén y el Naproxeno se distribuye comercialmente en tabletas que contienen 300 mg de APAP y 275 mg de NAP. En la Farmacopea Americana (USP) se establece que la uniformidad de las unidades de dosificación se aplica tanto a unidades de dosificación que contengan dos o más ingredientes activos. A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, los requisitos se aplican a cada ingrediente activo en el producto.

Los requisitos de Uniformidad de Contenido se pueden aplicar en todos los casos. La prueba para Uniformidad de Contenido se requiere para:

Tabletas recubiertas, que no sean tabletas recubiertas con película, que contengan 50 mg o más de un ingrediente activo que corresponda a 50% o mas (en peso) de una tableta. Esto se cumple con las tabletas que contienen Acetaminofén y Naproxeno.

Los requisitos para uniformidad de dosificación se cumplen si la cantidad de ingrediente activo en cada una de las 10 unidades de dosificación está dentro del intervalo de 85 a 115% de la cantidad declarada en la etiqueta y la Desviación estándar relativa es menor o igual al 6%.

Si una unidad esta fuera del intervalo 85 a 115% de la cantidad declarada en la etiqueta y ninguna unidad está fuera del intervalo de 75% a 125% de la cantidad declarada en la etiqueta o si la desviación estándar relativa es mas de 6%, o si ambas condiciones prevalecen, analizar 20 unidades adicionales. Los requisitos se cumplen si no mas de 1 unidad de las 30 está fuera del intervalo de 85 a 115% de la cantidad declarada en la etiqueta y ninguna unidad está fuera del intervalo de 75 a 125% de la cantidad declarada en la etiqueta y la desviación estándar relativa de las 30 unidades es de dosificación no es mas de 7.8%.

1.3 VALIDACION DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Para el desarrollo químico-farmacéutico de un nuevo medicamento es imprescindible el uso de un método analítico que permita cuantificar el producto mayoritario en forma de materia prima, como ingrediente activo de una formulación o para evaluar algunas características de desempeño. Para asegurar efectividad y confiabilidad, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación ⁽¹⁹⁾.

La validación de métodos analíticos puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por medio de estudios de laboratorios, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en todos los casos, en términos de parámetros o propiedades analíticas, que proporcionan una medida del comportamiento del método analítico ^(14, 19, 20).

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

1.3.1 TIPOS DE MÉTODOS ANALÍTICOS A SER VALIDADOS ^(5, 20).

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

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

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

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

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

1.3.2 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

El procedimiento o método analítico es la forma en la que se debe llevar a cabo el análisis. En él, se debe describir detalladamente los pasos necesarios para realizar cada ensayo analítico. Entre estos pasos se deben incluir algunos tales como: la muestra, las soluciones estándares y la preparación de soluciones, aparatos utilizados, generación de la calibración, uso de la fórmula para el cálculo de las concentraciones, etc ⁽²¹⁾.

1.3.3 LINEALIDAD

1.3.3.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA ^(1, 5, 18, 22, 23)

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

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

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

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

1.3.3.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO.

La linealidad del método es la capacidad del mismo para cuantificar confiablemente al analito independientemente de la proporción en la que se encuentre con respecto al resto de los componentes de la muestra.

Para realizar la linealidad del método, se debe determinar los miligramos de APAP y de NAP en los placebos cargados preparados a 5 niveles de proporción, principios activos-excipientes. Para cada uno de los niveles de proporción se realizan 3 ensayos.

La linealidad del método se evalúa por medio de las siguientes características: el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación, la pendiente, conocida también como coeficiente de regresión, la ordenada al origen y el coeficiente global.

1.3.4 PRECISIÓN ^(1, 14, 19)

La precisión está relacionada con la dispersión de los datos alrededor de su valor promedio y corresponde al grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales que se han obtenido dentro de una serie de mediciones efectuadas en una muestra homogénea bajo las mismas condiciones de análisis. La precisión mide el error aleatorio de un análisis y generalmente se expresa en términos de desviación estándar, variancia o coeficiente de variación.

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

La precisión del método debe ser evaluada realizando la determinación de tres diferentes concentraciones en placebos cargados, con seis ensayos cada una.

1.3.5 EXACTITUD

La exactitud es el grado de concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. A diferencia de la precisión que mide el error aleatorio, la exactitud mide el error sistemático o la tendencia hacia él y generalmente se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del analito de interés, en general, se requiere que el valor medido no difiera significativamente con el valor de referencia.

La exactitud debe ser evaluada realizando la determinación de los miligramos de APAP y de NAP en los placebos cargados a 3 niveles de proporción de principios activos-excipientes. Para cada nivel de proporción se realizan 6 ensayos.

1.3.6 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de Detección es la cantidad mínima de analito contenido en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de análisis establecidas y se expresa en términos de la concentración del analito presente en la muestra ^(1, 18, 20).

El límite de Cuantificación es la cantidad mínima de un analito contenido en una muestra que puede ser determinado con precisión y exactitud, bajo las condiciones de análisis establecidas. El límite de cuantificación es particularmente utilizado (aunque no exclusivamente) en la determinación de impurezas, en la determinación de perfiles de disolución o en la determinación de productos de degradación y se expresa en términos de la concentración del analito en la muestra ^(18, 20).

Una forma para poder estimar el límite de detección y el límite de cuantificación, es utilizando los datos de regresión calculados a partir de la curva de calibración en la linealidad del método. Así, se deben estimar los intervalos de confianza para el intercepto y posteriormente se deben estimar por extrapolación los valores del límite de detección y del límite de cuantificación (figura 1.8).

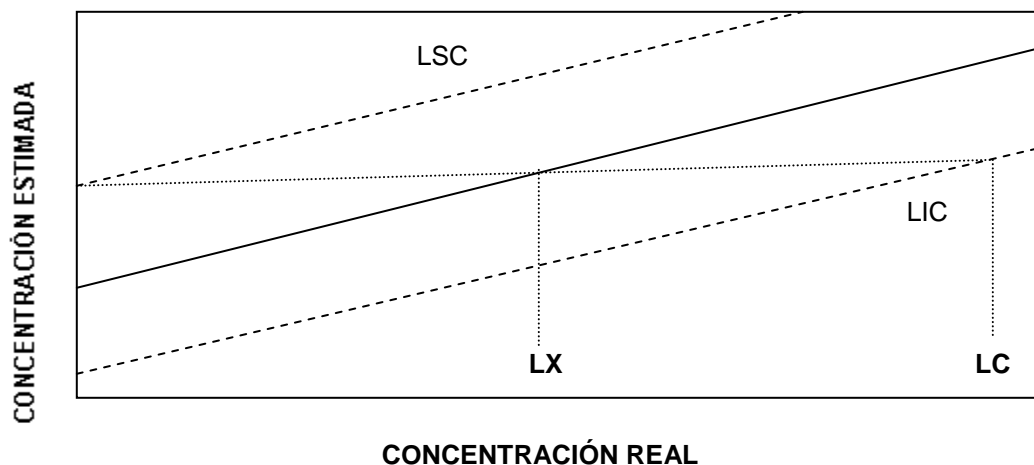


Figura 1.8: Gráfico que representa la forma para estimar el Límite de Detección y el Límite de Cuantificación.

Sin embargo, en los casos donde se estimen los valores del límite de cuantificación y detección por extrapolación, estas concentraciones deben ser subsecuentemente validadas, realizando un ensayo por sextuplicado de un placebo cargado que presente la concentración estimada para el límite de cuantificación y el límite de detección ^(3, 9, 14, 21, 23).

1.3.7 REPETIBILIDAD ENTRE DÍAS

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones de análisis (analista, instrumentos, laboratorios) pero en diferentes días ^(18, 19).

1.3.8 REPRODUCIBILIDAD

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

Para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad, se debe evaluar el efecto de los eventos aleatorios en la precisión del método analítico, tales como los días (repetibilidad), los analistas ó los equipos (reproducibilidad). Debe analizarse una muestra homogénea del producto, por lo menos por triplicado para probar cada condición ^(18, 19).

1.3.9 SENSITIVIDAD

La sensibilidad de un método analítico se define como la mínima diferencia entre la concentración del analito contenido en una muestra que genera una diferencia significativa en la respuesta analítica bajo condiciones de análisis establecidas y se expresa en términos de la concentración del analito presente en la muestra que genera la diferencia significativa ^(18, 19).

1.3.10 SENSIBILIDAD

Cualidad que tiene el método para dar un cambio en la respuesta analítica cuando cambia la concentración del analito, bajo condiciones de análisis establecidas. Se expresa en unidades de respuesta sobre unidades de concentración o cantidad del analito ^(18,19).

1.3.11 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA

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

Se determina mediante la comparación de los resultados de análisis iniciales de 3 muestras procesadas con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones de almacenamiento tales como temperatura ambiente, refrigeración, congelación, protegidos de la luz, etc., durante un tiempo preestablecido por el analista. Las muestras almacenadas se analizan bajo las mismas condiciones de análisis, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por el mismo analista ^(18, 19).

1.3.12 SELECTIVIDAD

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

Los métodos espectroscópicos (UV, IR, colorimetría, etc.) frecuentemente carecen de especificidad cuando existen dos o más componentes presentes en la muestra analítica. Sin embargo, se ha demostrado que la utilización de la espectrofotometría de derivadas y los métodos de calibración multivariante incrementa y logran la especificidad del método, permitiendo la determinación cuantitativa y simultánea de varios componentes presentes en una misma muestra analítica ⁽¹⁹⁾.

1.3.13 TOLERANCIA

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo pequeñas modificaciones de las condiciones de operación establecidas, tales como diferentes temperaturas, pH, lotes de reactivos, condiciones ambientales, etc., y da una buena indicación de su confiabilidad durante el trabajo rutinario de laboratorio ⁽¹⁹⁾.

1.3.14 ROBUSTEZ

Es el grado de reproducibilidad de los ensayos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo una variedad de condiciones normales de análisis, tales como diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, etc ⁽¹⁹⁾.

CAPÍTULO 2:

DESARROLLO DEL

MÉTODO ANALÍTICO

2.1 REACTIVOS, MATERIAL, EQUIPOS Y SOFTWARES

2.1.1 REACTIVOS:

REACTIVO	PROVEEDOR	No. LOTE
Fosfato monobásico de Potasio	Baker Analyzer reactivo. 99%	--
Solución de NaOH 0.5 M	JT Baker	D44103
Estándar secundario de Acetaminofén	I. M. Bruluart S. A	MP1L113
Estándar Secundario de Naproxeno Sódico	I. M. Bruluart S. A	MP1F655
Lactosa 200M	I. M. Bruluart S. A	MP1B139
Avicel pH 102	I. M. Bruluart S. A	MP1A078
Plasdone K 30	I. M. Bruluart S. A	MP1I1172
Poliplasdone XL	I. M. Bruluart S. A	MP0L1413
Talco	I. M. Bruluart S. A	MPC246
Estearato de Magnesio	I. M. Bruluart S. A	MP2C306
Materia prima de APAP DC 90	I. M. Bruluart S. A	--
Materia prima de NAP	I. M. Bruluart S. A	--

2.1.2 EQUIPOS:

REACTIVO	MARCA	No. INVENTARIO
Balanza Analítica	Adverturer Ohaus. Modelo ARO640	1581170
Espectrofotómetro	Varian Cary 1E	---
Computadora Pentium 3	Samsung	1969861
Potenciómetro	Thermo electron corporation. Orion 3 star	1945203

2.1.3 SOFTWARES:

Los datos fueron recolectados utilizando los programas "Cary Simple Reads" y "Cary Scan".

Para el tratamiento de los datos (método de MCP), se utilizó tanto el programa de ISHEJA INC. Versión 1.0.0 soportado en ambiente Windows 98, como el programa Excel de la paquetería de Microsoft Office.

Los gráficos fueron realizados con el programa de Excel de la paquetería de Microsoft Offices.

2.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

2.2.1 PREPARACIÓN DE 1 LITRO DE LA SOLUCIÓN NaOH 0.1 N

1. Medir volumétricamente 20 mililitros de la solución 5 M de NaOH.
2. Transferir los mililitros a un matraz volumétrico de 1000 ml
3. Llevar a la marca de aforo con agua destilada.
4. Etiquetar la solución como NaOH 0.1 N

2.2.2 PREPARACIÓN DE 1 LITRO DE LA SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO 0.2 N

1. Medir volumétricamente 40 mililitros de la solución 5 M de NaOH.
2. Transferir los mililitros a un matraz volumétrico de 1000 ml
3. Llevar a la marca de aforo con agua destilada.
4. Etiquetar la solución como NaOH 0.2 N

2.2.3 PREPARACIÓN DE 1 LITRO DE LA SOLUCIÓN DE FOSFATO MONOBÁSICO DE POTASIO 0.2 M

1. Pesar en un vaso de precipitado de 100 ml, aproximadamente 27.24 gramos de Fosfato Monobásico de Potasio con una balanza Analítica.
2. Adicionar aproximadamente 50 ml de agua destilada al vaso de precipitado.
3. Colocar el vaso de precipitado sobre una parrilla con agitador.

4. Agitar la muestra con una barra magnética hasta completa disolución del Fosfato Monobásico de Potasio.
5. Trasvasar esta solución a un matraz volumétrico de 1000 ml.
6. Enjuagar 3 veces el vaso de precipitado con un total de 15 ml de agua destilada y transferir el contenido al matraz volumétrico.
7. Llevar a la marca de aforo con agua destilada.

2.2.4 PREPARACIÓN DE 2 LITROS LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH 7.4

1. Colocar en una probeta graduada de 500 ml, 200 ml de la solución de NaOH 0.2 N y transferir su contenido a un matraz volumétrico de 2 litros.
2. Adicionar en otra probeta graduada de 500 ml, 500 ml de la solución de Fosfato Monobásico de Potasio 0.2 M y transferir su contenido al mismo matraz volumétrico.
3. Adicionar aproximadamente 1100 ml de agua destilada al matraz volumétrico.
4. Tomar y registrar la lectura del valor de pH de esta solución con el potenciómetro.
5. Ajustar el valor de pH a 7.4 con la cantidad necesaria de la solución de Fosfato Monobásico de Potasio o de NaOH.

2.2.5 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN.

1. Pesar con exactitud aproximadamente 30 mg de Acetaminofén SR secundario sobre un vaso de precipitados de 25 ml en una balanza analítica previamente calibrada.
2. Agregar 10 ml de la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en el vaso de precipitados de 25 ml para disolver el Acetaminofén.
3. Agitar con una varilla de vidrio la solución anterior.
4. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 100 ml.

5. Enjuagar 2 veces con aproximadamente 10 ml de la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, el vaso de precipitados de 25 ml y la varilla de vidrio y transferir cada vez los mililitros al matraz volumétrico de 100 ml.
6. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Solución A (300 mcg/ml).
7. Tomar 2 mililitros con una pipeta volumétrica de la solución A y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml.
8. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Solución B (12 mcg/ml).
9. Colocar la cantidad suficiente en la celda espectrofotométrica y determinar el espectro de absorción de la Solución B en un rango de longitudes de onda de 200 a 320 nm.
10. Pesar con exactitud aproximadamente 30 mg de Naproxén SR secundario sobre un vaso de precipitados de 25 ml en una balanza analítica previamente calibrada.
11. Agregar 10 ml de la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en el vaso de precipitados de 25 ml para disolver el Naproxeno.
12. Agitar con una varilla de vidrio la solución anterior.
13. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 100 ml.
14. Enjuagar 2 veces con aproximadamente 10 ml de la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, el vaso de precipitados de 25 ml y la varilla de vidrio y transferir cada vez los mililitros al matraz volumétrico de 100 ml.
15. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Solución C (300 mcg/ml).
16. Tomar 1 mililitro con una pipeta volumétrica de la solución C y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml.
17. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Solución D (6 mcg/ml).

18. Colocar la cantidad suficiente en la celda espectrofotométrica y determinar el espectro de absorción de la Solución D en un rango de longitudes de onda de 200 a 320 nm.
19. Tomar 2 mililitros con una pipeta volumétrica de la solución A y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml.
20. Tomar 1 mililitro con una pipeta volumétrica de la solución C y transferirlos al mismo matraz volumétrico de 50 ml donde se encuentra la solución de Acetaminofén.
21. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Solución E (12 mcg/ml APAP y 6 mcg/ml NAP)
22. Colocar la cantidad suficiente en la celda espectrofotométrica y determinar el espectro de absorción de la Solución E en un rango de longitudes de onda de 200 a 320 nm.

2.2.6 PREPARACIÓN DE LA CALIBRACIÓN.

1. Pesar en un vaso de precipitado de 50 ml, aproximadamente 70 mg de Acetaminofén SR secundario en una balanza analítica.
2. Adicionar al vaso de precipitado 5 ml de la de NaOH 0.1 N para disolver al APAP.
3. Agitar mecánicamente con una varilla de vidrio hasta completa disolución.
4. Trasvasar esta solución a un matraz volumétrico de 100 ml.
5. Enjuagar 3 veces el vaso de precipitado con un total de 15 ml de la Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 y transferir los 15 ml al matraz volumétrico.
6. Llevar a la marca de aforo con la Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4 (Solución A).
7. Tomar con una pipeta volumétrica, 25 ml de la Solución A y verter su contenido a un matraz volumétrico de 250 ml. Llevar a la marca de aforo con la Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4 (Solución Patrón de APAP)
8. Pesar en un vaso de precipitado de 50 ml, aproximadamente 70 mg de Naproxeno SR secundario en una balanza analítica.

9. Adicionar al vaso de precipitado 5 ml de la Solución de NaOH 0.1 N para disolver al NAP.
10. Agitar mecánicamente con una varilla de vidrio hasta completa disolución.
11. Trasvasar esta solución a un matraz volumétrico de 100 ml.
12. Enjuagar 3 veces el vaso de precipitado con un total de 15 ml de la Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 y transferir los 15 ml al matraz volumétrico.
13. Llevar a la marca de aforo con la Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4 (Solución B).
14. Tomar con una pipeta volumétrica, 25 ml de la Solución B y verter su contenido a un matraz volumétrico de 250 ml. Llevar a la marca de aforo con la Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4 (Solución Patrón de NAP)
15. Tomar con una pipeta volumétrica, 7 ml de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml; tomar con otra pipeta volumétrica, 5 ml de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. (**Solución Estándar 1**). 19.6-14 mcg/ml
16. Tomar con una pipeta volumétrica, 8 ml de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml; tomar con otra pipeta volumétrica, 5 ml de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. (**Solución Estándar 2**). 22.4-14 mcg/ml
17. Tomar con una pipeta volumétrica, 8 ml de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml; tomar con otra pipeta volumétrica, 6 ml de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. (**Solución Estándar 3**). 22.4-16.8 mcg/ml
18. Tomar con una pipeta volumétrica, 9 ml de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml; tomar con otra pipeta volumétrica, 6 ml de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo

- matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. (**Solución Estándar 4**). 25.2-16.8 mcg/ml
19. Tomar con una pipeta volumétrica, 9 ml de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml; tomar con otra pipeta volumétrica, 7 ml de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. (**Solución Estándar 5**). 25.2-19.6 mcg/ml
20. Tomar con una pipeta volumétrica, 10 ml de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml; tomar con otra pipeta volumétrica, 7 ml de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. (**Solución Estándar 6**). 28-19.6 mcg/ml
21. Tomar con una pipeta volumétrica, 10 ml de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml; tomar con otra pipeta volumétrica, 8 ml de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. (**Solución Estándar 7**). 28-22.4 mcg/ml
22. Tomar con una pipeta volumétrica, 11 ml de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml; tomar con otra pipeta volumétrica, 8 ml de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. (**Solución Estándar 8**). 30.8-22.4 mcg/ml
23. Tomar con una pipeta volumétrica, 11 ml de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml; tomar con otra pipeta volumétrica, 9 ml de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al mismo matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. (**Solución Estándar 9**). 30.8-25.2 mcg/ml.
24. Tomar con una pipeta volumétrica, 11 ml de la Solución Patrón de APAP y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml; tomar con otra pipeta volumétrica, 10 ml de la Solución Patrón de NAP y verter su contenido al

mismo matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. (**Solución Estándar 10**). 30.8-28 mcg/ml.

2.2.7 PREPARACION DE LA MUESTRA

1. Tomar una tableta que contenga Acetaminofén y Naproxeno y pesarla sobre un matraz Erlenmeyer de 50 ml en una balanza analítica.
2. Verter aproximadamente 10 ml de Solución de etanol tibio al matraz Erlenmeyer.
3. Colocar el matraz Erlenmeyer sobre una parrilla con agitador magnético por 10 minutos.
4. Transferir la solución anterior a través de un embudo bushner y papel filtro Whatman no. 42 a un matraz kitazato.
5. Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 100 ml.
6. Enjuagar 3 veces el matraz kitazato con un total de 5 ml de solución amortiguadora de Fosfatos pH 7.4 y transferir los 15 ml al matraz volumétrico de 100 ml.
7. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de Fosfatos pH 7.4.
8. Tomar con una pipeta volumétrica, 5 ml de la solución anterior y verterlos a un matraz volumétrico de 50 ml.
9. Llevar a la marca de aforo con la solución amortiguadora de Fosfatos pH 7.4.
10. Tomar con una pipeta volumétrica, 2 ml de la solución anterior y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
11. Llevar a la marca de aforo con solución amortiguadora de Fosfatos pH 7.4

2.3 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS REALIZADOS PARA EL DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Se realizaron los espectros de absorción de APAP, del NAP y una mezcla de ambos en diferentes medios de disolución, tales como NaOH 0.1N y HCl 0.1 N, obteniéndose resultados poco convenientes para su uso en el desarrollo del método, ya que a lo largo de todo el espectro de absorción (200 a 350 nm) se observaron múltiples interacciones entre las soluciones de APAP y de NAP con respecto a la solución de la mezcla de ambos analitos. Así que con base al trabajo de Mauricio Barrera ⁽²⁴⁾ y considerando los pK_a 's del Acetaminofén y del Naproxeno se estableció que el medio de trabajo adecuado para el análisis es la Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4. En este valor de pH, se encuentra presente sólo una especie química tanto del APAP como para el NAP.

Con el propósito de establecer las condiciones espectrofotométricas adecuadas, se obtuvieron los espectros de absorción del APAP, del NAP y una mezcla de ambos en la Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4, en un rango de longitudes de onda de 200 a 350 nm (figura 2.1).

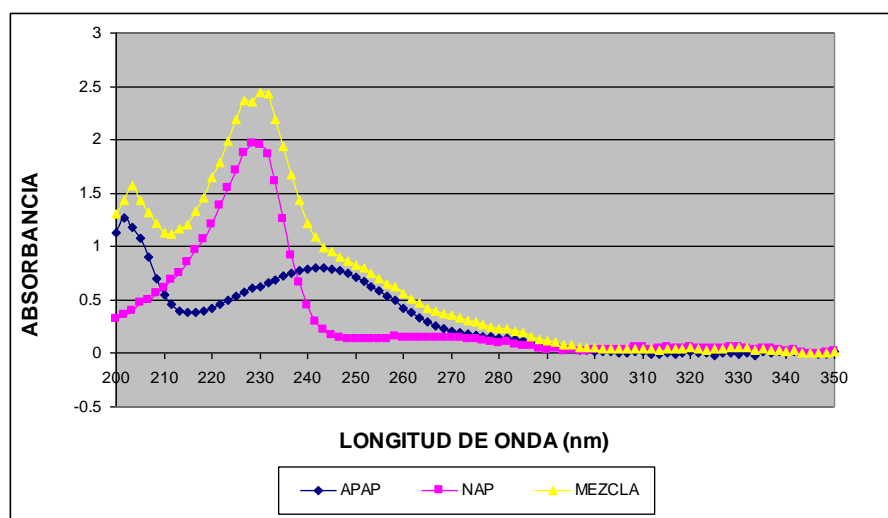


Figura 2.1: Gráfico que muestra los espectros obtenidos de las soluciones de APAP (12 mcg/ml) NAP (6 mcg/ml) y la mezcla APAP-NAP (12-6 mcg/ml) en un rango espectral de 200 a 350 nm en solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4.

2.3.1 ADITIVIDAD, INTERACCIÓN E INTERFERENCIA

Para determinar si hay aditividad entre el espectro obtenido por las mezcla de APAP-NAP, este se comparó con la suma de los espectros individuales de APAP y de NAP.

Los espectros de APAP y NAP al ser sumados (figura 2.2) presentan el mismo espectro a lo largo de la región espectral entre 236 a 300 nm, al ser comparados con el espectro obtenido por la mezcla de APAP y de NAP, por lo que se puede afirmar que existe aditividad entre los espectros de APAP y NAP en esta región espectral.

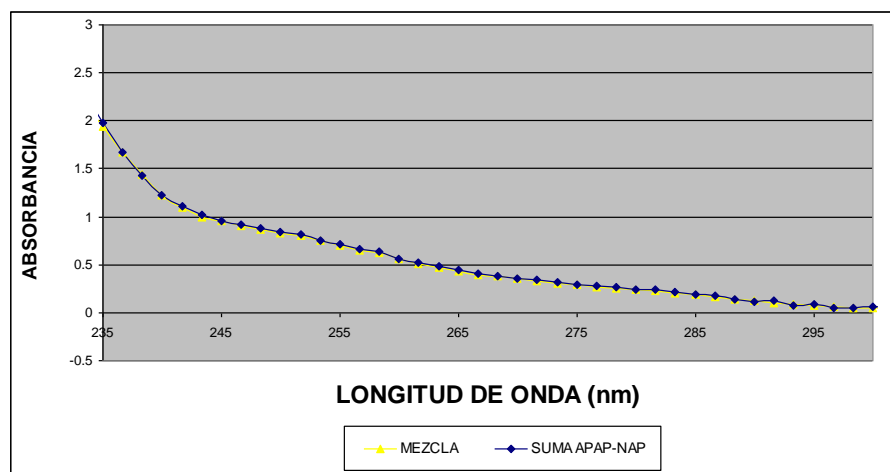


Figura 2.2: Gráfico que muestra los espectros obtenidos de la mezcla APAP-NAP (12-6 mcg/ml) y la suma de los espectros individuales de APAP y de NAP, en un rango espectral de 236 a 300 nm en solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4

Por otra parte, en la región espectral comprendida entre los 200 y 236 nm, el espectro obtenido para la mezcla APAP-NAP comienza a ser diferente con respecto al obtenido por la suma de los espectros por separado (figura 2.2 y figura 2.3), por lo que se puede decir que se presenta el fenómeno de interacción a lo largo de esta región espectral.

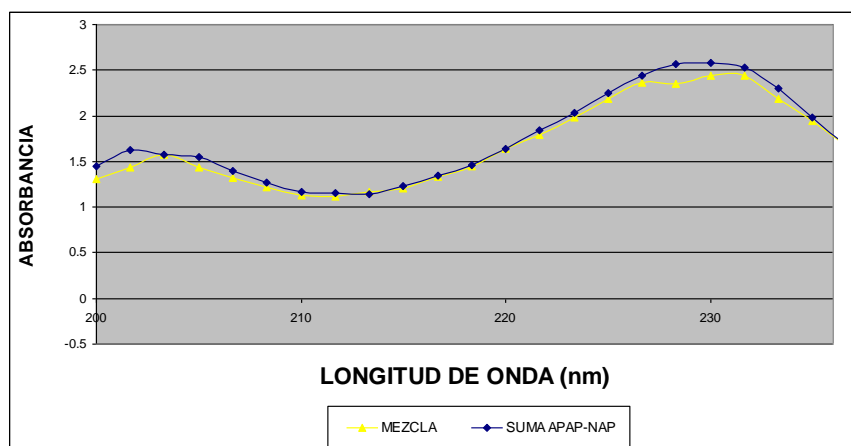


Figura 2.3: Gráfico que muestra los espectros obtenidos de la mezcla APAP-NAP (12-6 mcg/ml) y la suma de los espectros individuales de APAP y de NAP, en un rango espectral de 200 a 236 nm en solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4. En este gráfico se observa que existe diferencia entre los espectros obtenidos (fenómeno de interacción).

Una vez analizados los gráficos anteriores es posible que se puedan determinar las longitudes de onda en las cuales no exista un fenómeno de interacción. Es por ello que se hizo uso del espectro de absorción entre 236 y 300 nm. Las longitudes de onda elegidas para llevar a cabo el método de mínimos cuadrados parciales fueron aquellas en donde la absorbancia entre la suma de espectros de APAP y NAP fuese muy similar (con una diferencia máxima de 0.001) con respecto al espectro obtenido por la solución de la mezcla de ambos analitos. Así mismo fue de suma importancia basarse en los resultados obtenidos en el trabajo de Mauricio Barrera⁽²⁴⁾ en donde se consideraron otros parámetros para determinar las longitudes de onda, las cuales resultaron ser muy similares a las que se fijaron en este trabajo. Se establecieron 13 longitudes de onda, las cuales son: 278.33, 276.67, 272, 265, 263, 262, 260, 258, 255, 252, 250, 246 y 240 nm.

2.3.2 SELECCIÓN DEL NÚMERO ÓPTIMO DE FACTORES

Para poder establecer el número óptimo de factores que deben ser incluidos en el método de MCP, se construyó una calibración con 10 diferentes mezclas que contenían al APAP y al NAP. Posteriormente aplicando el algoritmo correspondiente para el método de calibración, se realizaron los gráficos del valor de SCERP (Suma de Cuadrados de los Errores Residuales de Predicción) contra el número de factores.

Como se muestra en la figura 2.4, el valor menor de SCERP obtenido para al APAP es de 5 al igual que para el NAP.

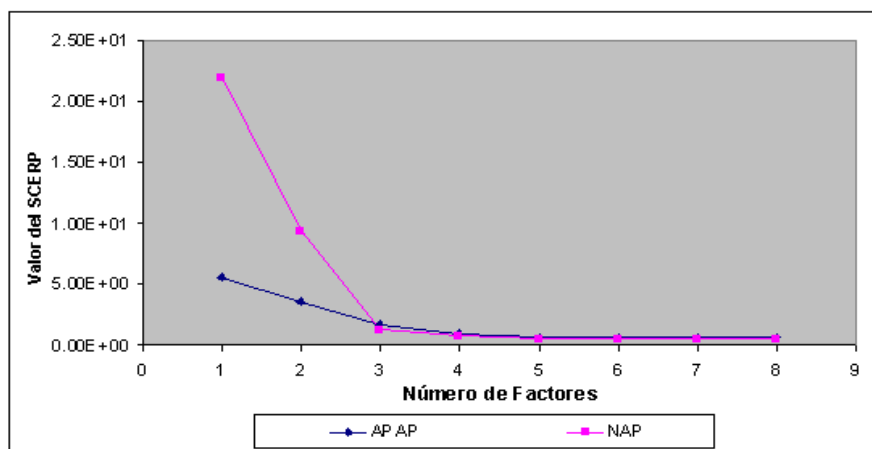


Figura 2.4: Gráfico del valor de SCERP contra el Número de factores calculados.

Durante todo el proceso de validación las calibraciones realizadas mostraron un número óptimo de factores igual al 5 por lo que se concluye que el valor óptimo de factores para ambos analitos es de 5.

2.3.3 CALIBRACIÓN

2.3.3.1 ELECCIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR

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

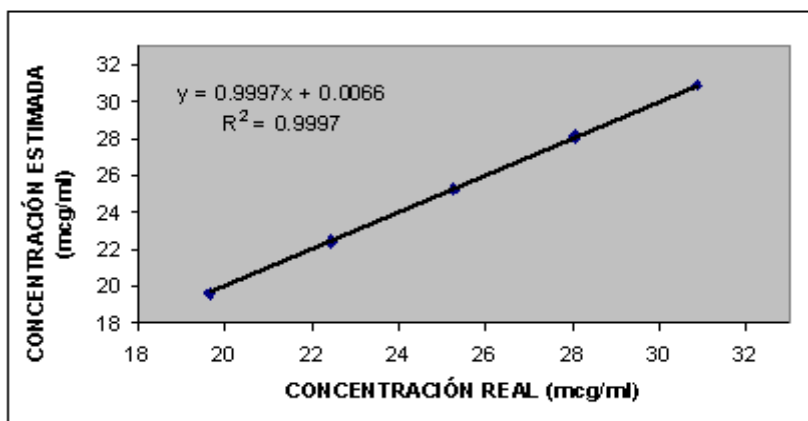


Figura 2.5: Gráfico de concentración estimada contra la concentración real para el APAP.

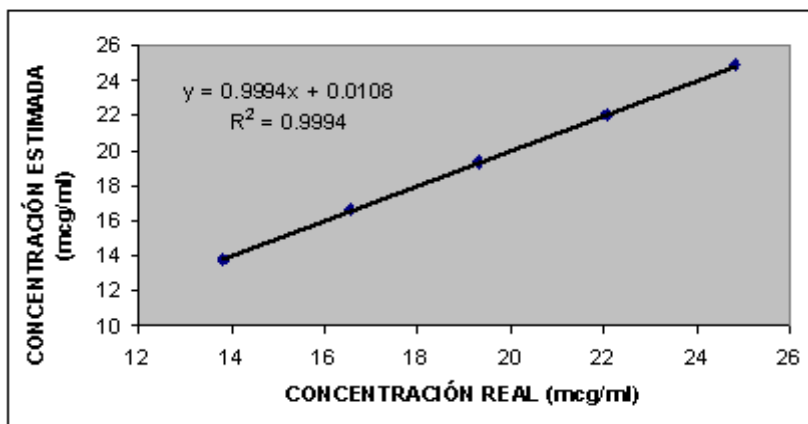


Figura 2.6: Gráfico de concentración estimada contra la concentración real para el NAP.

Con los resultados obtenidos descritos en las figuras 2.5 y 2.6 en donde se aprecia una relación lineal entre la concentración estimada y real (en el capítulo 3 se llevara acabo la comprobación de esta aseveración), se determinó que las 10 soluciones estándar preparadas presentan una buena capacidad predictiva, por lo cual estas 10 soluciones son las que conformarán la matriz de calibración.

Tabla 2.1: Soluciones Estándar que conforman la matriz de calibración.

Solución Estándar	Concentración APAP (mcg/ml)	Concentración NAP (mcg/ml)
1	19.6	14.0
2	22.4	14.0
3	22.4	16.8
4	25.2	16.8
5	25.2	19.6
6	28.0	19.6
7	28.0	22.4
8	30.8	22.4
9	30.8	25.2
10	30.8	28.0

2.3.3.2 DETECCIÓN DE MUESTRAS DESECHABLES

Para determinar si una o varias de las soluciones estándar fueron mal preparadas, se debe realizar la detección de muestras desechables con el fin de asegurar la confiabilidad en la predicción de las muestras bajo el análisis de donde todas las muestras deben encontrarse dentro del intervalo de +/- 2% (figura 2.7). Así, si alguna de las soluciones estándar fue preparada incorrectamente, esta deberá ser nuevamente preparada.

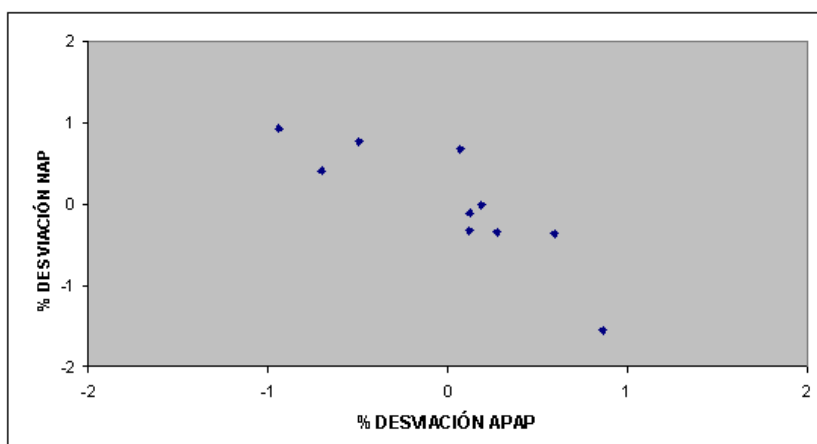


Figura 2.7: Gráfico del porcentaje de desviación del NAP contra el porcentaje de desviación del APAP. Todas las muestras se encuentran dentro del intervalo de error de +/- 2%.

2.4 CONDICIONES FINALES DE ANÁLISIS

- Las muestras deben estar en la Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.4.
- En cada día de experimentación debe ser preparada la matriz de calibración.
- Las soluciones estándares y las muestras de análisis deben leerse a las longitudes de onda de 278.33, 276.67, 272, 265, 263, 262, 260, 258, 255, 252, 250, 246 y 240 nm.
- El modelo de MCP debe ser realizado según el algoritmo descrito en la sección 1.1.2.1.
- El número de factores óptimo que debe ser calculado es de 5 tanto para el APAP como para el NAP.
- En cada matriz de calibración, se deberá realizar la detección de muestras desechables (utilizando la validación cruzada). Si alguna de las soluciones estándar fue mal preparada, esta solución tendrá que volver a ser preparada.

CAPÍTULO 3: VALIDACIÓN DEL MÉTODO

3.1 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

En este capítulo se mostrarán los resultados obtenidos durante la validación del método, para ello es necesario conocer los criterios establecidos para que el método analítico sea confiable. En la siguiente tabla se muestran dichos criterios:

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

CARACTERÍSTICA A EVALUAR	FACTOR DE EVALUACIÓN	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Linealidad del Sistema	Coeficiente de Variación (CV) Coeficiente de Correlación (r) Coeficiente de determinación (r ²) Intercepto (b)	≤ 2% ≥ 0.999 ≥ 0.98 = 0
Precisión del Sistema Exactitud del Sistema	Coeficiente de Variación (CV) Prueba t de Student	≤ 2% $t_{cal} < t_{crítica} (\alpha= 0.05, gl)$
Linealidad del Método	Coeficiente de Variación (CV) Coeficiente de Correlación (r) Coeficiente de determinación (r ²) Intercepto (b) Pendiente (m)	≤ 2% ≥ 0.999 ≥ 0.98 = 0 = 1
Precisión del Método	Coeficiente de Variación (CV)	≤ 2%
Exactitud del Método	Prueba t de Student Porcentaje de recobro	$t_{cal} < t_{crítica} (\alpha= 0.05, gl)$ 98-102%
1.Repetibilidad 2.Reproducibilidad	Coeficiente de Variación (CV) Modelo Anidado-Cruzado	1.Global = ± 3% 2.Global = ± 3% 1. $f_{cal} < f_{crítica} (\alpha= 0.05, gl)$ 2. $f_{cal} < f_{crítica} (\alpha= 0.05, gl)$
Límite de Cuantificación Límite de Detección	Prueba t de Student Coeficiente de Variación (CV) Método Gráfico	$t_{cal} < t_{crítica} (\alpha= 0.05, 5gl)$ ≤ 2% *
Sensitividad	Diferencia Mínima Significativa (DMS)	*
Estabilidad de la Muestra Procesada	Prueba t de Student	$t_{cal} < t_{crítica} (\alpha= 0.05, 5gl)$

A continuación se presentan las tablas, gráficos, análisis estadísticos e interpretación de estos análisis para cada una de las pruebas realizadas para la validación del método.

3.2 VALIDACIÓN DEL SISTEMA.

La linealidad del sistema se evaluó por medio de la estimación de la concentración de 10 diferentes soluciones de mezclas de APAP y de NAP, las cuales fueron preparadas por duplicado y a partir de una solución patrón de ambos analitos.

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones empleadas para la preparación de la calibración así como las absorbancias obtenidas por el espectrofotómetro Varian Cary 1E, el cual permite obtener absorbancias hasta un valor de 3.

Tabla 3.2: Concentraciones de la calibración y las absorbancias obtenidas en cada una de las longitudes de onda.

Concentraciones (mcg/ml)		LONGITUDES DE ONDA (nm)												
APAP	NAP	278.33	276.67	272	265	263	262	260	258	255	252	250	246	240
19.88	14	0.4604	0.5021	0.6265	0.8022	0.894	0.9335	1.0203	1.1017	1.2105	1.3597	1.4191	1.5733	2.2676
19.88	14	0.4619	0.4988	0.6279	0.7891	0.8914	0.9347	1.0246	1.0854	1.2083	1.3525	1.4105	1.5587	2.2455
22.72	14	0.4982	0.5327	0.6635	0.858	0.9628	1.0224	1.1152	1.1919	1.3401	1.5003	1.5687	1.7213	2.1527
22.72	14	0.4931	0.5318	0.6603	0.8525	0.9608	1.0192	1.1046	1.1923	1.3344	1.4961	1.5658	1.7305	2.4141
22.72	16.8	0.5399	0.5847	0.7227	0.9196	1.0293	1.0871	1.1787	1.2548	1.3927	1.5545	1.6296	1.805	2.2618
22.72	16.8	0.5328	0.5772	0.7275	0.9193	1.0306	1.0784	1.1748	1.2497	1.3926	1.528	1.6076	1.7988	2.4751
25.56	16.8	0.5703	0.6142	0.7681	0.9883	1.1081	1.164	1.2736	1.3568	1.5211	1.6814	1.7235	1.8477	2.3119
25.56	16.8	0.5665	0.6169	0.7781	0.9787	1.1028	1.1583	1.273	1.364	1.5096	1.6914	1.7617	1.9567	2.5634
25.56	19.6	0.6084	0.66	0.8313	1.0496	1.1748	1.2317	1.3252	1.4036	1.5705	1.7358	1.8138	2.0043	2.6298
25.56	19.6	0.6099	0.6558	0.8258	1.0518	1.1626	1.2175	1.3267	1.4085	1.5614	1.7158	1.7987	1.9934	2.6234
28.4	19.6	0.6396	0.6994	0.8721	1.1095	1.2343	1.3039	1.4284	1.5269	1.698	1.873	1.9551	2.176	2.4947
28.4	19.6	0.6372	0.6941	0.8658	1.1091	1.2405	1.3044	1.4254	1.5036	1.6885	1.865	1.9518	2.1598	2.6215
28.4	22.4	0.6866	0.7396	0.9403	1.1714	1.3169	1.3672	1.485	1.5757	1.7488	1.9449	2.0263	2.2017	2.4876
28.4	22.4	0.688	0.7462	0.944	1.1799	1.3118	1.3765	1.4936	1.5935	1.7577	1.9211	2.023	2.1841	2.5959
31.24	22.4	0.7202	0.7823	0.9794	1.2383	1.3891	1.4576	1.5783	1.6813	1.8577	1.9384	2.0078	2.1115	2.3194
31.24	22.4	0.7185	0.774	0.978	1.2345	1.3904	1.4601	1.5673	1.6765	1.8752	2.0416	2.145	2.3509	2.8137
31.24	25.2	0.7628	0.8292	1.0407	1.2957	1.4444	1.5108	1.6502	1.7451	1.9141	2.0986	2.2253	2.3512	2.7032
31.24	25.2	0.7624	0.8265	1.0372	1.2958	1.4434	1.5072	1.6343	1.7413	1.8957	2.1127	2.2006	2.36	2.7942
31.24	28	0.8024	0.8688	1.0938	1.3484	1.5064	1.5738	1.6952	1.7818	1.9345	2.1454	2.2184	2.413	2.8581
31.24	28	0.8002	0.8663	1.1008	1.35	1.5059	1.5728	1.706	1.8002	1.9482	2.0457	2.1209	2.3203	2.5123

3.2.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Tabla 3.3: Concentración real y respuesta analítica obtenidas con el método de MCP.

Solución	Concentración Real		Respuesta analítica		Normalización	
	APAP (mcg/ml)	NAP (mcg/ml)	APAP (mcg/ml)	NAP (mcg/ml)	APAP	NAP
1	19.88	14	19.89	14.09	1.00	1.00
1	19.88	14	19.79	14.07	0.99	1.00
2	22.72	14	22.50	14.12	0.99	1.00
2	22.72	14	22.62	13.91	0.99	0.99
3	22.72	16.8	22.76	16.79	1.00	0.99
3	22.72	16.8	22.85	16.66	1.00	0.99
4	25.56	16.8	25.78	16.54	1.00	0.98
4	25.56	16.8	25.38	17.10	0.99	1.01
5	25.56	19.6	25.71	19.52	1.00	0.99
5	25.56	19.6	25.60	19.47	1.00	0.99
6	28.4	19.6	28.43	19.57	1.00	0.99
6	28.4	19.6	28.25	19.64	0.99	1.00
7	28.4	22.4	28.47	22.32	1.00	0.99
7	28.4	22.4	28.80	22.24	1.01	0.99
8	31.24	22.4	31.08	22.56	0.99	1.00
8	31.24	22.4	31.31	22.40	1.00	1.00
9	31.24	25.2	31.27	25.11	1.00	0.99
9	31.24	25.2	31.02	25.35	0.99	1.00
10	31.24	28	31.02	28.11	0.99	1.00
10	31.24	28	31.30	27.92	1.00	0.99

En la tabla 3.3 se muestran las respuestas analíticas obtenidas por el método de MCP, así como las correspondientes concentraciones utilizadas de APAP y de NAP. En las figuras 3.1 y 3.2 se muestran los gráficos de la concentración real contra la respuesta analítica obtenida para cada analito aplicando el método de MCP. El análisis de variancia para determinar si existe o no una relación lineal entre la concentración real y la respuesta analítica obtenida para los dos analitos se muestran en las tablas 3.4 y 3.5.

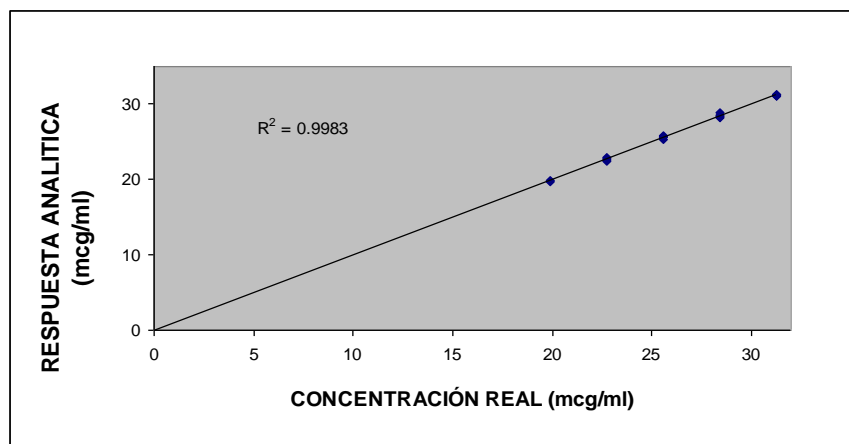


Figura 3.1: Gráfico de la Concentración Real de APAP contra su Respuesta Analítica obtenida aplicando el método de MCP.

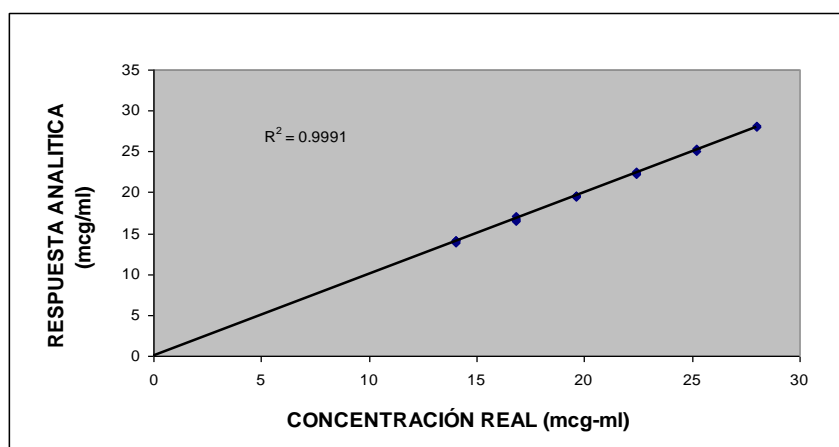


Figura 3.2: Gráfico de la Concentración Real de NAP contra su Respuesta Analítica obtenida aplicando el método de MCP.

Tabla 3.4: Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entra la Concentración real de APAP y su Respuesta Analítica aplicando el método de MCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ($\alpha=0.05$)
Tratamientos	9	2.54	0.28	0.34	3.02
Residuos	10	8.19	0.81		
Total	19	10.73			

Tabla 3.5: Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entre la Concentración real de NAP y su Respuesta Analítica aplicando el método de MCP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ($\alpha=0.05$)
Regresión	9	3.45	0.38	1.10	3.02
Residuos	10	3.46	0.34		
Total	19	6.92			

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

A continuación, en la tabla 3.6 se muestran los valores de las características empleadas para evaluar la Linealidad del Sistema obtenidas por el análisis de regresión para cada analito.

Tabla 3.6: Características requeridas para evaluar la Linealidad del Sistema.

Características a Evaluar	APAP	NAP
Intercepto (b)	0.04	0.01
Pendiente (m)	0.99	0.99
Coefficiente de Correlación (r)	0.99	0.99
Coefficiente de Determinación (r^2)	0.99	0.99
CV (%)	0.60	0.75

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

Tabla 3.7: Intervalos de confianza y valor de t calculados para determinar si el valor del intercepto es igual o no a cero en las 2 rectas de regresión.

Curva de Regresión	Valor del Intercepto (b)	LIC (95%)	LSC (95%)	t calculada	Valor de t crítica
APAP	0.04	-0.41	0.50	0.2089	1.7341
NAP	0.01	-0.34	0.38	0.1026	1.7341

Por otra parte, con los resultados obtenidos en la tabla 3.7 de los intervalos de confianza estimados así como el valor de t calculada, la cual es menor a su correspondiente t crítica, se determina que el valor del intercepto en cada una de las 2 rectas de regresión estadísticamente es cero, por lo cual se establece que el sistema es lineal para cada analito de interés.

3.2.2 PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL SISTEMA

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

En la tabla 3.8, se muestran los porcentajes determinados por el método en cada una de las tres soluciones empleadas así como las concentraciones utilizadas de APAP y de NAP. En las tablas 3.9 y 3.10 se muestran los valores obtenidos del CV en cada analito para determinar la precisión del Sistema y en las tablas 3.11 y 3.12 se muestran los valores obtenidos de t calculada para determinar si el sistema es exacto.

Tabla 3.8: Porcentajes determinados a partir de la concentraciones obtenidos por el método de MCP.

Concentración Real (mcg/ml)		Porcentaje Determinado (%)	
APAP (mcg/ml)	NAP (mcg/ml)	APAP (%)	NAP (%)
19.6	14	102.48	101.77
		100.68	100.74
		101.15	100.65
		100.07	100.95
		101.90	100.43
		99.84	99.23
25.2	16.8	100.81	101.09
		101.75	101.88
		101.57	100.53
		100.36	101.13
		100.95	99.40
		100.52	100.32
30.8	25.2	100.62	100.97
		100.46	101.49
		99.80	100.02
		100.16	99.45
		99.57	100.46
		99.45	99.71

Tabla 3.9: Características determinadas para evaluar la Precisión del Sistema para el APAP.

Concentración Real APAP	Promedio	Desv. Est	CV (%)
19.6	101.02	1.03	1.02
25.2	100.99	0.56	0.55
30.8	100.01	0.47	0.47

Tabla 3.10: Características determinadas para evaluar la Precisión del Sistema para el NAP.

Concentración Real NAP	Promedio	Desv. Est	CV (%)
14	100.63	0.82	0.81
16.8	100.72	0.84	0.84
25.2	100.35	0.77	0.77

En las tablas 3.9 y 3.10, se observa que los valores calculados de CV para ambos analitos en las tres diferentes concentraciones utilizadas, son menores al 2% por lo cual se establece que el sistema es preciso.

Tabla 3.11: Resultados para evaluar la exactitud del sistema para el APAP.

Concentración Real APAP	t calculada	t crítica ($\alpha=0.05$)
19.6	0.06	2.23
25.2	0.25	2.23
30.8	-2.17	2.23

Tabla 3.12: Resultados para evaluar la exactitud del sistema para el NAP.

Concentración Real NAP	t calculada	t crítica ($\alpha=0.05$)
14	-0.20	2.23
16.8	0.79	2.23
25.2	0.59	2.23

Por otra parte, con los resultados obtenidos en las tablas 3.11 y 3.12, se puede observar que todos los valores de la t calculada son menores que el valor de la t crítica correspondiente por lo cual se establece que el sistema es exacto, en las tres diferentes concentraciones utilizadas para APAP y para NAP.

3.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para llevar acabo la validación del método es necesaria la fabricación de placebos cargados a diferentes proporciones de principios activos-excipientes, las cuales comprenden los porcentajes establecidos en las monografías de uniformidad de contenido químico y pueden ser determinadas a lo largo de las concentraciones de la calibración establecida.

A continuación se muestra de manera general, el procedimiento realizado para obtener los placebos cargados. En este caso se ejemplifica la forma de preparar placebos cargados al 100%, es decir, placebos con 300 y 275 mg de APAP y NAP respectivamente, sin embargo, es necesario mencionar que para la realización de las demás proporciones se calcula la cantidad de miligramos de APAP, NAP y excipientes requeridos.

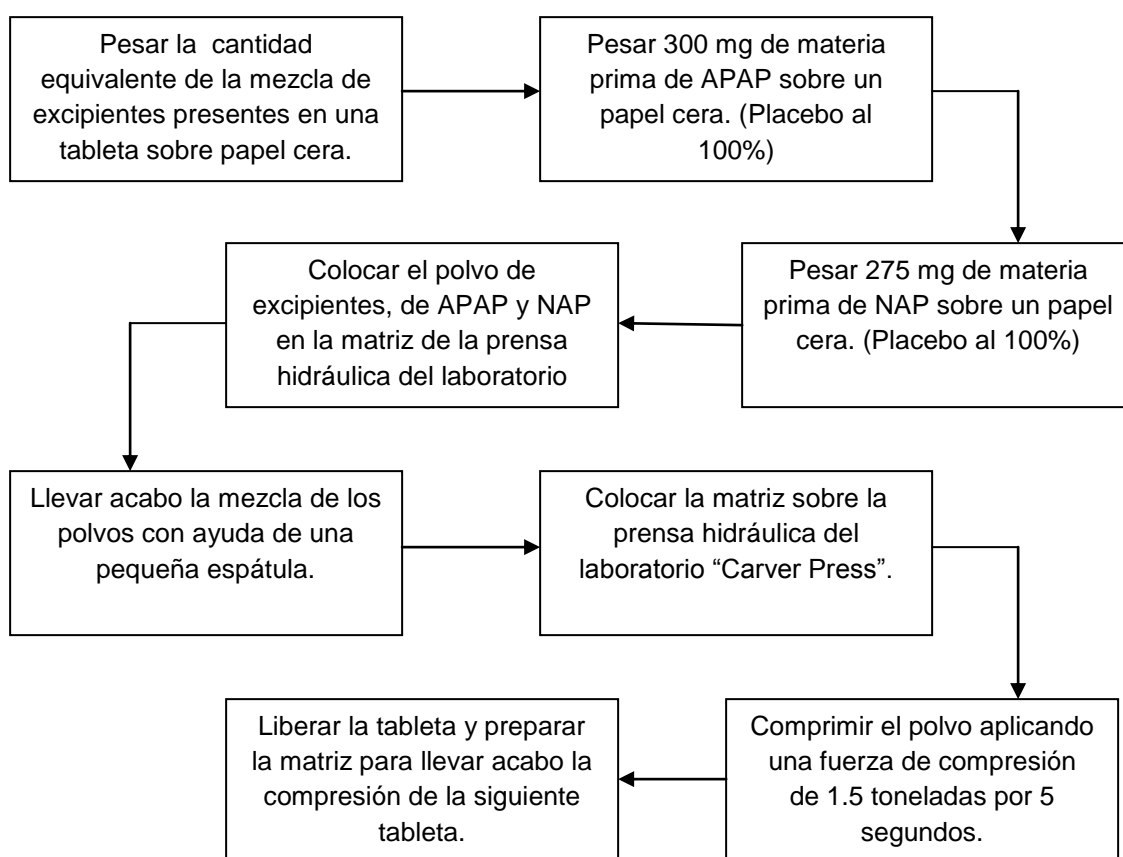


Figura 3.3: Procedimiento para la preparación de placebos cargados.

3.3.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad del método se evaluó mediante la estimación de los miligramos de placebos cargados preparados a 5 diferentes niveles de proporción principios activos-excipientes. Cada nivel de proporción fue preparado por triplicado.

En la tabla 3.13 se muestran los miligramos recuperados por el método de MCP, así como los correspondientes miligramos adicionados de APAP y de NAP. En las figuras 3.4 y 3.5 se muestran los gráficos de los miligramos adicionados contra los miligramos recuperados para cada analito.

Tabla 3.13: Miligramos por tableta obtenidos aplicando el método de MCP.

Ensayo	mg /Tableta Adicionado		mg /Tableta Recuperado		Normalización	
	APAP (mg)	NAP (mg)	APAP (mg)	NAP (mg)	APAP (mg)	NAP (mg)
1	162.00	419.00	161.38	419.16	0.99	1.00
2	162.50	420.00	161.71	416.97	0.99	0.99
3	162.20	419.60	161.83	418.99	0.99	0.99
4	438.00	137.30	436.49	136.73	0.99	0.99
5	438.50	137.60	436.56	136.78	0.99	0.99
6	438.40	137.50	436.61	136.72	0.99	0.99
7	236.10	343.60	236.04	342.89	0.99	0.99
8	235.80	343.50	236.20	344.19	1.00	1.00
9	236.00	343.70	236.12	343.26	1.00	0.99
10	366.00	213.00	365.50	213.81	0.99	1.00
11	366.60	212.80	365.30	211.48	0.99	0.99
12	365.00	213.20	365.03	213.63	1.00	1.00
13	300.60	206.80	301.02	206.71	1.00	0.99
14	302.00	207.00	300.79	207.01	0.99	1.00
15	302.00	205.00	300.89	205.04	0.99	1.00

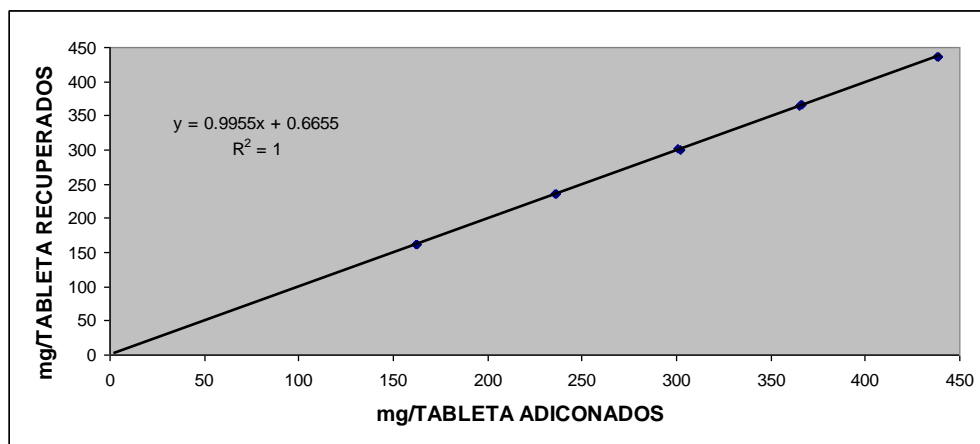


Figura 3.4: Gráfico de los Miligramos Adicionados por tableta de APAP y los Miligramos Recuperados por tableta aplicando el método de MCP.

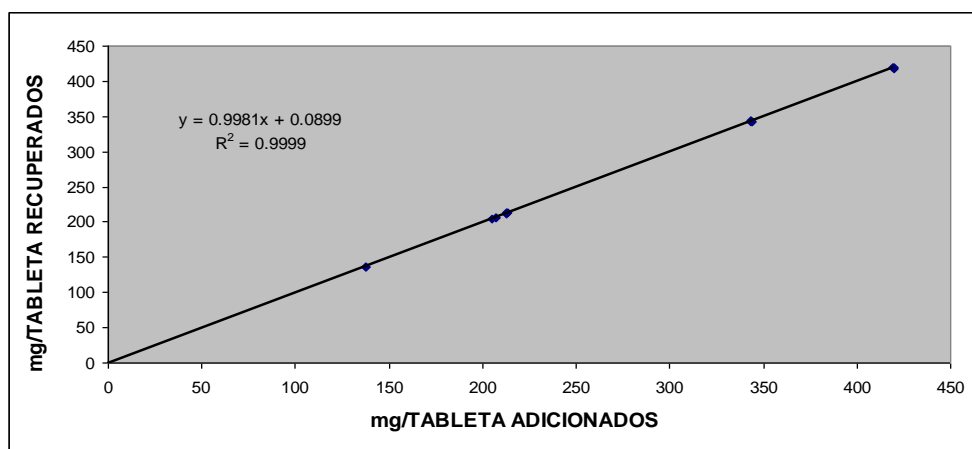


Figura 3.5: Gráfico de los Miligramos Adicionados por tableta de NAP y los Miligramos Recuperados por tableta aplicando el método de MCP.

El análisis de variancia efectuado para determinar si existe o no una relación lineal entre la concentración real y la concentración estimada obtenida para ambos analitos se muestran en las tablas 3.14 y 3.15.

Tabla 3.14: Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entre los Miligramos Adicionados por tableta de APAP y los Miligramos Recuperados por tableta.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica
Tratamientos	4	0.41	0.10	3.37	3.48
Residuos	10	0.30	0.03		
Total	14	0.72			

Tabla 3.15: Análisis de variancia realizado para determinar la relación lineal entre los Miligramos Adicionados por tableta de NAP y los Miligramos Recuperados por tableta.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica
Tratamientos	4	0.61	0.15	1.55	3.48
Residuos	10	0.99	0.09		
Total	14	1.61			

De acuerdo a los gráficos 3.3 y 3.4 de los miligramos adicionados por tableta contra los miligramos recuperados por tableta y a los análisis de variancia mostrados en las tablas 3.14 y 3.15 en donde todas las f calculadas con menores a sus respectivas f críticas, se determinó que si existe una relación lineal entre los miligramos adicionados por tableta contra los miligramos recuperados por tableta, en ambos analitos.

A continuación, en la tabla 3.16 se muestran los valores de las características empleadas para evaluar la Linealidad del Método obtenidas por análisis de regresión por mínimos cuadrados para cada analito.

Tabla 3.16: Características empleadas para evaluar la Linealidad del Método.

Características a Evaluar	APAP	NAP
Intercepto (b)	0.65	0.08
Pendiente (m)	0.99	0.99
Coefficiente de Correlación (r)	0.99	0.99
Coefficiente de Determinación (r^2)	0.99	0.99
CV (%)	0.22	0.34

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

Tabla 3.17: Intervalos de Confianza y valor de t calculados para determinar si el valor del intercepto es igual o no a cero en las 2 rectas de regresión.

Curva de Regresión	Valor del Intercepto (b)	LIC (95%)	LSC (95%)	t calculada	Valor de t crítica
APAP	0.66	0.42	0.90	4.8664	1.7709
NAP	0.08	-0.20	0.38	0.5488	1.7709

Tabla 3.18: Intervalos de Confianza calculados para determinar si el valor de la pendiente incluye el valor de uno en las dos rectas de regresión.

Curva de Regresión	Valor de Pendiente (m)	LIC (95%)	LSC (95%)	t calculada	Valor de t crítica
APAP	0.9955	0.9924	0.9987	2.5346	1.7709
NAP	0.9981	0.9938	1.0024	-0.7881	1.7709

Por otra parte, con los resultados obtenidos en la tabla 3.17 de los intervalos de confianza estimados así como el valor de t calculada, la cual es menor a su correspondiente t crítica, se determina que el valor del intercepto en la recta de regresión es igual a cero sólo para NAP, no así para APAP, sin embargo el porcentaje de APAP recuperado en cada uno de los ensayos se encuentra entre 100.1728 y 99.5169 intervalo que incluye el 100%, así que la desviación que se observa en el intercepto se debe a la interpolación propia de los resultados obtenidos. Así mismo, como se puede observar en la tabla 3.18, los intervalos de confianza calculados para la pendiente incluyen la unidad en la recta de regresión para NAP, por lo cual se puede establecer que el método es lineal para este analito. Por otro lado los intervalos de confianza para APAP, no incluyen el 1, sin embargo se puede observar que el valor de la pendiente es muy cercano a 1, por lo que se puede determinar que es lineal también para APAP.

3.3.2 PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO

La precisión y exactitud del método se evaluó por medio de la determinación de los miligramos por tableta de tres diferentes proporciones de placebos cargados. Las muestras preparadas contenían el porcentaje inferior, medio y superior del intervalo lineal establecido en la linealidad del método y se hicieron seis ensayos de cada uno.

En la tabla 3.19, se muestran los porcentajes determinados por el método de MCP en los tres diferentes porcentajes empleados así como los miligramos utilizadas de APAP y de NAP. En las tablas 3.20 y 3.21 se muestran los valores obtenidos del CV de cada analito para determinar la precisión del método y en las tablas 3.22 y 3.23 se muestran los valores obtenidos de t calculada para determinar si el método es exacto.

Tabla 3.19: Porcentajes determinados obtenidos aplicando el método de MCP.

Miligramos/ Tableta Adicionados		Miligramos/ Tableta Recuperados		Porcentaje Recuperado (%)	
APAP	NAP	APAP	NAP	APAP	NAP
162.0	419.0	161.38	419.16	101.48	101.65
162.5	420.0	161.71	416.97	100.48	100.65
162.2	419.6	161.83	418.99	100.25	100.71
162.1	418.9	161.38	419.16	100.00	100.85
162.2	421.0	161.71	416.97	100.90	100.36
162.3	420.1	161.64	418.37	99.32	99.33
298.2	278.1	297.41	278.32	100.79	101.08
300.9	279.4	299.55	279.19	101.53	101.78
300.7	275.1	303.10	274.93	100.23	100.63
300.6	275.0	299.63	275.78	100.16	101.23
300.9	275.3	302.43	274.58	100.32	99.50
297.5	277.0	296.13	278.29	100.42	100.33
438.0	137.3	436.49	136.73	100.52	100.82
438.5	137.6	436.56	136.78	100.36	101.65
438.4	137.5	436.61	136.72	99.66	100.00
438.5	137.2	436.49	136.73	100.26	99.55
438.0	137.4	436.57	136.78	99.37	100.52
438.6	137.5	436.55	136.74	99.35	99.72

Tabla 3.20: Características determinadas para evaluar la Precisión del Método para el APAP.

% de APAP en Placebos	Promedio	Desv. Est	CV (%)
54	100.41	0.74	0.74
100	100.58	0.51	0.51
146	99.92	0.52	0.52

Tabla 3.21: Características determinadas para evaluar la Precisión del Método para el NAP.

% de NAP en Placebos	Promedio	Desv. Est	CV (%)
152	100.59	0.75	0.75
100	100.76	0.79	0.78
50	100.38	0.78	0.78

Tabla 3.22: Resultados obtenidos para evaluar la Exactitud del Método para el APAP.

% APAP en Placebos	t calculada	t crítica ($\alpha=0.05$)
54	-0.45	2.23
100	2.18	2.23
146	1.30	2.23

Tabla 3.23: Resultados obtenidos para evaluar la Exactitud del Método para el NAP.

% NAP en Placebos	t calculada	t crítica ($\alpha=0.05$)
152	-0.37	2.23
100	0.83	2.23
50	0.48	2.23

Como se observa en las tablas 3.20 y 3.21, los valores calculados del CV para ambos analitos en los tres diferentes porcentajes de placebos cargados empleados, son menores al 2% por lo cual se puede establecer que el método es preciso.

Por otra parte, se observa en las tablas 3.22 y 3.23 que los valores de t calculada en los tres diferentes porcentajes de placebos empleados son menores que el valor de la t crítica, por lo cual se establece que este método es capaz de cuantificar ambos analitos con aceptable precisión y exactitud.

Como lo muestra la tabla 3.1, los valores del porcentaje determinado deben encontrarse entre los valores del 98 a 102%, por lo cual se comprueba por medio de la tabla 3.24 que el método es exacto, además que los valores del LSC y LIC incluyen el valor del 100% y el CV es menor de 2%.

Tabla 3.24: CV e intervalos de confianza globales calculados del porcentaje determinado (%) para cada analito de interés.

Analito de Interés	CV Global (%)	Porcentaje Determinado	
		LIC (%)	LSC (%)
APAP	0,59	99,99	100,62
NAP	0,77	99,90	100,95

3.3.3 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad se evaluó por medio de la determinación de la concentración de 6 placebos cargados al 100%. Las muestras fueron preparadas por dos diferentes analistas, en dos diferentes días y bajo las condiciones de análisis establecidas. En la tabla 3.25 se muestran los miligramos aproximados utilizados de APAP y de NAP.

Tabla 3.25: Miligramos aproximados adicionados de APAP y NAP utilizados para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del método.

Analito de interés	mg/Tableta Adicionados
APAP	300
NAP	275

Por otra parte, en las tablas 3.26 y 3.27 se muestran los porcentajes determinados por el método, y el análisis de variancia Anidado efectuado para determinar la repetibilidad y reproducibilidad en ambos analitos se muestran en las tablas 3.28 y 3.29.

Tabla: 3.26: Porcentajes determinados para el APAP.

Analito APAP		mg/ Tableta Adicionados	mg/Tableta Recuperados	Porcentaje Determinado
Analista 1	Día 1	298.2	297.41	99.73
		300.9	299.55	99.56
		300.7	303.10	100.81
		300.6	299.63	99.69
		300.9	302.43	100.52
		297.5	296.13	99.55
	Día 2	304.2	303.49	99.76
		309.6	307.86	99.44
		305.0	303.36	99.46
		311.5	312.57	100.34
Analista 2	Día 1	312.7	313.82	100.36
		310.0	305.18	98.44
		301.2	299.80	99.53
		301.1	299.82	99.57
		302.4	302.72	100.10
		297.5	295.77	99.42
	Día 2	302.3	301.99	99.90
		297.5	297.02	99.83
		299.3	298.92	99.87
		300.5	297.69	99.06
Día 2	302.5	303.08	100.19	
	299.4	296.14	98.91	
	300.8	302.36	100.52	
	300.0	298.64	99.54	

Tabla 3.27: Porcentajes determinados para el NAP.

Analito NAP		mg/ Tableta Adicionados	mg/Tableta Recuperados	Porcentaje Determinado
Analista 1	Día 1	278.1	278.32	99.73
		279.4	279.19	99.56
		275.1	274.93	100.81
		275.0	275.78	99.69
		275.3	274.58	100.52
		277.0	278.29	99.55
	Día 2	278.3	278.49	99.76
		283.3	283.99	99.44
		279.1	279.54	99.46
		285.1	285.25	100.34
		286.1	287.06	100.36
		283.7	285.10	98.44
Analista 2	Día 1	275.0	276.75	99.53
		275.6	274.37	99.57
		276.7	275.98	100.10
		276.3	275.46	99.42
		276.6	275.81	99.90
		275.6	274.42	99.83
	Día 2	279.5	281.98	99.87
		275.5	277.10	99.06
		276.4	276.21	100.19
		275.0	276.94	98.91
		277.6	274.79	100.52
		276.0	276.90	99.54

Tabla 3.28: Análisis de variancia realizado para el APAP.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ($\alpha=0.05$)
Analista	1	0.06	0.06	0.34	18.51
Día	2	0.35	0.17	0.56	3.49
Error	20	6.34	0.31		
Total	23				

Tabla 3.29: Análisis de variancia realizado para el NAP.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ($\alpha=0.05$)
Analista	1	0.08	0.08	0.27	18.51
Día	2	0.60	0.30	1.60	3.49
Error	20	3.75	0.18		
Total	23				

Como se puede observar en las tablas 3.28 y 3.29, los valores obtenidos de la f calculada son menores a su correspondiente valor de la f crítica en todas las fuentes de variación, por lo cual se establece que el método es repetible entre días y reproducible entre analistas para el APAP y el NAP aplicando en método de MCP.

Tabla 3.30: Coeficiente de Variación obtenidos para evaluar la repetibilidad entre días y la reproducibilidad entre analistas.

Factor de Evaluación	APAP			NAP		
	LIC (%)	LSC (%)	CV (%)	LIC (%)	LSC (%)	CV (%)
Analista 1	99,40	100,20	0,63	99,96	100,29	0,22
Analista 2	99,41	100,00	0,46	99,65	100,40	0,58
Día 1	99,58	100,12	0,42	99,71	100,16	0,35
Día 2	99,25	100,06	0,64	99,92	100,53	0,48
Global	99,41	100,10	0,54	99,81	100,34	0,41

Como se puede observar en la tabla 3.30, todos los valores del CV para cada analista, cada día y global, son menores al 3% siendo incluso menores al 1.5%, además de que los intervalos de confianza calculados de los porcentajes determinados incluyen el 100%. Por lo anterior se puede establecer que el método es reproducible entre analistas y repetible entre días.

3.3.4 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA

La estabilidad de la muestra procesada se evaluó mediante la comparación en la estimación de la concentración de 6 muestras placebo cargados al 100% a las 0 horas contra la estimación de la concentración de las mismas muestras después de

ser almacenadas en refrigeración a 4°C y a temperatura ambiente expuestas a la luz por un periodo de 24 y 48 horas.

En la tabla 3.31 se muestran los porcentajes determinados por el método en las muestras empleadas así como las condiciones de almacenamiento utilizadas.

Por otra parte, con el fin de determinar si las concentraciones estimadas inicialmente (0 horas) son o no significativamente diferentes con respecto a las concentraciones estimadas después de los tiempos en los que fueron almacenadas las muestras, se realizó la prueba de la DMS. Así, en las tablas 3.32 y 3.33, se muestran las diferencias de los promedios y su correspondiente valor de DMS.

Tabla 3.31: Resultados obtenidos para determinar la estabilidad de las muestras procesadas aplicando el método de MCP.

Condiciones de Almacenamiento	0 HORAS		24 HORAS		48 HORAS	
	Porcentaje Determinado (%)		Porcentaje Determinado (%)		Porcentaje Determinado (%)	
	APAP	NAP	APAP	NAP	APAP	NAP
Temperatura ambiente	99.11	100.88	93.71	94.14	94.26	71.39
	99.06	101.03	91.96	93.60	85.74	74.83
	100.19	99.48	83.52	91.57	74.30	77.39
	98.11	101.61	84.90	93.75	85.01	70.06
	100.52	98.53	93.81	96.87	91.43	75.58
	98.65	101.32	95.55	96.30	94.47	73.60
Refrigeración			99.08	100.51	97.04	93.12
			99.00	100.06	89.79	93.97
			100.16	99.06	89.20	94.08
			98.05	100.66	90.54	94.37
			100.50	98.31	96.38	94.07
		98.62	100.88	97.11	94.68	

Tabla 3.32: Diferencias de los promedios para el APAP.

APAP Temperatura Ambiente	0 Horas	24 Horas	48 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.00	-8.69	-11.73	3.83
24 Horas	8.69	0.00	-3.03	
48 Horas	11.73	3.03	0.00	
APAP Refrigeración	0 Horas	24 Horas	48 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.00	-0.03	-5.93	1.69
24 Horas	0.03	0.00	-5.89	
48 Horas	5.93	5.89	0.00	

Tabla 3.33: Diferencias de los promedios para el NAP.

NAP Temperatura Ambiente	0 Horas	24 Horas	48 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.00	-6.10	-26.66	1.47
24 Horas	6.10	0.00	-20.56	
48 Horas	26.66	20.56	0.00	
NAP Refrigeración	0 Horas	24 Horas	48 Horas	Valor de DMS
0 Horas	0.00	-0.56	-6.42	0.69
24 Horas	0.56	0.00	-5.86	
48 Horas	6.42	5.86	0.00	

Como se observa en las tablas 3.32 y 3.33 las diferencias entre los promedios obtenidos al tiempo de almacenamiento de 0 horas con respecto a los tiempos de 24 horas en refrigeración son menores a sus correspondientes valores de DMS por lo cual se establece que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos bajo estas condiciones de almacenamiento para el caso del APAP y NAP.

Por otro lado, ya que los promedios obtenidos al tiempo de almacenamiento de 0 horas con respecto a los tiempos de 24 horas a temperatura ambiente y los tiempos de 48 horas a temperatura ambiente y refrigeración son mayores a sus correspondientes valores de DMS se establece que si existe diferencia significativa entre estos resultados.

3.3.5 TOLERANCIA

La tolerancia se evaluó realizando la estimación de la concentración de seis ensayos de muestras placebos cargados al 100% a las absorbancias establecidas en el método y a las absorbancias 0.5 por arriba y 0.5 por debajo de cada una de ellas. En la tabla 3.34 se muestran los miligramos adicionados y los miligramos estimados, así como los porcentajes recuperados por el método en cada una de las condiciones establecidas. En la tabla 3.35 y 3.36 se muestra el análisis de Variancia realizado.

Tabla 3.34: Miligramos adicionados y los miligramos estimados, así como los porcentajes recuperados por el método en cada una de las condiciones establecidas.

Condiciones de Lectura	mg/ Adicionados		mg/Recuperados		Porcentaje Recuperado (%)	
	APAP	NAP	APAP	NAP	APAP	NAP
Establecidas	308	270	307.34	269.16	99.78	99.68
	298.5	280	297.56	280.23	99.68	100.08
	308	270.1	307.45	269.71	99.82	99.85
	306.9	270.2	307.30	268.99	100.13	99.55
	298.5	280.1	297.57	280.29	99.68	100.06
	298.6	280	297.55	280.18	99.64	100.06
0.5 Por arriba	308	270	306.48	271.48	99.50	100.55
	298.5	280	297.75	280.46	99.74	100.16
	308	270.1	307.01	269.92	99.68	99.93
	306.9	270.2	307.15	268.85	100.08	99.50
	298.5	280.1	297.59	280.67	99.69	100.20
	298.6	280	297.52	280.72	99.64	100.25
0.5 Por debajo	308	270	307.35	269.36	99.79	99.76
	298.5	280	297.24	280.58	99.57	100.20
	308	270.1	307.49	269.87	99.83	99.91
	306.9	270.2	307.31	269.58	100.13	99.77
	298.5	280.1	297.43	280.46	99.64	100.13
	298.6	280	297.34	280.54	99.57	100.19

Tabla 3.35: Análisis de Variancia efectuado para APAP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ($\alpha=0.05$)
Tratamientos	5	0.01	0.0028	0.05	3.11
Residuos	12	0.57	0.0476		
Total	17	0.58			

Tabla 3.36: Análisis de Variancia efectuado para NAP.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	f calculada	f crítica ($\alpha=0.05$)
Tratamientos	5	0.14	0.02	0.30	3.11
Residuos	12	1.09	0.09		
Total	17	1.23			

De acuerdo a las tablas 3.35 y 3.36 en donde se muestra el análisis de variancia se observa que todas las f calculadas son menores a sus respectivas f críticas, por lo cual se determinó que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos al estimar las concentraciones a las longitudes de onda establecidas en el método y a 0.5 por arriba y 0.5 por debajo de cada una de ellas, en ambos analitos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se estableció un método espectrofotométrico U.V aplicando técnicas de análisis de mínimos cuadrados parciales determinando la uniformidad de contenido químico de Acetaminofén y Naproxeno presentes en tabletas.

Se determinaron las condiciones espectrofotométricas adecuadas, como el medio de disolución de la muestra y calibración, la cantidad de soluciones para la calibración, las longitudes de onda y el número de factores óptimo que permitieran la cuantificación simultánea de Acetaminofén y Naproxeno.

Se llevó acabo la validación del método el cual resultó ser lineal, exacto, preciso, repetible, reproducible y tolerante.

REFERENCIAS

1. **USP 24.** pp 13, 1148, 1149, 2149-2152, 2231, 2232.
2. LINDBERG, N. O. (1995), 21 (9). **Application of Multivariate Analysis in Pharmaceutical Development Work.** Drug Development and Industrial Pharmacy. pp 987-1007.
3. LÓPEZ, de Alba P., López M., Amador H. J. (1996), 41 (1). **Métodos de Calibración Multivariante.** Sociedad Química de México A.C. pp 445-475.
4. KENNETH, Beebe; Pell Tandy and Seasholtz Mary Beth (1998). **Chemometrics: A practical Guide.** Wiley. New York. pp 81-101, 278.339.
5. GOMEZ, Mirón Margot. (1998). **Desarrollo de un Método Espectrofotométrico confiable para cuantificar la cantidad de Sulfametazina Sódica liberada en el proceso de disolución de bolos de liberación controlada.** Tesis de licenciatura. UNAM, Cuautitlán Izcalli. pp 14-20, 30, 31.
6. BRERETON, R. G. (2000). **Introduction to Multivariate Calibration in Analytical Chemistry.** Analyst, Vol 125. pp 2125-2154.
7. GABRIELSON, Jhon, Lindberg N. (2002), 16. **Multivariate Methods in Pharmaceutical Applications.** Journal of Chemometrics. pp 141-160.
8. GERALDI, P. and Kowalski B. (1986), 185. **Partial Least Squares regression: a Tutorial.** Analytica Chimica Acta. pp 1-17.
9. MARTENS, Harald and Tormod Naes. (1989). **Multivariate Calibration.** Wiley. New York. pp 1-34, 90-121.
10. HAALAND, M. D., E. V. Thomas. (1988), 60 (11). **Partial Least Squares Methods for Spectral Analysis. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction for quantitative information.** Analytical Chemistry. pp 1193-1202.
11. HAALAND, M. D., E. V. Thomas. (1988), 60 (11). **Partial Least Squares Methods for Spectral Analysis. Application to Simulated and Glass Spectral Data.** Analytical Chemistry. pp 1202-1208.
12. GARRIDO, A. Frenich; D. L. Jouan-Rimbaud, Massart, Kuttatharmakaul; Martinez Galera y J. L. Martinez Vidal (1995). **Wavelength Selection Method for Multicomponent Spectrophotometric Determinations Using Partial Least Squares.** Analyst, Vol 120, pp 2787-2792.

13. MOBERG, Ludvig and Karlberg B. (2001). **Validation of Multivariate Calibration Method for the Determination of chlorophyll a, b and c and their Corresponding Pheopigments.** Analytica Chimica Acta. pp 143-153.
14. ISLAS Hernández José Alejandro. (2004). Tesis **Desarrollo de un método espectrofotométrico U.V. para la obtención del perfil de disolución de una forma farmacéutica que contenga Trimetropim y Sulfametoxazol** FES-Cuautitlán, UNAM
15. RAMOS, Ramos Guillermo. (2001). **Quimiometría.** Ed. Síntesis. España. Pp 200-230.
16. GOODMAN & Gilman. (1996). **Las bases Farmacológicas de la Terapéutica.** 9ª edición. Ed. Interamericana. México. pp 677-679, 684-686.
17. The United States Pharmacopeia. The National Formulary (USP 29) Ed. United States Pharmacopeia Convention.
18. CASTILLO, Aguilar B., González Hernández R. (1997), 30 (1). **Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para la Cuantificación de Fármacos.** Rev. Cubana Farm.
19. **Requisitos mínimos para la validación de Métodos Analíticos.** Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México. (1993).
20. HARMONISED Tripartite Guideline (1995). **Guideline for Industry. Text on Validation of Analytical Procedures.** ICH-Q2A. pp A1-A3.
21. HARMONISED Tripartite Guideline.(1999). **Validation of Analytical procedures: Methodology.** ICH-Q2B. pp 1-10.
22. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1- 1998.
23. MILLER, J. C. y Miller J. N. (1993). **Estadística para Química Analítica.** 2ª ed. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana. Delaware.
24. BARRERA, Galicia Mauricio. (2003). **Aplicación de métodos de calibración multivariante en la cuantificación simultánea, por espectrofotometría U. V., de Acetaminofén (APAP) y Naproxeno (NAP) presentes en un medio de disolución.** Tesis de licenciatura QFB. UNAM, Cuautitlán Izcalli.