



---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA UV DE ASPIRINA Y CAFEÍNA  
CONTENIDAS EN TABLETAS, APLICANDO EL MÉTODO DE MÍNIMOS  
CUADRADOS PARCIALES.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

**MANUEL ALEJANDRO PINO COATE**

ASESOR: QFB. JOSÉ ANTONIO GARDUÑO ROSAS



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE



ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Cuantificación espectrofotométrica UV de Aspirina y Cafeína contenidas en tabletas, aplicando el método de Mínimos Cuadrados Parciales.

que presenta el pasante: Manuel Alejandro Pino Coate  
con número de cuenta: 9608512-7 para obtener el título de :  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Enero de 2008.

PRESIDENTE	<u>QFB. Elia Granados Enriquez</u>	
VOCAL	<u>Dra. Raquel López Arellano</u>	
SECRETARIO	<u>QFB. José Antonio Garduño Rosas</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Guadalupe Rebollar Barrera</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Salvador Zambrano Martínez</u>	

Manuel Alejandro Pino Coate



---

---

## Agradecimientos.

- ☺ A Dios por darme la vida, por permitirla vivir todos los días y por aprender a vivir con mis defectos y virtudes.
- ☺ A mis padres José Manuel Pino Moreno y María de la Paz Coate Chávez, por ser mi máxima inspiración. Gracias a su ejemplo se que uno todo lo puede lograr, y mostrarme que no hay barreras para alcanzar nuestros sueños. Agradezco el apoyo que han brindado hasta el día de hoy, simplemente son mi adoración los quiero mucho.
- ☺ A mi hermana Mima, por su amor, su apoyo que me han brindado y por su ejemplo en cumplir nuestras metas.
- ☺ A mi abuelita Juanita, hace mucho tiempo que no estas con nosotros. Gracias por tus bendiciones.
- ☺ A Raquel Pérez Paéz, por ser la persona a la cual amo, quiero, adoro, idolatro, admiro, en este planeta. Gracias por estar conmigo en mis logros y en mis tropiezos. Como todo lo que hago en mi vida, este trabajo es pensando en ti y para ti. **TE AMO** mi changuita hermosa.
- ☺ A mis amigos que siempre han estado conmigo. Changustín, Andrés, Caguich, Estibaliz, Daniel, Olga, Ulrich, Vladimir, Edgar.
- ☺ A Lety.
- ☺ A todos mis compañeros de la Generación 26 y 26  $\frac{1}{2}$ . Directa o indirectamente por su aporte en este trabajo.
- ☺ Gracias a I.M BRULUART. En especial al departamento de Control Químico, Sistemas Críticos, Sistema de Tratamiento de Agua.
- ☺ A mis sinodales: QFB Elia Granados, QFB Guadalupe Rebollar, QFB Salvador Zambrano, Dra Raquel López, y en especial a mi asesor el QFB José Antonio Garduño Rosas gracias por ser mi asesor, mi amigo y a su vez colega en el trabajo. Gracias a todos ustedes por sus aportaciones.
- ☺ A la UNAM y con todos los honores a la FES Cuautitlán C-1.



---

---

En la vida hay tres tipos de personas, las que saben contar y las que no.

*HOMERO SIMPSON*



---

---

## ÍNDICE

Abreviaturas.....	I
Introducción.....	II
Objetivos.....	V
 <b>Capítulo 1. GENERALIDADES</b>	
1.1-Quimiometría.....	2
1.2-Métodos univariantes y multivariantes.....	4
1.3-Análisis de multicomponentes.....	5
1.4-Análisis multivariado.....	5
1.5-Calibración multivariante.....	8
1.6-Diversos modelos de calibración multivariante.....	9
1.7-Ventajas de calibración multivariante.....	11
1.8-Interferencias.....	12
1.9-Tipos de errores.....	13
1.9.1-Error aleatorio y sistemático.....	13
1.9.2-Clasificación del error atendiendo su origen.....	13
1.10-Vectores y Matrices.....	14
1.11-Fundamento de modelos matemáticos de análisis de multicomponentes.....	18
1.12-Mínimos Cuadrados Parciales.....	19
1.13-Algoritmo del modelo de Mínimos Cuadrados Parciales.....	22



---

---

1.13.1-Etapa de calibración.....	24
1.13.2-Etapa de predicción.....	26
1.14-Validación del modelo de calibración.....	28
1.15-Validación cruzada.....	29
1.16-Selección del número óptimo de factores. Análisis de SCERP.....	31
1.17-Selección del número de estándares .....	32
1.18-Detección de muestra desechables .....	32
1.19-Selección de la región espectral .....	33
1.20-Características de ASA y CAF .....	35
1.20.1-Propiedades fisicoquímicas de ASA.....	35
1.20.2-Propiedades fisicoquímicas de CAF.....	36
1.20.3-Características farmacológicas de ASA y CAF.....	37
1.21-Espectrofotometría .....	37
1.22-Ley de Lambert Beer .....	39

## **Capítulo 2. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO**

2.1- Reactivos, material y programas utilizados en el desarrollo del método analítico.....	42
2.2-Selección de la región espectral.....	44
2.3-Determinación de aditividad, interacción de interferencia.....	45
2.4-Desarrollo de la calibración.....	47
2.4.1-Elección de las soluciones estándares .....	47
2.4.2-Evaluación de la Calibración.....	51

---

---



---

---

2.4.3-Precisión y exactitud de la calibración.....	56
2.5-Evaluación del método con Mezclas físicas.....	58
2.6-Evaluación de la linealidad del método con Placebos Cargados.....	61
2.7-Evaluación con muestras reales.....	69
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS</b>	
A.1 Preparación de 2 L de una solución amortiguadora de HCl a pH 2.....	73
A.2 Preparación de las soluciones stock de ASA y CAF.....	73
A.3 Procedimiento de ensayo para ASA y CAF en Tabletas de Cafiaspirina de Bayer.....	75
A.4 Procedimiento de ensayo para ASA y CAF en Placebos Cargados.....	76
A.5 Proporción de componentes en las diferentes formulaciones de Placebos Cargados.....	76
A.5.1 Preparación de las tabletas para su uso en Placebos Cargados...	78
A.5.2 Preparación de las tabletas para su uso en Placebos Cargados, nueva propuesta.....	79
A.6 Procedimiento para la preparación de una mezcla de excipientes para su uso en la preparación de tabletas y mezclas físicas de ASA y CAF.....	80
A.7 Procedimiento para la realización de mezclas físicas Aspirina y Cafeína al 100%.....	80
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>82</b>

---

---



---

---

## Abreviaturas

A	Absorbancia
$\xi$	Coefficiente de absortividadad
HCl	Acido Clorhídrico
ASA	Aspirina, Ácido acetil Salicílico
B	Ordenada al origen
CAF	Cafeína
R	Coefficiente de correlación
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
CV	Coefficiente de variación
C	Concentración
Conc	Concentración
CLAR	Cromatografía de Líquidos de alta resolución
MEKC	Cromatografía Electrocinética Micelar (Micellar Electrokinetic Chromatography).
HPTLC	Cromatografía en Placa de Alta Resolución (High Performance Thin Layer Chromatography)
EtOH	Etanol
Est	Estimada
EXCP	Excipiente
gl	Grados de libertad
g	Gramos
HPLC	High Performance Liquid Chromatography o CLAR Cromatografía de Líquidos de alta resolución
IR	Infrarrojo
Llb	Límite Inferior de Confianza para la ordenada al origen
LSb	Límite Superior de Confianza para la ordenada al origen
L	Litro
$\lambda$	Longitud de Onda
mcg	Microgramo
mg	Miligramo
mL	Millilitro
min	Minutos
MCC	Mínimos Cuadrados Clásicos
MCI	Mínimos Cuadrados Inversos
MCP	Mínimos Cuadrados Parciales
MCP 1	Mínimos Cuadrados Parciales para Regresión Múltiple
MCP 2	Mínimos Cuadrados Parciales para Regresión Multivariante
min	Minutos
nm	Nanómetros
B	Ordenada al origen
Outliers	Muestras desechables
PLS	Partial Least Squares (Mínimos Cuadrados Parciales)
%	Porcentaje
pp.	Precipitados
P.A	Principio Activo
CM	Medio de cuadrados
RCP	Regresión del Componente Principal
Rev	Revoluciones
TAB	Tableta
SC	Suma de cuadrados
SCERP	Suma de cuadrados del error residual de predicción
UV	Ultravioleta



---

---

## INTRODUCCIÓN

En la última década, los análisis de cuantificación simultánea de 2 o más activos fueron introducidos en el campo de la química analítica. La cuantificación simultánea de varios fármacos puede ser obtenida mediante el uso de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) o conocida en sus siglas en inglés HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Otras técnicas también puede realizarse con Cromatografía en Placa de Alta Resolución HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) y Cromatografía Electrocinética Micelar MEKC (Micellar Electrokinetic Chromatography). Sin embargo estos métodos, presentan desventajas tales como su alto costo, tiempos en preparación de reactivos y acondicionamiento de equipo.<sup>1</sup>

El análisis de muestras que contienen mezclas de compuestos químicos constituye uno de los retos más importantes de la química analítica. La dificultad aumenta cuando se pretende determinar simultáneamente varios analitos en bajas concentraciones o en presencia de otras sustancias que tengan estructuras y propiedades similares, las cuales pueden interferir en su determinación. El análisis cuantitativo de muestras requiere del uso de un conjunto de muestras de referencia, que tengan las mismas características de las muestras a analizar, y algún método instrumental que mida alguna propiedad característica de los analitos.

Como alternativa, cuando no se cuenta con equipo de separación, el desarrollo de métodos quimiométricos como Mínimos Cuadrados Parciales, nos permite tener una alternativa como método de cuantificación, extraer la información requerida sobre los componentes de interés de las muestras a partir del tratamiento de datos obtenidos por algoritmos y matrices.



---

---

El uso del modelo de Mínimos Cuadrados Parciales podría reemplazar un lento y costoso método cromatográfico por una rápida aproximación espectroscópica. La aplicación de este modelo ofrece como principal ventaja la rápida resolución de sistemas complejos sin la necesidad de separarlos previamente, esto a su vez implica una reducción de costos.

La importancia de este estudio radica en la escasez de bibliografía sobre el desarrollo de métodos alternativos que cuantifiquen varios activos a la vez sin ocupar HPLC. En este trabajo se muestra la utilidad del método de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP) junto con la espectrofotometría U.V, para la cuantificación de 2 activos Aspirina y Cafeína en tabletas. Además se muestran las condiciones necesarias para el desarrollo del método para una futura validación del mismo.

Este trabajo se divide en 2 partes. La primera es el Capítulo 1 Generalidades, trata sobre la Quimiometría, su utilidad y aplicación en las Ciencias Químicas. Hacemos referencia a la pieza central de esta tesis, “Mínimos Cuadrados Parciales” en la cual damos una breve explicación en que consiste y los pasos del algoritmo para la obtención de datos como es la etapa de calibración y predicción. A su vez se mencionan las propiedades generales de los principios activos en cuestión.

El Capítulo 2 trata la parte experimental, el desarrollo de la calibración, la realización de ensayos en mezclas físicas, placebos cargados y muestras reales con sus respectivos resultados los cuales incluyen tablas, gráficos y análisis estadísticos. Al final se encuentran las conclusiones y un anexo, en el cual están los procedimientos de la preparación de las soluciones, de la calibración, etc.





---

---

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad predictiva del método de mínimos cuadrados parciales para la cuantificación simultánea de Cafeína y Aspirina en mezclas físicas, placebos cargados y tabletas comerciales utilizando espectrofotometría ultravioleta.

## OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar las condiciones espectrofotométricas (Longitudes de onda, medio de disolución, concentraciones) y de operación que permitan la cuantificación de Aspirina y Cafeína. Para una futura validación del método.

Establecer un ensayo analítico que pueda ser utilizado en la cuantificación confiable de Aspirina y Cafeína para disminuir tiempos de análisis y costos en futuros análisis de muestras comerciales.



---

---

# **CAPÍTULO 1**

# **GENERALIDADES**



---

---

## 1.1 QUIMIOMETRÍA

La Quimiometría es una disciplina ampliamente utilizada en el área de la química, nacida aproximadamente al final de los años 70's y que, actualmente, está siendo ampliamente utilizada en diversos campos, especialmente la química analítica. También es una disciplina metrológica que aplica conocimientos matemáticos, especialmente estadísticos, a procesos químicos, para extraer de los datos experimentales la mayor cantidad posible de información y extender el conocimiento del sistema químico. Además, para que este conocimiento sea óptimo se deberá discriminar entre la información relevante y aquella otra de menos interés, siendo ésta otra faceta de la Quimiometría.<sup>2</sup>

En 1975 la Sociedad de Quimiometría, la definió como “La disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida a través de experimentos óptimos y proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos”.<sup>3</sup>

Massart la define “Como la disciplina química que utiliza la Matemática, la Estadística y la Lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar la máxima información química relevante a partir de análisis de datos químicos, y obtener conocimiento a partir de sistemas químicos”.<sup>3</sup>

Es importante recalcar el contexto en el que se hace uso de la Quimiometría como disciplina que trata la adquisición y aprovechamiento de la información en las aplicaciones analíticas.



---

---

Todo proceso de obtención de información esta constituido por tres etapas bien diferenciadas:

- 1.- Obtención de los datos químico-analítico.
- 2.- Presentación condensada de la información.
- 3.- Análisis estadístico de la información y conclusiones que de ella derivan.

La Quimiometría está presente en cada etapa, aunque de forma un tanto diferente. Antes de iniciar la obtención de datos se plantea el problema a resolver (Composición cualitativa y cuantitativa de la muestra, estudio de parámetros y variables analíticas, reducción del número de variables). A continuación se inicia el muestreo, siendo esta una parte del análisis químico cuyo tratamiento estadístico es de vital importancia. Sin embargo las muestras reales distan de tener una composición tan simple; normalmente son mezclas complejas de diversos componentes, constituidos por partículas de diversos tamaños.<sup>2</sup>

La segunda etapa del proceso implica la presentación condensada de la información: datos en forma de tablas, gráficos o resúmenes numéricos que permita comunicar la información obtenida de manera breve y concisa, pero a su vez de forma clara y coherente.

En la última etapa, el análisis de los datos analíticos tiene como meta extraer de ellos la mayor cantidad posible de información con el rigor exigible a todo planteamiento científico.



---

---

## 1.2 MÉTODOS UNIVARIANTES Y MULTIVARIANTES.<sup>2</sup>

En los métodos de regresión, las variables se clasifican en dependientes e independientes, los métodos se consideran **univariantes** si únicamente existe una variable dependiente, mientras que serán **multivariantes** cuando existe más de una variable dependiente.

En los métodos univariantes se define una única variable experimental a partir de una serie de características relativas a una única muestra. Antes del desarrollo de la Quimiometría, a lo máximo que se solía recurrir era a aplicar pruebas univariantes para extraer información de los datos mediante aplicaciones muy elementales, aunque la incidencia quimiométrica actual ha permitido nuevo enfoques en la extracción de información. Actualmente los sistemas univariantes siguen siendo fundamentales en muchas situaciones. Un ejemplo de ello la calidad del agua (Variable dependiente) en una instalación de agua purificada, esta se regula a través de la conductividad (Variable independiente), que es la que controla la concentración salina máxima permitida antes de cortar la acción de las resina de intercambio. En este caso el problema se describe por una información univariante simple (de una sola variable independiente). El siguiente paso en la estructura de los datos implica considerar dos variables (sistema bivariante). Aquí las variables pueden determinarse sobre una misma muestra o sobre muestras distintas y, aunque desde el punto de vista quimiométrico la aplicación sigue siendo muy simple, se pueden abordar situaciones de enorme trascendencia para los métodos analíticos. En otros casos se requiere el conocimiento de varias variables para definir el problema, los datos se ordenan en una tabla o *matriz de datos*, donde cada columna corresponde a una variable y cada fila a una muestra, un caso o un objeto.



---

---

### 1.3 ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES.<sup>4</sup>

Existen dos diferentes estrategias para aplicar métodos instrumentales en los análisis de multicomponentes y por lo tanto dos posibles enfoques para dichos análisis, los cuales son mostrados en la figura 1:

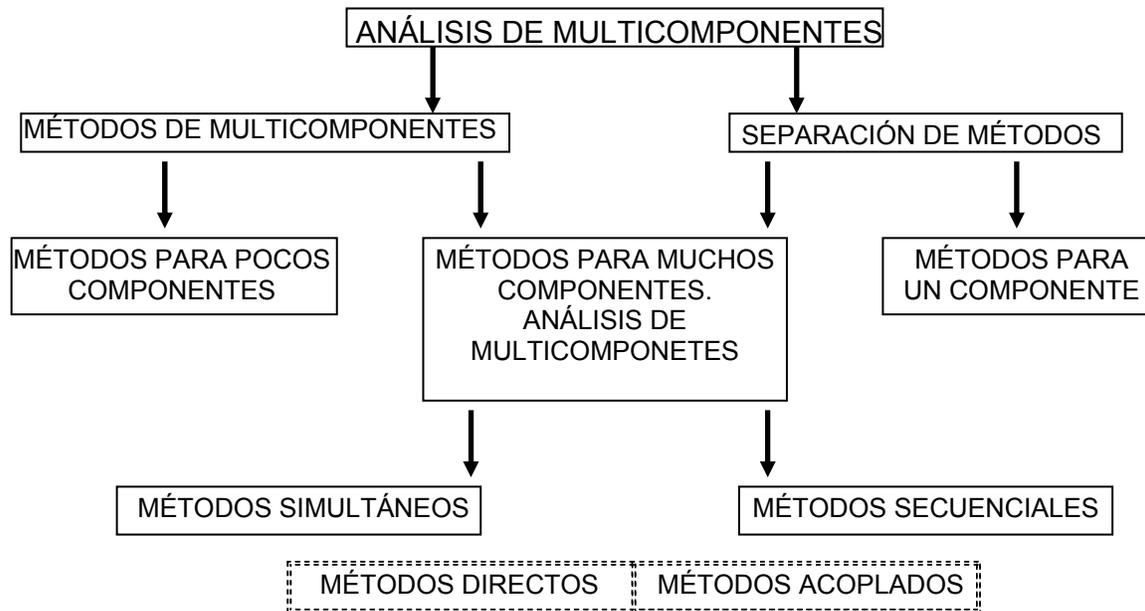


Figura 1. Posibles caminos para el Análisis de Multicomponentes.

- 1) El directo es un método bidimensional con la suficiente resolución para registrar las señales de componentes indistintos.
- 2) El método acoplado separa y determina señales.

### 1.4 ANÁLISIS MULTIVARIADO<sup>2</sup>

El análisis multivariante es una rama de la estadística y del análisis de datos que examina, interpreta y elabora los datos estadísticos sobre la base de un conjunto de variables que pueden ser cuantitativas, cualitativas o una mezcla de ambas.



El análisis multivariante implica una estructura más compleja, con una disposición *matricial de los datos*, cumple también con los objetivos descriptivo e inductivo, pero trabajando simultáneamente con varias variables, de modo que la información que se maneja es de carácter multidimensional. Seguramente la propiedad más determinante del análisis multivariante es que las variables son de naturaleza similar y ninguna de ellas tiene una importancia superior a las restantes. Aunque el análisis multivariante requiere una metodología más compleja, es mucho más potente, utilizando extensamente los métodos del álgebra lineal, cálculo numérico, geometría lineal y otras geometrías. La metodología seguida en el análisis multivariante se esquematiza en el siguiente diagrama de flujo:

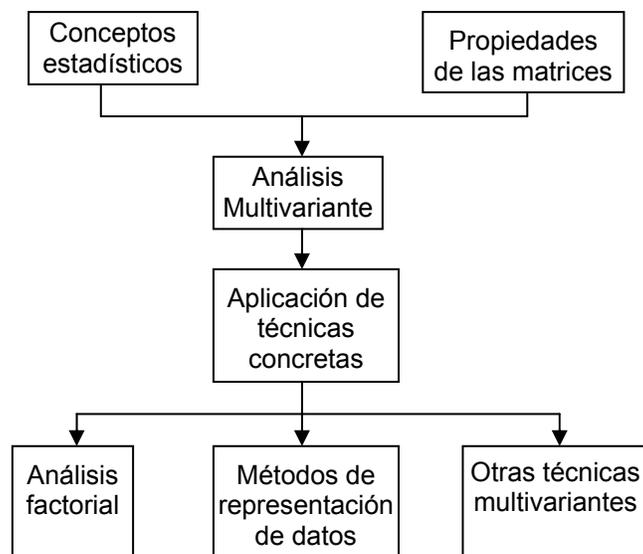


Figura 2. Flujo de las aplicaciones del análisis multivariante.

Cuando en una disolución hay más de una especie absorbente, el espectrofotómetro detecta la suma de absorbancias de todas las especies. Sin embargo, si las distintas especies tienen absorptividades a diferentes longitudes de onda y conocemos el espectro de los componentes puros, podemos



---

---

descomponer matemáticamente el espectro de la mezcla en los espectros de sus componentes.

La clave que nos permite analizar mezclas es que a cada longitud de onda la absorbancia de una disolución (que contiene especies X, Y, Z....) es la suma de las absorbancias de cada una de las especies.

Sin embargo, muchas veces los espectros de los componentes se superponen a una misma longitud de onda, por lo cual no se puede utilizar un método directo. Así que cuando se presentan estos casos, frecuentemente los analitos son separados y cuantificados de manera individual. Para evitar esto, se utilizan los métodos multivariados. Su importancia y utilidad aumentan al incrementarse el número de variables complejas que constan de una gran variedad medidas en número de unidades experimentales que se están evaluando. Debido a estas razones son extraordinariamente útiles para ayudar a los investigadores a hacer que tengan sentido grandes conjuntos de datos.

A menudo, el objetivo primario de los métodos es resumir grandes cantidades de datos por medio de relativamente pocos parámetros. Muchas de estos métodos tienden a ser de naturaleza exploratoria en lugar de confirmatoria. Es decir, tienden a mostrar hipótesis en lugar de probarlas. Los métodos estadísticos tradicionales suelen exigir que un investigador establezca algunas hipótesis, reúna algunos datos y, a continuación, use estos datos para comprobar o rechazar estas hipótesis. Una situación alternativa que se da frecuentemente es un caso en el cual el investigador dispone de una gran cantidad de datos y se pregunta si pudiera haber una información valiosa en ellos. Los métodos multivariados suelen ser útiles para examinar los datos en un intento por saber, si hay información que valga la pena y sea valiosa.



---

---

## 1.5 CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE

Los métodos de calibración multivariante han incrementado la importancia de análisis de multicomponentes junto con la instrumentación computarizada, especialmente aquellos que utilizan el método de Mínimos Cuadrados Parciales con descomposición de variables latentes.<sup>5</sup>

La calibración multivariante (un modelo matemático de análisis de multicomponentes) es una herramienta de reconocida selectividad y confiabilidad en el análisis cuantitativo multicomponentes, aplicable en distintas técnicas de análisis como: fluorometría, espectrofotometría, espectrofotometría de infrarrojo cercano, análisis cinéticos, y para la evaluación de valoraciones potenciométricas ácido-base.<sup>6</sup>

En general un modelo de calibración multivariante está construido de los datos obtenidos de la respuesta instrumental provenientes de un conjunto de muestras de multicomponentes de concentraciones conocidas con respecto al analito de interés.

La Calibración Multivariante significa utilizar muchas variables medidas " $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$ " simultáneamente para cuantificar una variable " $Y$ ", es decir, se toman en cuenta un conjunto de variables predictoras para estimar una o varias respuestas interdependientes. Como su propósito fundamental en química analítica es establecer la fórmula de predicción  $Y = f(X)$ , se asume que  $Y$  corresponde a la cantidad de analito(s) y  $X$  a las mediciones instrumentales; por ejemplo,  $Y$  puede ser la concentración de una especie a determinar y  $X$  las mediciones cromatográficas o espectroscópicas.<sup>7</sup>



---

---

Para predecir la información  $Y$  a partir de  $X$  debe identificarse la fórmula de predicción  $Y=f(x)$  que describa el modelo de calibración del sistema en estudio, a través de algunos de los distintos métodos de calibración multivariante. El análisis de sistemas complejos requiere una estimación estadística de los parámetros del modelo de calibración basándose en muestras representativas del sistema con el fin de optimizar la calidad del trabajo analítico. <sup>7,8</sup>

### 1.6 DIVERSOS MODELOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE. <sup>6,9,10</sup>

El desarrollo de programas especializados en Quimiometría permite actualmente la aplicación de poderosos algoritmos matemáticos (algoritmo es una lista bien definida, ordenada y finita de operaciones, que permite hallar la solución a un problema. Dado un estado inicial y una entrada, a través de pasos sucesivos y bien definidos llega a un estado final, obteniendo una solución) para la resolución de sistema químicos complejos, utilizando múltiples señales analíticas, que debido a las interferencias presentes en la determinación, desviaciones de la linealidad, ruido, etc, que no es posible resolver directamente. Existen diferentes modelos de análisis que actualmente se ocupan entre los que se pueden mencionar:

- Análisis o Regresión del Componente Principal, ACP o RCP (Principal Component, PCA).
- Mínimos Cuadrados Clásicos, MCC, ( Classic Least Square, CLS).
- Mínimos Cuadrados Inversos, MCI (Inverse Least Square, ILS).
- Mínimos Cuadrados Parciales, MCP (Partial Least Square).



---

---

Debe considerarse que en el momento de efectuar la calibración existen anomalías en la preparación de las muestras o variaciones instrumentales (sin importar qué tan cuidadoso sea el analista) que la calibración multivariante identifica como datos anormales, siendo posible eliminarlos y evitar en un futuro errores mayores en el modelo de calibración estimado. Así la calibración multivariante es una herramienta quimiométrica que establece un modelo matemático multivariante del sistema en estudio, donde los parámetros de calibración se derivan de cálculos estadísticos.

El método de Mínimos Cuadrados Clásicos (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, la mayoría de las veces desconocemos esto en casi un 100%.

El método Mínimos Cuadrados Inversos (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 puedan ser incluidas en el análisis. Utilizar este método de calibración tiene la ventaja de que no es necesario conocer la contribución total de todas las especies absorbentes de la muestra, sino solo la de los analitos en los que estamos interesados. Sin embargo los componentes no incluidos en la cuantificación deben estar presentes en todas las muestras y son modelados implícitamente.

El método RCP descompone los espectros independientes, luego se integran y se ajustan para obtener el espectro desconocido y finalmente, se relaciona con la concentración de los componentes por lo que para su uso se requiere de conocer a todos los componentes al igual que en MCC.



---

---

RCP y MCP son métodos indirectos de calibración, no requieren los espectros individuales de cada analito e interferentes. Sin embargo requieren el análisis exhaustivo de muestras de la calibración las cuales expliquen los fenómenos físicos y químicos que puedan influir en el espectro de las muestras para su predicción. Con esta calibración, la concentración del analito puede ser conocida, y los niveles de cualquier interferencia no necesitan ser conocidas.

### 1.7 VENTAJAS CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE.

Entre las principales ventajas de los modelos matemáticos de análisis de multicomponentes tenemos:<sup>5,8</sup>

- Es posible cuantificar, en forma confiable y de manera simultánea, varios componentes presentes en una muestra analítica (Análisis de Multicomponentes) en donde se conozcan los espectros de los componentes puros de interés.
- Se puede cuantificar solo uno o varios de los componentes de una mezcla aún cuando no se conozcan todos los componentes en dicha mezcla.
- 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, con la calibración multivariante se pueden identificar dichas muestras para separarlas posteriormente de la matriz de calibración.
- Permite analizar en forma espectrofotométrica sistemas con interferencia químicas, aunque no sean definidas, sin necesidad de manipular excesivamente la muestra.



- 
- 
- Es posible eliminar fácilmente los errores que pudieran presentarse en las mediciones ocasionados por variaciones de temperatura en diversos instrumentos como espectrofotómetros, monocromadores mal ajustados, errores de procedimientos en el manejo de las muestras analíticas.

Por otro lado, ciertos fenómenos físicos aparentemente irrelevantes pueden afectar seriamente la señal de medición (interferencias físicas), siendo necesario mantener constantes sus efectos o compensarlos matemáticamente. Además, la variación de ciertos parámetros como son temperatura, precisión, pH, etc. Puede provocar grandes errores en las mediciones. No obstante, con la Calibración Multivariante es posible eliminar fácilmente cada uno de estos problemas.

## 1.8 INTERFERENCIAS

Uno de los principales problemas que enfrentan los investigadores en el análisis químico instrumental son las interferencias, cuyo término se aplica a cualquier efecto en la señal analítica causada por fenómenos físicos o químicos ajenos al de interés.<sup>7</sup> Las interferencias químicas son errores sistemáticos causados por ciertas sustancias cuya presencia cambia la señal analítica, o bien, interaccionan con los analitos modificando su respuesta frente al instrumento.

Si la señal de las interferencias se añade a la señal del analito, parte A de la figura 3 la concentración de la muestra,  $x_1$ , da lugar a una señal más alta que la esperada:  $y'_1$  en lugar de  $y_1$ . En este caso, la lectura de la concentración correspondiente a  $y'_1$  sobre la recta de calibrado de que se dispone (no corregida),  $x'_1$ , produce error sistemático por exceso. En cambio, si las interferencias dan una señal que se resta de la concentración de analito (Parte B del gráfico), la concentración de la muestra,  $x_1$ , da lugar a una señal más



baja que la esperada,  $y_1$ , y la lectura sobre la recta de calibración disponible (no corregida),  $x'_1$ , produce error sistemático por defecto.<sup>3</sup>

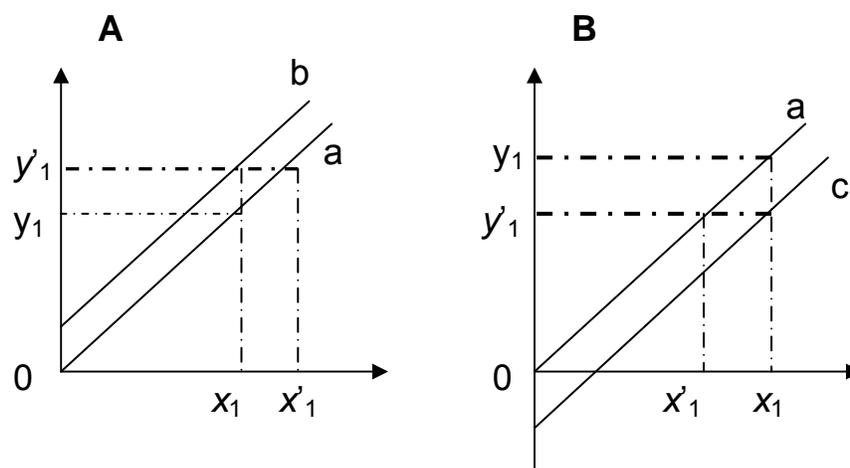


Figura 3. Gráficos de calibraciones sin interferencias (a), y con interferencias cuya señal se suma a la señal del analito (b), o se resta de la misma (c). Error sistemático cometido en cada caso: (A) por exceso, y (B) por defecto. Concentraciones reales ( $x_1$ ) y predichas ( $x'_1$ )

## 1.7 TIPOS DE ERRORES <sup>2</sup>

### 1.7.1 Error aleatorio y sistemático.

Atendiendo a su naturaleza, se distinguen dos tipos de errores: aleatorio y sistemático. El error aleatorio es impredecible en signo y magnitud. Pero su comportamiento estadístico se puede describir mediante modelos de distribución. La forma más conveniente para describir el error aleatorio es la desviación estándar relativa. El error sistemático produce una desviación en un determinado sentido, ya sea positivo (error por exceso) o negativo (error por defecto), respecto a un valor esperado o de referencia.

### 1.7.2 Clasificación del error atendiendo a su origen.<sup>2</sup>

Atendiendo a su origen, e independientemente de que su naturaleza sea aleatoria o sistemática, es útil distinguir entre errores operativos, instrumentales y



metódicos. El error operativo tiene su origen en el operador (analista), en su forma de aplicar el método, en su interacción con el instrumento de medida, con el ambiente, y de prejuicio. En general, los errores operativos se reducen automatizando las operaciones del laboratorio. El error instrumental tiene su origen en el instrumento de medida, cuando el equipo no cumple con la calificación de instalación, de operación y de desempeño. Los errores metódicos son debidos a los defectos o insuficiencias del método analítico. Los errores metódicos pueden afectar a todas las etapas del método, y para reducirlos o corregirlos por completo, es necesario modificar el método.

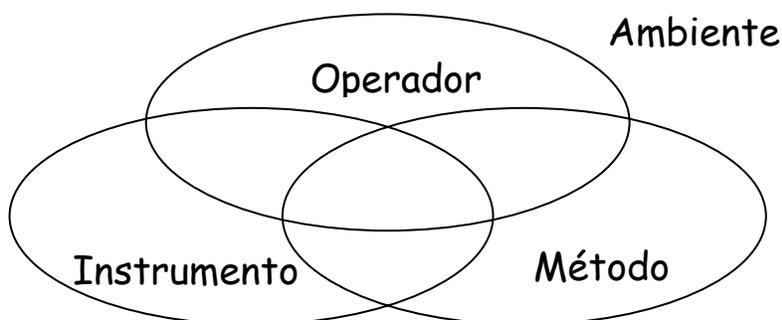


Figura 4. Origen de los errores.

### 1.10 VECTORES Y MATRICES.<sup>11,12</sup>

Para comprender acerca de los modelos matemáticos, es necesaria tener el conocimiento de vectores, matrices matemáticas y las operaciones que pueden realizarse con estas. A continuación se presentara un breve resumen sobre lo que son las matrices y sus operaciones.

$$A_{3 \times 4} = \begin{pmatrix} 1 & 3 & 2 & 9 \\ 5 & 7 & -1 & 8 \\ 0 & 3 & 5 & 1 \end{pmatrix}$$

Figura 5.1 Ejemplo de una matriz



---

---

La matriz numérica de la figura 5.1, se considera de 3 filas, representando el resultado de 3 objetos. Estas filas son llamadas vector fila. Por ejemplo para r1 (1 3 2 9). Similarmente, esta matriz tiene 4 columnas, cada una representando los resultados para cada una de las variables, a esto se le denomina vector columna. La primera columna del vector es la siguiente:

$$x = \begin{Bmatrix} 1 \\ 5 \\ 0 \end{Bmatrix}$$

Cuando se utiliza la palabra vector sin especificar, si es columna o fila, por convención es una vector columna y se escribe así:

$$X = \begin{Bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ \cdot \\ \cdot \\ x_n \end{Bmatrix}$$

Los datos de  $X_1$  a  $X_n$  son llamados elementos del vector, estos poseen magnitud y longitud. Debido a esto nos permiten representar datos en espacios multidimensionales. Con esta información podemos decir que las matrices son conformadas por vectores.

Las matrices se utilizan en el cálculo numérico, en la resolución de sistemas de ecuaciones lineales, de las ecuaciones diferenciales y de las derivadas parciales. Además de su utilidad para el estudio de sistemas de ecuaciones lineales, las matrices aparecen de forma natural en Geometría, Estadística, Economía, Informática, Física, Quimiometría.



---

---

La utilización de matrices constituye actualmente una parte esencial de los lenguajes de programación, ya que la mayoría de los datos se introducen en los ordenadores como tablas organizadas en filas y columnas.

Una matriz es un conjunto de elementos de cualquier naturaleza aunque, en general, suelen ser números ordenados en filas y columnas. Se llama matriz de orden " $m \times n$ " a un conjunto rectangular de elementos  $a_{ij}$  dispuestos en  $m$  filas y en  $n$  columnas ver Tabla 1. El orden de una matriz también se denomina dimensión o tamaño, siendo  $m$  y  $n$  números naturales. Las matrices se denotan con letras mayúsculas: A, B, C,.... y los elementos de las mismas con letras minúsculas y subíndices que indican el lugar ocupado: a, b, c, .... Un elemento genérico que ocupe la fila  $i$  y la columna  $j$  se escribe  $a_{ij}$ . Si el elemento genérico aparece entre paréntesis también representa a toda la matriz.  $A = (a_{ij})$ . Como en el siguiente ejemplo:

$$A = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & \dots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & \dots & a_{2n} \\ \dots & \dots & a_{ij} & \dots \\ a_{m1} & a_{m2} & \dots & a_{mn} \end{pmatrix}$$

Figura 5.2. Ejemplo de una matriz.



Tipo de matriz	Definición	Ejemplo
FILA	Aquella matriz que tiene una sola fila, siendo su orden $1 \times n$	$A_{1 \times 3} = (7 \ 2 \ -5)$
COLUMNA	Aquella matriz que tiene una sola columna, siendo su orden $m \times 1$	$A_{3 \times 1} = \begin{pmatrix} -7 \\ 1 \\ 6 \end{pmatrix}$
RECTANGULAR	Aquella matriz que tiene distinto número de filas que de columnas, siendo su orden $m \times n$	$A_{3 \times 4} = \begin{pmatrix} 1 & 3 & 2 & 9 \\ 5 & 7 & -1 & 8 \\ 0 & 3 & 5 & 1 \end{pmatrix}$
TRASPUESTA	Dada una matriz A, se llama traspuesta de A a la matriz que se obtiene cambiando ordenadamente las filas por las columnas. Se representa por $A^t$ ó $A^T$	Si es $A = (a_{ij})_{m \times n}$ su traspuesta es $A^t = (a_{ji})_{n \times m}$ $A = \begin{pmatrix} 1 & 2 & 5 \\ 3 & -4 & 7 \end{pmatrix}$ ; $A^t = \begin{pmatrix} 1 & 3 \\ 2 & -4 \\ 5 & 7 \end{pmatrix}$
CUADRADA	Aquella matriz que tiene igual número de filas que de columnas, $m = n$ , diciendose que la matriz es de orden n.	$A_3 = \begin{pmatrix} 1 & 9 & -6 \\ 0 & 2 & 1 \\ -2 & 4 & 5 \end{pmatrix}$
ESCALAR	Es una matriz cuadrada que tiene todos sus elementos nulos excepto los de la diagonal principal que son iguales	$A = \begin{pmatrix} 7 & 0 & 0 \\ 0 & 7 & 0 \\ 0 & 0 & 7 \end{pmatrix}$
ORTOGONAL	Una matriz ortogonal es necesariamente cuadrada e invertible : $A^{-1} = A^T$ . El producto de dos matrices ortogonales es una matriz ortogonal. La inversa de una matriz ortogonal es una matriz ortogonal. El determinante de una matriz ortogonal vale +1 ó -1.	$A \cdot A^T = A^T \cdot A = I$ $\begin{pmatrix} a_1 & a_2 & a_3 \\ b_1 & b_2 & b_3 \\ c_1 & c_2 & c_3 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} a_1 & b_1 & c_1 \\ a_2 & b_2 & c_2 \\ a_3 & b_3 & c_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$
NORMAL	Una matriz es normal si conmuta con su traspuesta. Las matrices simétricas, antisimétricas u ortogonales son necesariamente normales.	$A = \begin{pmatrix} 5 & 4 \\ -4 & 5 \end{pmatrix}$ $A \cdot A^T = A^T \cdot A$
INVERSA	Decimos que una matriz cuadrada A tiene inversa, $A^{-1}$ , si se verifica que : $A \cdot A^{-1} = A^{-1} \cdot A = I$	$A = \begin{pmatrix} 2 & 3 \\ 1 & 1 \end{pmatrix}$ , $A^{-1} = \begin{pmatrix} -1 & 3 \\ 1 & -2 \end{pmatrix}$

Tabla 1. En la cual se muestran los diferentes tipos de matrices que se utilizan para la resolución del algoritmo de MCP.



---

---

## 1.11 FUNDAMENTOS DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS DE ANÁLISIS MULTICOMPONENTES <sup>13,14</sup>

En el análisis cuantitativo se busca alguna relación lineal entre la medición y la concentración de un componente en particular. En espectroscopia, la ley de Lambert y Beer define la relación entre la absorbancia y la concentración a una longitud onda de la siguiente manera.

$$A = \varepsilon b C \quad (1.0)$$

Donde el coeficiente de absortividad y la longitud del paso óptico se combina en una sola constante,  $K$ .

$$A = KC \quad (1.1)$$

Como se observa la ecuación (1.0), esta puede resolverse estudiando una sola muestra. Sin embargo, ante las imitaciones por ruido, error instrumental, error en la manipulación de soluciones, etc. Se recomienda analizar cierto número de muestras de distinta concentración, se grafican los resultados y localiza la línea recta que mejor comprenda los puntos mediante lo que se conoce matemáticamente como ajuste de mínimos cuadrados, el cual encuentra simplemente la ecuación de la recta donde el error total entre las absorbancias sea mínimo.

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

$$C_{(n,m)} = A_{(n,p)} K_{(m,p)} + E_{(n,p)} \quad (1.2)$$

Siendo  $C$  la concentración,  $A$  los valores de las absorbancias,  $E$  son los errores residuales, es decir es una parte de la medida del vector que no esta



---

---

explicada por el modelo. También conocida como errores de ajuste, es la diferencia de la absorbancia experimental y la determinada a cada longitud de onda según el modelo. El número de soluciones patrón es  $n$ ,  $p$  el número de longitudes de onda y  $m$  el número de analitos. Por ejemplo, para dos muestras, dos analitos, y dos longitudes de onda, las ecuaciones son:

Para la longitud de onda 1

$$A_{11} = C_{11}K_{11} + C_{12}K_{21} + E_{11} \quad (1.3)$$

$$A_{12} = C_{11}K_{12} + C_{12}K_{22} + E_{12} \quad (1.4)$$

Para la longitud de onda 2

$$A_{21} = C_{21}K_{11} + C_{22}K_{21} + E_{21} \quad (1.5)$$

$$A_{22} = C_{21}K_{12} + C_{22}K_{22} + E_{22} \quad (1.6)$$

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

## 1.12 MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (MCP)

Mínimos cuadrados parciales (MCP) es una poderosa herramienta estadística multivariante, la cual comprende una serie de técnicas matemáticas que dan una reconocida selectividad y confiabilidad en el análisis cuantitativo de multicomponentes. Aprovecha la correlación que existe entre los datos espectrales y las concentraciones constitutivas. Puesto que los datos espectrales se pueden descomponer en sus variaciones más comunes, conserva los datos de la concentración.



---

---

En una mezcla de dos componentes, hay dos variantes independientes (idealmente) en el sistema, es decir, el espectro de la mezcla puede recrearse sumando los espectros puros de A y B. En la realidad generalmente hay variaciones instrumentales o de la muestra; pueden existir, además, interacciones entre los dos componentes que pueden dar origen a compuestos intermediarios o simplemente cambiar la forma de los espectros de los componentes puros, esto aunado al hecho de que puede haber un número finito de espectros independientes factibles de sumarse o restarse para reconstruir los datos. Si estos espectros se calculasen de alguna manera, podrían sumarse las cantidades apropiadas de cada uno, integrarse y ajustarse para obtener el espectro desconocido y, finalmente relacionarlas con la concentración de los componentes. Por convención, estas cantidades se conocen como scores (indicadores o marcadores) y los espectros se denominan loadings (de peso o cargadores).

La base del algoritmo es primero definir los vectores de peso que determinan las direcciones de proyección, enseguida se utilizan las variables latentes derivadas de los vectores de peso para construir finalmente el modelo. Esto genera dos conjuntos de vectores indicadores correspondientes; un conjunto para los datos espectrales, y otro para las concentraciones constitutivas. Los dos conjuntos de vectores indicadores se relacionan el uno con el otro a través de un cierto tipo de regresión, y se construye un modelo de calibración. Cabe señalar que la regresión de mínimos cuadrados parciales es capaz de ser un método de espectro completo al cual le resultan muy útiles los métodos para la detección de muestras desechables (outliers)<sup>5</sup>

El algoritmo ocupado en este trabajo es de Haaland, a su vez es una modificación del NIPALS (No Lineal Iterative Partial Squares), algoritmo desarrollado por Wold<sup>10,13</sup>, en el cual el análisis de calibración y predicción se



---

---

hace un componente a la vez, así que sólo las concentraciones de los componentes químicos de interés son usados en la calibración. 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 solamente se incluya este componente en los datos de calibración.<sup>7</sup>

En la aproximación más extendida del algoritmo en lugar de modelar exclusivamente la variable “A” (Absorbancias). Dos grupos de datos son obtenidos de la forma:

$$A = TW + E_a \quad (1.7)$$

Donde T es la variable latente, (vector que ha sido optimizado desde el punto de vista de su uso como variable predictora para predecir una respuesta dada, o para predecir un pequeño grupo de respuestas);  $E_a$ , es la variabilidad del error, T y W son matrices. El producto de T y W aproxima a los datos espectrales. La concentración del analito de interés esta representada por:

$$c = Tv + e_c \quad (1.8)$$

El producto de T y v aproxima a las concentraciones reales, ya que v es el vector de los coeficientes que relacionan a las concentraciones.

Este algoritmo describe intensidades (marcadores) generadas que son ortogonales y el problema de colinealidad es eliminado, por ende, toda la información útil contenida en la ecuación de la absorbancias puede ser incluida y se puede llevar a cabo el análisis para un componente químico a la vez sin que haya colinealidad.<sup>8</sup>



### 1.13-ALGORITMO DEL MODELO DE MCP <sup>13, 14</sup>

**Tabla I. MCP1. Algoritmo de Calibración.**

Paso 1. Pretratamiento de datos. Centrar A y c		
Paso 2. Formación del vector cargador de peso, $\hat{w}_h$		
Modelo		$A = c \hat{w}_h' + E_A$
Solución		$\hat{w}_h = A' c / c' c$
		Normalizar $\hat{w}_h$
Paso 3. Formación del vector cargador, $t_h$ (variable latente espectral)		
Modelo		$A = (t_h) \hat{w}_h' + E_A$
Solución		$t_h = (A) \hat{w}_h' / \hat{w}_h' (\hat{w}_h) = (A) \hat{w}_h$
Paso 4. Relacionando el vector cargador, $t_h$ , a las concentraciones		
Modelo		$c = (v_h)(t_h) + e_c$
Solución		$v_h = (t_h)' c / t_h' (t_h)$
Paso 5. Formación de $b_h$ vector cargador MCP para A,		
Modelo		$A = (t_h) b_h' + E_A$
Solución		$b_h = A' (t_h) / t_h' (t_h)$
Paso 6. Cálculo de los residuales en A y c.		
	Residuales espectrales	$E_A = A - (t_h) b_h'$
	Residuales de concentración	$e_c = c - t_h v_h$
Paso 7. Incrementar h, sustituir $E_A$ para A y $e_c$ para c en el paso 2 y continuar hasta el número deseado de vectores cargadores.		

Tabla 2. MCP1 En esta tabla se presenta los pasos del algoritmo de MCP. <sup>19,20</sup>



Tabla II. MCP1. Algoritmo de Predicción.

**Método 1**

Paso 1. Centrar  $\mathbf{a}$  usando los datos de la calibración. Escalar  $\mathbf{a}$  si los espectros de calibración fueron escalados.

Paso 2.  $t_h = (\mathbf{a}) \hat{w}_h$

Paso 3.  $c_h = c_{h-1} + t_h v_h$

Paso 4.  $e_h = e_{h-1} - t_h b_h$

Paso 5. Incrementar  $h$ , sustituyendo  $e_h$  por  $\mathbf{a}$  y repitiendo el paso 2 hasta  $h=r$

**NOTA:**  $\hat{w}_h$ ,  $v_h$ ,  $b_h$ , son de la calibración MCP1,  $c_0$ , es la concentración media del analito en las muestras de calibración y  $e_0 = \mathbf{a}$ .

**Método 2**

Paso 1. Después de la calibración PLS1, calcular los coeficientes de regresión final

$$K = \hat{W}(B'\hat{W})^{-1}v$$

Paso 2. Centrar  $\mathbf{a}$  usando los datos de la calibración (escalar  $\mathbf{a}$  si el espectro de calibración fue escalado).

Paso 3.  $c = \mathbf{a}'K + c_0$

**NOTA:**  $\hat{W}$  y  $B$  tiene  $r$  filas compuestas de vectores  $\hat{w}_h$  y  $b_h$ , y  $v$  esta formado de términos individuales  $v_h$  del modelo óptimo MCP1 ( $h = r$ );  $c_0$  es el mismo dado en el método 1.

Tabla 2.1. MCP1 En esta tabla se presenta los pasos del algoritmo de MCP. <sup>19,20</sup>



---

---

El algoritmo de MCP consta de dos etapas:

- A. Etapa de Calibración
- B. Etapa de Predicción

### **1.13.1- ETAPA DE CALIBRACIÓN.**

En esta etapa, la relación entre las absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda y las concentraciones de los componentes de interés se estiman a partir de un conjunto de soluciones de referencia que presentan las posibles combinaciones de los componentes de la mezcla. Se obtienen expresiones matriciales compuestas por valores de absorbancias a diferentes longitudes de onda y el número de soluciones (en columnas y filas respectivamente). Una vez que se obtienen las matrices de calibración, los datos deben centrarse (Distribuir los datos alrededor del medio) y normalizarse (Obtener la dispersión de datos respecto al valor medio) para obtener una segunda matriz la cual se resuelve para convertir las respuestas analíticas (absorbancias a diferentes longitudes de onda en la banda del espectro) a términos respecto al valor promedio, los cuales pueden relacionarse con la concentración. La elaboración del modelo establecido para MCP se logra resolviendo los datos de las matrices conforme al siguiente algoritmo.

PASO 1: Pre-tratamiento de los datos. Se calculan los promedios, tanto de la matriz A como del vector C, para obtener valores de A y C centrados, esto es, restando el promedio de las absorbancias a cada absorbancia y el promedio de los valores del vector C a cada concentración.



---

---

PASO 2: Formación de los vectores cargadores de peso  $W_h$ :

$$\text{Modelo: } A = c w_h' + EA \quad (1.9)$$

$$\text{Solución: } w_h = A'c / c'c \quad (2.0)$$

Donde  $A$  en la ec 1.10 representa la matriz transpuesta de la absorbancia y  $C$  es el vector transpuesto de la concentración del analito. Una vez obtenido los valores de  $W_h$ , estos deben ser normalizados.

PASO 3: Formación del vector indicador,  $t_h$ :

$$\text{Modelo: } A = t_h W_h' + EA \quad (2.1)$$

$$\text{Solución: } t_h = A W_h \quad (2.2)$$

El vector  $t_h$  representa la intensidad o cantidad del primer vector de carga en las muestras de calibración para el sistema coordinado de MCP.

PASO 4: Relación del vector indicador con las concentraciones:

$$\text{Modelo: } c = V_h t_h + e_c$$

$$\text{Solución: } V_h = t_h' c / t_h' t_h$$

PASO 5: Formación de  $b_h$ , vector de carga de MCP para  $A$ :

$$\text{Modelo: } A = t_h b_h' + E_A \quad (2.3)$$

$$\text{Solución: } b_h = A' t_h / t_h' t_h \quad (2.4)$$



---

---

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

Espectros Residuales  $EA = A - t_h b_h'$  (2.5)

Concentraciones Residuales  $e_c = c - v_h t_h'$  (2.6)

El producto del vector indicador ( $t_h$ ) y del 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, se sustituye EA por A y ec por c en el paso 2 y continuar hasta el número deseado de vectores cargadores.

### 1.13.2- Etapa de predicción.

La predicción de MCP1 puede ser obtenida del espectro de una muestra desconocida, después de la calibración pueden ser aplicados uno de los dos métodos ilustrados en la Tabla 2.1. En esta etapa, las respuestas analíticas de la matriz de calibración se usan para estimar los resultados (concentraciones) del componente de interés a partir del espectro obtenido para una muestra problema. Así, el principio básico en MCP es la generación de "Residuos 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 datos centrados, que son los residuales provenientes de un análisis anterior.



---

---

## Método 1.

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.

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  $t_h$ :

$$t_h = w_h' a \quad (3.0)$$

PASO 3: Cálculo de la concentración

$$C_h = C_{h-1} + V_h t_h \quad (3.1)$$

PASO 4: Cálculo de residuales de la absorbancia

$$e_h = e_{h-1} - b_h' t_h \quad (3.2)$$

En donde  $e_h$  es el error asociado al vector de las absorbancias y  $e_{h-1}$  es el error asociado a una de las calibraciones.

PASO 5: Incremente  $h$ , sustituir  $e_h$  por "a" y repetir desde el paso 2, basta completar el número de "h" utilizadas en la calibración.

## Método 2.

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,  $k$ , el cual tiene las



---

---

mismas dimensiones que un espectro normal y puede calcularse de diversas formas. Una de estas formas es aplicando el siguiente algoritmo de predicción:

PASO 1: Después de la etapa de calibración para MCP, calcular el coeficiente de regresión final  $K$

$$K = W (B^T W)^{-1} v^T \quad (3.3)$$

Paso 2: Cálculo del residual  $e_c$

$$e_c = c_0 - a k \quad (3.4)$$

Paso 3: Cálculo de la concentración:

$$c = a k + e_c \quad (3.5)$$

Los valores de  $a$  no son centrados, mientras que  $W$  y  $B$  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 óptimos para el modelo;  $v$  es el vector obtenido utilizando todos los  $v_h$  óptimos calculados para el modelo y  $a_0$  = el vector del espectro obtenido en la etapa de calibración.

#### 1.14-VALIDACIÓN DEL MODELO DE CALIBRACIÓN. <sup>5</sup>

Uno de los aspectos más importantes de los métodos de calibración multivariante es el modelo de validación. Sin embargo, se debe hacer notar que existe una gran diferencia entre “validar el modelo” que se está utilizando y “validar el método analítico”, ya que en el primer caso solo se demuestra que las condiciones establecidas para realizar el método de MCP es adecuada, 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 puntos:

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

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

- La detección de muestras desechables (conocidas como outliers).
- Número de las soluciones de la calibración.
- 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 datos y el modelo ha sido establecido, entonces se puede hablar de “validar” el método analítico.

### 1.15-VALIDACIÓN CRUZADA <sup>5</sup>

Una herramienta útil utilizada en los métodos de calibración multivariante es la “Validación cruzada”. En este tipo de validación, los datos obtenidos de la calibración original son divididos en dos partes, una de las cuales contiene el número de muestras y la otra parte solo contiene una o varias muestras separadas, es decir, se separan los datos espectrales de una o varias muestras. Se realiza una calibración con las muestras restantes y se hace una estimación con todas las muestras incluyendo las muestras excluidas se repite este proceso utilizando cada una de las muestras de calibración. Así, la validación cruzada tiene dos propósitos:



---

1) Se puede emplear como un método para determinar la cantidad suficiente de muestras que puedan ser incluidas en la calibración.

2) Para conocer la capacidad predictiva del modelo.

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

Al aplicar la validación cruzada se pueden utilizar varias gráficas y pruebas para realizar la validación del modelo. Entre las principales se tienen:

- ✦ Suma de cuadrados de errores en la Predicción (SCERP) contra el número de factores calculados.
- ✦ Gráfico de concentración estimada contra concentración real.
- ✦ Gráfico de porcentaje de desviación de la concentración de cada muestra de la calibración.
- ✦ Gráfico de concentración residual contra la concentración estimada de cada muestra de la calibración.
- ✦ Gráfico del SCERP contra la cantidad de longitudes de onda utilizadas.
- ✦ Gráfico del SCERP contra el número de muestras utilizadas en la calibración.



---

---

### 1.16-SELECCIÓN DEL NÚMERO ÓPTIMO DE FACTORES: ANÁLISIS DE SCERP.<sup>5</sup>

Una de las tareas más difíciles en la aplicación del método de MCP y en otros métodos, 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, se ordenan en grado de importancia para el modelo (ponderación de concentración en MCP).

Eventualmente, los vectores comenzarán a modelar el ruido del sistema (el cual generalmente contribuye en menor cantidad a los datos); si los vectores “ruido” se incluyen en la calibración, el error comenzará a incrementarse. La descomposición espectral con tales métodos y la correcta selección del número de factores, es un camino muy efectivo para eliminar el ruido. La manera más efectiva para establecer el número óptimo de factores, es la aplicación del SCERP. En este método se utiliza la validación cruzada y se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{SCERP} = \sum_{i=1}^n (C_{i \text{ est}} - C_{i \text{ real}})^2 \quad (3.5)$$

Donde  $n$  es el número de muestras de 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 del SCERP es un indicador de qué tan bien se están estimando la concentración de las soluciones de la calibración con cada número de factores. El incluir vectores ruido en la matriz de calibración se conoce como “sobreajuste” (overfitting). Por ello, es recomendable elegir el mejor número de



---

---

factores donde el valor de SCERP alcance el mínimo para evitar el problema del sobreajuste.

### 1.17-SELECCIÓN DEL NÚMERO DE ESTÁNDARES <sup>5</sup>

Para la obtención de buenos resultados es importante el diseño de soluciones estándar para la calibración. Para ello se deben cumplir las siguientes condiciones:

- Las soluciones 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 soluciones o muestras preparadas deberán cubrir todo el intervalo de concentraciones esperadas para las muestras problemas.
- 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 sí.

### 1.18-DETECCIÓN DE MUESTRAS DESECHABLES <sup>5,13,14</sup>

La detección de muestras desechables resulta tan importante como el diseño de las soluciones patrón o como la elección de números 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 problemas.



---

---

Una o varias de las muestras de la calibración pueden tener su valor de concentración incorrecto debido a que las muestras pudieron ser mal preparadas ó que las muestras tuvieron una manipulación inadecuada durante la medición del espectro u otros errores relacionados. Una poderosa herramienta para la detección de muestras desechables es la aplicación de la validación cruzada.

### 1.19-SELECCIÓN DE LA REGIÓN ESPECTRAL<sup>5</sup>

Una de las ventajas de utilizar el método de MCP es que se puede utilizar el espectro completo para la construcción del modelo con sólo el conocimiento de los espectros de los componentes puros de interés. En estos casos, el número de longitudes de onda puede ser muy grande y el tiempo para realizar los cálculos de la calibración puede ser largo y laborioso, además, ciertas longitudes de onda pueden contener ruido espectral o simplemente no contienen información relevante que pueda ayudar a construir el modelo robusto. Por ello, es importante seleccionar longitudes de onda que aporten la información necesaria. Esta selección se puede realizar: De forma empírica o empleando un procedimiento, como puede ser la obtención del coeficiente  $K_w$ .

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



---

---

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

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

$$Kw = (\alpha_i - \bar{\alpha}) / s^2 \quad (3.6)$$

Donde  $\alpha_i$  es cada uno de los valores espectrales,  $\bar{\alpha}$  es la media del espectro de calibración y  $s$  es la desviación estándar al cuadrado.

2.- Realizar el Gráfico de coeficiente de regresión final estandarizado ( $kw$ ) contra la longitud de onda.

3.- Seleccionar la región de longitudes de onda que tengan valores de  $kw$  equidistantes entre sí, o eliminar la región de longitudes de onda que presenten valores de  $kw$  negativos grandes.

4.- Realizar el algoritmo de calibración y predicción para MCP con los datos centrados y con las longitudes de onda seleccionadas.

5. El número óptimo de longitudes de onda se determina cuando se obtiene el valor más pequeño de SCERP con el menor número de factores calculados.

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

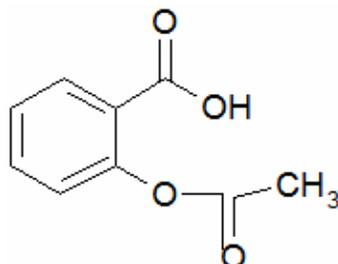


---

## 1.20-CARACTERÍSTICAS GENERALES DE ASA Y CAF

### 1.20.1-Propiedades Físicoquímicas del Ácido Acetil Salicílico (ASA)<sup>16,17</sup>

Estructura química:



Nombre químico: Ácido 2-acetil-oxibenzoico.

Fórmula condensada:  $C_9H_8O_4$

Naturaleza química y constante de disociación: Ácida, con un valor de pka de 3.5 (25 °C).

Peso molecular: 180.16 g/mol.

Descripción: Cristales transparentes o blancos, aciculares. También se encuentra como polvo blanco cristalino o gránulos; es inodoro o de olor ligero y de sabor ligeramente amargo.

Solubilidad: Soluble en etanol, muy poco soluble en cloroformo, éter, insoluble en agua.

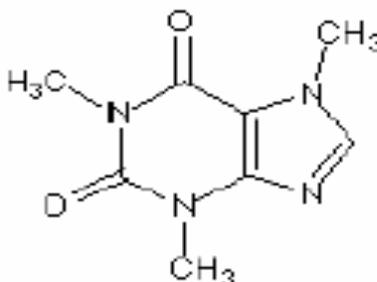
Espectro Ultravioleta: En una solución ácida presenta picos a 230nm y 278nm, en solución alcalina presenta picos a 231nm y 298nm.



---

## 1.20.2- Propiedades Físicoquímicas de la Cafeína (CAF) <sup>17,18</sup>

Estructura química:



Nombre químico: 7-Metilteofilina, 1,3,7-Trimetilxantina.

Fórmula condensada:  $C_8H_{10}N_4O_2$ .

Naturaleza química y constante de disociación: Básica, pkb de 13.2 (25°C).

Peso molecular: 194.2g/mol.

Descripción: Cristales blancos.

Solubilidad: Soluble en agua hirviendo, cloroformo, muy poco soluble en etanol, acetona, agua.

Espectro Ultravioleta: En una solución ácida presenta picos a 277nm.



---

---

### 1.18.3-Características farmacológicas de la Aspirina y Cafeína. <sup>19</sup>

#### Ácido acetilsalicílico (ASA)

La aspirina, el éster salicílico del ácido acético, fué introducida en la clínica en 1899 siendo utilizada como analgésico, anti-inflamatorio, antipirético y antitrombótico. Una vez en el organismo, el ácido acetilsalicílico es hidrolizado a salicilato. El ácido acetilsalicílico es utilizado en el tratamiento de numerosas condiciones inflamatorias y autoinmunes como la artritis juvenil, la artritis reumatoidea, y la osteoartritis. Por sus propiedades antitrombóticas se utiliza para prevenir o reducir el riesgo de infarto de miocardio y de ataques transitorios de isquemia manifiesta su capacidad para inhibir la agregación plaquetaria, siendo utilizada cada vez más para esta indicación.

#### Cafeína (CAF)

La cafeína es un estimulante directo y moderado del sistema nervioso central y también estimula el corazón y el sistema cardiovascular. La cafeína estimula el centro respiratorio medular y relaja el músculo bronquial liso. También estimula el músculo voluntario y la secreción gástrica de ácido, aumenta el flujo sanguíneo renal y tiene propiedades diuréticas moderadas. A menudo la cafeína se combina con analgésicos o derivados del alcaloide ergotamina para el tratamiento de la migraña y otros tipos de cefalea. La cafeína también se comercializa en productos utilizados para tratar el mareo u obesidad.

### 1.21-ESPECTROFOTOMETRÍA <sup>20,21</sup>

La técnica espectrofotométrica en el análisis de medicamentos es aplicada ampliamente para la determinación cuantitativa de diversos fármacos. Todas las especies moleculares que pueden ser determinadas



---

---

espectrofotométricamente deben ser absorbentes, es decir, que su estructura molecular se comporte de una forma tal, que al establecer contacto con una radiación electromagnética de una longitud de onda específica, absorba cierta cantidad de energía. Desde el punto de vista físico, la absorción puede definirse como la reducción de la intensidad de energía resultante de la conversión en el medio; podemos interpretar entonces, que las especies absorbentes captan cierta cantidad de energía y la transforman, provocando una disminución de la potencia radiante incidente.

Los métodos de análisis espectrofotométricos están basados en la medición de la radiación electromagnética absorbida o emitida por la materia. No se limitan exclusivamente al uso de la luz visible (VIS), sino que también incluye a aquellas muestras que emplean energía radiante de otras regiones del espectro electromagnético, como la ultravioleta (UV) y el infrarrojo (IR).

La espectrofotometría UV es un método instrumental que mide las transiciones electrónicas en las moléculas y consiste en la transferencia de un electrón desde un orbital ocupado ( $n, \sigma, \pi$ ) hasta otro de anti-enlace desocupado ( $\sigma^*, \pi^*$ ). La cantidad de energía absorbida en la región ultravioleta del espectro depende de la estructura electrónica de la molécula y corresponde a la promoción de los electrones desde electrones en el estado basal a orbitales de energía en estado excitado.

El estudio experimental de la relación entre la magnitud de la absorción y la longitud de onda electromagnética, permite la construcción de gráficos denominados espectros de absorción, los cuales son característicos de cada sustancia y del medio de disolución en donde se encuentra la muestra.



---

---

La transmitancia y la absorbancia son dos términos muy importantes que se aplican en la espectroscopia de absorción. La transmitancia significa la fracción de la radiación incidente transmitida por la solución, “Po” es la energía del rayo incidente (100%) y “P” es la energía de la radiación resultante, la transmitancia puede representarse en porcentaje. La absorbancia se representa como el negativo del logaritmo de la fracción de la radiación incidente transmitida, la absorbancia aumenta a medida que aumenta la atenuación del haz, si la transmitancia disminuye, la absorbancia aumenta de forma exponencial.

Transmitancia:  $T = P / P_o$

Absorbancia:  $A = -\log T$

### 1.22-LEY DE LAMBERT –BEER<sup>21</sup>

Una ventaja de usar la espectroscopía como técnica de medida es que la ley de Lambert-Beer define una relación lineal simple entre la concentración de los constituyentes de una muestra y la cantidad de energía que absorbe. En términos matemáticos:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot b \cdot C$$

Donde:

$A_{\lambda}$  = Absorbancia a un valor específico de longitud de onda.

$\epsilon_{\lambda}$  = Es una constante de proporcionalidad que es independiente del paso de la luz e intensidad de la radiación incidente. Se conoce como coeficiente de absortividad. Depende de la temperatura, disolvente, estructura molecular del soluto y de la longitud de onda.

b = Longitud del paso óptico, largo de la luz.

C = Concentración del analito en solución.



---

---

La ecuación de la Ley de Lambert-Beer representa una línea recta que puede construirse experimentalmente determinando las absorbancias de varias soluciones con diferentes concentraciones sucesivas de una especie absorbente. Cuando se representa la absorbancia en función de la concentración se obtiene lo que se denomina curva de calibración, en donde la pendiente de la recta representa la absorptividad.

La aplicación cuantitativa de la Ley de Lambert-Beer se obtiene al determinar la absorbancia de una solución de concentración desconocida e interpolando en la curva de calibración de la sustancia correspondiente, o despejando la concentración  $C$  de la misma ecuación sustituyendo los valores de  $A$ ,  $\epsilon$  y  $b$ .



---

---

# **CAPÍTULO 2**

# **DESARROLLO DEL**

# **MÉTODO ANALITICO**



---

---

## 2.1 REACTIVOS, MATERIAL Y PROGRAMAS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.

La parte experimental fue realizada con estándar secundario de Ácido Acetil Salicílico (Pureza 100.01%) USP Lote 201110 de Química USP de México y estándar secundario de Cafeína (Pureza 99.95%) MP-03-358 de Bioresearch de México. Las soluciones stock de ASA y CAF fueron preparadas pesando cantidades exactas de los activo y disolviendo ambos en EtOH, grado reactivo, se utilizó como medio de disolución una solución amortiguadora de HCl-KCl pH de 2.1 (Ver ANEXO A.1-A.2). Todas las soluciones fueron preparadas el mismo día de análisis. Las tabletas utilizadas para los ensayos de disolución fueron tabletas de Cafiaspirina de Bayer, conteniendo 500mg de ASA y 30mg de CAF. A su vez los excipientes utilizados para la preparación de mezclas físicas y placebos cargados fueron los siguientes, Almidón pregelatinizado (Nutrer 99.6%), ácido esteárico (Nutrer 99.8%) y Celulosa Microcristalina (Chemo 98.6%).

El material de laboratorio utilizado:

Matraces volumétricos de 25, 250, 500, 1000 mL.

Pipetas volumétricas de 7, 6, 5, 4, 3 mL

Vasos de precipitados de 20, 50, 250, 1000 mL

Agitadores de vidrio

Tubos de ensaye

Vidrios de reloj

Mortero con pistilo

Las mediciones espectrofotométricas fueron realizadas en un Espectrofotómetro UV VARIAN, Modelo Cary, empleando celdas de cuarzo Varian de 10 mm de longitud. Los espectros fueron obtenidos en un rango de 200-300nm a intervalos de 1nm. También se utilizaron los siguientes equipos: Balanza



---

---

Analítica OHAUS Plus, purificador de agua Milli-Q de Millipore No Serie F6MN12661L, pHmetro Oakton No 35613-01, y agitador mecánico.

Los datos fueron recolectados utilizando los programas “Cary Simple Reads” y “Cary scan” en formato ASCII transferidos a una computadora Pentium 3 a 700Mhz. Para el tratamiento de los datos por el algoritmo de MCP, se utilizó el programa ISHEJA INC. Versión 1.0. Soportado en ambiente Windows, y el programa de Excel de la paquetería de Microsoft Office.

### DESARROLLO EXPERIMENTAL

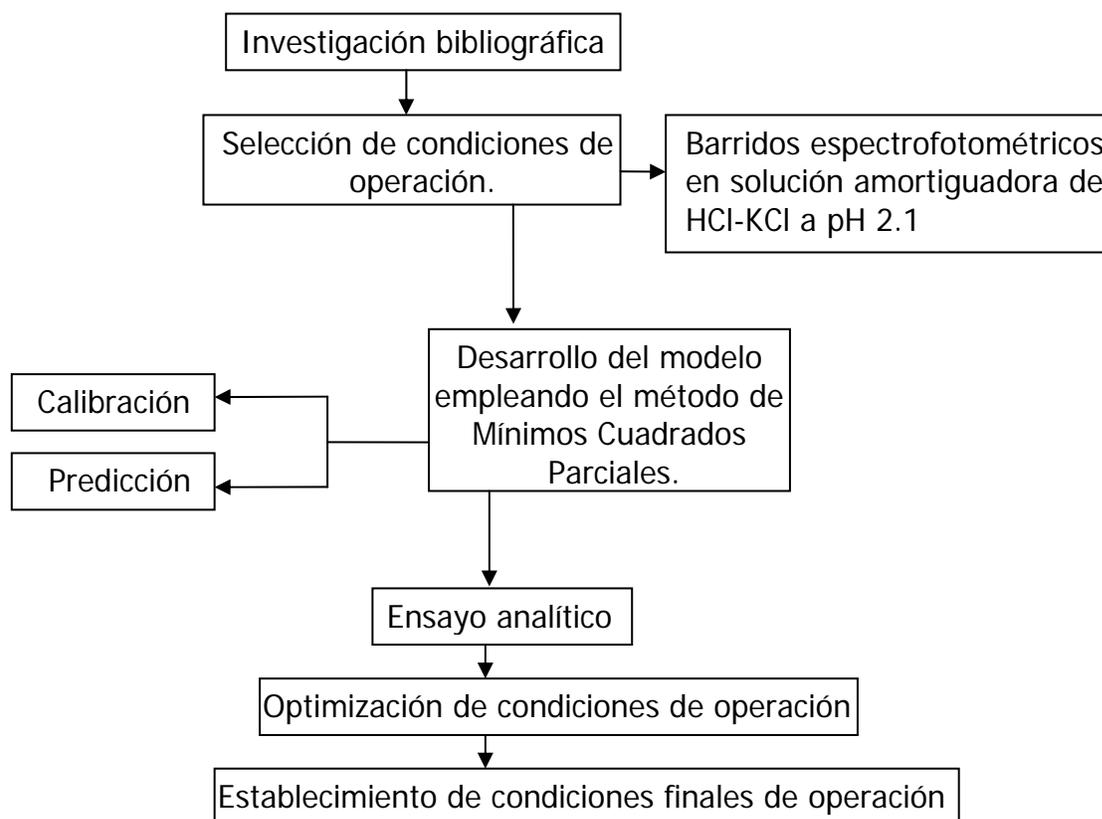


Figura 6. Diagrama de flujo del Desarrollo experimental.



## 2.2-SELECCIÓN DE LA REGION ESPECTRAL.

Con el propósito de establecer las condiciones espectrofotométricas adecuadas. Se realizó un barrido de 350nm a 200nm, en el cual obtuvieron los espectros de absorción de CAF (4.86mcg/mL), ASA (94.81mcg/mL) y una mezcla de ambos analitos en una solución amortiguadora de HCl-KCl a un pH de 2.1 Figura (7).

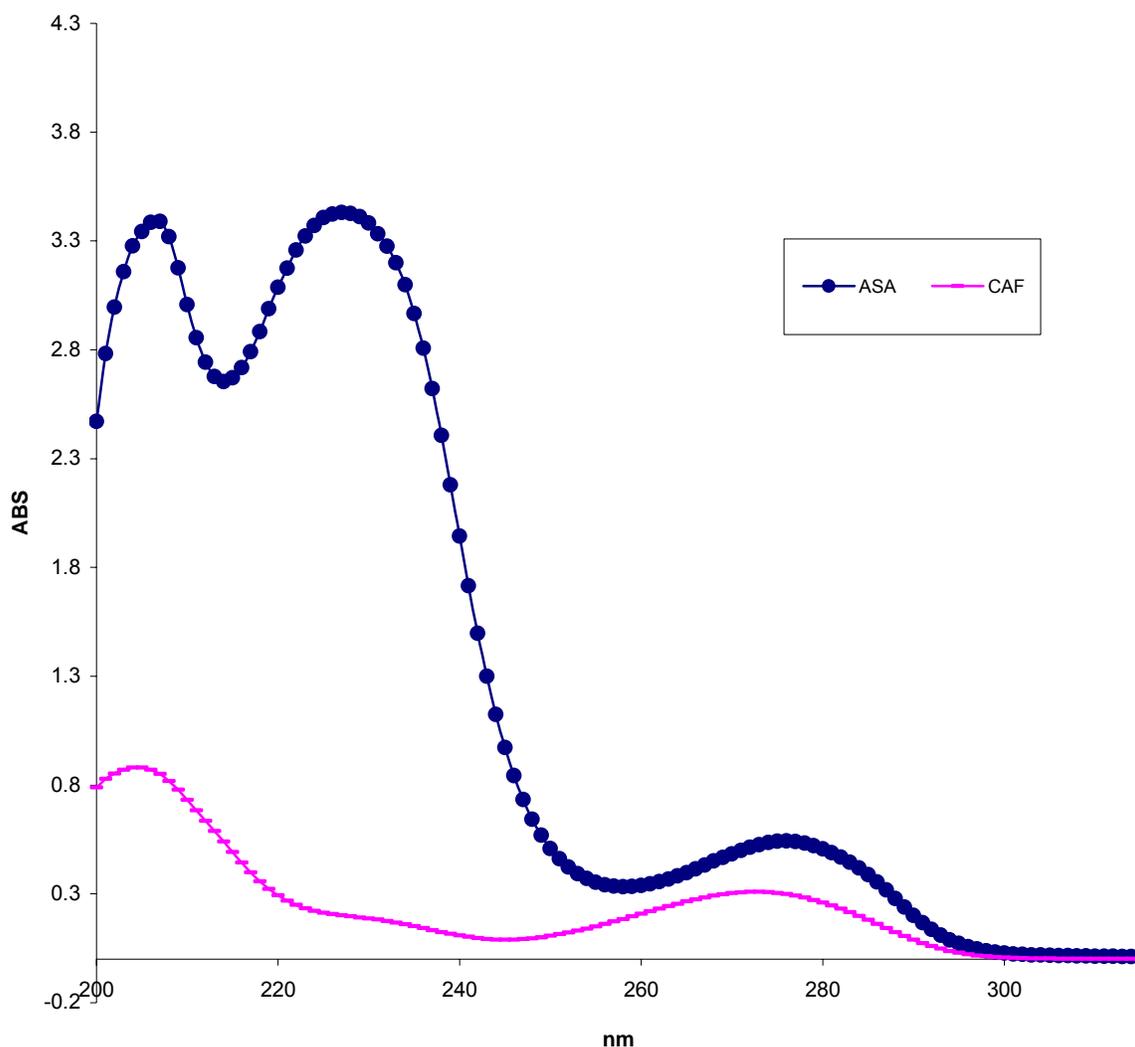


Figura 7. En este gráfico se muestra los espectros obtenidos de las soluciones de ASA (94.81mcg/mL), CAF (4.86mcg/mL), en una solución amortiguadora de HCl-KCl pH de 2.1.



## 2.3-DETERMINACION DE ADITIVIDAD, INTERFERENCIA, INTERACCIÓN.

Para determinar si existe aditividad obtenido por la mezcla de ASA-CAF, se comparó las absorbancias en mezcla contra la suma de los espectros individuales de ASA y CAF. Los espectros de ASA y CAF al ser sumados (Figura 8) presentaron el mismo espectro a lo largo de la región espectral entre 300 a 235nm, por lo que existe aditividad entre ASA y CAF en esta región. Excepto en la región de 235nm a 200nm donde se pierde la aditividad.

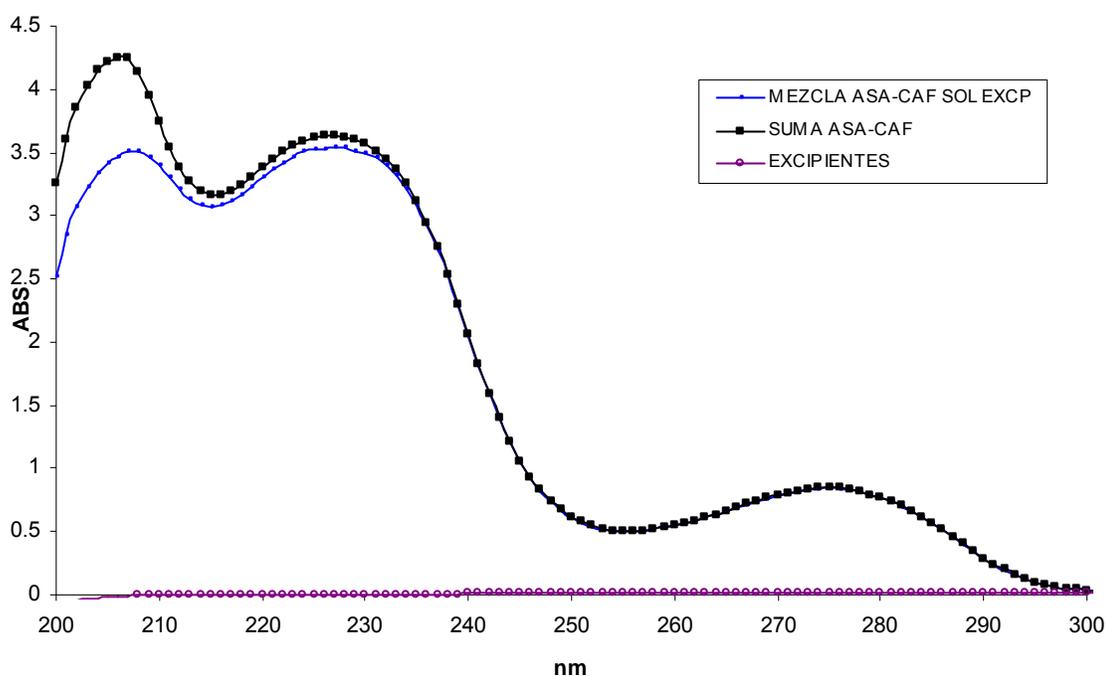


Figura 8. Gráfico se muestra los espectros obtenidos de la mezcla, de ASA (94.81mcg/mL) y CAF (4.86mcg/mL), en una solución de excipientes, en un rango espectral de 200-300nm en una solución amortiguadora de HCl-KCl pH de 2.1.

A su vez, se hicieron barridos de contraste, utilizando una solución de excipientes, los respectivos estándares de los analitos por separado y juntos en una solución de excipientes. Se realizaron los ajustes respectivos en el



espectrofotómetro para determinar si estos pueden interferir en la cuantificación de ASA y CAF, se obtuvieron los siguientes gráficos.

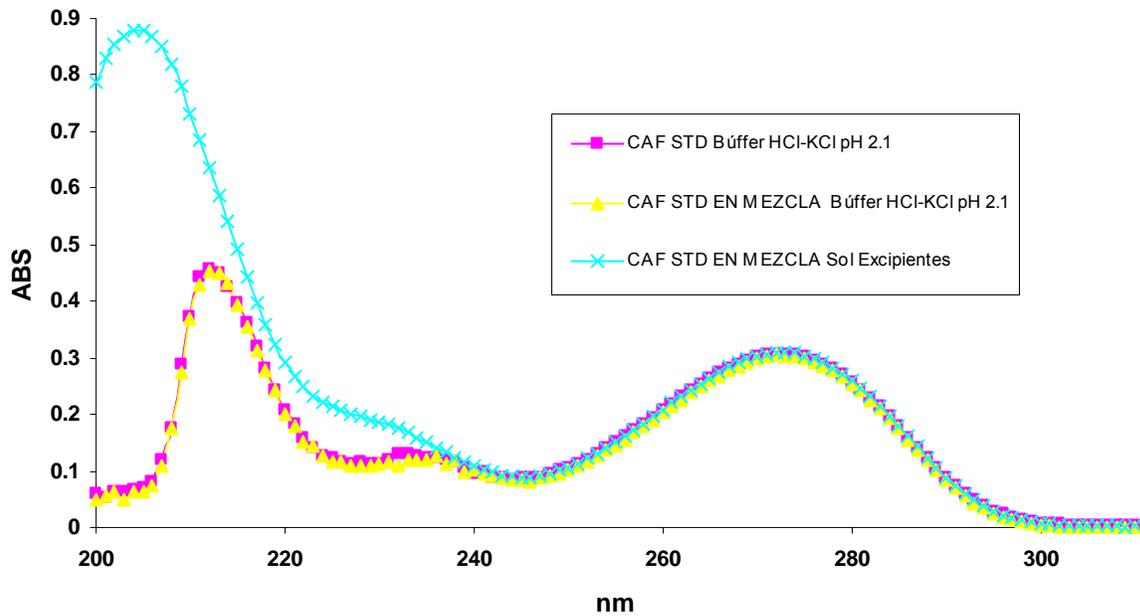


Figura 9.1 En estos gráficos se muestran los barridos de CAF std(4.86 mcg/mL) en buffer de HCl-KCl pH 2.1, la mezcla de CAF std (4.86 mcg/mL) y ASA std (94.81mcg/mL) en buffer de HCl-KCl pH 2 y la mezcla de CAF std (4.86 mcg/mL) y ASA std (94.81mcg/mL) en solución de excipientes.

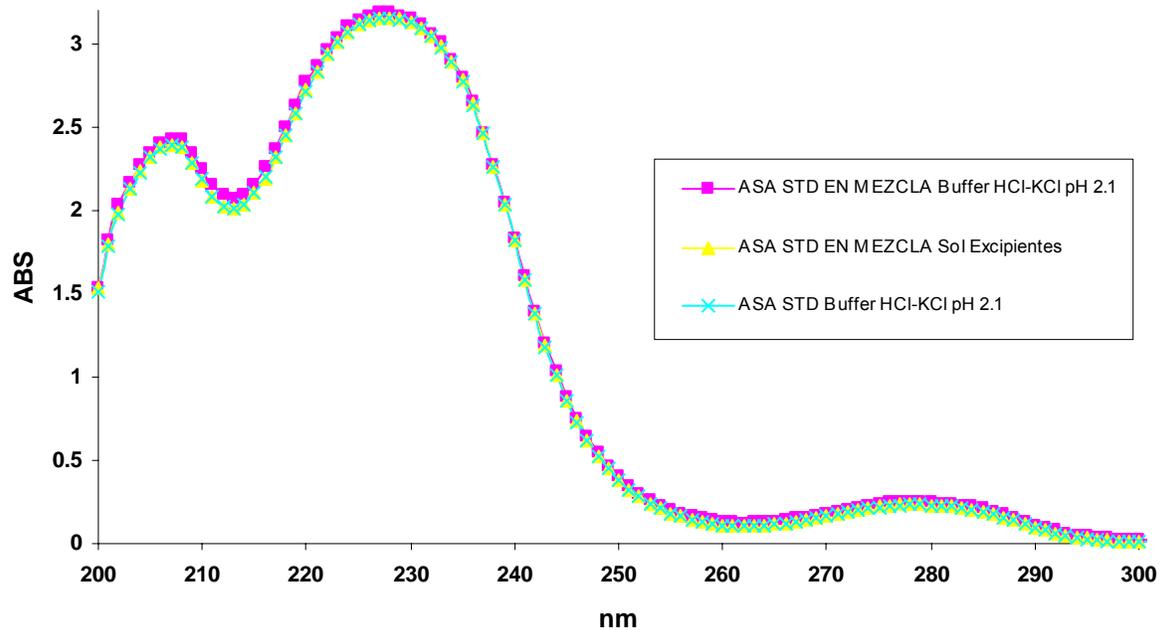


Figura 9.2 En estos gráficos se muestran los barridos de ASA std (94.81 mcg/mL) en buffer de HCl-KCl pH 2.1, la mezcla de CAF std (4.86 mcg/mL) y ASA std (94.81mcg/mL) en buffer de HCl-KCl pH 2 y la mezcla de CAF std (4.86 mcg/mL) y ASA std (94.81mcg/mL) en solución de excipientes.



---

---

Los espectros obtenidos en los gráficos anteriores, en la figura 9.1 se observa para CAF una interacción en la región de 234 a 200nm en la solución de excipientes, en la cual aumenta en la absorptividad en esta región. En la figura 9.2 que corresponde a ASA no se observa diferencias significativas a lo largo del espectro. Con esta información la región a utilizar será la de 290 a 2236nm.

## **2.4-DESARROLLO DE LA CALIBRACIÓN.**

### **2.4.1-Elección de las soluciones estándares.**

Una vez que elegimos la región espectral a trabajar, la cual fue de 290nm a 236nm a intervalos de 1 nm, fue necesario decidir el número de soluciones estándar a preparar y la concentración de las mismas. Nuestro objetivo fue cuantificar el contenido químico de dos analitos provenientes de tabletas. En la USP-NF XXVI (Farmacopea de los Estados Unidos de América) indica que el contenido químico de los analitos en esta forma farmacéutica debe estar entre el 90%–110% de lo que marca el marbete. Se propuso una calibración en la cual se incluía un intervalo del 60% al 140% pasando por un 80%, 100% y 120% de contenido químico de lo que indica el marbete. El 100% para ASA es de 500mg/TAB y el 100% de CAF es de 30mg/TAB. Con lo cual se tenían 5 puntos para cada analito, al realizar las posibles combinaciones entre las cinco concentraciones de ambos analitos se prepararon 25 soluciones estándar las cuales fueron leídas a 30 longitudes de onda (Ver Anexo A.2). Los valores de las concentraciones y de las absorbancias obtenidas se sometieron al análisis de Mínimos Cuadrados Parciales por medio del programa ISHEJA.



INTRODUZCA LOS DATOS DE LA CALIBRACIÓN														
Edición: Aguda														
	ASA	CAF	L ONDA 1	L ONDA 2	L ONDA 3	L ONDA 4	L ONDA 5	L ONDA 6	L ONDA 7	L ONDA 8	L ONDA 9	L ONDA 10	L ONDA 11	L ONDA 12
CONC. 1	56.7552	3.7128	0.1851	0.2561	0.3282	0.3906	0.4416	0.482	0.5114	0.5277	0.5285	0.5258	0.5123	0.4899
CONC. 2	56.7552	4.9504	0.2037	0.2829	0.3634	0.4334	0.4903	0.5365	0.57	0.588	0.5915	0.5897	0.5754	0.5519
CONC. 3	56.7552	6.188	0.229	0.3152	0.403	0.4807	0.5454	0.5976	0.6365	0.6584	0.6624	0.6609	0.6475	0.624
CONC. 4	56.7552	7.4256	0.2447	0.3394	0.4337	0.5172	0.5871	0.6453	0.689	0.7132	0.7179	0.7181	0.7038	0.6777
CONC. 5	56.7552	8.6632	0.2573	0.3567	0.4587	0.5506	0.626	0.6899	0.7388	0.765	0.7705	0.7704	0.7569	0.7299
CONC. 6	75.6736	3.7128	0.2342	0.322	0.41	0.4864	0.5471	0.5963	0.6306	0.6487	0.6495	0.6458	0.6276	0.5983
CONC. 7	75.6736	4.9504	0.2468	0.3417	0.438	0.5218	0.588	0.6428	0.6827	0.7044	0.7138	0.7054	0.6833	0.6532
CONC. 8	75.6736	6.188	0.2658	0.3685	0.4718	0.5623	0.6362	0.6965	0.7406	0.764	0.7679	0.7645	0.7454	0.7139
CONC. 9	75.6736	7.4256	0.2877	0.3985	0.5091	0.608	0.6899	0.7547	0.8052	0.8311	0.8342	0.8327	0.8138	0.7812
CONC. 10	75.6736	8.6632	0.2999	0.4164	0.5344	0.6386	0.7258	0.7969	0.8494	0.8793	0.8841	0.8832	0.8651	0.8302
CONC. 11	94.592	3.7128	0.2771	0.3835	0.4894	0.5781	0.6497	0.7074	0.7481	0.7677	0.7682	0.7631	0.7393	0.704
CONC. 12	94.592	4.9504	0.2948	0.4087	0.5212	0.6197	0.699	0.7622	0.8079	0.831	0.8321	0.8267	0.8037	0.767
CONC. 13	94.592	6.188	0.3104	0.4314	0.5519	0.6568	0.7422	0.8095	0.8593	0.8848	0.888	0.883	0.8589	0.8216
CONC. 14	94.592	7.4256	0.3274	0.454	0.5807	0.6927	0.7831	0.8585	0.911	0.939	0.9414	0.9393	0.9181	0.8793
CONC. 15	94.592	8.6632	0.3526	0.4832	0.6188	0.7368	0.8347	0.9127	0.9722	1.004	1.0097	1.0058	0.9825	0.9423
CONC. 16	113.5104	3.7128	0.3166	0.4387	0.5586	0.6617	0.7431	0.8073	0.8544	0.8759	0.8753	0.8685	0.8399	0.7984
CONC. 17	113.5104	4.9504	0.336	0.4666	0.596	0.7093	0.7975	0.868	0.9192	0.9434	0.9452	0.9388	0.9099	0.8671
CONC. 18	113.5104	6.188	0.353	0.4886	0.6266	0.7442	0.8379	0.9155	0.9704	0.9972	0.9996	0.9936	0.9653	0.9211
CONC. 19	113.5104	7.4256	0.3763	0.5206	0.6655	0.7919	0.8928	0.9764	1.035	1.0658	1.0694	1.0647	1.0369	0.9902
CONC. 20	113.5104	8.6632	0.3862	0.5363	0.6867	0.8187	0.927	1.0152	1.0789	1.1132	1.1158	1.1124	1.0833	1.0374
CONC. 21	132.4288	3.7128	0.3624	0.5029	0.641	0.7603	0.8531	0.9264	0.9797	1.0029	1.0022	0.9929	0.9605	0.912
CONC. 22	132.4288	4.9504	0.379	0.5262	0.6723	0.7969	0.8989	0.9756	1.0331	1.0603	1.0601	1.0526	1.0184	0.969
CONC. 23	132.4288	6.188	0.3967	0.5489	0.7001	0.8307	0.9351	1.0207	1.0807	1.1084	1.1114	1.1036	1.0706	1.0204
CONC. 24	132.4288	7.4256	0.4134	0.574	0.7335	0.8724	0.9847	1.0753	1.1407	1.1729	1.1745	1.1693	1.1366	1.085
CONC. 25	132.4288	8.6632	0.4357	0.6051	0.7739	0.9212	1.0409	1.1363	1.2067	1.2428	1.2454	1.2403	1.2069	1.1534

Tabla 3. Matriz de datos la cual consta de 25 concentraciones por 30 longitudes de onda. Es decir es una matriz de 25 x 30 la que se ocupa en nuestra calibración. Por razones de espacio faltan 18 longitudes de onda con sus respectivas absorbancias. Tabla extraída del programa ISHEJA.

Como primer paso, se eligió el número de factores óptimos para ASA y CAF empleando el gráfico de SCERP Figuras 10 y 11. En estos gráficos se buscó el punto donde hubo un cambio brusco en el descenso y se realizan las estimaciones en el programa, con el número de factor elegido para realizar las estimaciones de MCP.

# FACTORES	SCERP	
	ASA	CAF
h 1	582.250	64.402
h 2	216.300	5.868
h 3	9.668	0.114
h 4	4.792	0.068
h 5	4.371	0.051
h 6	2.933	0.030
h 7	2.424	0.013
h 8	1.695	0.009
h 9	1.100	0.005
h 10	0.788	0.004

Tabla 4. En la cual se muestran el SCERP para ASA y CAF con 10 factores.

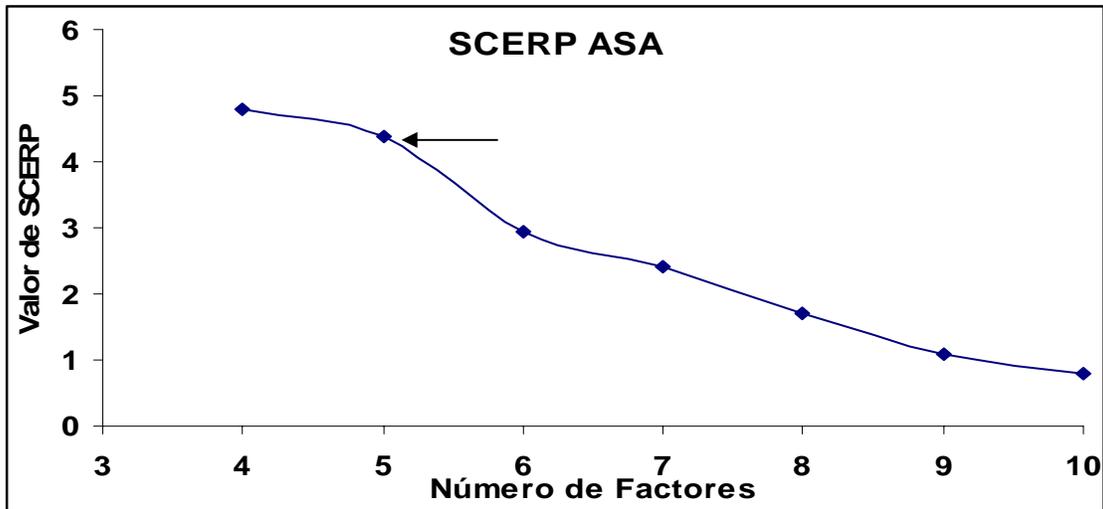


Figura 10. Gráfico del valor de SCERP de ASA contra el número de factores

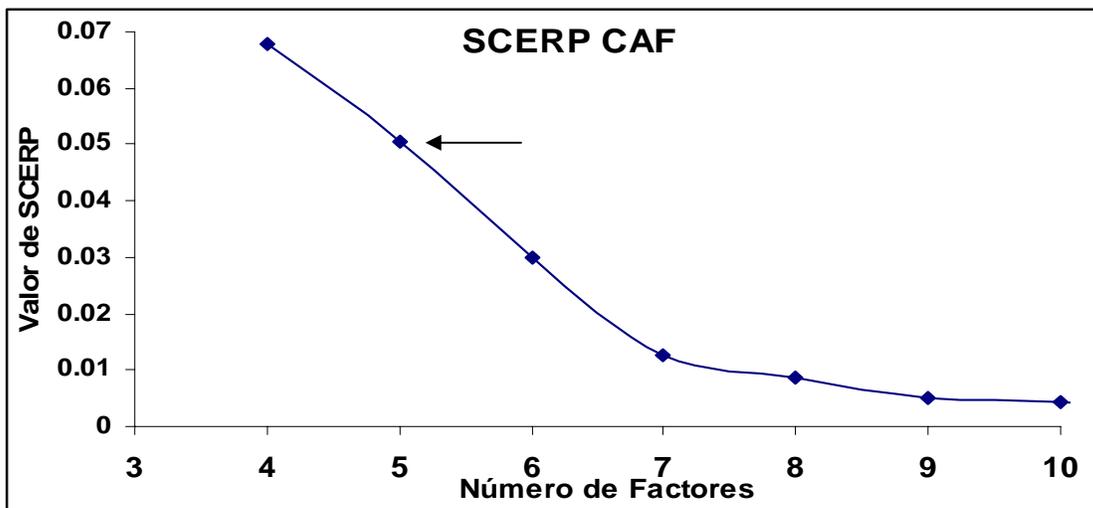


Figura 11. Gráfico del valor de SCERP de CAF contra el número de factores.

En las figuras 10 y 11, el número de factores óptimos obtenido fue de 5 tanto para ASA como para CAF respectivamente. Una vez elegido el factor fue necesario evaluar si no existieron muestras con un porcentaje de desviación mayor al 2% —debido a una mala preparación o a un error crasso— que pudiese causar la obtención de resultados erróneos. La determinación de muestras desechables se lleva a cabo empleando el programa de ISHEJA. En la tabla 5 se muestran los resultados. Las 25 concentraciones para ASA y CAF son menores al 2%.



CONC	MUESTRAS DESECHABLES	
	ASA	CAF
1	-0.42%	-1.99%
2	-0.43%	-0.40%
3	1.66%	1.34%
4	0.26%	0.37%
5	0.16%	-0.24%
6	-0.77%	-0.73%
7	-0.37%	1.46%
8	-0.20%	-0.39%
9	0.08%	0.50%
10	-1.47%	-0.54%
11	0.18%	-0.14%
12	0.93%	0.06%
13	0.83%	0.28%
14	-0.49%	-0.45%
15	0.26%	0.01%
16	-0.30%	-1.59%
17	0.30%	1.02%
18	-0.14%	0.08%
19	0.60%	0.50%
20	-1.03%	-0.32%
21	0.47%	1.57%
22	-0.34%	0.70%
23	-1.40%	-1.49%
24	0.03%	0.08%
25	1.01%	-0.05%

Tabla 5. En la cual se muestran las muestras desechables para ASA y CAF y en la cual se observan un porcentaje menor al 2 % para las 25 disoluciones.

A su vez se obtuvo un mejor coeficiente de correlación y un mejor coeficiente de variación con un factor de 5 (Tabla 6).

	# FACTOR 4		# FACTOR 5	
	ASA	CAF	ASA	CAF
REGRESIÓN	ASA	CAF	ASA	CAF
PROMEDIO	1	1	1	1
DESVEST	0.0026	0.00274	0.00232	0.00244
C.V.	0.26009	0.27438	0.23179	0.24413
INTERCEPTO	0.0262	0.00252	0.02097	0.00193
PENDIENTE	0.99972	0.99959	0.99978	0.99968
COEF.CORR.	0.99972	0.99959	0.99978	0.99968

Tabla 6. En esta tabla podemos notar que en tenemos un mejor coeficiente de correlación y un mejor coeficiente de variación con un factor de 5 para ambos analitos que con el factor 4.



## 2.4.2-Evaluación de la Calibración.

La linealidad del sistema se evaluó por medio de la estimación de la concentración de 25 diferentes disoluciones de mezclas de ASA y CAF, las cuales fueron preparadas a partir de soluciones stock de cada analito (Tabla 7).

SISTEMA	Conc de ASA (mcg/mL)	Conc. de cafeína (mcg/mL)	Conc total (mcg/mL)	Fracción de ASA	Fracción de CAF
1	56.4	8.4	64.8	0.87	0.13
2	56.4	7.2	63.6	0.89	0.11
3	56.4	6	62.4	0.90	0.09
4	56.4	4.8	61.2	0.92	0.07
5	56.4	3.6	60	0.94	0.06
6	75.2	8.4	83.6	0.90	0.13
7	75.2	7.2	82.4	0.91	0.11
8	75.2	6	81.2	0.93	0.09
9	75.2	4.8	80	0.94	0.07
10	75.2	3.6	78.8	0.95	0.06
11	94	8.4	102.4	0.92	0.13
12	94	7.2	101.2	0.93	0.11
13	94	6	100	0.94	0.09
14	94	4.8	98.8	0.95	0.07
15	94	3.6	97.6	0.96	0.06
16	112.8	8.4	121.2	0.93	0.13
17	112.8	7.2	120	0.94	0.11
18	112.8	6	118.8	0.95	0.09
19	112.8	4.8	117.6	0.96	0.07
20	112.8	3.6	116.4	0.97	0.06
21	131.6	8.4	140	0.94	0.13
22	131.6	7.2	138.8	0.95	0.11
23	131.6	6	137.6	0.96	0.09
24	131.6	4.8	136.4	0.96	0.07
25	131.6	3.6	135.2	0.97	0.06

Tabla 7. En esta tabla se presenta las concentraciones teóricas y proporciones de la calibración la cual fue utilizada en la calibración multivariante.



CONC REAL		CONC ESTIMADA		NORMALIZACIÓN	
ASA (mcg/mL)	CAF (mcg/mL)	ASA (mcg/mL)	CAF (mcg/mL)	ASA	CAF
56.7552	3.7128	56.5931	3.6626	0.9971	0.9865
56.7552	4.9504	56.5731	4.9354	0.9968	0.9970
56.7552	6.188	57.419	6.2474	1.0117	1.0096
56.7552	7.4256	56.8531	7.4445	1.0017	1.0025
56.7552	8.6632	56.82	8.6509	1.0011	0.9986
75.6736	3.7128	75.2752	3.6924	0.9947	0.9945
75.6736	4.9504	75.6024	5.0013	0.9991	1.0103
75.6736	6.188	75.5597	6.1692	0.9985	0.9970
75.6736	7.4256	75.7104	7.4536	1.0005	1.0038
75.6736	8.6632	74.943	8.6313	0.9903	0.9963
94.592	3.7128	94.7166	3.7082	1.0013	0.9988
94.592	4.9504	95.2803	4.9519	1.0073	1.0003
94.592	6.188	95.2358	6.2029	1.0068	1.0024
94.592	7.4256	94.2295	7.3993	0.9962	0.9965
94.592	8.6632	94.7148	8.6621	1.0013	0.9999
113.5104	3.7128	113.335	3.6807	0.9985	0.9914
113.5104	4.9504	113.6927	4.9806	1.0016	1.0061
113.5104	6.188	113.3897	6.1925	0.9989	1.0007
113.5104	7.4256	114.0109	7.453	1.0044	1.0037
113.5104	8.6632	112.8983	8.6492	0.9946	0.9984
132.4288	3.7128	132.8637	3.7533	1.0033	1.0109
132.4288	4.9504	132.1491	4.964	0.9979	1.0027
132.4288	6.188	131.1067	6.1214	0.9900	0.9892
132.4288	7.4256	132.5173	7.4322	1.0007	1.0009
132.4288	8.6632	133.3109	8.66	1.0067	0.9996

Tabla 8. Concentración real y respuestas analíticas obtenidas por el método de MCP.

Debido a la gran cantidad de puntos en la curva de calibración se decidió trabajar estas concentraciones sin duplicado (Tabla 8). A continuación en las figuras 12 y 13 y en las tablas 9 y 10 se muestran los resultados estadísticos obtenidos en la calibración.

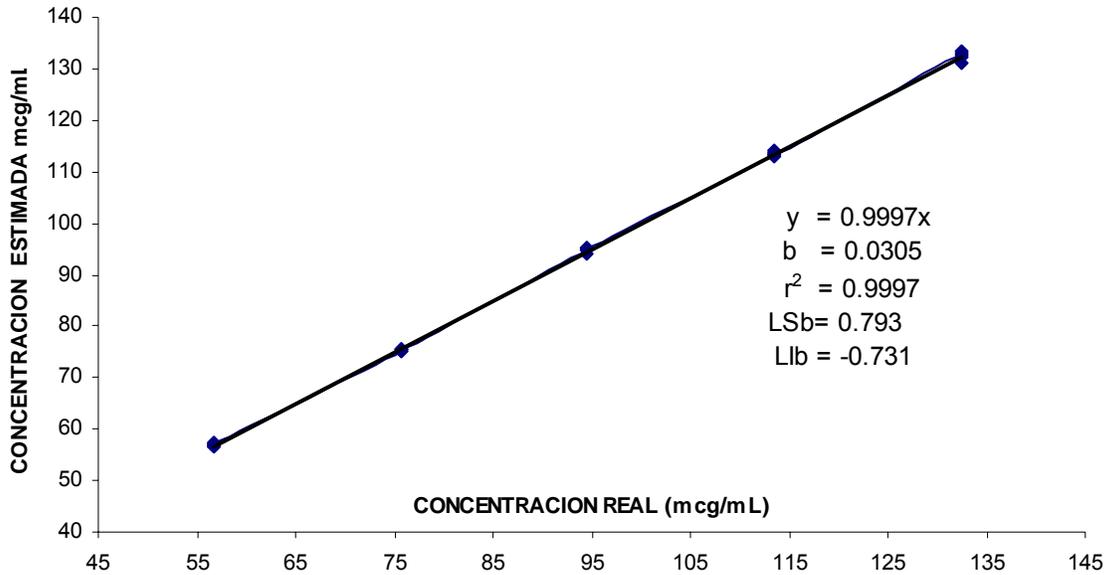


Figura 12. Gráfico de concentración estimada contra la concentración real para ASA aplicando el método de MCP.

	<i>gl</i>	<i>SM</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>F CRITICA</i>
Regresión	1	17883.74322	17883.74322	71174.59787	1.18288E-41
Residuos	23	5.77911	0.25127		
Total	24	17889.52233			

Tabla 9. Resultados del análisis de variancia para ASA considerando un nivel de significancia del 95%.

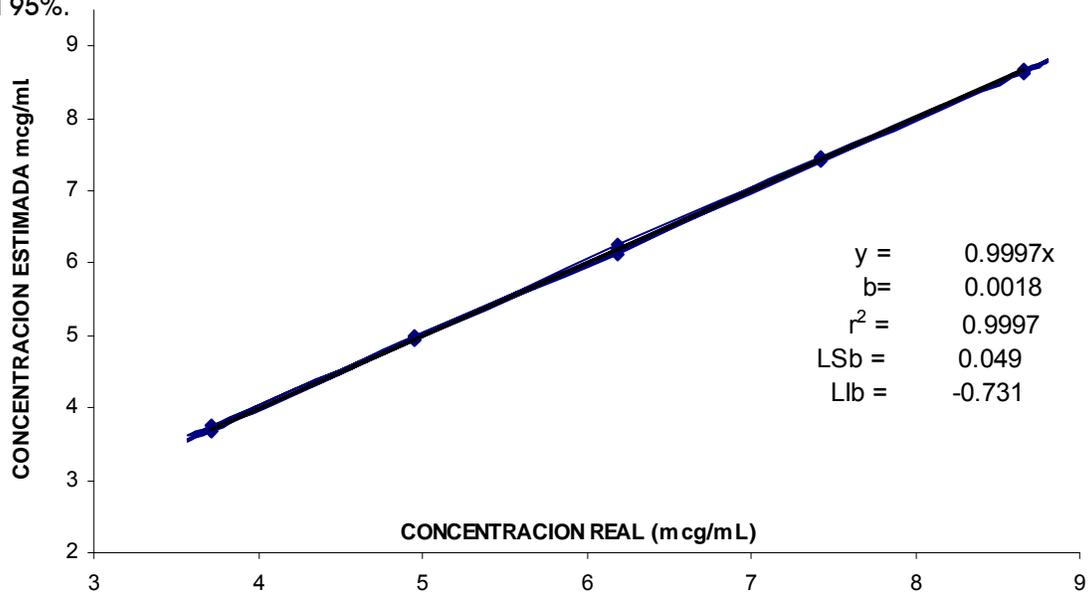


Figura 13. Gráfico de concentración estimada contra la concentración real para CAF aplicando el método de MCP.



---

---

	<i>GI</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>F CRITICA</i>
Regresión	1	76.53814	76.53814	79655.83710	3.2422E-42
Residuos	23	0.02210	0.00096		
Total	24	76.56024			

Tabla 10. Resultados del análisis de variancia para CAF considerando un nivel de significancia del 95%.

En las figuras 12 y 13, la concentración real contra la respuesta analítica obtenida se observa la tendencia lineal tanto de ASA como de CAF. Los análisis de variancia efectuados tablas (9 y 10), arrojaron una *f* calculada mayor que su *f* crítica en todos los casos, con lo que se demuestra que existe una relación lineal entre la concentración real y su respuesta analítica obtenida, para ambos analitos. Por lo tanto, con las 25 soluciones estándar preparadas se obtiene una buena capacidad predictiva, por lo que con ellas se conformó la matriz de calibración para el método de calibración multivariante.

Con el fin de determinar las longitudes de onda que pueden ser eliminadas, y reducir tiempos en la lectura de muestras y estándares, se obtuvo el gráfico de coeficiente de regresión final estandarizado (*kw*) contra la longitud de onda (Figura 14).

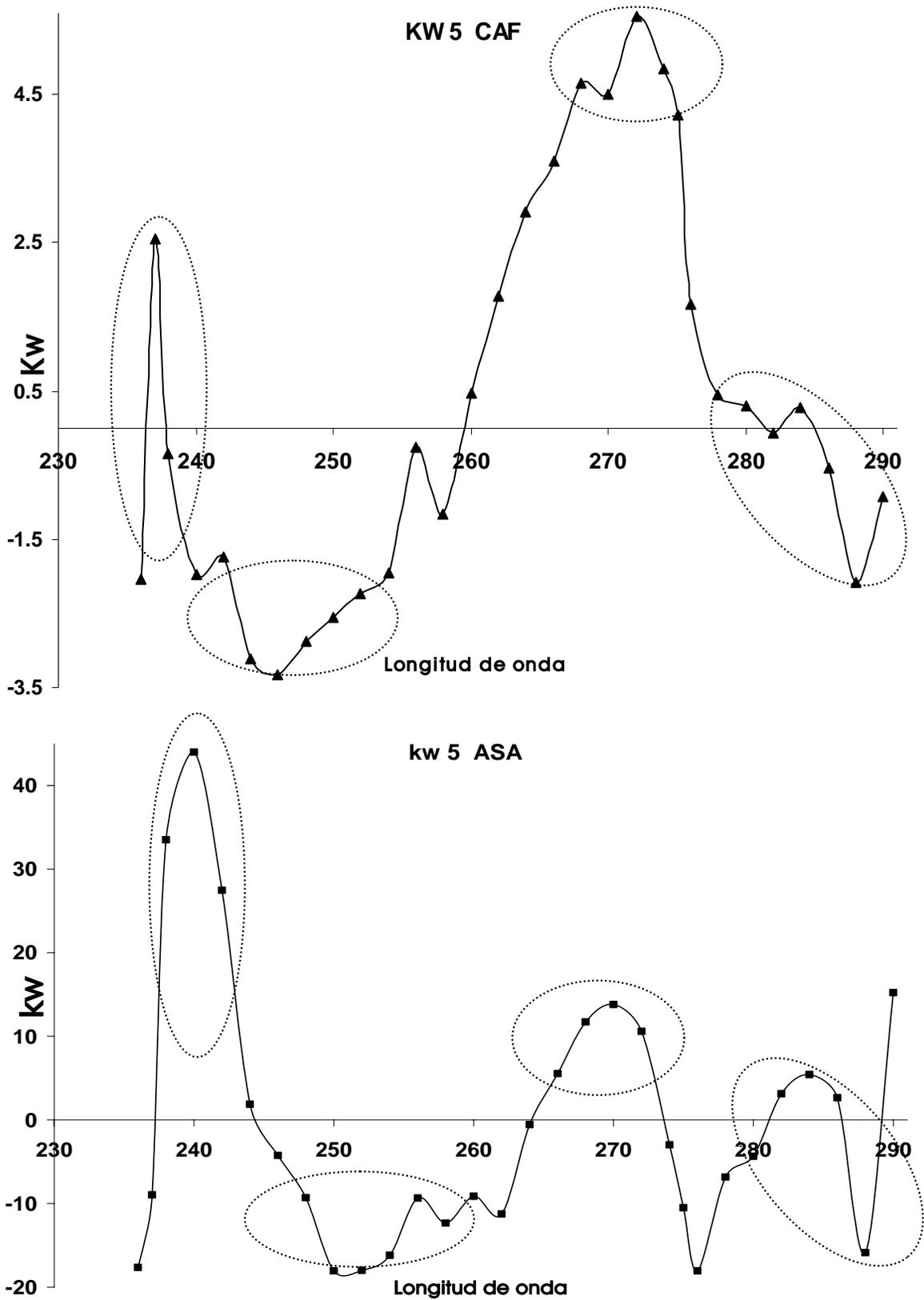


Figura 14. Gráfico del valor de Kw contra la longitud de onda para ASA y CAF.



---

---

En este gráfico para ambos analitos el Kw fue obtenido con el número de factores de  $h=5$ . El trazo de ASA tiene algunas similitudes con el de CAF, estas se muestran en las gráficas con círculos. Debido a la magnitud muy pequeña de Kw de CAF no es posible superponerlo en la gráfica de ASA. Con esta información se procedió a realizar estimaciones con diferentes combinaciones de longitudes de onda. Con lo que se tuvieron mejores estimaciones con 30 longitudes de onda originales.

#### **2.4.3-PRECISIÓN Y EXACTITUD DE LA CALIBRACIÓN.** <sup>22,23</sup>

La precisión y exactitud de la calibración se evaluó mediante la estimación de la concentración de cinco diferentes soluciones de CAF y ASA. Cada solución se preparó por sextuplicado. En la tabla 11, se muestran los porcentajes estimados por el método de MCP en cada una de las cinco soluciones empleadas así como las concentraciones utilizadas de ASA y CAF.



ASA mcg/mL	CAFmcg/mL	PORCENTAJES DE RECOBR					t CRÍTICA	
		ASA	CAF		ASA	CAF	ASA	CAF
113.4336	4.9152	100.14	99.60	120%-80%	ASA	CAF	2.57	
		99.98	99.57	PROM	99.88	100.19		
		100.34	99.54	DEST	0.35	0.75		
		99.77	100.21	CV	0.35	0.75		
		99.64	101.14	TCALC	-0.356	0.247		
		99.39	101.05					
113.4336	7.3728	99.82	100.27	120%-120%	ASA	CAF		
		100.70	100.30	PROM	100.09	99.90		
		100.07	100.29	DEST	0.36	0.51		
		100.27	99.88	CV	0.36	0.51		
		99.69	99.02	TCALC	0.260	-0.205		
		100.01	99.61					
94.528	6.144	99.90	99.74	100%-100%	ASA	CAF		
		100.08	99.79	PROM	100.05	99.97		
		100.31	99.93	DEST	0.24	0.22		
		100.27	100.02	CV	0.24	0.22		
		99.67	99.97	TCALC	0.203	-0.144		
		100.06	100.36					
75.6224	4.9152	100.35	99.71	80%-80%	ASA	CAF		
		100.06	99.56	PROM	100.14	99.86		
		100.19	99.80	DEST	0.27	0.23		
		99.64	100.19	CV	0.27	0.23		
		100.30	99.85	TCALC	0.533	-0.613		
		100.32	100.05					
75.6224	7.3728	99.77	100.33	80%-120%	ASA	CAF		
		99.52	100.14	PROM	99.84	100.10		
		100.02	100.04	DEST	0.25	0.16		
		99.64	99.98	CV	0.25	0.16		
		99.89	99.90	TCALC	-0.641	0.642		
		100.20	100.23					

Tabla 11. Se muestra las estimaciones para ASA y CAF. Así como los parámetros determinados (medias, CV's, y t calculadas) en los diversos niveles de concentración de los dos analitos para evaluar la precisión y exactitud del sistema.

Como podemos observar en la tabla 11 las estimaciones de ASA y CAF son muy cercanos al 100% para todas las concentraciones, mientras los CV's son menores al 1% por lo cual podemos decir que el sistema es preciso. Por otra parte se evaluó la exactitud, calculando la t de student, como la t calculada es menor que la t crítica con un nivel de confianza del 95% se puede afirmar que el sistema es exacto para las cinco concentraciones utilizadas.



## 2.5-EVALUACIÓN DEL MÉTODO CON MEZCLAS FÍSICAS. <sup>24,25,26</sup>

Se emplearon mezclas físicas, antes de realizar placebos cargados. Es decir los excipientes mezclados junto con los activos a una concentración conocida (Tabla 12). A continuación se da una breve explicación de los ensayos en mezclas físicas (Ver Anexo A.6-A.7), estas fueron preparadas inicialmente a una concentración del 100%, y se utilizaron los siguientes activos y excipientes:

- ❖ Lactosa Spray Dried
- ❖ Celulosa microcristalina
- ❖ Ácido esteárico
- ❖ Cafeína
- ❖ Aspirina

Uso	Componentes	PORCENTAJE (%)
P. Activo	Aspirina	76.92
P. Activo	Cafeína	4.62
EXCIPIENTES	Lactosa, Celulosa, Ac Estearico	18.46
	Total	100

Tabla 12. Porcentajes de excipientes y activos utilizados en mezclas físicas al 100% de ASA y CAF.

En la tabla 13 se muestran las estimaciones de los ensayos por sextuplicado de ASA y CAF en mezcla físicas en una proporción del 100%.

SISTEMA	mg REALES		mg ESTIMADOS		ESTIMACIONES	
	ASA mg	CAF mg	CAF mg	ASA mg	ASA	CAF
1	237.40	15.62	15.74	232.83	98.08	100.78
2	235.72	16.01	16.74	233.47	99.05	104.54
3	235.53	15.49	15.33	235.52	100.00	98.99
4	239.94	15.60	16.24	235.54	98.17	104.11
5	235.11	15.09	15.51	240.62	102.34	102.75
6	238.04	15.40	15.49	238.20	100.07	100.58
				PROM	99.62	101.96
				DEST	1.59	2.19
				CV	1.59	2.15
				TCALC	-0.24	0.89

TABLA 13. En esta tabla se muestran las estimaciones de las mezclas físicas así como la t calculada a una proporción del 100% para ambos activos.



Como podemos observar el CV para ASA y CAF está dentro de la especificación (se acepta un CV no mayor 3 cuando es de 2 analitos), es decir es preciso, el promedio de los ensayos es casi del 100% y la t calculada es menor de +/- 2.57 con lo cual los resultados son exactos. Con estos resultados nos dan pauta para realizar una calibración de mezclas físicas en distintos porcentajes. A continuación presento los resultados de esta calibración (Tabla 14).

%	EXP (mg)	C REAL ASA(mg)	C EST ASA(mg)	C REAL CAF(mg)	C EST CAF(mg)	% DE RECOBRO	
						ASA	CAF
80-120	105.23	189.71	188.40	18.05	17.94	99.31	99.38
80-120	106.66	188.05	188.29	18.25	18.15	100.13	99.40
80-120	100.47	188.91	190.55	25.48	25.36	100.87	99.55
90-110	78.70	211.19	213.50	16.90	16.77	101.09	99.20
90-110	79.64	212.27	213.20	16.71	16.58	100.44	99.20
90-110	80.03	212.43	211.40	16.74	16.70	99.52	99.79
100-100	56.49	236.69	234.46	15.25	15.40	99.06	100.95
100-100	57.15	237.11	235.57	15.40	15.47	99.35	100.46
100-100	56.09	236.66	236.38	19.35	19.59	99.88	101.22
110-90	34.23	259.27	257.38	14.12	14.26	99.27	100.98
110-90	34.74	259.98	258.12	14.68	14.66	99.29	99.84
110-90	36.24	259.17	254.13	13.93	14.01	98.05	100.54
120-80	11.60	282.72	281.49	13.10	13.05	99.57	99.73
120-80	12.34	284.44	281.86	12.42	12.52	99.09	100.82
120-80	14.10	283.18	280.68	13.33	13.25	99.12	99.42
					PROM	99.60	100.03
					DEST	0.78	0.72
					CV	0.78	0.72

Tabla 14. Porcentajes de recobro de las mezclas físicas de ASA y CAF Se tiene como resultado un CV menor a 1 y el promedio para ambos es casi 100%.



Concentración estimada de ASA en mezclas físicas en función de la concentración realmente añadida.

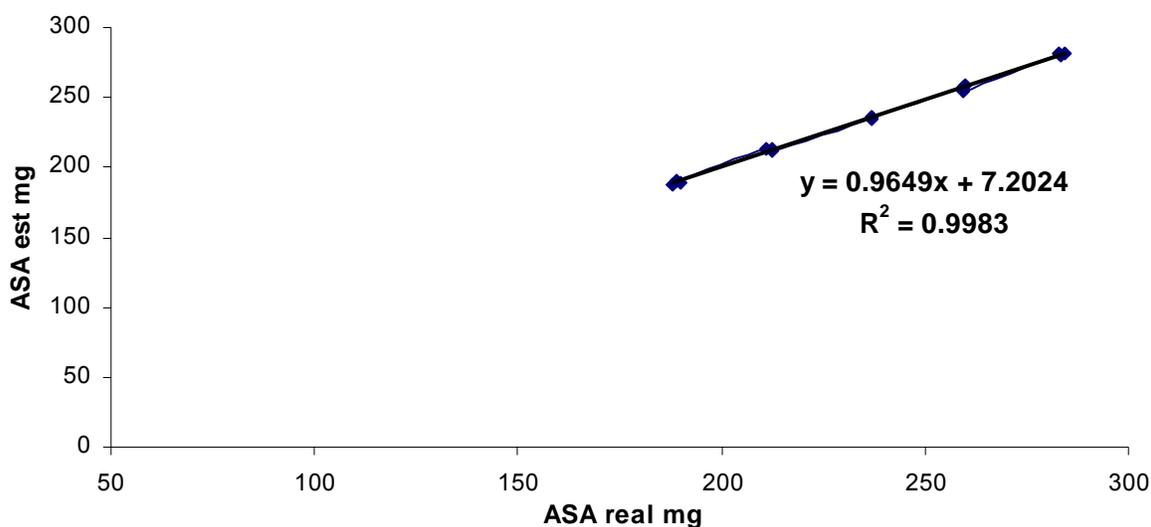


Figura 15. En este gráfico se muestra la concentración real de ASA y la concentración estimada de ASA contenido en mezclas físicas.

Concentración estimada de CAF en mezclas físicas en función de la concentración realmente añadida.

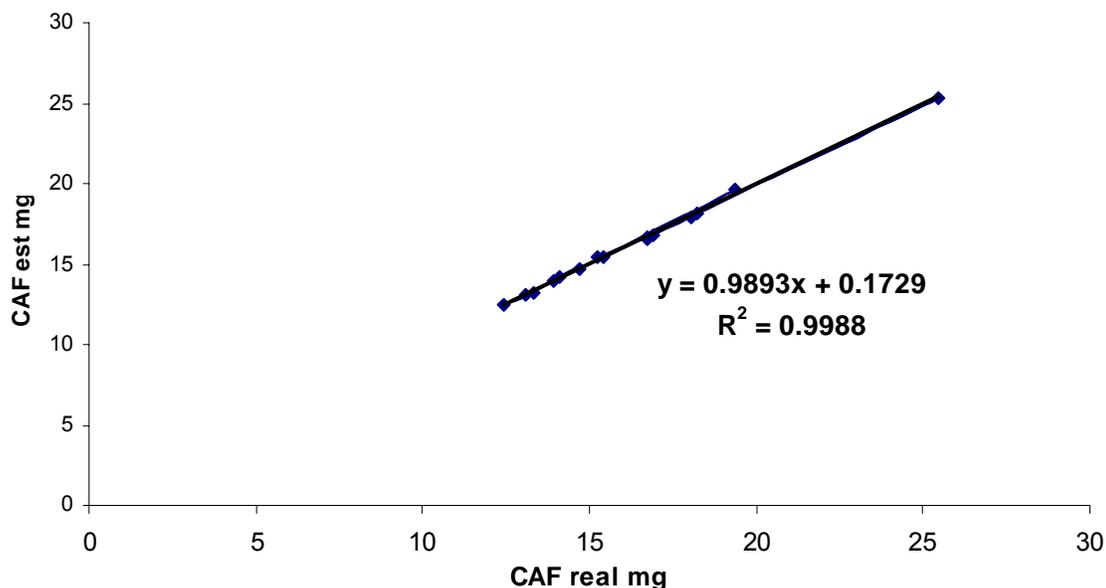


Figura 16. En este gráfico se muestra la concentración real de ASA y la concentración estimada de ASA contenido en mezclas físicas.



---

---

Para ambos analitos se obtuvieron estimaciones casi del 100% con un CV por debajo de 1, y un coeficiente de correlación casi de 1 en todas las diferentes proporciones, con lo que se demuestra que el método de Mínimos Cuadrados Parciales es capaz de cuantificar ASA y CAF con confiabilidad en mezclas físicas.

## **2.6-EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO CON PLACEBOS CARGADOS.**

Cada día que se hacían los ensayos, se realizaba una calibración para minimizar los errores del día. Las propiedades físicas de los placebos cargados se obtuvieron haciendo caracterizaciones del innovador (Cafiasprina® de Bayer®): se midió el peso, longitud, espesor, tensión de la ruptura, de varios lotes de tabletas del innovador. No solamente estas características requerimos para su fabricación, hay algo sumamente importante que hace falta, esto es, los excipientes que componen la tableta.

Para evaluar la linealidad del método, se requiere realizar ensayos en placebos cargados, (tabletas con una concentración conocida), para someterlas al ensayo; se prepararon lotes de 30 tabletas.

La composición de la tableta del innovador la desconocemos, por lo cual se propuso, de acuerdo a las características de los activos, una formulación. Los excipientes se seleccionaron de acuerdo a que tuvieran compatibilidad con los activos, para lo cual se empleo, una lactosa (aglutinante), el estearato de magnesio (lubricante), y celulosa (diluyente).

Se fabricó un lote de 30 tabletas a una primera proporción de 100% de ASA y 100% de CAF, lo equivalente a una tableta de Cafiaspirina®. Una vez preparados los comprimidos, se trituraron las tabletas, y el polvo fue sometido a



un ensayo por sextuplicado (Ver Anexo A.4-A.5). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 15.

mg polvo TAB	Prediccion MCP	Factor 5	
		ASA	CAF
306.54	3	92.5533	6.2313
306.48	2	93.1677	6.217
306.63	5	92.4199	6.2699
306.45	4	92.3812	6.4491
306.49	1	92.8986	6.4056
306.37	6	91.5842	6.6305

<b>Contenido de ASA mg lote 13ABR05</b>	500.4
<b>Contenido de CAF mg lote 13ABR05</b>	33.5
<b>Peso promedio mg/TAB lote 13abr05</b>	652.909
<b>Factor Dilución</b>	2500

Para obtener el resultado analítico se hace lo siguiente:

Resultado analítico  
 **$(\text{Prediccion MCP}/1000 * \text{FD}) / \text{mg polvo TAB} * \text{Peso prom TAB}$**

Ejemplo para la 1a predicción de ASA

Resultado analítico  
 $(92.5533/1000 * 2500) / 306.54 * 652.909$

Resultado analítico  
 492.83032

Y se realiza de las misma forma para obtener el resultado analítico de ASA y CAF

	ASA mg /TAB	CAF mg/TAB
	492.8304	33.1806
	496.1991	33.1109
	491.9756	33.3763
	492.0585	34.3504
	494.7498	34.1143
	487.9407	35.3259
<b>PROM</b>	492.6257	33.9097
<b>DEST</b>	2.8290	0.8597
<b>CV</b>	0.5743	2.5354
<b>T CALC</b>	-2.7481	0.4766

Tabla 15. En esta tabla se muestran los resultados para placebos cargados para una proporción de 100% ASA 100% CAF.



Al analizar estos resultados, tenemos que CAF es precisa CV menor a 3 y exacta t calc menor a 2.57, en cambio ASA es precisa pero no es exacta su t calc es mayor a 2.57. Aún con estos resultados podemos decir que estamos cuantificando ambos analitos ASA y CAF confiablemente. Tener estos parámetros, dió la pauta para preparar placebos a las demás concentraciones tabla 16 y evaluar la linealidad del método.

80% -120%				
Uso	Componentes	Porcentaje	Peso/Tab (mg)	Peso 30 Tab (g)
P.A	Aspirina	61.5384615	400	12
P.A	Cafeína	5.53846154	36	1.08
EXCIPIENTES	Almidón, Avicel, Ac Estearico	32.9230769	214	6.42
	Total	100	650	

120% -80%				
Uso	Componentes	Porcentaje	Peso/Tab (mg)	Peso 30 Tab (g)
P.A	Aspirina	92.3076923	600	18
P.A	Cafeína	3.69230769	24	0.72
EXCIPIENTES	Almidón, Avicel, Ac Estearico	4	26	0.78
	Total	100	650	

90% -110%				
Uso	Componentes	Porcentaje	Peso/Tab (mg)	Peso 30 Tab (g)
P.A	Aspirina	69.2307692	450	13.5
P.A	Cafeína	5.07692308	33	0.99
EXCIPIENTES	Almidón, Avicel, Ac Estearico	25.6923077	167	5.01
	Total	100	650	

110% -90%				
Uso	Componentes	Porcentaje	Peso/Tab (mg)	Peso 30 Tab (g)
P.A	Aspirina	84.6153846	550	16.5
P.A	Cafeína	4.15384615	27	0.81
EXCIPIENTES	Almidón, Avicel, Ac Estearico	11.2307692	73	2.19
	Total	100	650	

100% -100%				
Uso	Componentes	Porcentaje	Peso/Tab (mg)	Peso 30 Tab (g)
P.A	Aspirina	76,92	500	15
P.A	Cafeína	4,62	30	0.9
EXCIPIENTES	Almidón, Avicel, Ac Estearico	18.46	119.99	3.5997
	Total	100	650	

Tabla 16. Porcentajes de los componentes de los placebos cargados en sus cinco concentraciones cada proporción es el tamaño para 30 Tabletas.



Se prepararon placebos cargados en cinco concentraciones diferentes ver (Anexo A.5), de las cuales se procedió a someterlas al ensayo, cada concentración por triplicado. La forma de preparación de los placebos cargados así como de ensayo se encuentra en el ANEXO A.5.1, A.5.2

% Placebos Cargados	Contenido Real		Prom mg/TAB	mg polvo Ensayo	Respuesta Analítica		Resultado analítico	
	ASA mg/TAB	CAF mg/TAB			ASA (mcg/mL)	CAF (mcg/mL)	ASA (mg/TAB)	CAF (mg/TAB)
ASA-CAF								
80-120	400.02	36.14	650.27	306.64	77.11	7.19	408.82	38.11
80-120	400.02	36.14	650.27	306.60	76.57	7.09	406.00	37.59
80-120	400.02	36.14	650.27	306.80	75.37	6.98	399.36	37.00
90-110	450.06	33.16	649.92	306.51	87.04	6.54	461.09	34.66
90-110	450.06	33.16	649.92	306.58	86.55	6.80	458.55	36.04
90-110	450.06	33.16	649.92	306.67	87.24	6.53	461.79	34.57
100-100	500.20	30.03	650.26	306.42	95.97	5.92	508.97	31.41
100-100	500.20	30.03	650.26	306.74	96.18	5.81	509.99	30.81
100-100	500.20	30.03	650.26	306.53	95.36	6.07	505.49	32.18
110-90	550.18	27.31	650.69	306.76	105.49	5.41	559.43	28.71
110-90	550.18	27.31	650.69	307.23	105.65	5.22	559.39	27.64
110-90	550.18	27.31	650.69	306.73	105.63	5.44	560.21	28.84
120-80	600.26	26.14	650.64	306.72	113.90	5.11	604.61	27.11
120-80	600.26	26.14	650.64	306.67	115.52	4.70	612.57	24.94
120-80	600.26	26.14	650.64	306.94	114.18	5.00	605.90	26.54

Tabla 17. Estimaciones de los placebos cargados de tabletas de ASA y CAF.

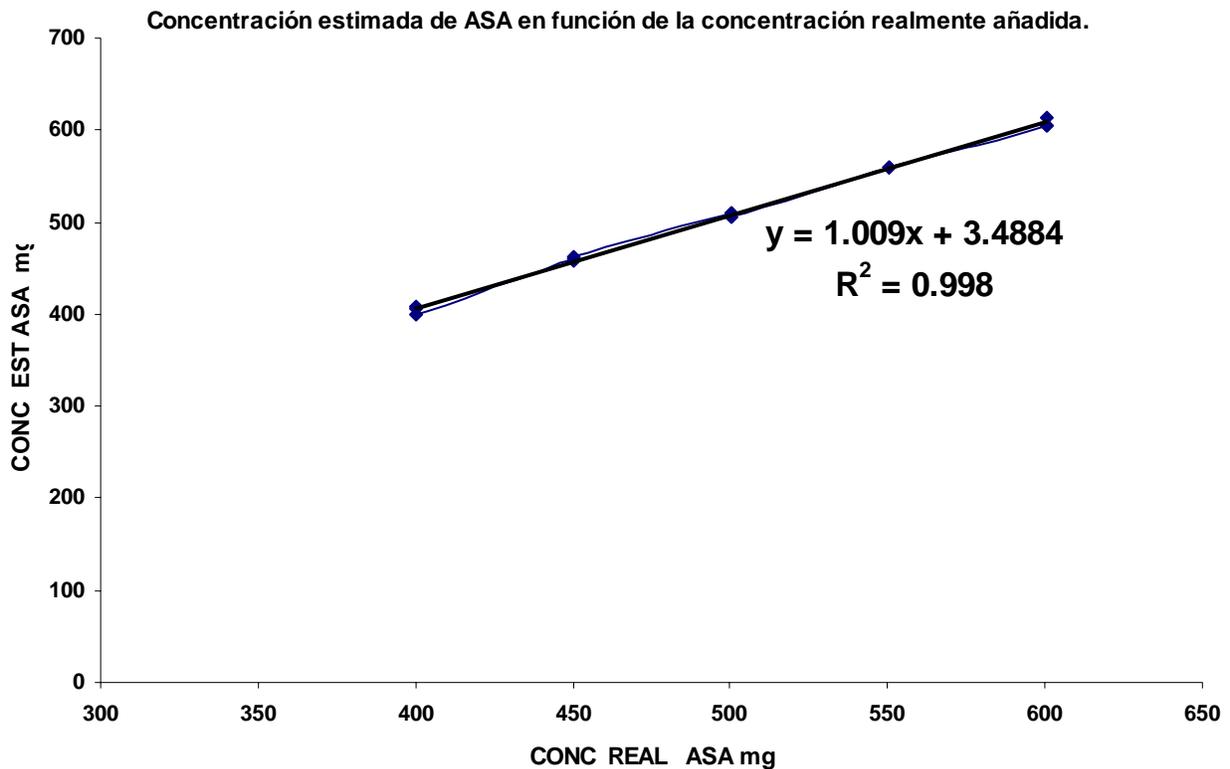


Figura 17. En este gráfico se muestra la concentración real de ASA en función de la concentración estimada de ASA contenido en los placebos cargados.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.998
R <sup>2</sup> ajustado	0.9979
Error típico	3.428
Observaciones	15

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	76543.631	76543.631	6513.572	6.05589E-19
Residuos	13	152.768	11.751		
Total	14	76696.400			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	3.488	6.315	0.552	0.590	-10.155	17.132
Variable X 1	1.009	0.013	80.707	6.05589E-19	0.982	1.036

Tabla 18 En esta tabla se presentan el análisis de variancia y de regresión de la linealidad de ASA.

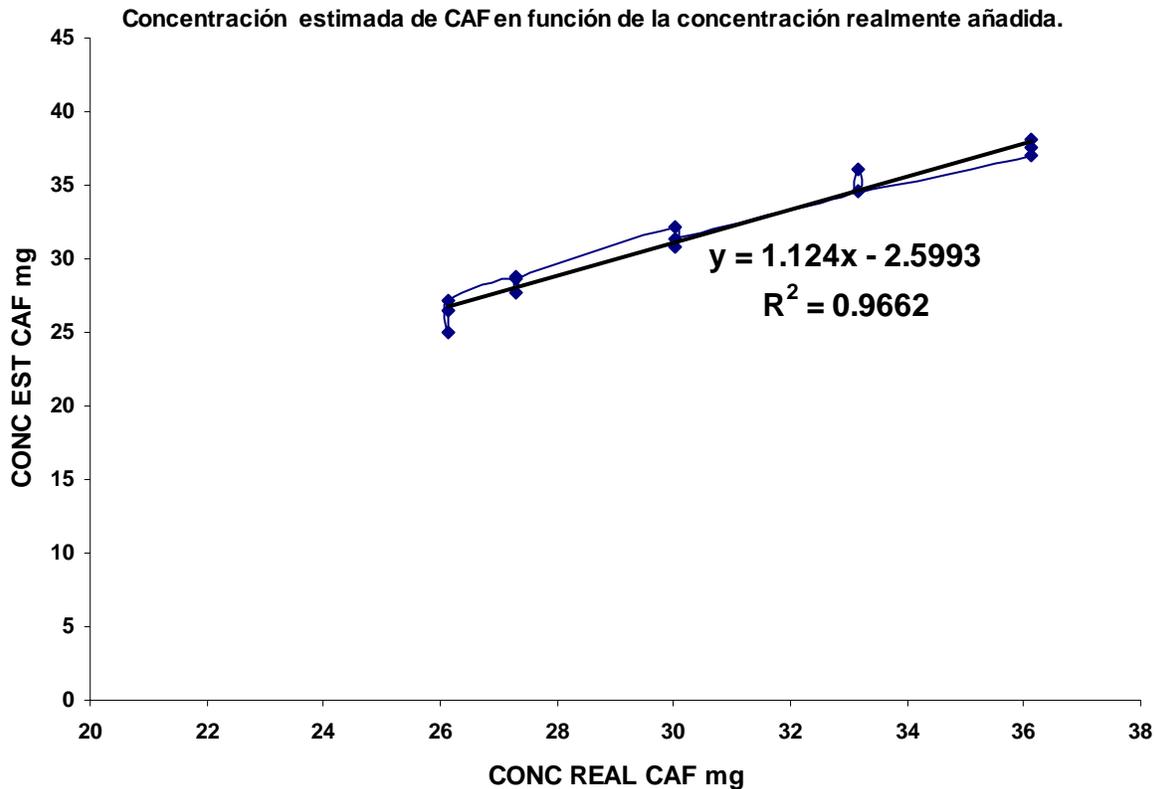


Figura 18. En este gráfico se muestra la concentración real de CAF en función de la concentración estimada de CAF contenido en los placebos cargados.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.983
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.966
R <sup>2</sup> ajustado	0.964
Error típico	0.835
Observaciones	15.000

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	258.7286	258.729	371.479	6.054E-11
Residuos	13	9.0543	0.696		
Total	14	267.7829			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-2.599	1.795	-1.448	0.171	-6.477	1.278
Variable X 1	1.124	0.058	19.274	6.054E-11	0.998	1.250

Tabla 19 Resultados del análisis de variancia y de regresión de la linealidad del método de CAF.



---

---

Como podemos observar se cumplen con los parámetros de la linealidad para ASA (Figura 17, Tabla 18). Esta presenta un  $r^2$  de 0.99, una pendiente casi de 1, el intercepto se encuentra dentro del intervalo. Caso contrario se presentó con CAF, (Figura 18 y Tabla 19) la ordenada al origen se encuentra dentro del intervalo, la pendiente es casi 1, como el valor de  $r^2$  es 0.96, entonces no cumple con el criterio para confiar en la linealidad.

Una justificación a estos resultados, es debido a una incorporación inadecuada de CAF en los placebos cargados, de una forma homogénea, tomando en cuenta que las proporciones de este analito en la mezclas se encuentra en muy poca cantidad, esta ve se impactada de manera muy importante. En ensayos posteriores se obtuvieron porcentajes de recobro hasta del 110% para CAF. En cambio para ASA se mantuvieron dentro del 98% y 101%. Lo ideal es que cada día que realizara los ensayos tuviera placebos de un día anterior o del mismo día, pero simplemente eso no podía ser posible, en primera no contaba con el material suficiente para realizar las pruebas, la segunda y más importante, el tiempo de preparación de la tabletas fue tardado porque la fabricación es una por una y son lotes de 30 tabletas.

Aún cuando los polvos de los placebos, se tenía guardados en bolsas con cierre, bien pudieron perder homogeneidad (demezclarse) al paso de los días. Posiblemente debido a que ocupaba el mismo polvo para diferentes ensayos en diferentes días, había manipulación del mismo, es como si en cada ensayo ocupara polvos de diferentes lotes, aún siendo el mismo, no existía homogeneidad día con día. Por eso mis resultados fueron variados en las cinco proporciones. Para verificar si realmente la homogeneidad fue el problema, se realizaron de nuevo mezclas físicas, de tal manera como si fuese a hacer un lote de Placebos Cargados con la única diferencia en que no se tableteó el polvo. Solo utilizamos el polvo mezclado, si tuve problemas con la



homogeneidad de esta manera se pondría en evidencia. En la tabla 20 presento los resultados.

Proporción %	Mg polvo	ASA mg	CAF mg	prom mg TAB/LOTE	Predicción MCP		Resultado Analítico		Estimaciones	
					ASA	CAF	ASA	CAF	ASA	CAF
80-120	306.52	400.585	36.03	650.665	70.621	8.416	374.777	44.663	93.557	123.960
80-120	306.51	400.585	36.03	650.665	70.637	7.291	374.876	38.693	93.582	107.391
80-120	305.74	400.585	36.03	650.665	71.223	7.642	378.938	40.656	94.596	112.841
90-110	307.28	450.205	33.05	650.63	79.315	7.171	419.853	37.958	93.258	114.851
90-110	305.51	450.205	33.05	650.63	78.703	7.794	419.023	41.496	93.074	125.554
90-110	307.54	450.205	33.05	650.63	80.203	6.955	424.191	36.785	94.222	111.301
100-100	306.36	501.055	30.1	651.28	88.147	6.994	468.472	37.173	93.497	123.498
100-100	306.42	501.055	30.1	651.28	88.375	6.818	469.591	36.226	93.721	120.353
100-100	309.32	501.055	30.1	651.28	89.452	6.704	470.858	35.290	93.973	117.241
110-90	308.01	551.134	27.528	651.995	98.269	5.933	520.036	31.400	94.358	114.064
110-90	306.04	551.134	27.528	651.995	98.099	5.510	522.479	29.344	94.801	106.599
110-90	307.8	551.134	27.528	651.995	98.052	6.354	519.245	33.646	94.214	122.223
120-80	306.5	602.55	24.08	652.795	108.437	5.053	577.382	26.906	95.823	111.735
120-80	307.63	602.55	24.08	652.795	107.653	5.879	571.102	31.189	94.781	129.522
120-80	306.26	602.55	24.08	652.795	107.713	5.438	573.975	28.975	95.258	120.329
								PROM	94.18	117.43
								DEST	0.77	6.86
								CV	0.82	5.84
								T CALC	-7.53	2.54

Tabla 20. En esta tabla se presentan las estimaciones de las mezclas físicas en sus 5 proporciones.

Con estos resultados se obtuvo para ASA el 94% de recobro y para CAF obtuvimos una sobreestimación del 17%, ninguno de los dos analitos andan alrededor del 100%. Con esto demuestro que tuve problemas de homogeneidad. Por ende esto afectó mis estimaciones, cuando realicé los ensayos en placebos cargados. Se comprobó que no existe homogeneidad en la preparación de los placebos cargados, lo cual se reflejó en el coeficiente de correlación y en los resultados tan dispersos que se obtuvieron.



## 2.7 EVALUACIÓN CON MUESTRAS REALES

Un análisis que falta por realizar es en muestras reales de Cafiaspirina® (Ver Anexo A.3), al hacerlo se obtendrían resultados, los cuales tienen un pequeño impedimento, no se tienen datos reales contra que compararlos, debido a que no se cuenta con la especificación de su contenido químico por parte de BAYER®. Sin embargo se sometió al análisis un lote para ensayo fue el 5G22G2.

mg polvo	ESTIMACION MCP		RESULTADO ANALITICO	
	ASA	CAF	ASA	CAF
307.01	93.718	5.5982	496.0771	29.6329
309.24	94.7184	5.8338	497.7570	30.6573
306.54	93.4872	5.5262	495.6142	29.2967
306.38	92.8601	5.6333	492.5467	29.8800
306.51	92.8621	5.6876	492.3484	30.1553
306.91	93.9682	5.6381	497.5636	29.8539
mg prom TAB 650.04		PROM	495.3179	29.9127
		DEST	2.3729	0.4638
		CV	0.4791	1.5506
		T CALC	-1.9732	-0.1883

Tabla 21. Se muestran las estimaciones de muestras reales de Cafiaspirina del lote.

Los resultados que se obtiene de muestras reales, son precisos, suponiendo que el contenido químico de ASA por TAB sea de 500mg y de CAF por TAB de 30mg. El método de Mínimos Cuadrados Parciales puede cuantificar ASA y CAF en muestras reales, lo único que se necesita para comprobarlo son las especificaciones de BAYER® del contenido químico de este lote y verificar si los resultados son exactos.



---

---

# CONCLUSIONES



- 
- 
- El método multivariado de MCP es aplicable de forma precisa y exacta, para la cuantificación de ASA y CAF en mezclas físicas, placebos cargados y muestras comerciales. Aún sin el conocimiento de la cantidad y tipo de excipientes de la formulación. A partir de las condiciones establecidas de análisis.
  - Se establecieron las condiciones espectrofotométricas y de operación para la cuantificación de ASA y CAF en mezclas físicas, placebos cargados y muestras comerciales permitiendo su análisis.
  - Se logró un ensayo analítico confiable para la cuantificación de ASA y CAF en mezclas físicas, placebos cargados y muestras comerciales con cual se disminuyeron tiempos de análisis y costos, encontrando que los placebos cargados no presentaron homogeneidad.



---

---

# ANEXOS



---

---

## Anexo A.1

### Preparación de 2 L de una solución amortiguadora de HCl-KCl a pH 2.1.

1. Pesar aproximadamente 15 g de KCl (99.5% pureza) en un vaso de pp. Agregar 10 mL de agua destilada en el vaso de pp y verter el contenido en un matraz aforado de 2 L. Lavar el vaso de pp tres veces con otros 10 mL de agua destilada y agregar 800mL de agua desionizada.
2. Tomar 2.4 mL de HCl concentrado y colocarlos en el matraz volumétrico de 2 L, agitar suavemente.
3. Verificar el pH de la solución anterior en un potenciómetro. De ser necesario ajustar el pH con HCl concentrado.
4. Una vez verificado el pH, llevar a volumen el matraz volumétrico de 2 L.

## Anexo A.2

### Preparación de las soluciones stock de ASA y CAF.

1. Pesar en una balanza analítica en un vaso de precipitados sin graduación 117.5mg de ácido acetilsalicílico (Estándar 100.01% Pureza).
2. Disolver en 5mL de etanol, agitar con una varilla de vidrio a una velocidad moderada y constante.
3. Colocarlo en un matraz volumétrico de 250mL y llevar a la marca de aforo con solución amortiguadora de HCl-KCl pH 2.1. (471 mcg/mL).

#### Sistema A

4. Pesar en una balanza analítica en un vaso de precipitados sin graduación 15mg de cafeína (Estándar 99.95% pureza).
5. Disolver en 5mL de etanol, agitar con una varilla de vidrio a una velocidad moderada constante.



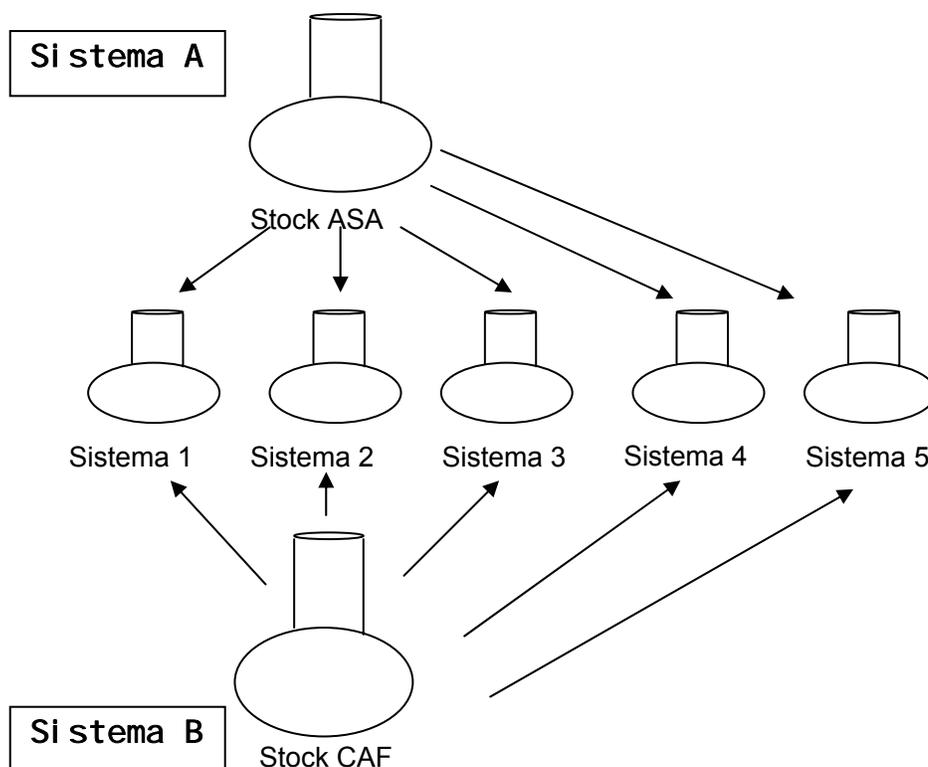
6. Colocar en un matraz volumétrico de 500mL y llevar a la marca de aforo con solución amortiguadora de HCl-KCl pH 2.1. (30 mcg/mL).

**Sistema B**

7. Tomar de los sistemas anteriores (A y B) con pipetas volumétricas correspondientes al volumen indicado en la Tabla A2 y llevar al volumen de aforo en matraces volumétricos de 25mL para cada sistema descrito.

		Número de soluciones.																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
SISTEMA	Mililitros (mL)																									
A	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7	3	4	5	6	7	
B	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7	7

Tabla A.2 En esta tabla se muestran los 25 Sistemas que se preparan en combinación con los sistemas A y B.





Leer en el espectrofotómetro, a las siguientes longitudes de onda Tabla A.2.1:

30 Longitudes de onda (nm)									
236	237	238	240	242	244	246	248	250	252
254	256	258	260	262	264	266	268	270	272
274	275	276	278	280	282	284	286	288	290

Tabla A.2.1. En esta tabla se muestran las 30 longitudes de onda a la que se leyeron las soluciones estándar.

### Anexo A.3

#### Procedimiento de ensayo para ASA y CAF en Tabletas de Cafiaspirina® BAYER®.

1. Triturar las tabletas que contiene ASA y CAF, en un mortero, hasta obtener un polvo uniforme.
2. Tomar la muestra, a someter en el ensayo.
3. Pesar 306.8mg de polvo equivalente a 500mg de ASA y 30mg de CAF en un vaso de pp de 50mL, agregar 5mL de etanol, agitar durante 5 minutos de manera mecánica a una velocidad de 50 revoluciones/min en la solución anterior, trasvasar el contenido a un matraz volumétrico de 100mL, llevar a la marca de aforo con solución amortiguadora de HCl-KCl a pH 2.1
4. Filtrar en un embudo de vidrio, con papel filtro Whatman # 42, un volumen aproximado de 10 mL sobre un tubo de ensaye.
5. Tomar una alícuota de 4mL del tubo de ensaye, y colocarla en un matraz volumétrico de 100mL, llevar a la marca de aforo con solución amortiguadora de HCl-KCl pH 2.1.

Leer en el espectrofotómetro, a las siguientes longitudes de onda:

30 Longitudes de onda (nm)									
236	237	238	240	242	244	246	248	250	252
254	256	258	260	262	264	266	268	270	272
274	275	276	278	280	282	284	286	288	290

Tabla A.4. En esta tabla se muestran las 30 longitudes de onda a la que se leyeron las soluciones estándar.



---

---

## Anexo A.4

### Procedimiento de ensayo para ASA CAF en Placebos Cargados.

1. Triturar las tabletas que contiene ASA y CAF, en un mortero, hasta obtener un polvo uniforme.
2. Tomar la muestra, a someter en el ensayo.
3. Pesar 306.8 mg de polvo equivalentes a 500mg de ASA y 30mg de CAF, en un vaso de pp de 50mL, agregar 5mL de etanol, agitar durante 5 minutos de manera mecánica a 50 revoluciones/min , trasvasar el contenido a un matraz volumétrico de 100mL, llevar a la marca de aforo con solución amortiguadora de HCl-KCl pH 2.1
4. Filtrar en un embudo de vidrio, con papel filtro Whatman No 42, un volumen aproximado de 10 mL en un tubo de ensaye.
5. Tomar una alícuota de 4mL del tubo de ensaye, y colocarla en un matraz volumétrico de 100mL, llevar a la marca de aforo con solución amortiguadora de HCl-KCl pH 2.1.

Leer en el espectrofotómetro, previamente calibrado; a las siguientes longitudes de onda:

30 Longitudes de onda (nm)									
236	237	238	240	242	244	246	248	250	252
254	256	258	260	262	264	266	268	270	272
274	275	276	278	280	282	284	286	288	290

Tabla A.5. En esta tabla se muestran las 30 longitudes de onda a la que se leyeron las soluciones estándar.

## Anexo A.5

### Proporción de componentes en las diferentes formulaciones de Placebos Cargados.

En estas tablas se muestran los porcentajes que le corresponden a cada proporción, la forma de preparación fue igual para todos los porcentajes empleados.



### ASPIRINA 100% - CAFEINA 100%

Uso	Componentes	%	Peso/Tab (mg)	Peso 30 Tab (g)
P.A	Aspirina	76.9230	500	15
P.A	Cafeína	4.6153	30	0.9
EXCIPIENTES	Almidón, Avicel, Ac Estearico	18.46	120	3.6
	Total	100	650	19.5

Tabla A.6.1. En esta tabla se muestran las proporciones de activos y excipientes para la preparación de ASA 100% y CAF 100%.

### ASPIRINA 80% - CAFEINA 120%

Uso	Componentes	%	Peso/Tab (mg)	Peso 30 Tab (g)
P.A	Aspirina	61.5384	400	12
P.A	Cafeína	5.5384	36	1.08
EXCIPIENTES	Almidón, Avicel, Ac Estearico	32.9230	214	6.42
	Total	100	650	19.5

Tabla A.6.2. En esta tabla se muestran las proporciones de activos y excipientes para la preparación de ASA 80% y CAF 120%.

### ASPIRINA 120 %- CAFEINA 80%

Uso	Componentes	%	Peso/Tab (mg)	Peso 30 Tab (g)
P.A	Aspirina	92.3076923	600	18
P.A	Cafeína	3.69230769	24	0.72
EXCIPIENTES	Almidón, Avicel, Ac Estearico	4	26	0.78
	Total	100	650	19.5

Tabla A.6.3. En esta tabla se muestran las proporciones de activos y excipientes para la preparación de ASA 120% y CAF 80%.

### ASPIRINA 90 %- CAFEINA 110%

Uso	Componentes	%	Peso/Tab (mg)	Peso 30 Tab (g)
P.A	Aspirina	69.2307692	450	13.5
P.A	Cafeína	5.07692308	33	0.99
EXCIPIENTES	Almidón, Avicel, Ac Estearico	25.6923077	167	5.01
	Total	100	650	19.5

Tabla A.6.4. En esta tabla se muestran las proporciones de activos y excipientes para la preparación de ASA 90% y CAF 110%.



### ASPIRINA 110 % - CAFEINA 90%

Uso	Componentes	%	Peso/Tab (mg)	Peso 30 Tab (g)
P.A	Aspirina	84.6153846	550	16.5
P.A	Cafeína	4.15384615	27	0.81
EXCIPIENTES	Almidón, Avicel, Ac Estearico	11.2307692	73	2.19
	Total	100	650	19.5

Tabla A.6.5. En esta tabla se muestran las proporciones de activos y excipientes para la preparación de ASA 110% y CAF 90%.

## Anexo A.5.1

### Preparación de las tabletas para su uso en Placebos Cargados

1. Pesar la aspirina en un vaso de pp de 50mL. (Vaso 1).
2. Pesar la cafeína en un vaso de pp de 50mL. (Vaso 2)
3. Colocar la mezcla de excipientes en un vaso de pp de 50mL. (Vaso 3)
4. Mezclar durante 10 minutos el contenido del vaso 3 a 30rpm en la mezcladora de cilindro.
5. Agregar poco a poco el contenido del (Vaso 1) a la mezcladora del cilindro seguir a 30rpm durante 5 minutos.
6. Agregar poco a poco el contenido del (Vaso 2) a la mezcladora del cilindro seguir a 30rpm durante 5 minutos.
7. Hacer 30 comprimidos en la prensa de laboratorio Carver Press a una fuerza de compresión de 2 Toneladas durante un tiempo de 2 segundos.



---

---

## Anexo A.5.2

### Preparación de las tabletas para su uso en Placebos Cargados. (Nueva propuesta).

1. Pesar la aspirina en un vaso de pp de 50mL. (Vaso 1).
2. Pesar la cafeína en un vaso de pp de 50mL. (Vaso 2)
3. Colocar la mezcla de excipientes en un vaso de pp de 50mL. (Vaso 3)
4. Pasar todos los componentes a través de una malla # 20. (Tamizado de seguridad) de forma individual.
5. Mezclar durante 10 minutos el contenido del vaso 3 a 30rpm en la mezcladora de cilindro.
6. Agregar poco a poco el contenido del (Vaso 1) a la mezcladora del cilindro seguir a 30rpm durante 5 minutos.
7. Agregar poco a poco el contenido del (Vaso 2) a la mezcladora del cilindro seguir a 30rpm durante 5 minutos.
8. Hacer 30 comprimidos en la prensa de laboratorio Carver Press a una fuerza de compresión de 2 Toneladas durante un tiempo de 2 segundos.
9. Triturar el lote de tabletas. Realizadas en el paso 8. Colocar el polvo en un vaso de pp de 250mL. Travarlo al contenedor de la mezcladora de cilindro.
10. Mezclar durante 10 minutos en la mezcladora de cilindro.
11. Hacer 30 comprimidos en la prensa de laboratorio Carver Press a una fuerza de compresión de 2 Toneladas durante un tiempo de 2 segundos.



---

---

## Anexo A.6

**Procedimiento para la preparación de una mezcla de excipientes para su uso en la preparación de tabletas y mezclas físicas de Aspirina-Cafeína.**

EXCIPIENTES	%	Gramos (gr)
Almidón pregelatinizado	10	8.12567714
Avicel	7.96	6.468039
Acido Esteárico	0.5	0.40628386
TOTAL	18.46	15

Tabla A.7. En esta tabla se muestran las proporciones de excipientes, que se emplearon en la preparación de mezclas físicas.

1. Pesar los excipientes en un vaso de pp de 50mL
2. Mezclar durante 6 minutos en el vaso de p de 50 mL (vaso 1). Con ayuda de una varilla de vidrio.
3. Utilizar esta mezcla de excipientes en la fabricación de placebos cargados. Guardarla en una bolsa de cierre.

## Anexo A.7

**Procedimiento para la realización de mezclas físicas Aspirina-Cafeína 100%-100%.**

1. Pesar en una balanza analítica en un vaso de precipitados sin graduación **236mg** de materia prima de ASA, **14.16mg** de materia prima de CAF, **30 mg** de una mezcla de excipientes (Almidón pregelatinizado, Avicel, Ácido Esteárico).



---

---

2. Agregar 5mL de etanol con pipeta graduada de 5mL en el vaso de pp, agitar durante 5 minutos de manera mecánica (agitador magnético) a velocidad moderada 50 revoluciones/min, posteriormente agregar 5mL de solución amortiguadora de HCl-KCl pH 2.1 y seguir en agitación durante 2 minutos.

3. Filtrar en un embudo de vidrio, con papel filtro Whatman # 42, el contenido del vaso de pp, sobre un matraz volumétrico de 100mL. Realizar 3 lavados de 5mL con solución amortiguadora de HCl-KCl pH 2.1. Llevar al aforo con la misma solución amortiguadora.

4. Tomar una alícuota de 4mL del matraz volumétrico de 100mL, y colocarla en otro matraz volumétrico de 100mL, llevar a la marca de aforo con solución amortiguadora de HCl-KCl pH 2.1.



---

---

## BIBLIOGRAFÍAS

1. Senna Marcelo, Poppi Ronei. "N way PLS applied to simultaneous espectrofotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine". Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis. Vol 24 2004 pp 27-24
2. Mongay Fernández Carlos, "Quimiometría", Ed Universitat de Valencia, España 2005.pp 19-35
3. Ramis Ramos, García Álvarez Coque. "Quimiometría". Ed Síntesis, España 2001. pp 199-228
4. Eckschalager, Danzer, "Information Theory in Analytical Chemistry", ED Jhon Wiley & Sons, USA, 1994. pp 5-19
5. Barrera Galicia Mauricio. Tesis de Licenciatura: "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." UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo de México, 2004. pp 2-35
6. Porcel Martha, Memorias "Aplicación de Técnicas Quimiométricas para el Desarrollo de nuevos Métodos Cinéticos-Espectrofotométricos de Análisis", Universidad Autónoma de Barcelona, 2001 pp 5-26
7. Guerrero Barrera Araceli, "Desarrollo y validación de un método analítico para perfiles de disolución de Lisinopril e Hidoclorotiazida en tabletas" UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo de México. Pp 25-27, 34-37
8. Islas Hernández Alejandro. Tesis de Licenciatura: "Desarrollo de un método espectrofotométrico U.V. para la obtención del perfil de Disolución de una forma farmacéutica que contenga Trimetoprim y Sulfametoxazol". UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo de México, 2004. pp
9. López de Alba, "Métodos de Calibración Multivariante" Sociedad Químicas de México Vol 41 pp 34-44
10. Ruiz A, Fernández de Córdoba M.L., Molina-Díaz A. "Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, and acetilsalicylic acid by means of FI ultraviolet PLS multiptosensing device" Vol 21 1999. pag 983-992



- 
- 
11. Massart, Vandegirst, Buydens. "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A", Ed. Elsevier. Holanda, 1997, pp 231-239
  12. Beebe, Pell, Seasholtz. "Chemometrics a practice guide", ED Jhon Wiley & sons, USA, 1998 pp 5-8
  13. Haaland M. D, Thomas. E V "Partial least squares methods for spectral analysis. 1 Relation to other quantitative calibration methods and the extraction for quantitative information". Analytical Chemistry, 1988 Vol 60 (11) pp.1193-1202
  14. Haaland M. D, Thomas. E V "Partial Least Squares Methods for Spectral Analysis 2. Application to Simulated and Glass Spectral Data" Analytical Chemistry. 1988 Vol 60(11) pp 1202-1208
  15. Irigoyen Osorno Olga Lidia. Tesis de Licenciatura: "Determinación de la capacidad predictiva del modelo de Mínimos Cuadrados Parciales en la cuantificación simultánea de Naproxeno y Acetaminofén provenientes de una suspensión". UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo de México, 2007. pp 7-20
  16. Clarke's Isolation and Identification of Drugs. In pharmaceutical, body fluids, and post-mortem material 2a Ed, England 1986 pp 361,420
  17. Cejudo, Soria, "Volumetría problemas" Ed UAM Xochimilco. México 1995 pp 56-60
  18. "THE INDEX MERCK" 12 ed. Ed Merck CO INC USA 1997 pp 18, 268
  19. "Diccionario de Especialidades Farmacéuticas" Versión Electrónica 2005 Ediciones PLM S.A de CV.
  20. Harris D, "Análisis Químico Cuantitativo" Ed Gpo Editorial Iberoamericana, México 1999 pp 495-515
  21. Skoog, West, Holler "Química Analítica" Ed Mc Graw Hill, Colombia. 1999 pp 383-402
  22. Guía de validación de métodos analíticos" Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C 2001 pp 4-32
  23. Miller J, "Estadística Para Química Analítica" 2da ed. ED Addison Wesley Iberoamericana pp 1-5, 147-163 199-206



- 
- 
24. Volker Buhler, "Generic Drug Formulation Fine Chemicals" 2<sup>nd</sup> edition, BASF, 1999.
  25. Connors, Amido, Stella. "Chemical stability of Pharmaceuticals a Handbook for Pharmacist" Second edition Ed Wiley 1986 USA pp 221-231
  26. Kibbe, Wade, Weller. "Handbook of Pharmaceutical Excipients", Third Ed, 2000 USA. pp 102-107, 528-530, 555-557
  27. Darr Alfred, "Tecnología Farmacéutica", Ed Acribia España 1981 pp 292-307
  28. Voight, Bornsschein, "Tratado de Tecnología Farmacéutica", Ed Acribia España 1982, pag 176-214
  29. United States Pharmacopeia National Formulary XXVI , USA, 2003 pp 172-176
  30. Gelaldi and Kowalski, "Partial Least Squares Regresion (PLS) a Tutorial", 1985 Educational Note, C P A C- University of Washington (1985) pp 1-17.
  31. Navarro Reyes Saúl. Tesis de Licenciatura: "Aplicación del método analítico de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP), en la cuantificación de naproxeno en suspensión, con el uso de espectrofotometría U.V." UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo de Mex, 2005 pp 9-13

## DIRECCIONES ELECTRÓNICAS

[http://www.aspirina.cl/prospectos/aspirina\\_500mg.asp](http://www.aspirina.cl/prospectos/aspirina_500mg.asp)