



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE PIROXICAM.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

DANIEL JOSÉ REGALADO SANTIAGO



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ

VOCAL: Profesor: GEORGINA MARGARITA MAYA RUÍZ

SECRETARIO: Profesor: ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ

1er. SUPLENTE: Profesor: ERNESTINA HERNÁNDEZ GARCÍA

2° SUPLENTE: Profesor: NATIVIDAD GARCÍA ESCAMILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**ANEXO DEL LABORATORIO 3-D, EDIFICIO A, DEPTO. QUÍMICA
ANALÍTICA, FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM.**

ASESOR DEL TEMA

Q. PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ

SUSTENTANTE:

DANIEL JOSÉ REGALADO SANTIAGO

ÍNDICE

CAPÍTULO	PÁGINA
1.INTRODUCCIÓN	
Introducción	2
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivos generales	6
2.2 Objetivos particulares	6
3. GENERALIDADES	
3.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)	8
3.2 Piroxicam	10
3.3 Propiedades farmacológicas del piroxicam	11
3.4 Mecanismo de acción del piroxicam	12
3.5 Aspectos farmacocinéticos del piroxicam	13
3.6 Reacciones adversas del piroxicam	14
3.7 Interacciones medicamentosas y de otro género	17
3.8 Estudios analíticos del piroxicam	18
4. PARTE EXPERIMENTAL	
4.1 Material, equipos y reactivos	30
4.2 Preparación de disoluciones	31
4.3 Preparación de la disolución de Referencia de piroxicam	32
4.4 Precisión del sistema	33
4.5 Linealidad del sistema	34
4.6 Especificidad	35
4.7 Precisión del método	38
4.8 Linealidad del método	40
4.9 Estabilidad analítica de la muestra	41
4.10 Exactitud y repetibilidad del método	43

5. RESULTADOS		
5.1 Obtención del espectro de absorción del producto de reacción entre el piroxicam y la ferriína		46
5.2 Precisión del sistema		47
5.3 Linealidad del sistema		48
5.4 Linealidad del método		50
5.5 Precisión del método		53
5.6 Especificidad		54
5.7 Estabilidad analítica de la muestra		54
5.8 Exactitud y repetibilidad del método		59
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS		
Análisis de resultados		61
7. CONCLUSIONES		
Conclusiones		67
8. BIBLIOGRAFÍA		
Bibliografía		69
ANEXOS		
Anexo A		74
Anexo B		79
Anexo C		80

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El piroxicam, [4-hidroximetil-N-(2-piridil)-2H-1,2-benzotiazin-3-carboamida-1,1-dióxido], es un compuesto que pertenece a la clase de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos AINES, derivado del éster del ácido cinámico, de ahí que se le conoce también como cinnoxicam.

Su fórmula molecular es $C_{15}H_{13}N_3O_4S$, su peso molecular es de 331.35 g mol⁻¹, su composición es de C 54.37 %, H 3.95 %, N 12.68 %, O 19.31 % y S 9.68 %, su punto de fusión de 198-200 °C y su dosis letal media DL₅₀ oral en ratones es de 360 mg kg⁻¹ (1).

El piroxicam es ligeramente soluble en agua (0.003 % a pH 5.7 a 37 °C); muestra una humectabilidad superficial baja, presenta una estructura reticular cristalina alta y su pK_a es de 5.1 en agua (2).

Esta molécula muestra buena característica de permeabilidad de membrana, su baja solubilidad es responsable de la lenta velocidad de disolución en los fluidos gastrointestinales. A su vez dan como resultado una lenta absorción y retraso en el comienzo de su acción.

El piroxicam, es un agente antiinflamatorio no esterooidal, que se utiliza ampliamente en el tratamiento de la artritis reumatoide, osteoartritis y otras enfermedades de las articulaciones. El efecto de la quimioprevención del piroxicam se atribuye a su propiedad de reducir los niveles de prostaglandinas que están asociados con la carcinogénesis en el colon. Además de la acción antiinflamatoria, el piroxicam es un agente analgésico, antipirético y antiagregante plaquetario. Tiene la capacidad de inhibir la activación de neutrófilos, aun cuando estén presentes los productos de la ciclooxigenasa 2 (COX 2).

El piroxicam es totalmente biotransformado en el hígado por hidroxilación del anillo piridol, de la cadena lateral y por copulación con el ácido glucónico.

Cuando sus metabolitos son inactivos, estos se excretan por la orina y por las heces fecales ⁽³⁾.

La validación de métodos analíticos, es una parte del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que durante una serie de pruebas y análisis, se demuestra si el método cumple con el objetivo y los propósitos para los cuales fue diseñado.

La validación de métodos analíticos, asegura que la calidad de un producto es consistente, ya que se debe contar con la evidencia documentada que demuestre que a través de un procedimiento específico, se obtenga un producto que cumple con las especificaciones de calidad establecidas para la cual es destinado y conforme a una serie de procedimientos, que lleven a las buenas prácticas de fabricación y a las buenas prácticas de laboratorio. Por lo tanto se deben tener todos los métodos analíticos que se lleguen a emplear, perfectamente validados.

En el presente trabajo, se realizó la validación del método espectrofotométrico para la determinación del contenido de piroxicam, con base en la reacción entre el piroxicam y el complejo ortofenantrolina- Fe^{3+} (ferriína). Todo esto bajo los parámetros de las buenas prácticas de laboratorio.

Un factor de suma importancia es que se debe llevar a cabo la disolución del piroxicam, debido a la baja solubilidad que tiene éste en agua.

La disolución del producto se realizó en agua, calentándose para aumentar su solubilidad. Se debe cuidar la temperatura a la cual se lleva la reacción entre el complejo ortofenantrolina- Fe^{3+} y el piroxicam, formándose el complejo conocido como ferroína que absorbe a una longitud de onda de 510 nm.

Otro punto muy importante, es el poder observar la coloración, que va inicialmente de color amarillo a una coloración, roja adquirida después de que se calentó la reacción, ya que tiene que ser en un tiempo adecuado (30

minutos), y la temperatura debe ser constante a 60 ± 1 °C, estas condiciones son óptimas para obtener el complejo de Ferroína.

Para la realización del presente trabajo, se utilizó una sustancia de referencia de piroxicam obsequiada por los laboratorios ASTROQUIM S.A. de C.V., con una pureza del 99.9 %.

La aplicación analítica del método de estudio, cumplió con los siguientes parámetros de desempeño: precisión del sistema, linealidad del sistema, especificidad, precisión del método, linealidad del método, exactitud y repetibilidad del método y la estabilidad analítica de la muestra.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GENERALES

- El objetivo del presente trabajo es diseñar y realizar la validación de un método analítico espectrofotométrico para la determinación de piroxicam.
- Llevar a cabo la validación de un método para la determinación de piroxicam en una preparación farmacéutica, mediante un método espectrofotométrico, aprovechando las propiedades reductoras del piroxicam frente al complejo 1,10-fenantrolina-Fe(III).

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los parámetros de desempeño del método analítico: precisión del sistema, linealidad del sistema, especificidad, precisión del método, linealidad del método, exactitud y repetibilidad del método y la estabilidad analítica de la muestra.
- Comprobar que el método analítico realizado es específico, exacto y lineal, para la cuantificación de piroxicam.

CAPÍTULO 3

GENERALIDADES

GENERALIDADES

3.1 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES).

Analgésicos.

Cuando los analgésicos se utilicen como fármacos suelen ser eficaces si el dolor presenta intensidades de leve a moderada, como por ejemplo el dolor dental. Su eficacia máxima es inferior a la de los opioides, es decir, los agentes antiinflamatorios no esteroideos carecen de los efectos adversos de los opiáceos en el sistema nervioso central, como es el caso de la depresión respiratoria y el desarrollo de dependencia física.

Los agentes antiinflamatorios no esteroideos, nunca cambian la percepción de modalidades sensitivas distintas al dolor. Un dolor crónico postoperatorio o un dolor debido a la inflamación de una extremidad del cuerpo humano, por ejemplo el dolor somático, se controla especialmente bien con un agente antiinflamatorio.

Los antiinflamatorios no esteroideos, son un grupo de fármacos de diversa composición química y terapéutica diferente. Presentan tres características comunes:

1. Tienen propiedades farmacológicas básicas e idénticas.
2. Poseen similitudes en sus mecanismos de acción.
3. Presentan de igual forma similitudes en sus efectos adversos.

Por otra parte, todos los medicamentos de este grupo presentan características ácidas, con valores de pK_a en un intervalo de 3 a 5.

Estas moléculas tienen grupos hidrofílicos (carboxílico o grupos enólicos) y lipofílicos (anillo aromático y átomos de halógeno).

Los agentes antiinflamatorios, se clasifican en los siguientes grupos de acuerdo a su estructura química, como derivados de:

- Ácido salicílico: ácido acetilsalicílico, salicilamida, salicilato de sodio.
- Anilina y del p-aminofenol: paracetamol y fenacetina.
- Pirazolona: fenilbutazona y propilfenazona.
- Ácido indol-acético: indometacina.
- Ácido fenilacético: diclofenaco.
- Ácido propiónico: ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno y ácido tioprofénico.
- Ácido enólico: piroxicam, meloxicam y tenoxicam.
- Ácido antranílico: ácido mefenámico y ácido flufenámico.
- Ácido nicotínico: ácido niflúmico.
- Ácido piranocarboxílico: etodolac.
- Sulfamida: nimesulida.

Los oxicanes son un grupo de agentes antiinflamatorios derivados del benceno, que presentan un sistema heterocíclico de triazina, donde el grupo N-heterocíclico carboxamida, incluye el azufre de la triazina, y en la posición 4 hay un grupo enólico. La condensación de un anillo de benceno o tiofeno con el sistema heterocíclico, así como la sustitución del grupo amida en posición 3, imparten propiedades ácidas al grupo enólico. Este es un grupo de fármacos de diversas composiciones químicas cuya característica común es la alta afinidad por la ciclooxigenasa (COX), con cierto predominio para inhibir la actividad de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) ⁽³⁾.

Los analgésicos incluyen opioides, no opioides y adyuvantes ó colinérgicos. Los agentes antiinflamatorios están indicados para el dolor que conforma inflamación como proceso patológico subyacente, por su capacidad de suprimir la producción de prostaglandinas. Los agentes antiinflamatorios son además analgésicos y pueden ser útiles en el tratamiento del dolor que no presenta inflamación ⁽⁴⁾.

Todos los agentes antiinflamatorios incluidos los inhibidores selectivos de la COX-2 son antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios.

Los agentes antiinflamatorios también se utilizan para cerrar el conducto arterial persistente en recién nacidos, esto es, para tratar episodios graves de vasodilatación e hipotensión en la mastocitosis sistémica. Otros de los efectos analgésicos para el cual se recomienda el piroxicam, es en el síndrome de Baartter para producir una alteración bioquímica, es decir, funciona como un quimiopreventor de ciertos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de colon.

La mayoría de los agentes antiinflamatorios tienen una elevada unión a proteínas (95-99 %), su metabolismo se da a nivel del hígado y se excretan por vía renal.

3.2 PIROXICAM

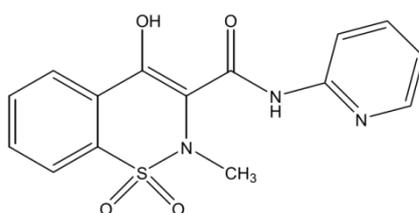


Figura No. 1 Estructura del piroxicam

En 1970 un grupo de investigación de los laboratorios Pfizer, encabezados por Lombardino y Wisemann, descubrieron el piroxicam (la estructura se muestra en la fig. 1), manipulando a la sacarina. Este antiinflamatorio fue el prototipo para el grupo de los oxicanes ⁽⁵⁾.

3.3 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL PIROXICAM.

El piroxicam, el meloxicam y el tenoxicam, ver la figura No. 2, Son agentes antiinflamatorios no esteroideos que se utilizan ampliamente en el tratamiento de la artritis reumatoide, osteoartritis y otras enfermedades de las articulaciones. El efecto de la quimioprevención del piroxicam se atribuye a su propiedad de reducir los niveles de prostaglandinas que están asociados con la carcinogénesis en el colon.

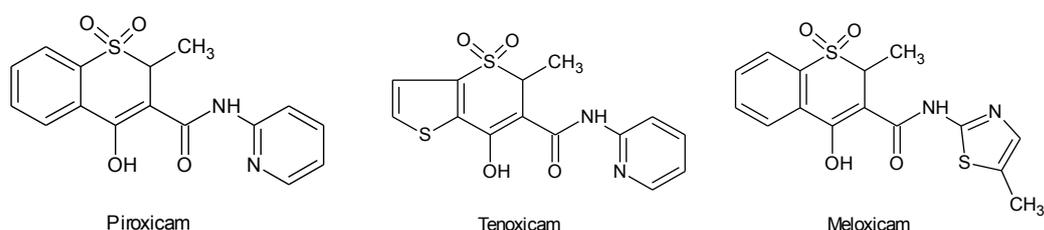


Figura No. 2. Estructuras del Piroxicam, Tenoxicam y Meloxicam

El piroxicam es un potente antiinflamatorio, analgésico, antipirético y antiagregante plaquetario. La actividad antiinflamatoria del piroxicam es similar en potencia a la indometacina, y su actividad analgésica es parecida a la de la aspirina. Tiene la capacidad de inhibir la activación de neutrófilos, aun cuando estén presentes los productos de la ciclooxigenasa.

Por otra parte, las prostaglandinas sensibilizan los receptores nociceptivos, por lo que la inhibición de su síntesis podría explicar los efectos analgésicos del piroxicam. Dado que otros antiinflamatorios que inhiben la síntesis de las prostaglandinas no alteran el umbral del dolor se supone que el efecto analgésico del piroxicam debe ser periférico.

La antipiresis, tiene lugar por la dilatación periférica causada por una acción central sobre el hipotálamo, lo que ocasiona un aumento del flujo sanguíneo cutáneo con la consiguiente pérdida de calor. Los efectos inhibidores de la síntesis de las prostaglandinas son también los responsables de los efectos del

piroxicam sobre la función renal, sobre la reducción de mucoprotección del estómago y sobre la agregación plaquetaria.

3.4 MECANISMO DE ACCIÓN DEL PIROXICAM.

Todos los agentes antiinflamatorios no esteroideos inhiben la enzima ciclooxigenasa (COX), inhibiendo por lo tanto, la síntesis de prostaglandinas, ejerciendo una acción central en el cerebro o en la médula espinal, que podría ser importante para sus efectos analgésicos.

La enzima ciclooxigenasa 1 (COX-1), se encuentra en las plaquetas, en el tubo digestivo, los riñones, y en la mayoría de tejidos humanos.

La enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) se encuentra primordialmente en el sistema nervioso central y es inducida en los tejidos periféricos por estímulos nocivos que causan inflamación y dolor.

Los efectos de los agentes antiinflamatorios no esteroideos, se deben en gran medida, a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa 2 y no a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa 1. Hasta hace poco todos los antiinflamatorios no esteroideos disponibles, inhibían las isoformas ciclooxigenasa 1 y ciclooxigenasa 2 de forma no selectiva. Los fármacos con este mecanismo de acción se denominan, antiinflamatorios no esteroideos no selectivos ⁽⁴⁾.

El piroxicam funciona principalmente por la reducción de la cantidad de prostaglandinas en especial de la ciclooxigenasa 2.

Las prostaglandinas son sustancias químicas que son liberadas por las células en los sitios de lesión. Están involucradas directamente con la inflamación y la hinchazón. También sensibilizan las terminaciones nerviosas que pueden causar dolor. El piroxicam detiene ciertas enzimas que se necesitan para producir prostaglandinas.

Por lo tanto, a medida que se producen menos prostaglandinas, hay menos inflamación y dolor.

Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, inhiben la actividad de la enzima ciclooxigenasa, produciendo una disminución en la formación de precursores de las prostaglandinas y tromboxanos del ácido araquidónico. Así mismo la disminución resultante en la síntesis de prostaglandinas y en su actividad en varios tejidos puede ser responsable de alguno de los efectos adversos de los antiinflamatorios no esteroideos. El piroxicam como antiinflamatorio no esteroideo, puede actuar periféricamente en los tejidos inflamados, probablemente por reducción de la actividad de las prostaglandinas en estos tejidos y posiblemente por inhibición de la síntesis y la acción de otros mediadores locales de la respuesta inflamatoria. Pueden estar comprometidos también en la inhibición leucocitaria, en la inhibición de la liberación y la acción de enzimas liposomales.

3.5 ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS DEL PIROXICAM.

Farmacocinética y farmacodinamia.

El piroxicam se absorbe rápida y completamente en el tubo digestivo y las concentraciones máximas se producen de 1 a 24 horas.

La presencia de alimentos tiende a retrasar la absorción, sin afectar a las concentraciones máximas.

Absorción y biodisponibilidad.

Los antiinflamatorios no esteroideos ácidos, que es el grupo al que pertenece el piroxicam, tienen elevada biodisponibilidad cuando se administran por vía oral.

Los antiinflamatorios no esteroideos ácidos poseen una elevada fracción unida a albúmina. Varias de sus interacciones clínicamente importantes se producen a este nivel.

El piroxicam se absorbe bien por vía oral, los alimentos disminuyen la velocidad de absorción, las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan entre 3 a 5 h. La concentración sérica máxima es de 1.5 a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

La vida media promedio del piroxicam es de 50 h (rango 30 a 86 h, aunque también se han encontrado valores fuera de rango). La mayoría de los pacientes alcanzan el estado estacionario en el ámbito de 7 a 12 días. En pacientes en que la vida media es mayor, el nivel estacionario se logra en 2 ó 3 semanas. Se une un 99 % a proteínas plasmáticas y difunde al líquido sinovial, en donde alcanza concentraciones de hasta un 33 % en las células plasmáticas. Su volumen de distribución aparente es de 0.12 – 0.14 L kg^{-1} . En la absorción oral, presenta abundante recirculación enterohepática. El piroxicam se conjuga con ácido glucurónico en el hígado y es eliminado por la bilis al intestino, donde sufre el proceso de hidrólisis, es ahí donde es metabolizado aproximadamente un 66 % por vía renal y un 33 % por vía fecal. Por otro lado, se excreta por la orina el piroxicam sin metabolizar, menos del 5 % de la dosis ⁽⁶⁾.

El piroxicam es totalmente biotransformado en el hígado por hidroxilación del anillo piridol de la cadena lateral y por la unión con ácido glucónico ⁽³⁾.

3.6 REACCIONES ADVERSAS DEL PIROXICAM.

Efectos digestivos.

La mayoría de los eventos gastrointestinales espontáneos fatales, se han observado en personas de edad avanzada y en pacientes inmunosuprimidos.

Son muy comunes los problemas del tracto superior gastrointestinal, por ejemplo, dispepsia. En menor frecuencia se puede presentar estomatitis, anorexia, náusea, constipación, molestias abdominales, flatulencia, diarrea, dolor abdominal e indigestión.

Los síntomas más frecuentes producidos por el piroxicam, están asociados a los digestivos, como son la anorexia, náuseas, dispepsia, dolor abdominal y diarrea. Estos síntomas pueden estar relacionados con la producción de úlceras gástricas o duodenales, que se calcula, se producen en un 15 a 30 % de los pacientes que consumen el piroxicam y otros agentes antiinflamatorios no esteroideos, en general.

Un mayor riesgo se presenta en pacientes que presentan una infección por *Helicobacter pylori* o cuando el paciente consume habitualmente grandes cantidades de alcohol.

Efectos renales:

La administración a largo plazo de piroxicam en animales de laboratorio, ha producido necrosis papilar renal.

En humanos existen reportes de nefritis aguda intersticial con hematuria, proteinuria y, ocasionalmente, síndrome nefrótico. También se ha reportado hipercalcemia.

En pacientes con condiciones prerrenales, alteraciones de la función renal, insuficiencia cardíaca o en pacientes que están usando diuréticos, en ancianos y en sujetos con disfunción hepática u otras alteraciones que provocan una reducción en el flujo sanguíneo renal o en el volumen sanguíneo, la administración de piroxicam puede causar una reducción en la formación de prostaglandinas proporcional a la dosis administrada y precipitar la descompensación renal.

El piroxicam puede interferir en la función plaquetaria. Cerca del 4 % de los pacientes presentan reducciones en hemoglobina y hematocrito con sintomatología de anemia.

Otras reacciones menos frecuentes que afectan a los elementos de la sangre son leucopenia y eosinofilia.

Se ha observado edema periférico maleolar en cerca del 2 % de los pacientes a quienes se les administra piroxicam.

Los agentes antiinflamatorios no esteroideos tradicionales entre ellos el piroxicam y los inhibidores de la enzima ciclooxigenasa 2, se han asociado con efectos adversos renales y renovasculares. Los agentes antiinflamatorios no esteroideos tienen poco efecto sobre la función renal o la presión arterial en las personas sanas. Sin embargo, en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, cirrosis hepática, nefropatía crónica, hipovolemia u otros estados de activación de los sistemas simpático-suprarrenal o renina-angiotensina, la formación de prostaglandinas y los efectos sobre el flujo sanguíneo renal-función renal son significativos en sistemas de modelos y en humanos.

Reacciones alérgica o dermatológica.

Ocasionalmente ocurren síntomas sugestivos de enfermedad del suero, incluyendo artralgias, prurito, fiebre y erupciones con lesiones vesiculobulosas y dermatitis exfoliativa y síntomas menos frecuentes como: sudación, eritema, descamación, eritema multiforme, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Stevens-Johnson y reacciones fotoalérgicas de la piel.

Efectos hepáticos.

Se han reportado reacciones hepáticas severas, incluyendo ictericia y casos de hepatitis fatal en pacientes tratados con piroxicam. Si durante el tratamiento aparecen signos clínicos y síntomas indicativos de un desarrollo de daño hepático o si se presentan manifestaciones sistémicas como eosinofilia, erupciones, etc, se debe de suspender la administración de piroxicam.

Sistema nervioso central:

Fatiga, depresión, insomnio y nerviosismo. La administración de piroxicam puede desarrollar alucinaciones.

Órganos de los sentidos.

Inflamación ocular, visión borrosa, irritación ocular, *tinnitus*.

Reacción corporal

Dolor de cabeza, dolor (cólico), fiebre.

Reacción adversa sobre el metabolismo:

La administración oral del piroxicam puede producir una hipoglucemia, o una hiperglucemia que se manifiesta por un incremento, o una disminución de peso.

Reacción de hipersensibilidad:

El piroxicam puede producir anafilaxia, broncoespasmo, urticaria o angioedema.

3.7 INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS Y DE OTRO GÉNERO.

Interfiere la acción natriurética de los diuréticos. El piroxicam, se asocia fuertemente a proteínas, por lo que puede desplazar a otros agentes con afinidad proteica, potencializar la acción de los anticoagulantes del tipo cumarina.

El nivel plasmático de piroxicam se reduce cerca del 80 % de sus valores normales, cuando se administra de forma conjunta con ácido acetilsalicílico. Se ha reportado que el piroxicam, incrementa los niveles plasmáticos de litio ⁽²²⁾.

3.8 ESTUDIOS ANALÍTICOS DEL PIROXICAM.

El piroxicam, es un compuesto que pertenece a la clase de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, ha sido investigado en forma pura y en diferentes preparaciones farmacéuticas comerciales y en fluidos biológicos como plasma, suero y orina de humanos y animales, utilizando diversas técnicas analíticas como: La espectroscopía visible y ultravioleta, la espectroscopía de fluorescencia, la cromatografía en capa fina de alto rendimiento, la cromatografía líquida, la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas, la electroforesis capilar, la voltamperometría y la potenciometría ⁽⁷⁾.

Las propiedades y eficacia terapéutica del piroxicam se han descrito ampliamente ⁽⁷⁾ y varios métodos de análisis tales como la espectroscopía ultravioleta y visible ^(8-10,12-13), la espectrofluorometría ^(9,13-14), la cromatografía en capa fina de alta resolución CCFAR ^(3,7,11), la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) ^(9,11,13,15,16), la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (CL-EM) ⁽⁷⁾, la fluorescencia en capa fina, cromatografía de capa fina con identificación por medio de espectrometría de masas con ionización/desorción láser asistida por matriz con analizador de m/z de tiempo de vuelo (TLC-MALDI-TOF-MS, por sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography-Matrix/Assisted Laser Desorption/ionization-Time Of flight-Mass Spectrometry)⁽⁷⁾, la potenciometría, la voltamperometría y la electroforesis capilar⁽⁹⁾.

La cuantificación de piroxicam en cualquier matriz por métodos oficiales se realiza por cromatografía líquida de alta resolución y detector ultravioleta a la longitud de onda de 248 nm ⁽¹²⁾.

La aplicación de la espectrofotometría ultravioleta y visible se limita al ensayo de disolución de las cápsulas de piroxicam, previamente filtrada y analiza por comparación contra patrón a la longitud de onda de 333 nm.

Teniendo en cuenta las posibilidades desde el punto de vista analítico que presenta la estructura de este compuesto para su cuantificación por métodos espectrofotométricos, la facilidad de aplicación de estas técnicas en cualquier laboratorio, así como la importancia de desarrollar un método confiable pero a la vez, rápido, sencillo y de bajo costo, para asumir el control de rutina de la nueva formulación una vez introducida, se ha descrito para la determinación de piroxicam en preparaciones farmacéuticas, el método espectrofotométrico, que consiste en la oxidación de este fármaco con el yodato de potasio en medio ácido con la liberación de yodo y posterior extracción con ciclohexano, la cuantificación se realizó por espectroscopía de inyección en flujo ⁽⁸⁾.

El método de análisis por inyección en flujo (FIA por sus siglas en inglés Flow Injection Analysis), se caracteriza por su simplicidad, por su alta velocidad, y lo económico. Éste método presenta una exactitud y confiabilidad en los resultados obtenidos. Su capacidad para controlar los volúmenes, los patrones de mezcla y los tiempos exactos de residencia, permite el uso de procedimientos químicos.

Este método no es confiable cuando se realiza de forma manual, ya sea porque las reacciones no alcanzan el equilibrio o porque el producto de la reacción, no es suficientemente estable con el tiempo ⁽¹⁰⁾.

Un método que utiliza el análisis por inyección en flujo, es el método que utiliza la N-bromosuccinimida en exceso, para oxidar al piroxicam en medio ácido y el exceso del oxidante se detecta mediante la reacción de éste con el ácido cloránico.

Varios reactivos y quelatos de metal se utilizaron para la determinación espectrofotométrica de piroxicam en preparaciones farmacéuticas ⁽⁸⁾.

Se determinó el piroxicam en tabletas que contienen piroxicam- β -ciclodextrina, y se analizó por el método espectrofotométrico ultravioleta y posteriormente por cromatografía líquida de alta resolución. La determinación cuantitativa de

piroxicam se llevó a cabo mediante el uso de espectroscopía derivativa de primer orden a la longitud de onda de 261.4 nm.

Se ha determinado de igual forma en las muestras provenientes de tabletas, plasma u orina con técnicas espectrofotométricas normales y derivados ^(8,13).

Diversos métodos han sido propuestos para la determinación de piroxicam, con especial atención a los métodos de alta sensibilidad y selectividad como son el método de espectrofluorimetría ⁽¹³⁻¹⁴⁾.

Es de notar que se ha reportado el método espectrofluorimétrico para el análisis de piroxicam en suero humano ⁽⁹⁾.

Las propiedades de fluorescencia de piroxicam en diversos medios micelares se han investigado, encontrándose que la presencia del tensoactivo dodecil sulfato de sodio, en concentración de 0,05 M a pH entre 1.5 y 2, provoca un aumento en la fluorescencia de este fármaco de aproximadamente 5 veces ⁽⁹⁾.

Con base en los resultados reportados, el método desarrollado se ha aplicado para la determinación del piroxicam en la industria farmacéutica, así como también en fluidos biológicos de humanos, después de que se ha extraído el piroxicam con éter etílico.

Recientemente, la espectrofluorimetría fue utilizada por Damiani ⁽⁹⁾ para la determinación de éste fármaco en preparaciones farmacéuticas apoyándose en métodos de electroforesis y voltametría ⁽⁹⁾. En este caso, el piroxicam se disolvió en medio alcalino y fueron las disoluciones acidificadas fuertemente antes de la medición de fluorescencia.

Escandar ⁽⁹⁾ determinó el piroxicam en cápsulas por espectrofluorimetría después de su complejación con ciclodextrina.

Se sabe que el uso de micromicelas en sistemas heterogéneos en espectrometría de fluorescencia, presenta ventajas; entre las cuales destacan

el aumento de la sensibilidad y la reducción de la interferencia en comparación sobre las disoluciones homoendógenas convencionales ⁽⁹⁾.

Se reportan trabajos donde se ha investigado las propiedades de fluorescencia del piroxicam en diversos medios micelares y se ha demostrado un aumento en la intensidad de fluorescencia del piroxicam marcada con sulfato de dimetil sulfóxido.

En la literatura se encuentran descritos métodos analíticos para la cuantificación de piroxicam y entre ellos está la cromatografía en capa fina, en donde se ha utilizado un método de detección con densitómetro, que describe la determinación de piroxicam y sus productos de degradación ⁽³⁾.

También se han determinado por cromatografía en capa fina de alto rendimiento, la concentración de piroxicam en preparaciones farmacéuticas en presencia de 2-aminopiridina.

La cromatografía en capa fina de alta resolución es un método simple, rápido y preciso, que se ha establecido y validado, para la determinación simultánea de paracetamol y piroxicam en tabletas. El método se basó en la separación por cromatografía en capa fina de alto rendimiento, de los dos fármacos seguido por mediciones densitométricas a la longitud de onda de 288 nm.

La separación se llevó a cabo sobre láminas de aluminio con gel de sílice 60 F-254, utilizando como fase móvil n-dicloroetano:metanol:triethylamina (10:2.5:1) como fase móvil. La gráfica de calibración fue lineal en el rango de 0.1-0.9 mg/punto, para el piroxicam. El método no presenta interferencias cromatográficas con algún componente del excipiente.

La cromatografía en capa fina, utilizando una matriz de láser asistida desorción/ionización acoplado a espectrometría de masas, (MALDI-MS por sus siglas en inglés) se ha empleado para el análisis directo de piroxicam, en placas de cromatografía en capa fina ⁽³⁾.

En los últimos años ha habido un aumento en el interés por el (MALDI MS) para el análisis directo de las placas de cromatografía en capa fina ⁽¹⁷⁾.

Varios métodos para la aplicación de la matriz para cromatografía en capa fina-MALDI, han comparado el acoplamiento incluyendo una matriz desarrollada recientemente por el método de matriz por electrospray ⁽¹⁷⁾.

Este método de electrospray se encontró que es superior a las otras técnicas estudiadas, ya que produce una señal estable, y reduce al mínimo la difusión del analito, por lo tanto permite la exploración de la placa cromatográfica para obtener así, los datos espectrales. El uso de un disolvente de extracción antes de la aplicación de una matriz se ha demostrado que mejora la sensibilidad ⁽¹⁷⁾.

En la administración oral de piroxicam a caballos y humanos, al secretarse los metabolitos del piroxicam por vía urinaria se han obtenidos datos espectrales de masas de este compuesto, por la técnica de ionización por electrospray (ESI por sus siglas en inglés) ⁽¹⁸⁾.

A la fecha, poco se ha realizado sobre la determinación cuantitativa de piroxicam en productos farmacéuticos por TLC-MALDI-TOF-MS. No pudimos encontrar informe alguno sobre la aplicación de esta metodología para la determinación del piroxicam en preparaciones farmacéuticas, solo se presenta el desarrollo y validación del método para el análisis de piroxicam en presencia de tenoxicam como estándar interno, para compensar las desviaciones de la señal y las variaciones en la eficacia de la extracción de piroxicam, por cromatografía en capa fina.

La extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés Solid Phase Extraction), es un método de preconcentración importante, ya que se ha utilizado generalmente por su simplicidad y exactitud.

La extracción en fase sólida es económica, rápida, con buenos rendimientos y se puede automatizar. Recientemente se ha reportado que la extracción en fase sólida basada en el uso selectivo de polímeros selectivos impresos ⁽¹⁸⁾.

Los polímeros selectivos impresos, es una tecnología de gran alcance por su estabilidad química en muchas áreas de análisis ⁽¹⁸⁾ y usos en la extracción en fase sólida. Tienen un gran potencial para la limpieza de muestras complejas, especialmente cuando los analitos tienen propiedades similares al placebo, en las preparaciones farmacéuticas respectivas ⁽¹⁸⁾.

Un método directo, muy sensible, sencillo y rápido, es el caso de la cromatografía líquida de alta resolución, la cual se ha aplicado a la determinación de piroxicam en fluidos biológicos, plasma y orina ⁽¹⁵⁾.

Se ha informado de la determinación de piroxicam, meloxicam y tenoxicam en fluidos biológicos, utilizando CLAR con detector de ultravioleta ⁽¹⁶⁾, amperométrico ⁽¹⁶⁾ y con acoplamiento a la espectrometría de masas (LC-MS/MS) ⁽¹⁶⁾. Sin embargo, la mayoría de estos métodos presentan insuficiente sensibilidad con límites de detección; 0.72 - 50 ng mL⁻¹.

Aunque es el método más empleado para medir el piroxicam en diferentes medios (plasma, orina, bilis y diferentes tejidos ⁽¹³⁾).

El método potenciométrico implica la valoración directa del piroxicam con N-bromosuccinimida en medio ácido y el punto final se determina utilizando un electrodo indicador de platino.

Las técnicas selectivas como son las voltamperométricas, polarográficas, y en donde se utilizan electrodos de ion selectivo, se han desarrollado para la determinación de piroxicam en preparaciones farmacéuticas ⁽⁸⁾.

Se ha informado que posiblemente el piroxicam muestra un potencial fototóxico, que podría ser causado por los productos de fotodegradación. La estabilidad del piroxicam ha sido estudiada en medios acuosos en función del pH pero sin considerar la influencia de la luz ⁽²⁰⁾.

Se plantea que al exponer a la luz solar al piroxicam en disoluciones al 1% en medios acuosos, es estable durante 72 h ⁽²⁰⁾. Estos resultados promovieron el interés de llevar a cabo un amplio estudio sobre la fotoestabilidad de los oxicanes. Se hace especial hincapié en los factores que influyen en la magnitud y la fotodegradación de los compuestos.

Se ha estudiado la influencia de diferentes fuentes de luz y diferentes concentraciones de piroxicam. Cabe señalar la importancia de considerar factores múltiples que influyen en la fotoestabilidad de la droga.

Se han realizado diversos trabajos que estudian el grado de la influencia de diferentes factores; por ejemplo: fuente de luz y la concentración de la disolución de la muestra en la fotodegradación del piroxicam.

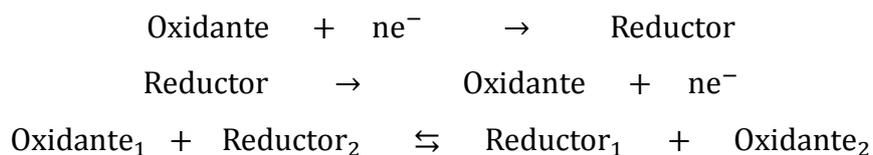
Se han comparado diferentes métodos indicadores como son la cromatografía de alta resolución/densitometría, la cromatografía de alta resolución y la electroforesis capilar, desarrolladas para las pruebas de fotoestabilidad de piroxicam a la luz solar. Con estos métodos se han determinado la estabilidad del piroxicam.

Reacciones óxido reducción.

En las reacciones de óxido reducción, llamadas también reacciones redox, cambia el estado de oxidación de las especies que estén reaccionando.

Para que se produzca una reacción de óxido reducción tiene que haber una especie que tenga la capacidad de ceder electrones, a este se le llama agente reductor y la otra especie que tenga la capacidad de aceptar los electrones se le llama agente oxidante ⁽²³⁾.

Por lo consiguiente, el reductor se transforma en su forma oxidada y el oxidante en su forma reducida.



Una clase de compuestos orgánicos conocidos como las 1,10-fenantrolinas u orto-fenantrolinas, forman complejos estables con el hierro (II y III) y otros iones metálicos. Como se puede observar en la figura No. 3,

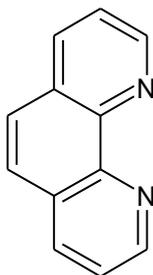


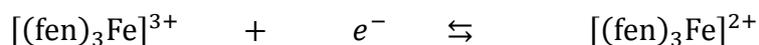
Figura No. 3 Estructura de la ortofenantrolina (fen)

La orto-fenantrolina tiene un par de átomos de nitrógeno, situados en una posición tal que cada átomo puede formar un enlace covalente con el ion hierro (II ó III), como se muestra en la figura No. 3. Tres moléculas de ortofenantrolina se combinan con un ión de hierro, formando la estructura conocida como ferroína con Fe^{2+} y ferriína con Fe^{3+} .



Reacción No.1. Equilibrio de formación del ion tris (1,10-fenantrolina) hierro (II)

El hierro en el complejo de la ferroína es el que experimenta una reacción de oxidación-reducción reversible.



Ferriína, color azul pálido

ferroína, color roja-canela

Reacción No. 2. Equilibrio óxido-reducción del sistema ferriina-ferroína

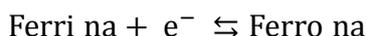
El color de la forma oxidada, conocido como ferriína, es azul muy pálido, siendo difícil de detectar, de modo que en la práctica el cambio de color que acompaña a la reducción va de casi incoloro a rojo.

Un indicador de óxido reducción deberá ser una sustancia altamente colorida que cambie de color al oxidarse o reducirse, cada indicador de óxido reducción vira de color en un intervalo de potencial determinado.

El indicador elegido para una titulación de óxido reducción, deberá tener un potencial de transición que sea lo más cercano posible al potencial en el punto de equivalencia de la titulación.

También es importante que el indicador sea oxidado o reducido con rapidez y en forma reversible. Con ello se puede decir que solo se dispone de unos cuantos indicadores de óxido reducción, realmente eficientes, siendo el tris (1,10-fenantrolina) hierro (II) uno de los más utilizados con este fin.

Para predecir el intervalo de potencial en el que cambia el color del indicador, se escribe primero la ecuación de Nernst para el indicador.



$$E = E^0 + 0.06 \text{ Log } \frac{[\text{Ferri na}]}{[\text{Ferro na}]}$$

Se observará el color de la ferroína cuando

$$\frac{[\text{Ferri na}]}{[\text{Ferro na}]} \geq 10$$

Y se observará el color de la ferriína cuando

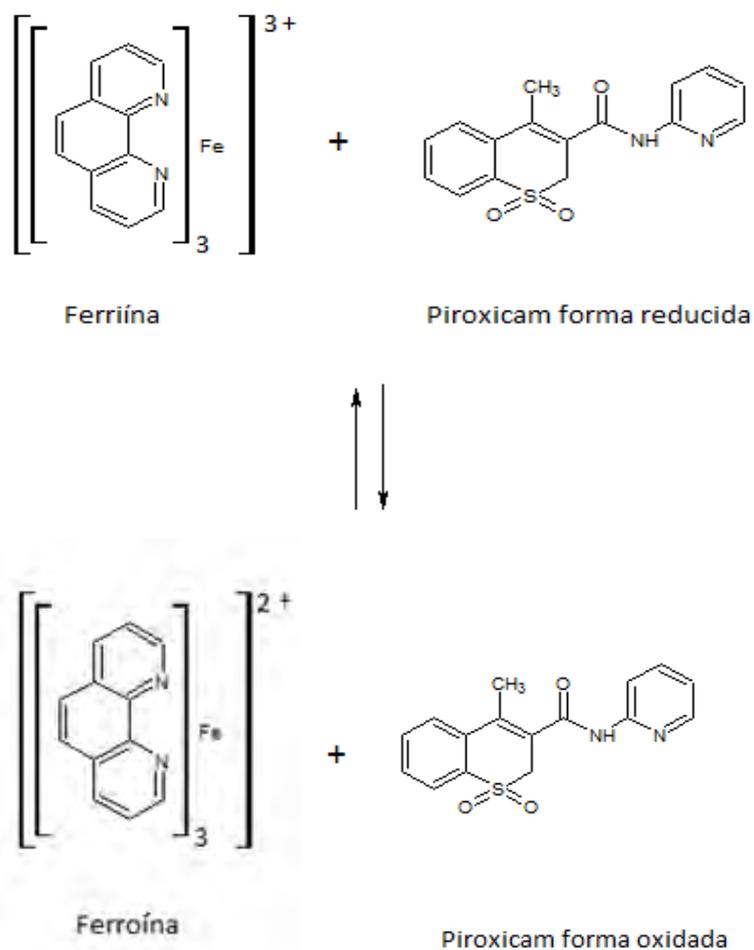
$$\frac{[\text{Ferri na}]}{[\text{Ferro na}]} \leq \frac{1}{10}$$

Introduciendo estos cocientes en la ecuación de Nernst, se verá que el cambio de color se producirá en el intervalo:

$$E = E_{\frac{\text{ferriína}}{\text{ferroína}}}^{\circ} \pm 0.06$$

Dado que el potencial normal del sistema ferriína-ferroína es 1.147 V y que su reducción supone la captura de un electrón, su intervalo de viraje o transición se encuentra entre el intervalo de potencial de 1.087 y 1.205 V, medido frente a un electrodo estándar de hidrógeno, y de 0.847 a 0.965 V frente a un electrodo de calomelanos saturado.

Con base en las características que presenta el sistema ferriína-ferroína y a que el piroxicam presenta propiedades oxido reductoras, independientemente de que no se encontró en la literatura reportado su potencial, en el presente trabajo se está proponiendo la reacción de reducción de la ferriína por el piroxicam como se muestra en la reacción No. 3.



Reacción No. 3 Equilibrio óxido-reducción entre la ferriína y el piroxicam en su forma reducida.

En el presente trabajo se utilizarán las propiedades óxido-reductoras del piroxicam frente al sistema ferriína-ferroína. Para llevar a cabo la determinación del piroxicam en un medio reaccional a pH controlado, verificando que este método, cumpla con las características de ser un método rápido, sencillo, económico y con base a ello realizar la validación de éste ⁽²¹⁾.

CAPÍTULO 4

PARTE

EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.

Material.

- Matraces volumétricos de vidrio Pyrex de 25 mL.
- Vasos de precipitados de vidrio Pyrex de 15, 50, 100 y 250 mL.
- Naves de pesado.
- Soporte universal con pinzas universal.
- Micropipeta 100-1000 μL y 500-5000 μL ,Transferpette BRAND.
- Propipetas.
- Pipetas graduadas de 10 mL.
- Mortero con pistil.
- Recipiente de plástico con capacidad de 200 mL con tapa.

Equipo.

- Parrilla de calentamiento marca Thermolyne Type 2200 Hot Plate.
- Balaza analítica, Sartorius Basic^{lite} BP 210S. Capacidad máx 210 g, d= 0.1 mg.
- Potenciómetro Corning, con electrodo combinado de vidrio plata cloruro de plata.
- Espectrofotómetro UV-V, PERKIN ELMER Spectrophotometer HITACHI 200.
- Celdas de cuarzo de 1cm de paso óptico.

Reactivos

- Ácido clorhídrico concentrado RA.
- 1,10 fenantrolina monohidratado RA.
- Sulfato férrico amónico RA.
- Hidróxido de sodio RA.
- Acetato de sodio RA.
- Ácido acético glacial RA.
- Agua destilada.

4.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Disolución de ácido clorhídrico 1 M.
Partiendo del ácido clorhídrico concentrado (36 %, Conc. 11.8 M densidad 1.18 g mL⁻¹), en un matraz volumétrico de 25 mL, con aproximadamente 10 mL de agua destilada, adicionar 2.1 mL de ácido clorhídrico y llevar al aforo con agua destilada.
- Disolución del complejo Ortofenantrolina –Fe (III).
Disolver 200 mg de ortofenantrolina y 160 mg de sulfato férrico amónico en 100 mL de agua.
- Disolución reguladora de acetatos de pH = 4.8.
Disolver 12.45 g de acetato de sodio en agua destilada, agregar 9 mL de ácido acético, transvasar a un recipiente apropiado y diluir con agua hasta 3000 mL.

4.3 METODOLOGÍA GENERAL PARA LA DETERMINACIÓN DE PIROXICAM

A) Preparación de la disolución de Referencia de piroxicam.

Pesar una cantidad equivalente a 30 mg de la sustancia de referencia de piroxicam, en un vaso de precipitados se adicionan 7 mL de agua destilada. Se calienta por 30 minutos con agitación constante en una parrilla de calentamiento, hasta observar una disolución homogénea de color amarillo. Se enfría a temperatura ambiente, se transvasa cuantitativamente a un matraz aforado de 10 mL, lavar el vaso de precipitados y adicionar al matraz. Llevar al aforo con agua destilada presentando una concentración de **3 mg mL⁻¹**. A esta preparación le llamamos **Disolución A**.

Se procede a preparar las disoluciones estándares para las determinaciones correspondientes.

B) Preparación de las disoluciones estándares.

Se mide un volumen de 15 mL de la disolución reguladora de acetatos de pH=4.8, la cual se transfiere a un matraz aforado de 25 mL, se adiciona un volumen de 3 mL de la disolución del complejo ortofenantrolina-hierro (III). Con la ayuda de una micropipeta de 5000 µL, tomar un volumen de 400 µL de la **disolución A** y se lleva al aforo con agua destilada. A esta preparación le llamamos **Disolución B**.

También se prepara la disolución de blanco de reactivos, para cada corrida. Se muestra el procedimiento general en la tabla No.1 para la preparación de las disoluciones a analizar. Homogenizar las disoluciones anteriores (**Disolución B**) y calentar en Baño de María a 60 °C durante 30 minutos, enfriar a temperatura ambiente. A esta preparación le llamamos Disolución del complejo de ferroína (**DCF**) que presenta una concentración de **48 µg mL⁻¹** de piroxicam. Para la realización de cada uno de los parámetros de la validación, se deberá tomar una alícuota apropiada de la (**DCF**) que se transfiere a un matraz volumétrico de 10 mL, el cual se lleva al aforo con agua destilada.

Las absorbencias que presentaron cada una de las disoluciones, se empleó el espectrofotómetro UV-V, PERKIN ELMER Spectrophotometer HITACHI 200, a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

No. Matraz	Disolución reguladora de acetatos (mL)	Disolución de la formulación (mL)	Disolución de ferriína (mL)
0	15	0	3
1	15	0.4	3
2	15	0.4	3
3	15	0.4	3

Tabla No. 1 Procedimiento general para la preparación de la serie de disoluciones a analizar.

4.4 PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Un analista debe preparar por lo menos un sextuplicado de disoluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la disolución de referencia utilizada o en ciertos casos la concentración que representa el 100 % de la muestra procesada para su medición, preparada por dilución o por pesada independiente, se debe medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones. Calcular la desviación estándar S y el coeficiente de variación CV.

Seguir el procedimiento de la preparación de la muestra de referencia de piroxicam y la preparación de las disoluciones estándares, descrito en la metodología general para la determinación de piroxicam.

La alícuota apropiada de la DCF para esta determinación es de 2.5 mL. Se prepararon seis disoluciones estándar por triplicado y un blanco de reactivos para cada corrida; utilizando matraces aforados de 10 mL (Concentración final **12 $\mu\text{g mL}^{-1}$** de piroxicam).

No. Matraz	Disolución del complejo de ferroína (mL)	Aforo con agua destilada (mL)
1	0	10
2	2.5	10
3	2.5	10
4	2.5	10
5	2.5	10
6	2.5	10
7	2.5	10

Tabla No. 2 Preparación de la serie estándar, para la determinación de la precisión del sistema.

Los 21 matraces volumétricos se llevaron al aforo con agua destilada (ver tabla 2).

Se leyó la absorbencia que presentó cada una de las disoluciones, en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

4.5 LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Un analista debe preparar por lo menos por triplicado cinco niveles de concentración, intervalo, de la disolución de referencia ya sea por dilución a partir de una misma disolución concentrada, o por pesadas independientes. La concentración central debe de ser igual a la que se prepara la disolución de referencia en el método ó en ciertos casos, la concentración que representa el 100 % en la muestra procesada para su medición. El intervalo debe incluir la especificación para el caso de aquellos métodos utilizados para contenido/potencia/valoración. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración contra la respuesta analítica.

Calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).

Preparar una disolución de piroxicam, pesando 30 mg de la sustancia de referencia, con precisión de 0.1 mg. Disolver en agua destilada, trasvasar a un matraz aforado de 10 mL y aforar a la marca con este disolvente (Disolución A). Se realiza un total de 18 veces.

Se prepararon seis disoluciones estándar, por triplicado y un blanco de reactivos; utilizando matraces aforados de 25 mL (disolución B), como se muestra en la tabla No.1 del procedimiento general para la preparación de la serie de disoluciones a analizar.

Para la determinación del parámetro de linealidad se tomaron las alícuotas conforme a la tabla No. 3, en los 18 matraces volumétricos se llevaron al aforo de 10 mL con agua destilada.

Se leyó la absorbencia que presentó cada una de las disoluciones, en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

No. Matraz	Disolución del complejo de ferroína (mL)	Aforo con agua destilada (mL)	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$
1	0	10	0
2	1.5	10	7.2
3	2.0	10	9.6
4	2.5	10	12.0
5	3.0	10	14.4
6	3.5	10	16.8

Tabla No. 3 Preparación de la serie estándar, para la determinación de la linealidad del sistema.

4.6 ESPECIFICIDAD

La especificidad es un parámetro del método de validación, que determina si los componentes de una formulación de tipo farmacéutico, interfiere en los resultados.

Para evaluar este parámetro se preparó una formulación de trabajo, a la cual se le llamó placebo cargado, con las cantidades de los reactivos descritos en la tabla No. 4 y utilizando una sustancia de referencia de piroxicam con el 99.9 % de pureza.

Reactivos para la formulación	Gramos
Piroxicam	0.8368
Almidón	6.3000
Ludipress	2.1000
Kollidon	0.3360
Polietilenglicol	0.4200
Aerosil	0.0429
Total	10.0357

Tabla No. 4. Formulación para preparar 10 gramos placebo cargado con piroxicam ⁽²⁴⁾

La muestra de la formulación se almacenó en un recipiente debidamente etiquetado y herméticamente cerrado.

De la misma manera se preparó la formulación pero sin el principio activo, es decir sin presencia de piroxicam, a este se le llamó placebo sin carga.

La sustancia de referencia de piroxicam tiene una pureza del 99.9 %.

Seguir el procedimiento de la preparación de la muestra de referencia, y la preparación de las disoluciones estándares, descrito en la metodología general para la determinación de piroxicam.

Se analizaron por triplicado los excipientes del producto, muestra del producto, y la sustancia de referencia del piroxicam (piroxicam-placebo y una mezcla de producto placebo), como se muestra en la Tabla No. 5.

Sustancia	Peso en mg
Placebo con carga	273.6
Placebo	273.1
Piroxicam	Equivalente a 30

Tabla No.5. Cantidades a pesar para preparar las muestras para la determinación del parámetro de especificidad.

A todas las disoluciones preparadas se le realizaron un barrido espectrofotométrico en el intervalo de longitud de onda de 400 a 600 nm. Con ello se observó que no existe interferencia entre los excipientes y la ferroína.

Se prepararon las disoluciones estándar por triplicado y un blanco de reactivos; utilizando matraces aforados de 25 mL (Disolución B), como se muestra en la tabla No.1 del procedimiento general para la preparación de la serie de disoluciones a analizar. Para determinar la especificidad del producto de reacción entre el piroxicam en su forma reducida y la ferroína se sigue lo señalado en las tablas No. 6, 7 y 8.

No. Matraz	Disolución del placebo con carga (mL)	Aforo con agua destilada (mL)	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$
1	0	10	9.2
2	2.5	10	9.2
3	2.5	10	9.2
4	2.5	10	9.2

Tabla No. 6 Preparación de la serie estándar, para la determinación de la especificidad del placebo con carga.

No. Matraz	Disolución del placebo (mL)	Aforo con agua destilada (mL)
1	0	10
2	2.5	10
3	2.5	10
4	2.5	10

Tabla No. 7 Preparación de serie estándar, para la determinación de la especificidad con el placebo.

No. Matraz	Disolución de piroxicam (mL)	Aforo con agua destilada (mL)	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$
1	0	10	0
2	2.5	10	12
3	2.5	10	12
4	2.5	10	12

Tabla No. 8 Preparación de serie estándar, para la determinación de la especificidad del complejo de ferroína y piroxicam.

Conforme a la tabla No. 6, 7 y 8, los 36 matraces volumétricos se llevaron al aforo de 10 mL con agua destilada.

Se leyó la absorbencia que presentó cada una de las disoluciones, en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

4.7 PRECISIÓN DEL MÉTODO

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

Se calcula la media aritmética (\bar{Y}), la desviación estándar S y el coeficiente de variación CV del contenido/potencia/valoración.

Seguir el procedimiento de la preparación de la muestra de referencia, y la preparación de las disoluciones estándares, descrito en la metodología general para la determinación de piroxicam. En las tablas No. 9 y No. 10, se aprecia la cantidad que pesaron los dos analistas para esta determinación, es decir, se pesaron 273.6 mg del placebo cargado, equivalente a 23 mg de piroxicam. Con una concentración final de **9.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$** .

Día 1

Peso de la formulación en mg	Peso de la formulación en mg
Analista 1	Analista 2
273.6	273.6
273.6	273.6
273.6	273.6

Tabla No. 9. Peso de la muestra analizada por los analistas en el día 1.

Día 2

Peso de la formulación en mg	Peso de la formulación en mg
Analista 1	Analista 2
273.6	273.6
273.6	273.6
273.6	273.6

Tabla No.10. Peso de la muestra analizada por los analistas en el día 2.

Se prepararon tres disoluciones estándar por triplicado y un blanco de reactivos; utilizando matraces aforados de 25 mL (Disolución B), como se muestra en la tabla No.1 del procedimiento general para la preparación de la serie de disoluciones a analizar.

Para la determinación de la precisión del método, se sigue lo descrito en la tabla No. 11, los 18 matraces volumétricos se llevaron al aforo con agua destilada. Se leyó la absorbencia que presentó cada una de las disoluciones, en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

No. Matraz	Disolución del complejo de ferroína (mL)	Aforo con agua destilada (mL)	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$
1	0	10	0
2	2.5	10	9.2
3	2.5	10	9.2
4	2.5	10	9.2

Tabla No. 11 Preparación de la serie estándar, para la determinación de la precisión del método.

4.8 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Se seleccionaron 5 niveles de la cantidad del analito (intervalo). Se prepararon por triplicado las disoluciones respectivas del piroxicam adicionados a cada nivel de concentración.

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

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

Se pesó una cantidad de placebo cargado; la cual fué de 273.6 mg equivalente a 23 mg de piroxicam. Seguir el procedimiento de la preparación de la muestra de referencia (Disolución A), y la preparación de las disoluciones estándares (Disolución B), descrito en la metodología general para la determinación de piroxicam.

Se prepararon cinco disoluciones estándar por triplicado y un blanco de reactivos; utilizando matraces aforados de 25 mL (Disolución B), como se muestra en la tabla No.1 del procedimiento general para la preparación de la serie de disoluciones a analizar.

Para la determinación de la linealidad del método se siguen las instrucciones de la tabla No.12, los 18 matraces volumétricos se llevaron al aforo con agua destilada.

Se leyó la absorbencia que presentó cada una de las disoluciones, en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

No. Matraz	Disolución del complejo de ferroína (mL)	Aforo con agua destilada (mL)	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$
1	0	10	0
2	1.5	10	5.5
3	2.0	10	7.3
4	2.5	10	9.2
5	3.0	10	11.0
6	3.5	10	12.8

Tabla No. 12. Preparación de la serie estándar, para la determinación de linealidad del método.

4.9 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

Se realiza un análisis en el cuál se evalúa la estabilidad de la muestra en diferentes condiciones de almacenaje: Temperatura ambiente y con presencia de luz, Temperatura ambiente y con ausencia de luz y Temperatura de 4 °C (refrigerador) y con ausencia de luz.

Se determina la estabilidad analítica de cada una de las muestras por triplicado. Simultáneamente y de la misma muestra, se procesa el mismo número de muestras necesarias para cada condición de almacenaje hasta la etapa preestablecida que fue de 96 horas, se realiza por triplicado. Proseguir el análisis de cada una de las preparaciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una disolución de referencia recientemente preparada. Esta determinación se realiza por triplicado.

Calcular la media aritmética del análisis inicial (\bar{Y}_0) y de cada condición de almacenaje (\bar{Y}_1). Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial ($|d_i|$).

Seguir el procedimiento de la preparación de la muestra de referencia, y la preparación de las disoluciones estándares, descrito en la metodología general para la determinación de piroxicam. Se pesó una cantidad de placebo cargado; la cual fue de 273.6 mg. equivalente a 23 mg de piroxicam.

Se proceden a almacenar las disoluciones correspondientes con el siguiente orden:

Corrida	Almacenamiento de las muestras
1	Temperatura ambiente y con presencia de luz
2	Temperatura ambiente y con ausencia de luz
3	Temperatura de 4 °C (refrigerador) y con ausencia de luz

Tabla No. 13 Orden de almacenamiento de las muestras a analizar, para determinar la estabilidad de la muestra

Se prepararon tres disoluciones estándar por triplicado para cada condición de almacenamiento y un blanco de reactivos; utilizando matraces aforados de 25 mL (Disolución B), como se muestra en la tabla No.1 del procedimiento general para la preparación de la serie de disoluciones a analizar.

Para la realización de la estabilidad analítica de la muestra se sigue lo señalado en la tabla No.13, los 9 matraces volumétricos para cada condición de almacenamiento se llevaron al aforo con agua destilada.

Se leyó la absorbencia que presentó cada una de las disoluciones, en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

No. Matraz	Disolución del complejo de ferroína (mL)	Aforo con agua destilada (mL)	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$
1	0	10	0
2	2.5	10	9.2
3	2.5	10	9.2
4	2.5	10	9.2

Tabla No. 14 Preparación de la serie estándar, para la determinación de la estabilidad analítica de la muestra.

4.10 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

La exactitud y repetibilidad del método determina la concordancia entre el valor obtenido de los resultados utilizando el placebo con carga y la sustancia de referencia de piroxicam de pureza conocida.

Se calcula la media aritmética (\bar{Y}), la desviación estándar S , el coeficiente de variación CV y el intervalo de confianza para la media poblacional $I_c(\mu)$ del porcentaje de recobro.

□

Para la determinación de este parámetro se requirió de la preparación de la formulación con las cantidades descritas en la tabla No. 4, adicionándole la cantidad de analito correspondiente al 100 % de piroxicam (placebo con carga) y la sustancia de referencia del piroxicam.

Se pesó una cantidad de placebo cargado de 273.6 mg. equivalente a 23 mg de piroxicam y 30 mg de la sustancia de referencia.

Seguir el procedimiento de la preparación de la muestra de referencia, y la preparación de las disoluciones estándares, descrito en la metodología general para la determinación de piroxicam.

Se prepararon seis disoluciones estándar por triplicado y un blanco de reactivos; utilizando matraces aforados de 25 mL (Disolución B), como se muestra en la tabla No.1 del procedimiento general para la preparación de la serie de disoluciones a analizar.

Para la determinación de la exactitud y repetibilidad del método se sigue lo descrito en las tablas No.15 y 16, las muestras contenidas en 42 matraces volumétricos se llevaron al aforo con agua destilada.

Se leyó la absorbencia que presentó cada una de las disoluciones, en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 510 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

No. Matraz	Disolución del complejo de ferroína (mL)	Aforo con agua destilada (mL)	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$
1	0	10	0
2	2.5	10	12.0
3	2.5	10	12.0
4	2.5	10	12.0
5	2.5	10	12.0
6	2.5	10	12.0
7	2.5	10	12.0

Tabla No. 15. Preparación de la serie estándar con la sustancia de referencia de piroxicam, para la determinación de la exactitud y repetibilidad del método.

No. Matraz	Disolución del complejo de ferroína (mL)	Aforo con agua destilada (mL)	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$
1	0	10	0
2	2.5	10	9.2
3	2.5	10	9.2
4	2.5	10	9.2
5	2.5	10	9.2
6	2.5	10	9.2
7	2.5	10	9.2

Tabla No. 16. Preparación de la serie estándar con placebo cargo, para la determinación de la exactitud y repetibilidad del método.

CAPÍTULO V

RESULTADOS.

RESULTADOS

5.1 OBTENCIÓN DEL ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL PRODUCTO DE REACCIÓN ENTRE EL PIROXICAM Y LA FERRÍINA.

En esta primera etapa, para el producto de la reacción entre el piroxicam y la ferriína, se realizó un barrido en un intervalo de longitud de onda de 400 a 600 nm, correspondiente a la zona del visible, para determinar la longitud de onda de máxima absorción de la ferriína.

En la figura No.4, se muestra el espectro de absorción de la reducción de la ferriína por el piroxicam, observándose la longitud de onda de máxima absorción que presenta a 510 nm. A este valor de longitud de onda, se realizaron todas las determinaciones necesarias para llevar a cabo la validación del método.

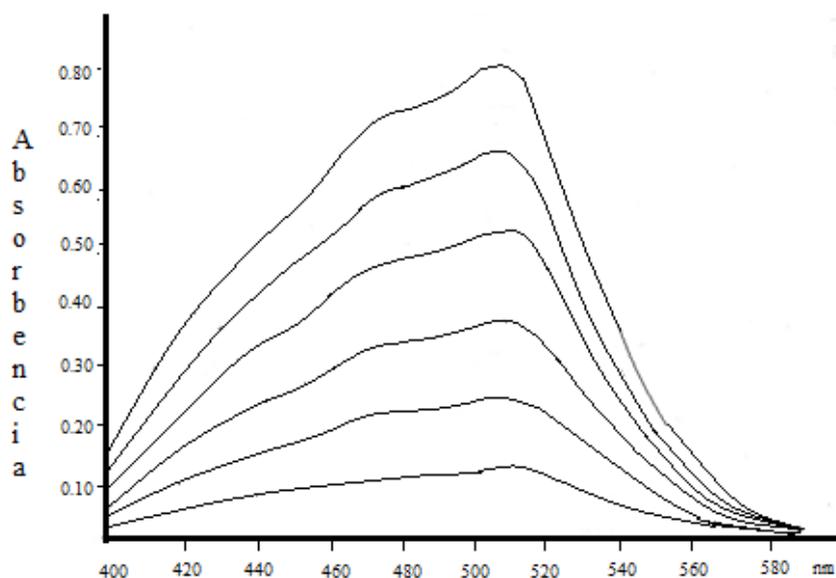


Figura No 4. Gráfico de absorción de la ferriína, producto de la reacción entre el piroxicam y la ferriína.

5.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Para determinar la precisión del sistema, se prepararon las disoluciones de la sustancia de referencia de piroxicam, se disolvieron en 10 mL de agua destilada con una concentración de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Estas disoluciones se trataron como se describe en la metodología general y se les determinó la absorbencia que presentaron a la longitud de onda de 510 nm utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los experimentos se realizaron por triplicado y a continuación en la tabla No.17 se muestran los resultados y el tratamiento estadístico de los datos, así como en la tabla No. 18 en donde se muestra cada parámetro para concluir si cumple o no el resultado experimental con el teórico.

Volumen de la disolución del complejo de ferroína (mL)	Concentración de piroxicam $\mu\text{g mL}^{-1}$	Absorbencia de la disolución de referencia (y)
2.5 mL	12	0.5573
		0.5563
		0.5573
		0.5563
		0.5560
		0.5566
	Σx	3.3399
	Σx^2	1.8592

Tabla No. 17 Resultados de la precisión del sistema. Se utilizó 30 mg de piroxicam de la sustancia de referencia para cada determinación.

Parámetro	Valor obtenido experimentalmente	Criterio de aceptación
\bar{y}	0.5566	-----
S	5.58×10^{-4}	-----
CV	0.1%	CV \leq 1.5 % para métodos físico – químicos ⁽²²⁾

Tabla No. 18 Comparación del valor obtenido para cada parámetro con respecto al criterio de aceptación.

En la precisión del sistema se cumplió con todos los criterios de aceptación como es el caso de la desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV), en éste último el valor obtenido experimentalmente es de 0.1 %.

5.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para evaluar el parámetro de la linealidad del sistema se realizaron 3 ensayos con 5 concentraciones diferentes de piroxicam cada uno, después de llevar a cabo la reacción óxido reducción entre el piroxicam y la ferriína, se continúa con la metodología general.

A las diluciones resultantes de cada ensayo se les midió la absorbencia que presentaban a la longitud de onda de 510 nm. Como se muestra en la tabla No. 19 y en la figura No. 5.

Matraz Número	Cantidad adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) más placebos (x)	Absorbencia (y)
1	7.2	0.169
2	7.2	0.170
3	7.2	0.169
4	9.6	0.222
5	9.6	0.238
6	9.6	0.254
7	12	0.345
8	12	0.339
9	12	0.311
10	14.4	0.450
11	14.4	0.450
12	14.4	0.426
13	16.8	0.522
14	16.8	0.534
15	16.8	0.529
	$\Sigma x = 180$	$\Sigma y = 5.128$
	$\Sigma x^2 = 2332,8$	$\Sigma y^2 = 2.2962$
	$(\Sigma x)^2 = 32400$	$(\Sigma y)^2 = 28615.70264$

Tabla No. 19 Resultados de la linealidad del sistema del piroxicam con ferriina.

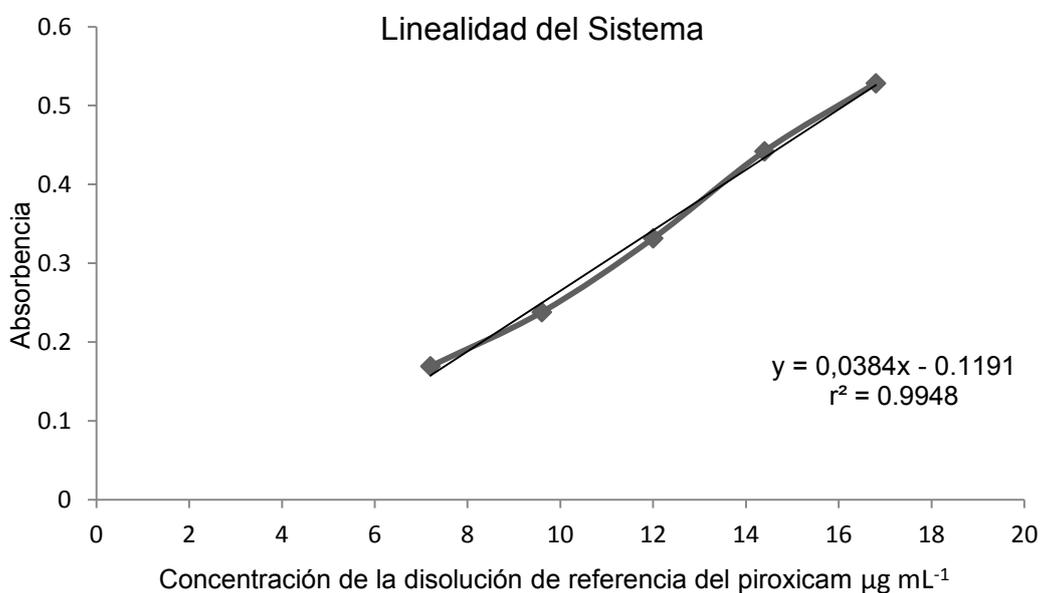


Figura No.5 Linealidad del sistema de piroxicam-ferriina, muestran los resultados de los 3 ensayos realizados.

Parámetro	Valor obtenido experimentalmente	Criterio de aceptación
Ecuación de la recta	$y = 0.0384x - 0,1191$	$y = b_1x + b_0$
r^2	0.9948	≥ 0.98
IC (β_1)	0.01395325199, 0.06287874801	El intervalo no incluye el cero ⁽²²⁾

Tabla No. 20 Comparación del valor obtenido para cada parámetro con respecto al criterio de aceptación.

5.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para evaluar la linealidad del método se realizaron 5 concentraciones de piroxicam con carga, después de llevar a cabo la reacción óxido reducción entre el piroxicam cargado y la ferriína.

Se le midió la absorbencia a cada una de las disoluciones a una longitud de onda de 510 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 21.

Matraz Número	Cantidad adicionada en $\mu\text{g mL}^{-1}$ más placebos (x)	Cantidad recuperada $\mu\text{g mL}^{-1}$ (y)	Promedio Cantidad recuperada en $\mu\text{g mL}^{-1}$ (y)	% de recobro (y)
1	5.5	5.3775	5.356959425	102.6
2		5.3620		102.9
3		5.3312		103.5
4	7.3	7.4576	7.493579866	98.7
5		7.5038		98.1
6		7.5192		97.9
7	9.2	9.2758	9.260400616	99.2
8		9.2604		99.3
9		9.2449		99.5
10	11.0	11.1556	11.17616846	99.0
11		11.2018		98.6
12		11.1710		98.8
13	12.8	12.6964	12.71700051	101.4
14		12.7118		101.3
15		12.7426		101.1
$\sum x = 138$		$\sum y = 138.0123$		$\sum y = 1501.9$
$\sum x^2 = 1371.1$		$\sum y^2 = 1371.1097$		$X = 100.1266$
$(\sum x)^2 = 19044$		$(\sum y)^2 = 19047.402$		$\sum y^2 = 150427.77$
				$(\sum y)^2 = 2255703.6$
				$S = 1.8425397$

Tabla No. 21 Datos correspondientes a los cinco niveles de la cantidad adicionada de piroxicam a placebos, cantidad recuperada y el coeficiente porcentual de la cantidad adicionada de piroxicam en respuesta a la linealidad del método.

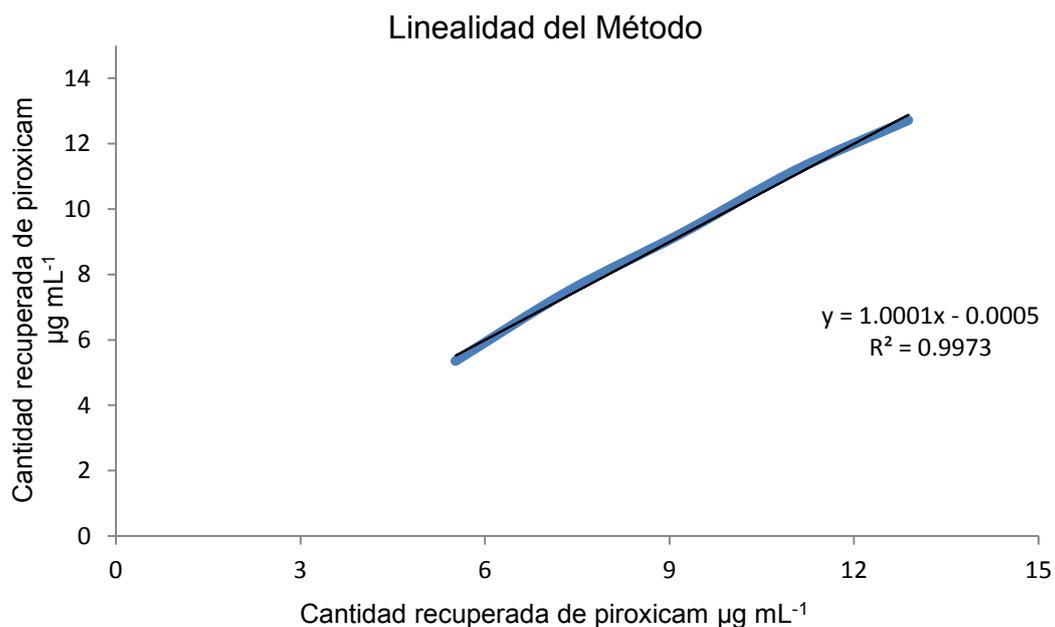


Fig. No.6 Linealidad del método para la determinación de piroxicam.

Parámetro	Valor obtenido experimentalmente	Criterio de aceptación
Ecuación de la recta	$y=1.0001x+0.0005$	$y = b_1 x + b_0$
r^2	0.99	≥ 0.98
IC (β_1)	0.9777347087, 1.022554647	El intervalo incluye la unidad ⁽²²⁾
IC (β_0)	-0.214760652, 0.2137433454	El intervalo incluye el cero ⁽²²⁾
$CV_{y/x}$	1.1%	El valor no excede del 3% ⁽²²⁾
CV	1.8%	El valor no excede del 3% ⁽²²⁾
IC (μ)	99.1 100.1	El intervalo incluye el valor de 100 ⁽²²⁾

Tabla No. 22 Comparación del valor obtenido para cada parámetro con respecto al criterio de aceptación.

5.5 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Para evaluar la precisión del método, se analizaron por triplicado, una muestra homogénea del producto que contenga un nivel cercano o igual al 100 %, en dos días diferentes y realizados por dos analistas diferentes.

	ANALISTA	
	Cantidad recuperada del analito ($\mu\text{g mL}^{-1}$ de piroxicam)	
	1	2
Día 1	9.1354	9.3054
	9.1770	9.4062
	9.1666	9.3906
Día 2	9.4791	9.3906
	9.4947	9.4062
	9.5052	9.3958

Tabla No. 23 Cantidad de piroxicam recuperada, con placebo cargado.

Parámetro	Valor obtenido experimentalmente	Criterio de aceptación
Promedio	9.3610	-----
S	0.1289	-----
CV	1.4%	$\leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos ⁽²²⁾

Tabla No. 24 Comparación del valor obtenido para cada parámetro con respecto al criterio de aceptación.

5.6 ESPECIFICIDAD

Se evaluó la especificidad con las disoluciones de piroxicam preparadas a partir del placebo con carga, placebo y piroxicam. Este experimento se realizó con el fin de observar si existe o no interferencia entre los compuestos del placebo y el piroxicam.

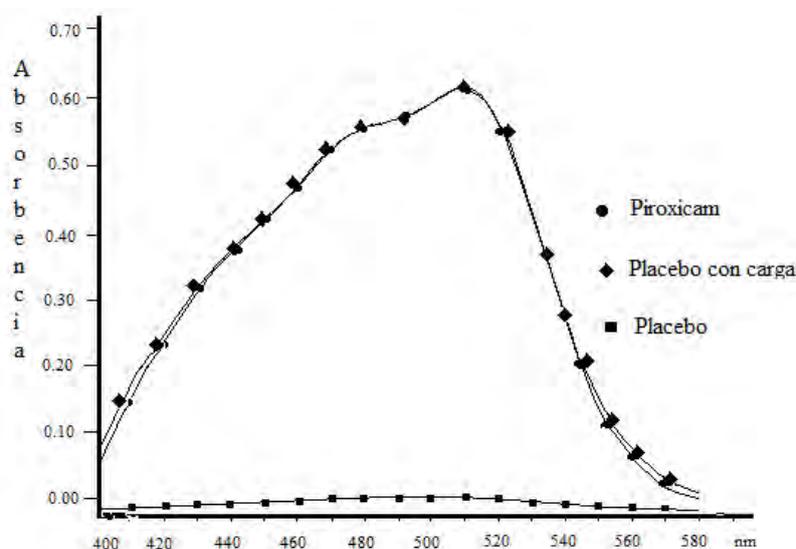


Figura. No.7 Espectro de absorción de la ferroína para observar la especificidad del piroxicam respecto a los componentes del placebo.

5.7 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Para evaluar la estabilidad analítica de las muestras independientes, se procesaron hasta la etapa preestablecida por lo menos por triplicado una muestra homogénea. Para ello, se pesaron **273.6 mg** de la muestra, equivalentes a 23 mg de piroxicam los cuales se disolvieron en agua destilada y a partir de ella se prepararon disoluciones de concentraciones de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ de piroxicam con carga.

Se llevó a cabo la técnica reportada en el procedimiento general y al producto de reducción de la ferrina, se le determinó las absorbencias a cada una a la longitud de onda de 510 nm, bajo las condiciones de trabajo establecidas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 26.

Corrida	Almacenamiento de las muestras
1	Temperatura ambiente y con presencia de luz
2	Temperatura ambiente y con ausencia de luz
3	Temperatura de 4 °C (refrigerador) y con ausencia de luz

Tabla No. 25 Indica el orden de almacenamiento de las muestras a analizar.

Muestra	Inicial (y_0)		Corrida 1. Tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente y con presencia de luz			
			24 Horas (y_1)		48 Horas (Y_2)	
1	102.0		75.8		65.1	
2	101.5		75.9		65.1	
3	101.7		75.6		65.3	
	Σy_0	305.3	Σy_1	227.2	Σy_2	195.5

Tabla No.26 Contenido de analito en porciento de recobro para un método espectrofotométrico de la corrida 1. Almacenada a temperatura ambiente y con presencia de luz. Obteniendo el porciento de recobro en el tiempo inicial (y_0), a las 24 horas (y_1) y 48 horas (Y_2).

Muestra	Inicial (y_0)		Corrida 2. Tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente y con ausencia de luz			
			24 Horas (y_1)		48 Horas (Y_2)	
1	102.4		76.6		69.6	
2	102.6		79.6		69.4	
3	102.9		79.3		69.5	
	Σy_0	307.9	Σy_1	238.6	Σy_2	208.5

Tabla No.27 Contenido de analito en porciento de recobro para un método espectrofotométrico de la corrida 2. Almacenada a temperatura ambiente y con ausencia de luz. Obteniendo el porciento de recobro en el tiempo inicial (y_0), a las 24 horas (y_1) y 48 horas (Y_2).

Muestra	Inicial (y_0)		Corrida 3. Tiempo de almacenamiento a 4 °C (refrigerador) y con ausencia de luz			
			24 Horas (y_1)		48 Horas (Y_2)	
1	103.1		87.0		74.9	
2	103.3		87.3		74.8	
3	103.3		87.5		74.9	
	Σy_0	309.7	Σy_1	261.9	Σy_2	224.7

Tabla No.28 Contenido de analito en porciento de recobro para un método espectrofotométrico de la corrida 3. Almacenada a 4 °C y con ausencia de luz. Obteniendo el porciento de recobro en el tiempo inicial (y_0), a las 24 horas (y_1) y 48 horas (Y_2).

Corrida 1. Tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente y con presencia de luz		
Parámetro	Valor obtenido experimentalmente	Criterio de aceptación
Media aritmética del análisis inicial	$(y_0) = 101.7754604$	-----
Media aritmética del análisis en cada condición de almacenaje	$(y_1) = 75.73972433$ $(y_2) = 65.18355406$	-----
Media aritmética del análisis de cada condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial	$ d_1 = \bar{y}_1 - \bar{y}_0 $ 26.03%	El valor no excede del 2 % ⁽²²⁾
	$ d_2 = \bar{y}_2 - \bar{y}_0 $ 36.06%	

Tabla No. 29 Comparación de los valores obtenidos para cada parámetro con respecto al criterio de aceptación de la condición de almacenamiento a temperatura ambiente y con presencia de luz.

Corrida 2. Tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente y con ausencia de luz		
Parámetro	Valor obtenido experimentalmente	Criterio de aceptación
Media aritmética del análisis inicial	$(y_0) = 102.6503$	-----
Media aritmética del análisis en cada condición de almacenaje	$(y_1) = 79.54008983$ $(y_2) = 69.5087939$	-----
Media aritmética del análisis de cada condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial	$ d_1 = \bar{y}_1 - \bar{y}_0 $ 23.1%	El valor no excede del 2 % ⁽²²⁾
	$ d_2 = \bar{y}_2 - \bar{y}_0 $ 33.4%	

Tabla No. 30 Comparación de los valores obtenidos para cada parámetro con respecto al criterio de aceptación de la condición de almacenamiento a temperatura ambiente y con ausencia de luz.

Tiempo de almacenamiento a temperatura de 4 °C (refrigerador) y con ausencia de luz		
Parámetro	Valor obtenido experimentalmente	Criterio de aceptación
Media aritmética del análisis inicial	$(y_0) = 103.241597$	-----
Media aritmética del análisis en cada condición de almacenaje	$(y_1) = 87.3689$ $(y_2) = 74.8846415$	-----
Media aritmética del análisis de cada condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial	$ d_1 = \bar{y}_1 - \bar{y}_0 $ 15.9%	El valor no excede del 2 % ⁽²²⁾
	$ d_2 = \bar{y}_2 - \bar{y}_0 $ 28.3%	

Tabla No. 31 Comparación de los valores obtenidos para cada parámetro con respecto al criterio de aceptación de la condición de almacenamiento a temperatura de 4 °C (refrigerador) y con ausencia de luz.

5.8 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

Para determinar la exactitud y la repetibilidad del método se realizaron dos ensayos con seis muestras cada uno, es decir, placebo cargado con piroxicam y la sustancia de referencia de piroxicam de pureza conocida.

Ensayo 1

Muestras	Abs	Cantidad adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) mas placebos (x)	Cantidad recuperada en $\mu\text{g mL}^{-1}$	% de recobro (y)
1	0.450	9.2	9.2968	101.1
2	0.452	9.2	9.3281	101.4
3	0.453	9.2	9.3437	101.6
4	0.455	9.2	9.3750	101.9
5	0.454	9.2	9.3593	101.7
6	0.454	9.2	9.3593	101.7

Tabla No. 32 Resultados obtenidos para la determinación de exactitud y repetibilidad del método, con placebo cargado.

Ensayo 2

Muestras	Abs	Cantidad adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) mas placebos (x)	Cantidad recuperada en $\mu\text{g mL}^{-1}$	% de recobro (y)
1	0.344	12	12.0598	100.5
2	0.344	12	12.0598	100.5
3	0.352	12	12.2682	102.2
4	0.35	12	12.2161	101.8
5	0.345	12	12.0859	100.7
6	0.352	12	12.2682	102.2

Tabla No. 33 Resultados obtenidos para la determinación de la exactitud y repetibilidad del método, con la sustancia de referencia de piroxicam.

Parámetro	Valor obtenido experimentalmente		Criterio de aceptación
	Ensayo 1	Ensayo 2	
Promedio	101.1	101.3	-----
S	0.2024	0.8507	-----
CV	0.20%	0.84%	≤ 2 % para métodos químicos o espectrofotométricos ⁽²²⁾
$IC(\mu)$	99.9 100.3	100.4 102.12	Debe de incluir el 100 % ⁽²²⁾

Tabla No. 34 Resultados de los parámetros de la exactitud y repetibilidad del método.

CAPÍTULO 6

ANÁLISIS DE

RESULTADOS

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

ESPECIFICIDAD.

Con esta prueba, se desea saber si existen o no interferencias de los constituyentes de la formulación, con la sustancia en estudio, el piroxicam y para ello se realizó la prueba con la sustancia de referencia de piroxicam, el placebo cargado con la sustancia de referencia y con el placebo sin carga.

En la figura No. 7 se observa que tanto la sustancia de referencia de piroxicam, como el placebo cargado y bajo las mismas condiciones de concentración, muestran espectros de absorción que se sobreponen, mientras que el placebo sin carga, su absorción tiende a cero en todo el ámbito de longitud de onda de trabajo.

Con base en ello se concluye que no existe interferencia de los componentes de la formulación sobre el piroxicam y que el método que se está proponiendo, es específico para este principio activo.

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

En la evaluación de este parámetro de desempeño, se consideraron 5 niveles de concentraciones diferentes, realizándose por triplicado cada nivel.

Los resultados obtenidos presentan un comportamiento lineal dentro del intervalo de concentración de 7.2 a 16.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la ecuación de recta obtenida es de la forma: $y = 0.0384 x - 0.1191$ y con un coeficiente de correlación de $r^2 = 0.9948$

En el análisis estadístico se tomaron todos los puntos para la realización de la linealidad del sistema, realizando 15 réplicas en total.

PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Para la realización del parámetro de precisión del sistema y basados en los cálculos estadísticos se obtuvieron los siguientes valores: desviación estándar (S) de 0.000558, el coeficiente de variación CV, fue de 0.1 % y el valor promedio (\bar{Y}) de 0.5566.

LINEALIDAD DEL MÉTODO.

En la linealidad del método los resultados confirman el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer en el ámbito de concentración trabajado y no existe interferencia de los constituyentes que integran el placebo.

Con la evaluación de éste parámetro se obtuvo una recta, con un coeficiente de correlación r^2 , de 0.9973, el ámbito de concentración fue de 5.5 a 12.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y la ecuación de la gráfica: $y = 1.0001x - 0.0005$. Por lo tanto, el parámetro linealidad de método es de aceptarse.

Con base en ello, se utilizó la ecuación de la recta para calcular las concentraciones del complejo ferroína que es proporcional a la cantidad de piroxicam recuperado.

PRECISIÓN DEL MÉTODO.

En la evaluación de la precisión del método, se consideró la muestra que tiene el nivel cercano al 76.6 %, realizándolo por dos días y dos analistas diferentes. Los resultados obtenidos conforme a la cantidad recuperada del piroxicam son similares a la cantidad adicionada a la misma, tal y como se esperaba.

Del análisis estadístico se obtuvo un coeficiente de variación (CV) de 1.4 %, por lo tanto, es un valor aceptable, ya que debe de ser menor o igual al 3 % para los métodos espectrofotométricos.

ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

En la evaluación de la estabilidad analítica de la muestra, se observa que en este parámetro cumple satisfactoriamente dentro de las primeras 24 horas en ausencia de luz y a temperatura de 4 °C, ya que se obtuvo el valor de la media aritmética del análisis las condiciones de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial para el día 1 y día 2 de 15.9 y 28.3 %, es decir, después de este intervalo no se garantizaría la estabilidad del complejo, ya que el valor de este criterio de aceptación no debe de exceder del 2 %.

En las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente con ausencia de luz se obtuvieron los resultados para el día 1 y día 2, de 23.1 y 33.4 %. En las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente con presencia de luz se obtuvieron los resultados para el día 1 y día 2, de 26.03 y 36.06 % de la media aritmética del análisis las condiciones de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial.

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

Con la exactitud y repetibilidad del método, se calculó la cantidad de piroxicam a partir de las absorbencias registradas en cada ensayo. Se obtuvieron los porcentajes de recobro para cada muestra de los 2 ensayos y a partir de estos valores se realizaron los análisis estadísticos.

Los resultados obtenidos para el ensayo 1 y 2 la desviación estándar (S) 0.20 y 0.8507 y el coeficiente de variación (CV) 0.20 % y 0.82 % respectivamente cumplen el criterio de aceptación. El intervalo de confianza (IC(μ)) para el ensayo 1 fue de 99.9%, 103.3% y para el ensayo 2 fue de 100.4%, 102.2%, por lo tanto no incluyó el valor de 100 como marca el criterio de aceptación.

Los parámetros de la linealidad, precisión, exactitud y repetibilidad del método, la estabilidad analítica de la muestra y en la especificidad donde se utilizó placebo cargado, no se trabajaron con un nivel cercano o igual al 100 % en la muestra procesada para la medición. Ya que se debió pesar una cantidad de

359.8 mg equivalente a 30 mg de piroxicam del placebo cargado. Sin embargo, se cometió un error sistemático, también llamado error determinado, ya que para los parámetros antes mencionados se pesaron una cantidad de 273.6 mg del placebo con carga, que experimentalmente es el equivalente a 23 mg de piroxicam y la concentración que representa el 76.6 % de la muestra procesada para la medición.

Este tipo de error se reproduce si se repite el experimento de la misma manera, como fue el caso para la determinación en los parámetros involucrados. Este tipo de error se detectó y se corrigió.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Independientemente de que en la literatura no se encontró reportado el valor de potencial normal de reducción del piroxicam y sabiendo que el potencial normal del sistema ferriína-ferroína es de 1.147 volts, así como a pruebas preliminares realizadas en el laboratorio con el piroxicam y el complejo ferriína a un pH controlado, se propuso un método analítico el cual se validó y posteriormente será aplicado a la determinación del contenido de piroxicam en muestras farmacéuticas comerciales.

De esta manera se desarrolló un método, que no está reportado en la literatura general.

Los parámetros establecidos en esta metodología propuesta, cumplieron satisfactoriamente los criterios de aceptación propuestos en la guía de validación de métodos analíticos ⁽²³⁾.

En la linealidad del sistema se determinó que las absorbencias obtenidas son directamente proporcionales a las concentraciones que se utilizaron. Se demostró, que con la adición del placebo, no existe interferencia alguna en la formación y lectura de la absorbencia del producto obtenido al hacer reaccionar el piroxicam con la ferriína.

La especificidad se evaluó con las disoluciones de piroxicam preparadas a partir del placebo con carga, placebo y piroxicam. Este experimento se realizó con el fin de observar si existe o no interferencia entre los compuestos del placebo con carga y el piroxicam, observando que no hay interferencia de los componentes del placebo cargado, para la cuantificación del piroxicam. Ya que son parecidos los espectros de absorción del placebo con carga y el piroxicam, mientras que el placebo sin carga no presenta absorción en la región espectral de trabajo, esto es, no presenta interferencia alguna.

Para los parámetros de desempeño, precisión, exactitud, repetibilidad y porcentaje de recobros, se puede decir que cumplen con los criterios de aceptación conforme a la guía de validación⁽²²⁾

En la estabilidad analítica del producto de reacción entre el piroxicam y la ferriína, nada más cumple con los criterios de aceptación en las primeras 24 horas, ya que a partir de este tiempo es inestable el complejo.

Se propone un mecanismo en el cuál se muestra la reacción entre el piroxicam y la ferriína, este mecanismo fue propuesto por los maestros: José Manuel Méndez Stivalet y Pedro Villanueva González⁽²⁵⁾.

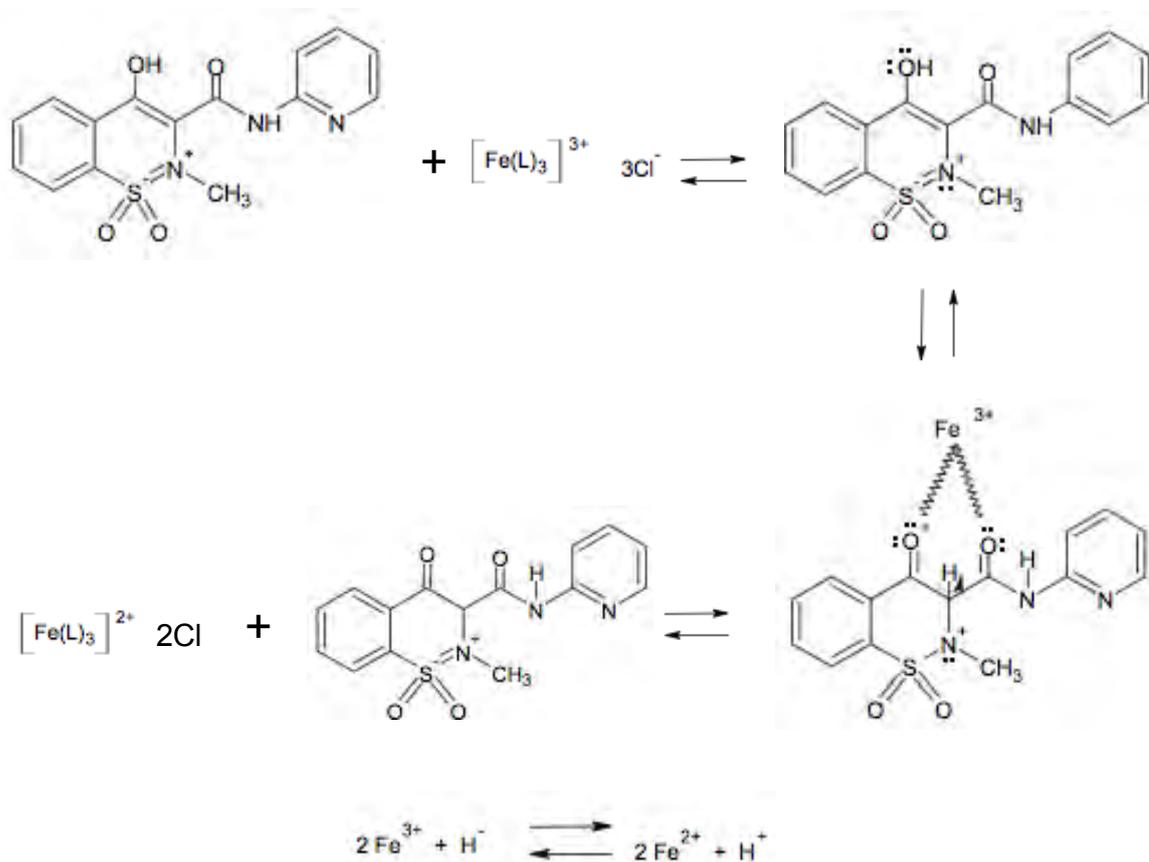


Fig. 8 Mecanismo de reacción del piroxicam con la ferriína, propuesto por los profesores José Manuel Méndez Stivalet y Pedro Villanueva González.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.drugfuture.com/chemdata/piroxicam.html>., consultado el 20 de enero de 2012
2. http://www.oepm.es/pdf/ES/0000/000/02/19/88/ES-2198872_T3.pdf., consultado el 20 de enero de 2012
3. Malgorzata Starek, Jan Krzek. A review of analytical techniques for determination of oxicanes nimesulide and nabumetone. *Talanta*, **77** (2009) 925-942.
4. Muhammad A. Munir, MD, Nasr Enany, MD, y Jun-Ming, MSc, MD. Analgésicos no opioides., *Med Clin N Am*, 91 (2007) 97-111.
5. Enrique Raviña Rubira. Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos. Santiago de Compostela. (Universidad de Santiago de Compostela, (2008), p 129-129.
6. <http://indicededrogas.com.ar/piroxicam.htm>., consultado el 20 de enero de 2012
7. P. Norouzi, M. R. Ganjali, S. Labbafi, A. Mohammadi., Subsecond FFT – adsorptive Voltammetric technique as a Novel Method for Subnano Level Monitoring of Piroxicam in its Tablets and Bulk Form at Au Microelectrode in Flowing Solutions., *Analytical Letters*, (2007) p 747-762.
8. Mohamed A. El-Ries, Gehad Mohamed, Shaeban KHALIL, and Manal El-SHALL. Spectrophotometric and Potentiometric Determination of Piroxicam and Tenoxicam in Pharmaceutical Preparations., *Chem. Pharm. Bull.* **51** (2003), p 8-10.
9. Jamshid L. Manzoori and Mohammad Amjadi. Spectrofluorometric Determination of Piroxicam in Pharmaceutical Preparations and Spiket Human Serum Using Micellar Media., *Microchim. Acta*, **143**, (2003), p 39-44.
10. Idrees F. AL-MOMANI. Indirect Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Meloxicam, Tenoxicam and Piroxicam in Pharmaceutical Formulations. *Analytical Sciences*., december 2006, **22**. (2006), p 1611-1613.
11. Saced Shahrokhian, Effat Jokar, Masoumeh Ghalkhani. Electrochemical Determination of Piroxicam in the Surface of Pyrolytic Graphite Electrode Modified with a Film of Carbon Nanoparticle-Chitosan. *Microchim Acta*., **170** (2010), p 141-146.

12. Yania Suárez Pérez, Oscar García Pulpeiro, Thuy Dao Thanh, Munkhzul Mishing. Diseño y Validación de un Método Espectrofotométrico para el Control de Calidad del Piroxicam Jalea 0.5 %, Revista Cubana de Farmacia, (2009), **43** (4), p 20-30.
13. A. Doliwa, S. Santoyo, M.A. Campanero, P. Ygartua. Sensitive LC Determination of Piroxicam After in vitro Transdermal Permeation Studies. Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis, **26** (2001), p 531-537.
14. G.M. Escandar, A.J. Bystol, A.D. Campiglia. Spectrofluorometric Method for the Determination of Piroxicam and Pyridoxine. Analytica Chimica Acta, **466** (2002), p 275-283.
15. Alaa S. Smin., Spectrophotometric Determination of Piroxicam and Tenoxicam in Pharmaceutical Formulations Using Alizarin. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **29** (2002), p 729-736.
16. Hye Young Ji, Hye Won Lee, Young Hoon Kim, Dong Won Jeong, Hye Suk Lee., Simultaneous Determination of Piroxicam, Meloxicam, and Tenoxicam, in Human Plasma by Liquid Chromatography With Tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography B, **826** (2005), p 214-219.
17. Anna Crecelius, Malcolm R. Clench, Don S. Richards, Vic Parr. Quantitative Determination of Piroxicam by TLC.MALDI TOF MS. Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **35** (2004), p 31-39.
18. Andrew R McKinney, Craig J. Suann and Allen M. Stenhouse. The Detection of Piroxicam, Tenoxicam, and Their Metabolites in Equine Urine by Electrospray Ionisation Ion Trap Mass Spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. (2004) **18**, p 2338-2342.
19. B. Razaeei, S. Mallakpour, and O. Rahmanian. A Selective Solid-Phase Extraction and Preconcentration Method With Using Molecularly Imprinted Polymer for Piroxicam In Pharmaceutical Sample. Analytical Letters, **41** (2008), p 1818-1831.
20. H. Bartsch, A. Eiper, H. Kopelent-Frank. Stability Indicating Assays for the Determination of Piroxicam Comparison of Methods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **20** (1999), p 531-541.
21. Harris Daniel C, Análisis Químico Cuantitativo, tercera edición, Grupo editorial iberoamericana, S.A. de C.V. 1992, p 495-499.
22. García Ma. Araceli Evelyn Soberón, Myriam Cortés, Ramón Rodríguez. Guía de Validación de Métodos Analíticos, Editada por el Colegio

Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México A.C. (México).
Edición (2002) p . 8-11, 20-31.

23. Burriel Martí Fernando, Química Analítica Cualitativa, decimoctava edición, Ed. Paraninfo Thomson Learning, (2001) p 175.
24. Volker Buhler, Generic Drug Formulations, Fine Chemical. 1ST edition 1997. BASF, p 2.9 Tablet Formulations Lab Scale.
25. Mecanismo de reacción propuesta por los profesores José Manuel Méndez Stivalet y Pedro Villanueva González.

ANEXOS

ANEXO A

MÉTODO ANALÍTICO

Un método analítico se define como: la descripción de la secuencia de: actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. Los métodos analíticos están definidos como un sistema crítico en el aseguramiento de la calidad de una empresa farmacéutica, ya que impactan de una manera directa en la evaluación de la calidad de un producto, siendo también importante para una empresa, utilizar métodos de menor costo y mayor rapidez.

Un método analítico mide un componente específico en una muestra y como en todo proceso de medición, éste debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido.

Los métodos analíticos son utilizados para determinar la potencia de los ingredientes, activos, niveles de impurezas o degradación de productos. La calidad de los métodos analíticos requiere la demostración apropiada de que cumple con linealidad, exactitud, precisión y especificidad.

Todo producto farmacéutico debe de reunir atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad, para cumplir con los aspectos normativos oficiales internos y no menos importantes, los éticos.

Un medidor de las características críticas de la calidad de un producto, es el método analítico, ya que éste debe de ser confiable para las personas que lo necesitan, en este caso, a los pacientes que requieren un antiinflamatorio no esteroideo.

El método analítico, es una metodología de medición utilizada para medir un componente de interés en una muestra, para ellos las empresas farmacéuticas, requieren que las metodologías farmacopéicas sean confiables.

Para ello es necesario realizar estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo, así, un proceso que permite cumplir con este fin, es la validación.

DEFINICIONES.

Analito

Analito es un componente específico de una muestra, a medir en un análisis.

Calibración

Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.

Sustancia de referencia.

La sustancia de referencia es una sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas ó microbiológicas, en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con la sustancia en evaluación.

Documentación.

La documentación, es el conjunto de información que sustenta una actividad realizada.

Especificidad.

La especificidad, es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Exactitud.

La exactitud, es la concordancia entre un valor obtenido, empleando el método y el valor de referencia

Estabilidad analítica de la muestra.

La estabilidad analítica de la muestra, es la propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Intervalo.

El intervalo de trabajo, son las concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito, incluyendo éstas, para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.

Linealidad.

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

Método analítico.

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

Muestra.

Porción del material a estudiar.

Muestra analítica.

La muestra analítica, es una porción del material a evaluar de acuerdo al método analítico.

Parámetro de desempeño

El parámetro de desempeño, es el parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación.

Placebo analítico

El placebo analítico, es una muestra que contienen todos los componentes de un producto a excepción del analito.

Placebo cargado

El placebo adicionado, es la muestra de un placebo analítico al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito.

Precisión.

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

Protocolo de validación.

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

Recobro

El recobro, es la cantidad del analito determinada en el placebo adicionado o muestra adicionada, empleando el mismo método.

Repetibilidad

La repetibilidad es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, utilizando los mismos instrumentos y método.

Reproducibilidad.

La reproducibilidad es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes, realizadas por diferentes laboratorios.

Validación de un método analítico.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método, satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

ANEXO B

Símbolos, abreviaturas y fórmulas

x	Concentración	
y	Respuesta analítica	
\bar{y}	Media aritmética de y	$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n}$
\bar{x}	Media aritmética de x	$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$
s	Desviación estándar	$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$
s_{b_1}	Desviación estándar de la pendiente	$s_{b_1} = s_y \frac{x}{\sqrt{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
r^2	Coefficiente de determinación	$r^2 = \frac{(n \sum xy) - (\sum x)(\sum y)^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$
CV	Coefficiente de variación	$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$
IC(μ)	Intervalo de confianza para la media poblacional	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)$
IC(β_1)	Intervalo de confianza para la pendiente	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-1} s_{b_1}$
$S_{y/x}$	Desviación estándar de regresión	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$
b_1	Pendiente	$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
n	Número de determinaciones	

$t_{0.975}$ Valor de la distribución t de Student, asociado a una confianza de 97.5 % y a grados de libertad, establecidos.

ANEXO C

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

Tabla 30. Tabla estadística de la distribución de la t de student