



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

" ZARAGOZA "

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO
PARA LA CUANTIFICACION DE $CuSO_4$ Y $ZnSO_4$ EN
UN POLVO ANTISEPTICO POR ABSORCION ATOMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

ANA PATRICIA PINEDA ZAVALA



MEXICO, D. F. OCTUBRE DE 1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

**"Es maravilloso alcanzar una meta,
pero lo es más todo el apoyo que me
brindaron para conseguirlo."**

Gracias

A. Patricia Pineda Z.

INDICE

	PAGINA
1.INTRODUCCION.....	1
2.FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	3
<u>2.1BASES FARMACOLOGICAS.....</u>	<u>3</u>
<u>2.2VALIDACION DE METODOS ANALITICOS</u>	<u>8</u>
<u>2.3ABSORCION ATOMICA</u>	<u>16</u>
3.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
4.OBJETIVOS.....	33
5.HIPOTESIS.	34

6.MATERIAL Y METODO.....	35
<u>6.1MATERIAL</u>	35
<u>6.2METODOLOGIA</u>	36
6.2.1DESARROLLO DEL METODO.....	38
6.2.2VALIDACION DEL METODO.....	41
7.RESULTADOS.....	46
<u>7.1RESULTADOS DEL DESARROLLO DEL</u>	
<u>METODO</u>	46
<u>7.2RESULTADOS DE LA VALIDACION</u>	
<u>DEL METODO</u>	54
8.CONCLUSIONES.....	85
9.APENDICES.....	86
10.BIBLIOGRAFIA.....	89

1.INTRODUCCION

Dentro del ámbito industrial se maneja el concepto de calidad cada vez con mayor énfasis, se habla de calidad total, de excelencia y cero errores en mayor o menor grado dependiendo del producto o servicio del cual se trate. Las industrias y compañías que producen servicios o insumos para la salud son en las que se trata con mayor preocupación de la calidad, debido a que en otros campos los errores en los productos resultan en quejas y quizás en la devolución de los servicios, mientras que en el campo de la salud los errores pueden costar vidas humanas.

Por lo anterior se requiere que todo lo que conforma este campo siga lineamientos estrictos y se apegue lo más posible a políticas y procedimientos de calidad.

La industria farmacéutica se cuenta entre las que más enfatizan la observación de la calidad y sobre todo de la eliminación máxima de errores. Dentro de ésta industria se cuenta con departamentos de aseguramiento de la calidad que hace posible, mediante la interacción con el resto de la compañía, que los productos sean confiables; para esto se requiere de métodos y procedimientos que cumplan con tales expectativas.

Teniendo en cuenta éstas necesidades se desarrolla un proyecto para asegurar en cierta forma que los métodos y procedimientos utilizados sean confiables y produzcan los resultados esperados, con el paso del tiempo se crea el concepto de validación y posteriormente se implementan programas de validación.

Así en nuestros días todo método analítico desarrollado debe ser validado con el fin de que pueda utilizarse de acuerdo a las leyes vigentes, además de contribuir a la mayor calidad de los productos y con esto incrementar la competitividad de los mismos dentro de un mercado creciente y con miras a la apertura internacional.

De acuerdo a esto el objetivo del presente trabajo es desarrollar y validar un método analítico que permita la cuantificación dentro de una sola muestra preparada de zinc y cobre para determinar indirectamente la cantidad de sulfato de zinc y sulfato de cobre contenidos en un medicamento comercial como es el polvo antiséptico Dalidome; para lo cual se utilizó la técnica de absorción atómica.

2.FUNDAMENTACION DEL TEMA

2.1BASES FARMACOLOGICAS.

La medicación tópica o local facilita la curación de procesos inflamatorios, por lo que las drogas que poseen dicha acción corresponden al grupo de fármacos antiinflamatorios o antiflogísticos locales. Este grupo comprende:

- a) Polvos protectores, químicamente inertes, que actúan mecánicamente.
- b) Emolientes, sustancias grasas y análogas que protegen y ablandan la piel.
- c) Demulcentes, coloides con propiedades protectoras sobre las mucosas.
- d) Astringentes, precipitantes de las proteínas en la superficie celular que constituyen sustancias de transición con el grupo de sustancias irritantes.

2.1.1ASTRINGENTES.

Se denominan astringentes a fármacos que forman una capa protectora de proteína coagulada por precipitación de ésta. Se clasifican en dos grupos:

- a) Origen vegetal
- b) Origen mineral

Debido a que el medicamento de interés contiene astringentes de origen mineral solo se tratarán éstos.

Los astringentes minerales comprenden las sales solubles de algunos metales pesados como el aluminio, zinc y cobre principalmente.

Estos fármacos producen algunos compuestos llamados proteínatos, algunos de los cuales son solubles en un exceso de proteínas, por lo que la acción es profunda, provocando a veces necrosis celular, cuando el precipitado es insoluble no se produce penetración, los efectos quedan confinados a la superficie celular y resulta una acción astringente dando lugar a los siguientes eventos:

1)El precipitado proteico forma una capa protectora sobre la mucosa y la piel inflamada, frente a los agentes irritantes.

2)La acción se ejerce también sobre el cemento que une las células de los endotelios capilares, así como sobre las células mismas, lo que provoca una disminución de la permeabilidad y retracción de los capilares.

3)Consecuentemente disminuye la exudación inflamatoria y la secreción mucosa de las glándulas, y la mucosa aparece pálida y contraída.

4)Se tiene como efecto general una acción antiinflamatoria.

5)La precipitación o coagulación de las proteínas sanguíneas, así como la retracción capilar, lleva a la detención de las hemorragias capilares superficiales, con cierta acción hemostática local.

Otra acción farmacológica de éstos fármacos es la acción antiséptica, tratándose más bien de efectos bacteriostáticos cuando se emplean las

concentraciones habituales, por un mecanismo de precipitación de las proteínas bacterianas.

La muestra en estudio es un polvo antiséptico que contiene sulfato de cobre (CuSO_4), sulfato de zinc (ZnSO_4), alcanfor y excipientes; es una mezcla soluble en agua que se utiliza sobre el tejido vivo para eliminar o prevenir el crecimiento de microorganismos en base a las propiedades astringentes del CuSO_4 y el ZnSO_4 .

El antiséptico a utilizar tiene por nombre comercial Dalidome y la formulación referida a la cantidad por sobre es:

Sulfato de cobre.....	0.389 g
Sulfato de zinc.....	1.362 g
Alcanfor.....	0.058 g
Excipiente, c.b.p.....	2.200 g

Este producto también se conoce como solución cuprozíncica alcanforada o agua de Dalibour está indicado en impétigo, piodermatitis, dermatitis exfoliativa, hiperhidrosis, dermatosis pustulares, eczemas agudos rezumantes con formación de costras debiendo constituir siempre el tratamiento inicial en forma de apósitos o compresas húmedas y previo al empleo de las lociones con polvos protectores; debido a su absorción a través de la piel ayuda a regenerar los tejidos dañados; su uso está contraindicado sobre los ojos o superficies descubiertas, así mismo no deberá emplearse por tiempo prolongado ni en áreas amplias del cuerpo. Este medicamento no presenta interacciones con otros fármacos, ni efectos secundarios como carcinogénesis, teratogénesis o alteraciones de la fertilidad por lo que es de uso común en las afecciones señaladas.

Esta preparación se emplea aplicándola en forma de apósitos o compresas húmedas, para lo cual se emplean compresas de gasa o tela humedecidas con dicha solución, que se aplican sobre el área inflamada y se renuevan cada 10 minutos durante 2 horas, 3 veces por día, si las lesiones no son agudas puede ocluirse el apósito mediante un plástico y una venda de gasa.

El sulfato de cobre tiene acción fungicida y se utiliza también en gotas oftálmicas, así mismo, tiene efecto sobre la mucosa gástrica y produce vómito

reflejo, casi no se absorbe por administración oral. Al inyectarse por vía intravenosa también produce vómito por estimulación de quimiorreceptores.

Las sales de zinc, principalmente el sulfato de zinc, se utilizan también como antitranspirantes y eméticos. El sulfato de zinc irrita la mucosa gástrica produciendo vómito al ingerirse.

REFERENCIAS: 6, 7, 1

2.2 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

2.2.1 GENERALIDADES

El concepto de validación se manejó originalmente por la Food and Drug Administration (FDA); primero en un comunicado de 1906 que exige el control de medicamentos para evitar su adulteración, posteriormente en 1938 convoca a los fabricantes para que éstos eliminen de sus formulaciones cualquier sustancia que pueda ser tóxica y se implementa el acta de acondicionamiento de seguridad de los medicamentos. A partir de 1967 se emiten normas de correcta fabricación y de control de la calidad de los productos llamadas Prácticas Adecuadas de Manufactura (PAM's) en las que se consideran todos aquellos factores que contribuyen a la obtención de alta calidad en los procesos de fabricación, así como la reproducibilidad lote a lote. Finalmente en 1983 se determina el significado de validación y se establecen criterios de aceptación y limitantes para considerar la validez de un proceso y/o de un método analítico.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Generalmente en este proceso se evalúa la precisión, linealidad, exactitud y especificidad del método proporcionando una medida del comportamiento del mismo.

Según las guías generales de validación los parámetros a evaluar se determinan de acuerdo a la aplicación que se le dará al método en cuestión, y se presentan en el apéndice I.

Para la validación de métodos analíticos utilizados en control de calidad, tal es el caso del que se presenta en este trabajo, los parámetros a evaluar son:

- +Linealidad y precisión del sistema
- +Linealidad del método
- +Exactitud y repetibilidad al 100%
- +Precisión (reproducibilidad) del método
- +Especificidad del método
- +Estabilidad de la muestra analítica.

2.2.2DEFINICIONES Y CRITERIOS.

A.Linealidad del sistema.

La linealidad de un sistema es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado, entendiéndose como intervalo las concentraciones comprendidas entre los

niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles).

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs. respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución. Para control de calidad se debe incluir la concentración al 100%, esto es la concentración de la muestra en la solución final que proporciona una respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación.

CRITERIO DE ACEPTACION
$CV \leq 1.5\%$
$r \geq 0.99$
$r \geq 0.98$

TABLA I. CRITERIO DE ACEPTACION PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

B.Precisión del sistema.

Es la correlación que existe entre un valor determinado experimentalmente y un valor aceptado como referencia, obtenidos por un solo analista utilizando los mismos aparatos y técnicas.

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

CRITERIO DE ACEPTACION
$CV \leq 1.5\%$

TABLA II. CRITERIO DE ACEPTACION PARA PRECISION DEL SISTEMA.

C.Linealidad del método.

Mide el grado en que la respuesta del método, al trabajar en un intervalo determinado de concentraciones, se aproxima a una función lineal del tipo $y=mx + b$.

Para evaluarla se utilizan placebos adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo el análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema incluyendo siempre la correspondiente al 100%.

Se construye una curva cantidad adicionada vs cantidad recuperada.

CRITERIO DE ACEPTACION
$m \cong 1$
$b \cong 0$
$r \geq 0.98$
% Recuperado 97 - 103%
$CV \leq 3\%$

TABLA III. CRITERIO DE ACEPTACION PARA LA LINEALIDAD DEL METODO.

D.Exactitud y repetibilidad al 100%.

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les han adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto, generalmente se expresa en términos de desviación estándar o coeficiente de variación (CV).

La repetibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones.

Se determina de por lo menos seis placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener el 100% utilizando el método propuesto, haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

CRITERIO DE ACEPTACION
% Recuperado 97 - 103%
$CV \leq 3\%$
$t_{cal} \leq t_{tab}$
$\chi^2_{cal} \leq \chi^2_{tab}$

TABLA IV. CRITERIO DE ACEPTACION PARA EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%,
LA t SE REFIERE AL ESTADIGRAFO DE CONTRASTE t DE STUDENT.

E.Reproducibilidad del método.

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes, esto es, diferentes analistas, diferentes días o diferentes laboratorios etcétera.

Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado, calculándose el porcentaje recuperado.

CRITERIO DE ACEPTACION
$CV \leq 3\%$
$F_{cal} \leq F_{tab}$

TABLA V. CRITERIO DE ACEPTACION PARA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO LA F SE REFIERE AL ESTADIGRAFO F DE FISHER OBTENIDO MEDIANTE UNA TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

F.Especificidad.

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

El desarrollo de esta prueba también depende de la aplicación del método evaluado, para métodos de control de calidad se analizan placebos del producto con el método propuesto y posteriormente se identifica(n) la(s) respuesta(s) del (los) activo(s), y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

CRITERIO DE ACEPTACION: Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

G. Estabilidad de la muestra.

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones, como son temperatura, tipo de luz, material del contenedor, etc. Se almacenan las muestras bajo condiciones determinadas previamente durante un tiempo preestablecido dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia a analizar, posteriormente reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, el análisis debe efectuarse por el mismo analista.

CRITERIO DE ACEPTACION: La muestra es estable si el intervalo de confianza para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda el $\pm 3\%$.

REFERENCIAS: 11, 12.

2.3.ABSORCION ATOMICA.

2.3.1PRINCIPIOS BASICOS.

La espectrofotometría de absorción atómica es una técnica para el análisis cuantitativo de elementos en su mayoría metales y metaloides. Se basa en la absorción de radiación visible o ultravioleta por el vapor atómico del elemento; se introdujo por primera vez en 1955 por Alan Walsh.

La absorción atómica difiere de la absorción molecular convencional en cuanto a que los átomos libres (neutros) de todo metal y metaloide, así como algunos no metales, presentan una absorción útil en alguna(s) longitud(es) de onda comprendida entre 190.0 nm y 800.0 nm en tanto muchas de las formas combinadas de los elementos (por ejemplo complejos. aniones, hidratos) no absorben de forma apreciable en este rango; por otra parte el espectro de absorción de la forma libre de un elemento es muy diferente del de la forma combinada, esto es, los átomos presentan un espectro de líneas de absorción, mientras que las moléculas presentan un espectro con picos y mesetas, es decir, áreas de absorción, lo que le confiere a la absorción atómica mayor sensibilidad y especificidad que la absorción molecular.

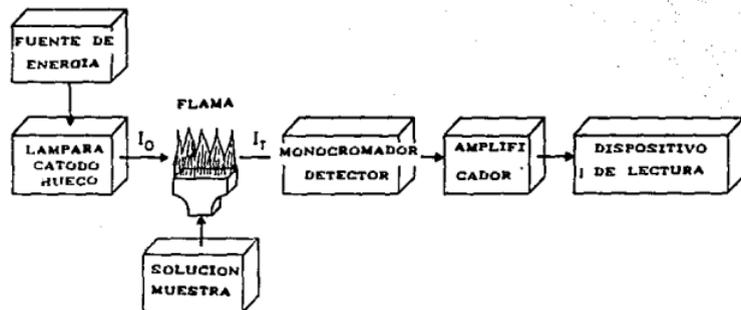


FIGURA I. ESPECTROFOTOMETRO PARA ABSORCION ATOMICA.

En la figura 1 se muestra el diagrama de un espectrofotómetro de absorción atómica en el que se indican las partes que lo conforman.

La absorción atómica se basa en que la aspersión de una solución que contiene iones o átomos metálicos en un quemador produce dispersión de los átomos en la flama; una pequeña porción de los átomos se excitan y emiten luz pero la gran mayoría absorbe longitudes de onda discretas de la luz incidente, si se mide la cantidad absorbida puede obtenerse una relación que permita conocer la concentración de los átomos, por tanto puede aplicarse la ley de Beer, en la que el término de concentración c estrictamente hablando se refiere a la concentración atómica en el vapor atómico, no a la concentración de la solución, por esto una de las etapas más importantes es la formación de átomos a partir de la solución y comprende los siguientes pasos:

- a) Transporte de la solución
- b) Nebulización
- c) Transporte del aerosol
- d) Desolvatación
- e) Vaporización
- f) Equilibrio de las especies vaporizadas

a. TRANSPORTE DE LA SOLUCION.

En este paso se lleva a cabo el movimiento de la solución hacia el nebulizador a través de un tubo de plástico, por tanto se requiere que la velocidad a la que entra la solución estándar y la muestra sean iguales y reproducibles por lo que debe controlarse la velocidad de flujo y evitar que haya diferencias entre la viscosidad, turbidez y solventes de la solución de referencia y la muestra problema.

b. NEBULIZACION.

Dentro de la absorción atómica de flama la nebulización es el paso de mayor importancia ya que es cuando se da la conversión de la solución a un rocío muy fino, para esto se utilizan nebulizadores generalmente neumáticos concéntricos como el que se muestra en la figura 2, el problema radica en la eficiencia del nebulizador para convertir la solución en aerosol ya que las gotas útiles deben tener un diámetro menor de 10 μm y éstas solo representan un 3- 15% de la solución total, el resto se elimina.

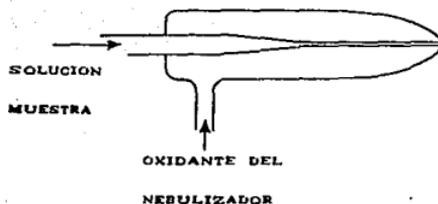


FIG. 2 NEBULIZADOR NEUMATICO CONCENTRICO (3)

c. TRANSPORTE DEL ROCIO.

Durante el paso del rocío a través de la cámara se seleccionan mediante deflectores las gotas más finas y útiles y el resto se condensa y se drena.

d. DESOLVACION.

Una vez que el rocío llega a la flama se evapora el solvente quedando solamente las partículas de sal, la velocidad a la que se lleva a cabo este cambio depende del tamaño de la gota, del solvente, el tiempo que pasa dentro de la flama y la temperatura y composición de ésta; pero debido a que solo las gotas finas llegan a esta etapa, raramente la desolvación incompleta es un problema.

e.VAPORIZACION.

Consiste en el paso de las partículas de sal a vapor lo que depende de la temperatura de la flama, el tiempo que tarda la partícula en ella y el tamaño y composición de la partícula, durante esta etapa pueden presentarse interferencias debido a la formación de compuestos entre el analito y otras especies presentes en la solución.

f.EQUILIBRIO DE LAS ESPECIES PRESENTES.

Este equilibrio se lleva a cabo entre las especies moleculares, átomos neutros e iones; lo cual depende en mayor parte de las condiciones de la flama, a temperaturas bajas las especies moleculares son las que predominan y como se requiere de átomos neutros preferentemente debe elevarse la temperatura de la flama, pero si se eleva demasiado se corre el riesgo de aumentar la formación de especies iónicas que interfieren, por tanto debe elegirse una temperatura óptima para determinar cada especie en particular.

2.3.2 INSTRUMENTACION.

a. FUENTE.

Las fuentes utilizadas en absorción atómica son muy diferentes a las utilizadas en absorción molecular ya que los átomos neutros absorben solamente intervalos de longitud de onda muy estrechos (líneas) de alrededor de 0.01 nanómetro de ancho. Los monocromadores utilizados comúnmente no son capaces de aislar intervalos lo suficientemente pequeños para que sean absorbidos completamente por una línea de absorción, además para aplicar la Ley de Beer se requiere que la absorptividad de la muestra sea constante, por lo que para absorción atómica se requiere una fuente que emita líneas angostas a la longitud de onda característica del elemento que se va a analizar, con este tipo de fuentes se obtiene la ventaja de que el análisis es altamente selectivo, pero a su vez se crea el problema de que se debe cambiar la fuente para cada elemento que se vaya a determinar.

Existen varios tipos de fuentes, pero todos contienen cierta cantidad del elemento cuya línea de absorción se quiera emitir, por tanto la línea que emite este tipo de fuentes es constante.

La fuente más utilizada es la lámpara de cátodo hueco, la cual es un tubo con

cátodo que contiene una pequeña cantidad del elemento de interés y un ánodo sellado en una cubierta de vidrio o cuarzo que contiene algún gas noble, (Figura 3), al aplicarle voltaje, se produce una descarga en el gas produciéndose iones positivos que bombardean el cátodo y desprenden átomos del material de éste, una parte de los átomos metálicos dispersados se encuentra en estado excitado, al regresar a su estado basal emiten radiación característica del metal y posteriormente se vuelven a depositar.

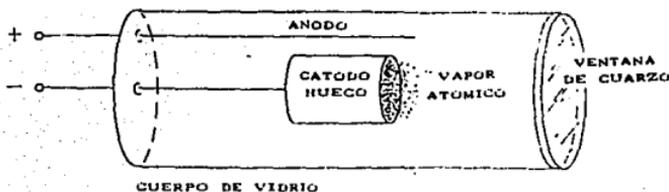


FIG.3. LAMPARA DE CATODO HUECO (17).

Este tipo de fuente cumple con las características necesarias ya que maximiza la absorción de la radiación emitida por la fuente como puede observarse en la figura 4, en donde se muestra: a) la relación entre el espectro de emisión de una lámpara de cátodo hueco, b) la misma como se ve a través de un monocromador y c) el efecto de absorción en la flama.

Estas fuentes se ven afectadas por la corriente ya que a medida que ésta aumenta tanto la temperatura como la presión dentro de la lámpara aumenta lo que provoca el ensanchamiento de las líneas emitidas.

Otro tipo de fuente son las lámparas de descarga gaseosa que producen un espectro lineal como consecuencia del paso de una corriente eléctrica por un vapor de átomos metálicos; como las lámparas de vapor de sodio o mercurio. Este tipo de fuentes son útiles para el análisis de metales alcalinos.

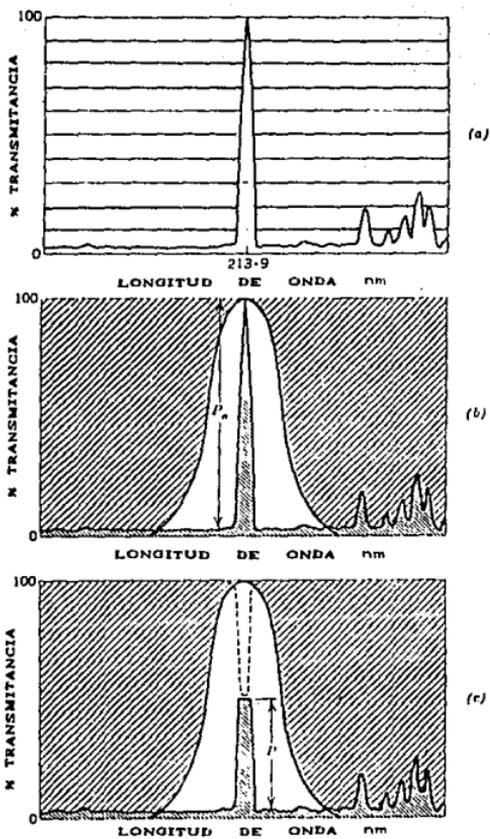


FIG. 4. a) ESPECTRO DE UNA LAMPARA DE CATODO DE ZINC, b) LAS LINEAS QUE NO SON DE INTERES SE ELIMINAN MEDIANTE UN MONOCROMADOR CENTRADO A 213.9 nm, c) LA INTENSIDAD DE LA LINEA ES APRECIABLEMENTE REDUCIDA POR LA ABSORCION DE LOS ATOMOS DE ZINC EN LA FLAMA (4).

b.FLAMA.

En absorción atómica de flama se emplea generalmente una mezcla de oxidante y combustible, los oxidantes más comunes son oxígeno, aire, óxido nítrico entre otros, éstos al mezclarse con diferentes combustibles producen flamas de diferentes temperaturas y características como puede observarse en la tabla VI.

COMBUSTIBLE	OXIDANTE		
	AIRE	OXIGENO	OXIDO NITROSO
HIDROGENO	2100	2780	
ACETILENO	2200	3050	2955
PROPANO	1925	2800	

TABLA VI. TEMPERATURAS EN C DE FLAMAS OBTENIDAS CON
DIFERENTES MEZCLAS OXIDANTE-COMBUSTIBLE (4).

Para espectrofotómetros con premezcladores no es muy seguro utilizar una mezcla oxígeno-acetileno porque la flama se propaga rápidamente y es posible que sea absorbida hacia el cuerpo del mezclador y provoque una implosión, así que se usa preferentemente una mezcla de aire-acetileno que es útil para la mayoría de los metales. El óxido nítrico mezclado con acetileno es otra opción ya que produce una flama de temperatura ligeramente menor que la de oxígeno-acetileno pero

sin el riesgo de implosión, por esto es muy utilizada en el análisis de aluminio, titanio, lantánidos, tierras raras, alcalinotérreos, berilio y silicón ya que éstos elementos forman óxidos refractarios en la flama de aire-acetileno.

c. QUEMADORES.

El quemador utilizado más ampliamente es el de cámara o premezclado, figura 5, la muestra se atomiza en el nebulizador por el paso de un flujo rápido de aire al final del capilar luego el gas combustible se mezcla con el aerosol en la cámara y la mezcla llega a la cabeza del quemador; generalmente estos quemadores tienen una longitud de 5 a 10 cm lo que da una flama larga, delgada y laminar con baja luminosidad y poco ruido, otra ventaja es que la viscosidad de la solución no es un problema porque las gotas más grandes se eliminan antes de entrar a la ranura del quemador; así mismo, hay una dependencia muy pequeña entre la señal y la velocidad de flujo de la muestra, además es mecánicamente simple. Una desventaja es que cuando se utilizan mezclas de solventes se lleva a cabo una evaporación selectiva lo que puede causar que la muestra quede en la porción no evaporada de las gotas; esto puede evitarse si se evapora casi la totalidad de los solventes antes de que las gotas entren a la flama, otra desventaja de este diseño es que con mezclas de combustible-oxidante de propagación rápida existe el riesgo de implosión

por retroceso de la flama.

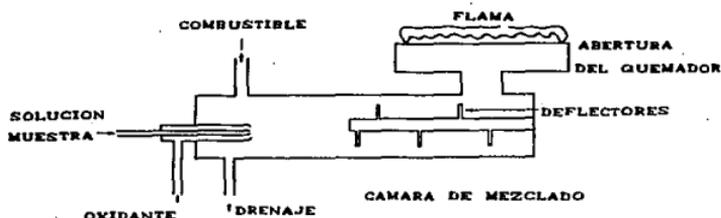


FIG.5 QUEMADOR DE PREMEZCLADO. LOS DEFLECTORES EN LA CAMARA COLECTAN LAS GOTAS MAS GRANDES (19).

Otro tipo de quemador es el de consumo total o de flujo turbulento, en el que las muestras se aspiran directamente a la flama a través de un capilar generalmente a una velocidad de 1-3 ml/min; presenta la ventaja de permitir la entrada de una cantidad relativamente grande y representativa de la muestra y no existe posibilidad de

retroceso de la flama y provocar una implosión; entre sus desventajas se cuenta una longitud corta de la flama, obstrucción del capilar y ruido.

d. Monocromadores.

La función de los monocromadores es seleccionar la longitud de onda a la cual se mide la absorbancia, aún cuando la fuente emite líneas específicas del elemento, el gas que contiene la lámpara también emite, así como los iones del analito o algún otro elemento que pueda estar presente en la lámpara, principalmente las que están compuestas por aleaciones o mezclas de metales, además el monocromador reduce en gran medida las emisiones de la flama.

La variable más importante del monocromador es la anchura de la ranura que determina la intensidad de la luz que pasa por el monocromador así como el intervalo de longitud de onda, generalmente se tiene un intervalo de 0.1 a 10 nm.

e. Fotodetector.

Generalmente se utiliza en absorción atómica el tubo fotomultiplicador, en el cual el haz de luz a medir se dirige a la superficie de un electrodo de metal llamado fotocátodo, el cual está cubierto con una aleación de metal alcalino, los fotones desprenden electrones de la superficie del fotocátodo (efecto fotoeléctrico), luego estos electrones pasan a una segunda serie de electrodos llamados dinodos los cuales

se mantienen a diferentes potenciales con incrementos de 100V, lo que provoca que el número de electrones desprendidos se multiplique hasta que llegan al ánodo con un factor de incremento de 10 a 10 dependiendo de la diferencia de potencial entre los dinodos y el número total de éstos.

f. Amplificador electrónico y Sistema de Lectura.

La corriente eléctrica del fotodetector se amplifica aun más mediante circuitería electrónica y se envía a un sistema de lectura o registrador. Los sistemas más simples dan lecturas en unidades de intensidad relativa generalmente con escalas de 0 a 100, otro tipo de sistemas incluyen un amplificador logarítmico que permite la lectura directa en unidades de absorbancia. También se cuenta con instrumentos que poseen módulos de lectura digital ya sea continua o integrada que pueden acoplarse a impresoras.

REFERENCIAS: 3, 4, 17, 18, 19.

3.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria farmacéutica se desarrolla día con día, implementando nueva tecnología. lo que la convierte en un sector de vanguardia. Uno de los departamentos en los que se refleja esta tendencia es el de control de calidad, dentro de él los métodos analíticos utilizados son importantes, por lo que deben ser precisos y exactos, ya que es una industria en donde la cuantificación de los componentes de un producto es uno de los parámetros decisivos en la aceptación o rechazo de los lotes de producción.

Existen técnicas variadas para determinar sulfato de cobre y sulfato de zinc, una de ellas es mediante titulaciones separadas de cobre y zinc, esto es utilizando la sal sódica del etilendiamintetraacetato como valorante para el sulfato de zinc y tiosulfato de sodio como reactivo titulante para el sulfato de cobre.

También se utiliza para cuantificar cobre y zinc un método espectrofotométrico en la región visible, para lo cual es necesario formar un complejo colorido con cada uno de ellos, para el cobre se requiere la formación bajo condiciones de pH adecuadas del complejo tetramincúprico utilizando solución reactivo de amoniaco, éste complejo presenta una coloración azul intensa que puede leerse a una longitud

de onda de 440 nm, para el zinc se requiere preparar una solución débilmente alcalina que le permita reaccionar con ditizona para formar zinc ceto ditizonato que le confiere a la solución un color rojo utilizando cloroformo como solvente, posteriormente se mide la intensidad espectrofotométricamente a 530 nm. Debido a que en éste trabajo se pretende la cuantificación de ambos metales, en la misma muestra preparada, se descartaron ambas técnicas.

Tomando en cuenta los requisitos anteriores una solución para éste producto en particular sería utilizar como método analítico la absorción atómica ya que ésta es una técnica precisa y sensible que requiere una cantidad mínima de reactivos, ya que solo requiere de soluciones acuosas de los activos y del producto acidificadas con ácido nítrico, además de esto es una técnica que permite la cuantificación de ambos metales dentro de la misma muestra preparada, y el límite de detección reportado para éstos metales es $> 0.01 \text{ mg/l}$ para el Cobre (recobro promedio 103.5 - 98.9%) y de 5.9 mg/l para el Zinc (recobro promedio 100.6%), lo que la convierte en una técnica de elegibilidad potencial para satisfacer los lineamientos y requisitos planteados en cuanto a el problema presentado.

REFERENCIAS: 1,2,5,8,9,12,13,14,15,19,20.

4.OBJETIVOS

4.OBJETIVOS:

GENERAL:

***Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar en una misma muestra zinc y cobre y de manera indirecta conocer la cantidad de sulfato de cobre y sulfato de zinc en un antiséptico.**

PARTICULARES:

***Diseñar un método analítico utilizando la técnica de Absorción Atómica para cuantificar cobre y zinc.**

***Validar el método propuesto.**

***Establecer con base a los resultados de la validación si el método es preciso y exacto para la cuantificación de cobre y zinc y conocer de forma indirecta la cantidad de sulfato de cobre y sulfato de zinc contenida en un polvo antiséptico.**

5.HIPOTESIS

5.HIPOTESIS:

Debido a que la técnica de Absorción Atómica es sensible y específica, disminuyendo el riesgo de error experimental, así mismo los límites de detección y cuantificación son bajos, se espera que sea adecuada para la cuantificación de Zinc y Cobre, permitiendo determinar de forma indirecta la cantidad de sulfato de zinc y sulfato de cobre en un polvo antiséptico.

6.MATERIAL Y METODO

6.1 MATERIAL

Espectrofotómetro de absorción atómica PYE UNICAM modelo SP192

Lámpara de cátodo hueco de zinc y cobre PYE UNICAM

Matraz volumétrico de 50 ml PYREX

Matraz volumétrico de 25 ml PYREX

Matraz volumétrico de 100 ml PYREX

Balanza analítica METTLER H80

Pipeta volumétrica 1, 2, 3, 5, 10 ml KIMAX

Bureta 10 ml PYREX

REACTIVOS

Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) reactivo analítico MERCK 99.0%

Sulfato de Zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) reactivo analítico JT BAKER 99.0%

Agua desionizada

Acido nítrico grado reactivo JT BAKER

Alcanfor grado USP

6.2METODOLOGIA.

6.2.1PREPARACION DEL MATERIAL.

El material de vidrio fué lavado con detergente y enjuagado con agua corriente; posteriormente se enjuagó con agua desionizada y se dejó con solución de ácido nítrico al 3% durante 24 horas, pasado este tiempo se enjuagó con agua desionizada y se procedió a calibrarlo.

Después de cada prueba el material se lavó y se dejó con solución de ácido nítrico al 3% durante 30 minutos.

6.2.2PREPARACION DE SOLUCIONES.

En la preparación de las soluciones patrón y las diluciones para las pruebas se utilizó como disolvente agua desionizada.

Solución de ácido nítrico al 3%. Medir 30 ml de ácido nítrico y añadir agua desionizada hasta ajustar un litro de solución.

Solución de ácido nítrico 0.05M. Medir 3.5 ml de ácido nítrico y aforar a 1000 ml.

Solución patrón de Cobre. Pesar con exactitud aproximadamente 20 mg de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml y aforar.

Solución patrón de Zinc. Pesar con exactitud aproximadamente 65 mg de sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml y aforar.

Solución patrón de Zinc y Cobre. Pesar con exactitud aproximadamente 20 mg de sulfato de cobre pentahidratado y 65 mg de sulfato de zinc heptahidratado, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml y aforar.

Curva de calibración. Tomar una alícuota de 10 ml de la solución patrón de zinc y cobre aforarla a 50 ml (solución A) a partir de ésta solución preparar las siguientes diluciones:

Solución	ml Sol.A	ml HNO_3 0.05M	Vol. final ml	mcg/ml Cu	mcg/ml Zn
1	1.0	3	25	0.408	1.182
2	1.5	3	25	0.613	1.773
3	2.0	3	25	0.817	2.365
4	2.5	3	25	1.022	2.956
5	3.0	3	25	1.226	3.547

6.2.3DESARROLLO DEL METODO.

Tomar una alícuota de 10 ml de la solución patrón de cobre y transferirla a un matraz volumétrico de 50 ml a partir de esta solución (solución A) realizar las siguientes diluciones:

Solución	ml Sol.A.	ml HNO ₃ 0.05M	Vol. final ml	mcg/ml Cu
1A	1	3	25	0.408
2A	2	3	25	0.817
3A	3	3	25	1.226
4A	5	3	25	2.043
5A	6	3	25	2.452
6A	7	3	25	2.861
7A	8	3	25	3.270

Tomar una alícuota de 10 ml de la solución patrón de zinc y diluirla a 50 ml (solución B) de ésta solución realizar las siguientes diluciones:

Solución	ml Sol.B.	ml HNO ₃ 0.05M	Vol. final ml	mcg/ml Zn
1B	1	3	25	1.182
2B	2	3	25	2.365
3B	3	3	25	3.547
4B	5	3	25	5.913
5B	6	3	25	7.095
6B	7	3	25	8.278
7B	8	3	25	9.461

Transferir una alícuota de 10 ml de la solución patrón de cobre y zinc a un matraz de 50 ml y aforar (solución C) a partir de esta solución realizar las diluciones siguientes:

Solución	ml Sol.A.	ml HNO ₃ 0.05M	Vol. final ml	mcg/ml Cu	mcg/ml Zn
1C	1	3	25	0.408	1.182
2C	2	3	25	0.817	2.365
3C	3	3	25	1.226	3.547
4C	5	3	25	2.043	5.913
5C	6	3	25	2.452	7.095
6C	7	3	25	2.861	8.278
7C	8	3	25	3.270	9.461

Preparar todas las soluciones por duplicado.

Medir la absorbancia de las soluciones anteriores a 324.8 nanómetros para el cobre y 213.8 nanómetros para zinc utilizando una flama de aire acetileno con una velocidad de flujo de 5 litros de aire por minuto y 1 ml de acetileno por minuto.

Con las lecturas obtenidas construir las gráficas absorbancia en función de la concentración de cobre y zinc ($\mu\text{g/ml}$), a partir de éstas determinar el rango de concentraciones en los que se presenta una relación lineal entre la absorbancia y la concentración. El cual será utilizado posteriormente para realizar las pruebas de validación. Así mismo identificar si hay interferencia entre el zinc y el cobre a partir de los resultados obtenidos con las diluciones de la solución C.

6.2.4VALIDACION DEL METODO.

*Linealidad del Sistema.

Tomar una alícuota de 10 ml de la solución patrón de zinc y cobre y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml y aforar (solución A), a partir de ésta solución preparar las siguientes diluciones:

Solución	ml Sol.C.	ml HNO ₃ 0.05M	Vol. final ml	mcg/ml Cu	mcg/ml Zn
1	1.0	3	25	0.408	1.182
2	1.5	3	25	0.613	1.773
3	2.0	3	25	0.817	2.365
4	2.5	3	25	1.022	2.956
5	3.0	3	25	1.226	3.547

La preparación de estas soluciones se realiza por triplicado.

Posteriormente se miden las absorbancias de las soluciones a las longitudes de onda y condiciones de flama establecidas en el desarrollo del método. Con los datos obtenidos se construye una gráfica de absorbancia vs. cantidad agregada (concentración de cobre y zinc mcg/ml).

***Precisión del Sistema.**

Medir una alícuota de 10 ml de la solución patrón de cobre y zinc y llevar a 50 ml, posteriormente tomar de esta solución 2 ml y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 ml añadir 3 ml de ácido nítrico 0.05 M y aforar, preparar ésta solución por sextuplicado.

Medir las absorbancias de las soluciones anteriores y calcular el porcentaje de recobro (%Recobro) de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\% \text{Recobro} = (\text{Cantidad Recuperada} / \text{Cantidad Agregada}) \times 100$$

***Linealidad del Método.**

Preparar cinco placebos cargados de la siguiente forma:

Placebo	mgCuSO ₄ ·5H ₂ O	mgZnSO ₄ ·7H ₂ O	mgAlcanfor
1	12	32	20
2	15	48	20
3	20	65	20
4	25	82	20
5	30	97	20

Transferirlos a matraces volumétricos de 100 ml y aforar, posteriormente tomar una alícuota de 10 ml y aforar a 50 ml. De ésta solución tomar 2 ml, añadir 3 ml de ácido nítrico 0.05 M y aforar a 25 ml para cada placebo por triplicado.

Medir las absorbancias y calcular la cantidad recuperada y el porcentaje de recobro, con estos valores construir una gráfica de cantidad adicionada vs. cantidad recuperada.

***Exactitud y Precisión al 100%**

Pesar con exactitud aproximadamente 20 mg de sulfato de cobre pentahidratado, 65 mg de sulfato de zinc heptahidratado y 20 mg de alcanfor, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml y aforar, de esta solución tomar 10 ml y llevarlos a 50 ml, posteriormente tomar una alícuota de 2 ml de ésta última y transferirla a un matraz de 25 ml, añadir 3 ml de ácido nítrico 0.05 M y aforar.

Se preparan 6 soluciones de la misma forma pesando muestras individuales para cada una de ellas.

Medir las absorbancias de cada muestra y calcular el porcentaje de recobro.

***Especificidad.**

Pesar con exactitud aproximadamente 20 mg de alcanfor y aforarlos a 100 ml tomar una alícuota de 10 ml y llevarla a 50 ml (solución A).

Tomar 10 ml de la solución patrón de zinc y aforar a 50 ml (solución B).

Tomar una alícuota de 10 ml de la solución patrón de cobre y aforar a 50 ml (solución C).

Diluir a 50 ml una alícuota de 10 ml de la solución patrón de zinc y cobre (solución D).

Preparar las siguientes soluciones:

Solución	mlSolución	mlHNO₃ 0.05M	Volumen final
A	2	3	25
B	2	3	25
C	2	3	25
D	2	3	25

Medir las absorbancias de las muestras y determinar si solamente las sustancias de interés dan respuesta, si no es así determinar la magnitud de la lectura dada por las sustancias restantes.

***Estabilidad de la Muestra.**

Pesar con exactitud tres muestras de aproximadamente 100 mg de polvo antiséptico y transferirlas a matraces volumétricos de 100 ml, aforar (solución A) y tomar una alícuota de 10 ml para aforarla a 50 ml. De ésta última solución tomar 2 ml, añadir 3 ml de ácido nítrico 0.05 M y aforar a 25 ml.

Medir las absorbancias y obtener el porcentaje de recobro comparando con un estándar de concentración similar y calcular el porcentaje de recobro.

Repetir el procedimiento a las 24, 48 y 72 horas realizando las diluciones a partir de la solución A y preparando un estándar fresco para cada medición.

***Reproducibilidad.**

Pesar con exactitud aproximadamente 100 mg de la muestra de fármaco llevarlos a 100 ml, tomar una alícuota de 10 ml transferirla a un matraz de 50 ml y diluir con agua hasta el aforo; tomar 2 ml de ésta solución y añadir 3 ml de ácido nítrico 0.05 M diluir a 25 ml. Preparar la muestra por triplicado, el procedimiento se lleva a cabo por dos analistas diferentes dos días diferentes.

7.RESULTADOS

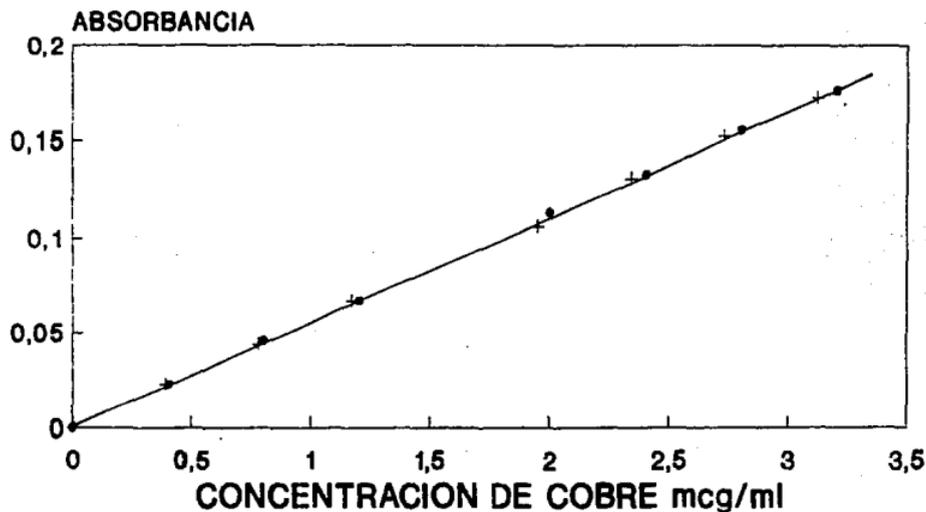
7.1 RESULTADOS DEL DESARROLLO DEL METODO

Concentración A	Absorbancia	Concentración B	Absorbancia
$\mu\text{g Cu/ml}$		$\mu\text{g Cu/ml}$	
0.4006	0.023	0.3904	0.023
0.4006	0.023	0.3904	0.023
0.8012	0.046	0.7808	0.044
0.8012	0.047	0.7808	0.045
1.2018	0.066	1.1712	0.066
1.2018	0.067	1.1712	0.066
2.0030	0.113	1.9519	0.106
2.0030	0.114	1.9519	0.106
2.4036	0.133	2.3423	0.131
2.4036	0.134	2.3423	0.132
2.8042	0.155	2.7327	0.152
2.8042	0.155	2.7327	0.152
3.2049	0.176	3.1231	0.172
3.2049	0.176	3.1231	0.172

TABLA VI. VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS DE A) SOLUCION DE COBRE SOLAMENTE Y B) SOLUCION DE COBRE Y ZINC.

GRAFICA 1

DESARROLLO DEL METODO (COBRE)



Solución	Coefficiente de correlación r	%Recobro promedio
Cobre	0.9998	100.0828
Zn + Cu	(Cu)0.9997	99.7954

TABLA VII. PARAMETROS OBTENIDOS DE LA REGRESION LINEAL DE LOS DATOS ENLISTADOS EN LA TABLA VI.

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA DIFERENCIA DE MEDIAS

COBRE:

$$P(-0.6927 < \mu_1 - \mu_2 < 4.7530) = 0.90$$

CRITERIO: Si el intervalo de la diferencia de medias contiene el cero no existe diferencia significativa entre éstas.

En la gráfica 1 se puede observar que en el rango de concentraciones utilizado para el cobre la relación entre la concentración de cobre y la absorbancia es lineal con un coeficiente de correlación de 0.9998 para la solución de cobre solo y de 0.9997 para la de cobre mezclado con zinc.

Con base a lo anterior se establecieron los rangos de concentraciones a utilizar en el método a validar, también se tomó en cuenta la relación entre la cantidad de sulfato de zinc y sulfato de cobre presentes en el medicamento a utilizar, así se tiene que para el cobre se utilizaron concentraciones de 0.45 a 1.25 $\mu\text{g/ml}$.

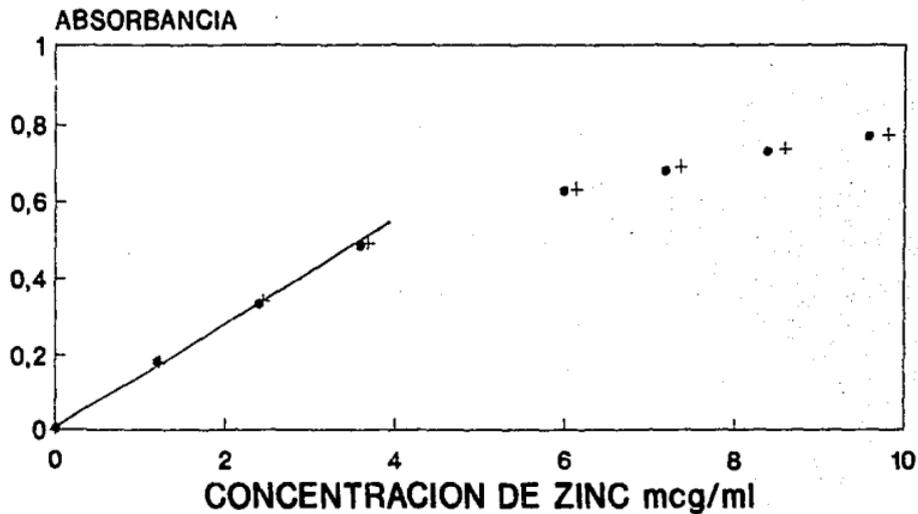
También puede observarse que no hay diferencia significativa entre las medias de los porcentos de recobro de la solución del metal solo y la de la mezcla, por lo que en lo que al cobre se refiere no se presenta interacción entre los dos metales, permitiéndose la cuantificación de éste en una misma muestra preparada.

Concentración A	Absorbancia	Concentración B	Absorbancia
$\mu\text{g Zn/ml}$		$\mu\text{g Zn/ml}$	
1.1972	0.184	1.2263	0.183
1.1972	0.186	1.2263	0.184
2.3944	0.332	2.4526	0.342
2.3944	0.336	2.4526	0.342
3.5915	0.482	3.6789	0.490
3.5915	0.482	3.6789	0.490
5.9859	0.628	6.1315	0.632
5.9859	0.630	6.1315	0.633
7.1831	0.678	7.3578	0.689
7.1831	0.678	7.3578	0.690
8.3803	0.730	8.5841	0.739
8.3803	0.731	8.5841	0.742
9.5775	0.771	9.8104	0.777
9.5775	0.773	9.8104	0.780

TABLA VIII. VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS DE A) SOLUCION DE ZINC SOLAMENTE Y B) SOLUCION DE ZINC Y COBRE.

GRAFICA 2

DESARROLLO DEL METODO (ZINC)



• Series 1 ZINC + Series 2 Zn + Cu

Solución	Coefficiente de correlación r	%Recobro promedio
Zinc	0.9992	102.2834
Zn + Cu	(Zn)0.9986	100.9267

TABLA IX. PARAMETROS OBTENIDOS DE LA REGRESION LINEAL DE LOS DATOS ENLISTADOS EN LA TABLA VIII. LOS CUALES SE OBTUVIERON SOLAMENTE CON LOS SEIS PRIMEROS DATOS DE LA MISMA TABLA.

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA DIFERENCIA DE MEDIAS

ZINC:

$$P(-0.6722 < \mu_1 - \mu_2 < 3.3856) = 0.90$$

CRITERIO: Si el intervalo de la diferencia de medias contiene el cero no existe diferencia significativa entre éstas.

En la gráfica 2 se puede observar que la relación entre la concentración de zinc y la absorbancia solo es lineal en los tres primeros puntos, posteriormente se pierde esta linealidad, lo que se observa tanto para la solución de zinc solo como para la solución de zinc mezclado con cobre, el coeficiente de correlación es de 0.998 y 0.997 respectivamente.

Con base a lo anterior se establecieron los rangos de concentraciones a utilizar en el método a validar, tomando en cuenta también la relación entre la cantidad de sulfato de zinc y sulfato de cobre contenidas en el medicamento a emplear, éste rango para el zinc es de 1.25 a 3.7 $\mu\text{g/ml}$.

Así mismo puede observarse que no hay diferencia significativa entre la media de los porcentos de recobro de la solución del metal solo y la de la mezcla, por lo que no se presenta interacción entre los dos metales, permitiéndose la cuantificación de ambos en una misma muestra preparada.

7.2 RESULTADOS DE VALIDACION

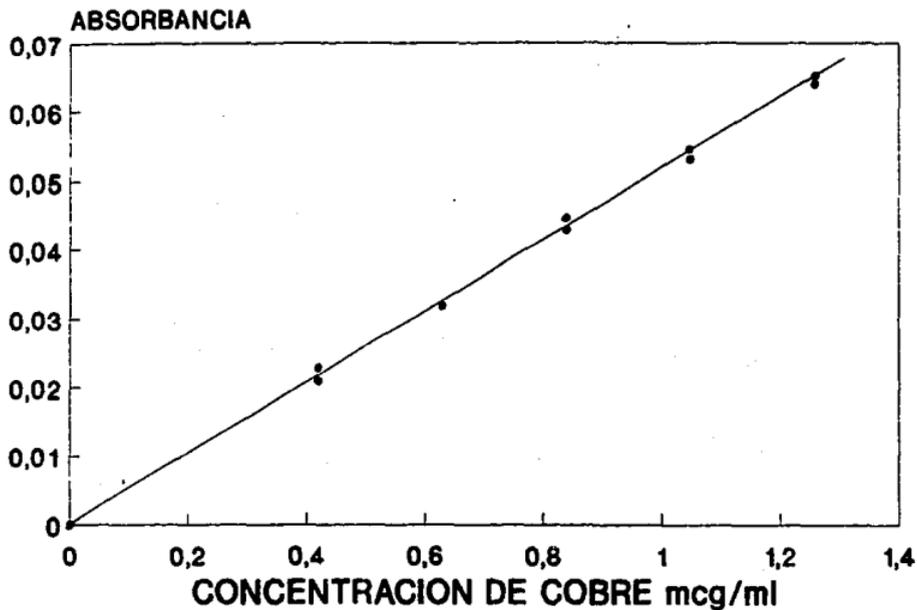
A. LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA COBRE.

Concentración de Cobre $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia
0.4190	0.021
0.4190	0.022
0.4190	0.022
0.6285	0.032
0.6285	0.032
0.8380	0.043
0.8380	0.043
0.8380	0.044
1.0475	0.053
1.0475	0.054
1.0475	0.054
1.2570	0.064
1.2570	0.064
1.2570	0.065

TABLA X. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE LINEALIDAD DEL SISTEMA.

GRAFICA 3

LINEALIDAD DEL SISTEMA (COBRE)



Parámetro evaluado	Valor	Valor
	Aceptado	Experimental
Coef. de correlación r	≥ 0.99	0.9996
Coef. de determinación r	≥ 0.98	0.9993
Coef. de variación CV	$\leq 1.5\%$	1.43%

**TABLA XI. CONTRASTE DE VALORES DEL CRITERIO DE ACEPTACION Y
LOS OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE.**

En el apéndice II.1 se presenta una tabla de análisis de varianza para la regresión lineal de los datos de ésta prueba como análisis complementario.

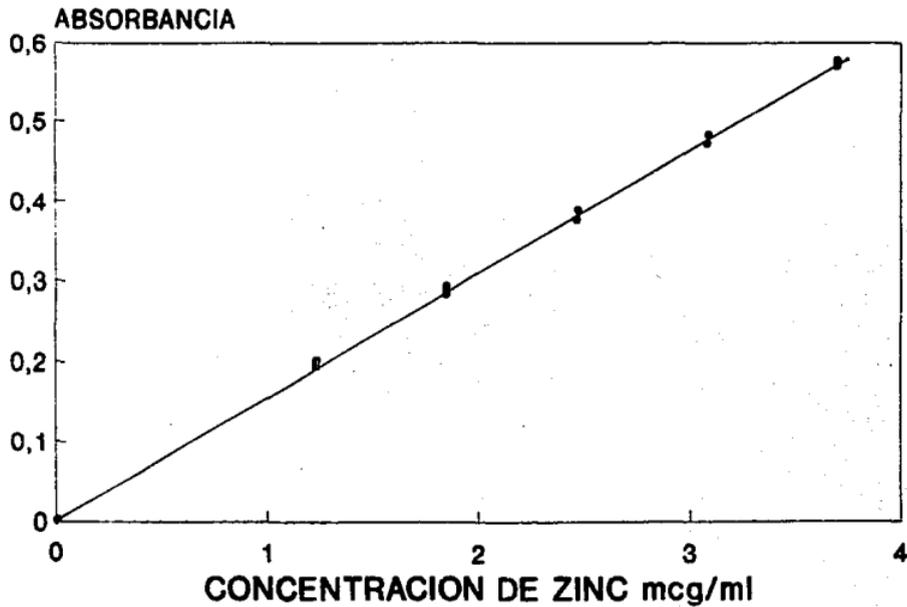
B.LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA ZINC.

Concentración de Zinc $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia
1.2317	0.196
1.2317	0.196
1.2317	0.198
1.8476	0.285
1.8476	0.286
2.4635	0.378
2.4635	0.381
2.4635	0.381
3.0794	0.473
3.0794	0.476
3.0794	0.476
3.6953	0.570
3.6953	0.572
3.6953	0.572

TABLA XII.RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE LINEALIDAD DEL SISTEMA.

GRAFICA 4

LINEALIDAD DEL SISTEMA (ZINC)



Parámetro evaluado	Valor	Valor
	Aceptado	Experimental
Coef. de correlación r	≥ 0.99	0.9998
Coef. de determinación r	≥ 0.98	0.9997
Coef. de variación CV	$\leq 1.5\%$	1.48%

**TABLA XIII. CONTRASTE DE VALORES DEL CRITERIO DE ACEPTACION
Y LOS OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE.**

En el apéndice II.2 se presenta una tabla de análisis de varianza para la regresión lineal de los datos de ésta prueba como análisis complementario.

En lo que se refiere al sistema puede observarse en las gráficas 3 y 4 que es lineal para ambos metales aun cuando para el zinc se obtiene una desviación mayor de los datos esto puede deberse a que la línea del zinc es menos energética que la del cobre ya que el error experimental es el mismo para ambos metales puesto que se utilizó una sola solución para los dos metales, por tanto si la variación se debiera a error del analista completamente se tendría una variación similar tanto para el cobre como para el zinc. Los valores obtenidos en los parámetros evaluados se encuentran dentro del rango de aceptación estipulado por las guías generales de validación de métodos analíticos por lo que se puede decir que es lineal para ambos metales; además de estos parámetros se realizó un análisis de varianza de la regresión lineal para observar si había dependencia de la absorbancia con la concentración de metal, de acuerdo a la estadística si la ordenada depende de x se tiene una relación lineal, lo que puede observarse tanto para zinc como para cobre con una significancia del 95%.

C.PRECISION DEL SISTEMA PARA COBRE

Cantidad Adicionada µg Cu/ml	Cantidad Recuperada µg Cu/ml	%Recobro
0.9238	0.9151	99.06
	0.9151	99.06

TABLA XIV.RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE PRECISION DEL SISTEMA.

Parámetro evaluado	Valor Aceptado	Valor Experimental
Promedio recuperado	97 - 103%	99.06%
Coefficiente de variación	≤ 1.5%	0.00

TABLA XV. CONTRASTE DE VALORES DE ACEPTACION Y LOS OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE.

D.PRECISION DEL SISTEMA PARA ZINC.

Cantidad Adicionada $\mu\text{g Zn/ml}$	Cantidad Recuperada $\mu\text{g Zn/ml}$	% Recobro
2.3543	2.3478	99.72
	2.3478	99.72
	2.3545	100.01
	2.3545	100.01
	2.3612	100.29
	2.3882	101.44

TABLA XVI.RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE PRECISION DEL SISTEMA.

Parámetro evaluado	Valor	Valor
	Aceptado	Experimental
Promedio recuperado	97 - 103%	100.20%
Coefficiente de variación	$\leq 1.5\%$	0.6435%

TABLA XVII.CONTRASTE DE VALORES DE ACEPTACION Y LOS OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE.

Al evaluar la precisión del sistema se encuentra nuevamente que los resultados para cobre son menos variables que los del zinc pero aun así ambos entran en el rango de aceptación, tanto el coeficiente de variación como el porciento de recobro promedio especificado para análisis espectrofotométricos.

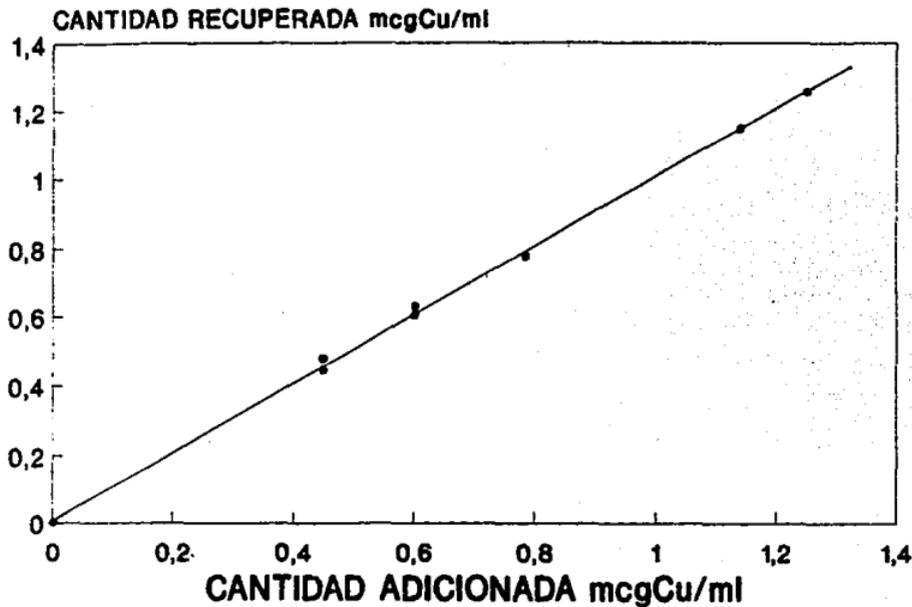
E.LINEALIDAD DEL METODO PARA COBRE.

Cantidad Adicionada	Cantidad recuperada	%Recobro
$\mu\text{g Cu/ml}$	$\mu\text{g Cu/ml}$	
0.4497	0.4466	99.32
0.4497	0.4466	99.32
0.4497	0.4662	103.67
0.6009	0.6031	100.37
0.6009	0.6031	100.37
0.6009	0.6226	103.68
0.7849	0.7791	99.26
0.7849	0.7791	99.26
0.7849	0.7791	99.26
1.1394	1.1495	100.88
1.1394	1.1495	100.88
1.1349	1.1495	100.88
1.2508	1.2590	100.65
1.2508	1.2590	100.65
1.2508	1.2590	100.65

TABLA XVIII.RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE LINEALIDAD DEL METODO PARA COBRE.

GRAFICA 5

LINEALIDAD DEL METODO (COBRE)



Parámetro evaluado	Valor	Valor
	Aceptado	Experimental
Coef. de correlación r	≥ 0.99	0.9997
Coef. de determinación r^2	≥ 0.98	0.9995
Coef. de variación CV	$\leq 1.5\%$	1.39%
Ordenada al origen	≈ 0	-4.8035E-4
Pendiente m	≈ 1	1.0064

TABLA XIX. CONTRASTE DE VALORES DEL CRITERIO DE ACEPTACION Y
LOS OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE.

PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA PENDIENTE (m)

$$H_0: m = 1 \quad H_a: m \neq 1$$

$$t_{\text{cal}} = 1.08449 \quad t_{0.975} = 2.1604$$

Criterio de aceptación: Si $t_{\text{cal}} \leq t_{\text{tab}}$ Ho se acepta

$$1.08449 < 2.1604 \quad \clubsuit \text{ Ho se acepta}$$

Intervalo de confianza

$$P(0.993615 < M < 1.019256) = 0.95$$

PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA ORDENADA AL ORIGEN (b).

$$H_0: b = 0$$

$$H_a: b \neq 0$$

$$t_{\text{cal}} = -0.093517$$

$$t_{0.975} = 2.1604$$

Criterio de aceptación: Si $t_{\text{cal}} \leq t_{\text{tab}}$ H_0 se acepta

$$-0.093517 < 2.1604 \quad \clubsuit \quad H_0 \text{ se acepta}$$

Intervalo de confianza

$$P(-5.6445E-3 < B < 4.6838E-3) = 0.95$$

En el apéndice III.1 se presenta una tabla de análisis de varianza para la regresión lineal de los datos de ésta prueba como análisis complementario.

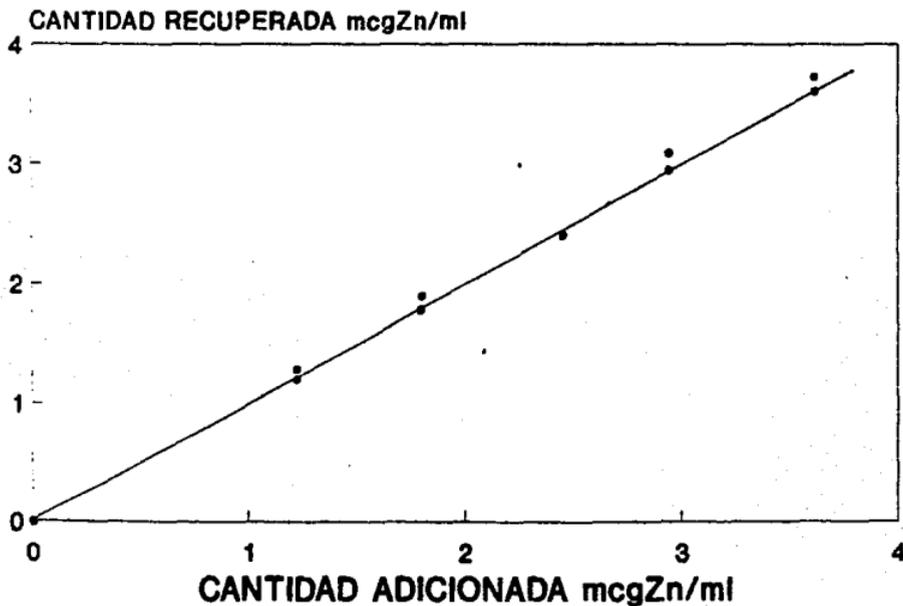
F.LINEALIDAD DEL METODO PARA ZINC.

Cantidad Adicionada	Cantidad recuperada	%Recobro
µg Zn/ml	µg Zn/ml	
1.2208	1.2526	102.60
1.2208	1.2004	98.33
1.2208	1.2004	98.33
1.7958	1.7812	99.19
1.7958	1.7812	99.19
1.7958	1.8465	102.82
2.4526	2.4078	98.17
2.4526	2.4078	98.17
2.4526	2.4078	98.17
2.9429	2.9364	99.77
2.9429	2.9364	99.77
2.9429	2.9560	100.44
3.6134	3.6021	99.69
3.6134	3.6021	99.69
3.6134	3.6217	100.23

**TABLA XX.RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE LINEALIDAD
DEL METODO PARA ZINC.**

GRAFICA 6

LINEALIDAD DEL METODO (ZINC)



Parámetro evaluado	Valor	Valor
	Aceptado	Experimental
Coef. de correlación r	≥ 0.99	0.9997
Coef. de determinación r ²	≥ 0.98	0.9994
Coef. de variación CV	< 1.5%	1.47%
Ordenada al origen	≈ 0	-1.9516E-3
Pendiente m	≈ 1	0.9971

TABLA XXI. CONTRASTE DE VALORES DEL CRITERIO DE ACEPTACION Y LOS OBTENIDOS EXPERIMENTALMENTE.

PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA PENDIENTE (m)

$$H_0: m = 1 \quad H_a: m \neq 1$$

$$t_{cal} = -0.4318 \quad t_{0.975} = 2.1448$$

Criterio de aceptación: Si $t_{cal} \leq t_{0.975}$ Ho se acepta

$$-0.4318 < 2.1448 \quad \clubsuit \text{ Ho se acepta}$$

Intervalo de confianza

$$P(0.982656 < M < 1.011530) = 0.95$$

PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA ORDENADA AL ORIGEN (b).

$$H_0: b = 0 \quad H_a: b \neq 0$$

$$t_{\text{cal}} = -0.1175 \quad t_{0,975} = 2.1448$$

Criterio de aceptación: Si $t_{\text{cal}} \leq t_{\text{tab}}$ H_0 se acepta

$$-0.1175 < 2.1448 \quad \bullet H_0 \text{ se acepta}$$

Intervalo de confianza

$$P(-0.037562 < B < 0.033659) = 0.95$$

En el apéndice III.2 se presenta una tabla de análisis de varianza para la regresión lineal de los datos de ésta prueba como análisis complementario.

En la evaluación del método se obtuvo también linealidad para ambos metales lo cual puede observarse tanto en las gráficas 5 y 6 como en los valores de las tablas XIX y XXI, ya que los coeficientes de correlación y determinación corresponden a los valores aceptados, además para la pendiente y la ordenada al origen se hicieron pruebas de hipótesis para comprobar que cumplen con el requisito de ser igual a 1 y a cero respectivamente con una significancia del 95%. En esta evaluación se observa nuevamente que los valores obtenidos en el cobre son menos variables y los parámetros para éste metal tienen una diferencia menor con los establecidos en las normas en comparación con los obtenidos con el zinc.

G.EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO AL 100% PARA COBRE.

Cantidad Adicionada µg Cu/ml	Cantidad Recuperada µg Cu/ml	%Recobro
0.8209	0.8233	100.30
0.8707	0.8784	100.89
0.8911	0.8784	98.58
0.8952	0.8968	100.18
0.9974	0.9886	99.11
1.0139	1.0069	99.31

TABLA XXII. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EXACTITUD Y
PRECISION AL 100% PARA COBRE.

Parámetro evaluado	Valor	Valor
	Aceptado	Experimental
Coef. de variación. CV.	≤ 3%	0.8691%

PRUEBA DE HIPOTESIS PARA REPETIBILIDAD.

$$H_0: s^2 \leq \sigma^2 \quad H_a: s^2 > \sigma^2$$

$$\chi^2_{cal} = 1.448 \quad \chi^2_{0.975} = 12.832$$

Criterio de Aceptación: Si $\chi^2_{\text{cal}} \leq \chi^2_{\text{tab}}$ Ho se acepta.

$1.448 < 12.832$ ❌ Ho se acepta

Intervalo de Confianza:

$P(0.338 < \sigma^2 < 5.2292) = 0.95$

PRUEBA DE HIPOTESIS PARA EXACTITUD.

Ho: $\mu = 100$

Ha: $\mu \neq 100$

$t_{\text{cal}} = -1.2139$

$t_{0.975} = 2.1448$

Criterio de aceptación : Si $t_{\text{cal}} \leq t_{\text{tab}}$ Ho se acepta

$-1.2139 < 2.1448$ ❌ Ho se acepta

Intervalo de Confianza:

$P(98.9894 < \mu < 100.4873) = 0.95$

H.EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO AL 100% PARA ZINC.

Cantidad Adicionada $\mu\text{g Zn/ml}$	Cantidad Recuperada $\mu\text{g Zn/ml}$	%Recobro
2.3534	2.3141	98.33
2.3616	2.3747	100.56
2.3653	2.3006	97.26
2.3653	2.3208	98.12
2.3980	2.3949	99.87
2.4526	2.4487	99.84

TABLA XXIII. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EXACTITUD Y PRECISION AL 100% PARA ZINC.

Parámetro evaluado	Valor	Valor
	Aceptado	Experimental
Coef. de variación. CV.	$\leq 3\%$	1.289%

PRUEBA DE HIPOTESIS PARA REPETIBILIDAD.

$$H_0: s^2 \leq \sigma^2 \quad H_a: s^2 > \sigma^2$$

$$\chi^2_{\text{cal}} = 2.148 \quad \chi^2_{0.975} = 12.832$$

Criterio de Aceptación: Si $\chi^2_{\text{cal}} \leq \chi^2_{\text{tab}}$ Ho se acepta.

$$2.148 < 12.832 \quad \clubsuit \text{ Ho se acepta}$$

Intervalo de Confianza:

$$P(0.167 < \sigma^2 < 2.5854) = 0.95$$

PRUEBA DE HIPOTESIS PARA EXACTITUD.

$$\text{Ho: } \mu = 100 \quad \text{Ha: } \mu \neq 100$$

$$t_{\text{cal}} = -1.9253 \quad t_{0.975} = 2.1448$$

Criterio de aceptación : Si $t_{\text{cal}} \leq t_{\text{tab}}$ Ho se acepta

$$-1.9253 < 2.1448 \quad \clubsuit \text{ Ho se acepta}$$

Intervalo de Confianza:

$$P(97.8790 < \mu < 100.1144) = 0.95$$

En las guías de validación se utiliza como criterio de aceptación el coeficiente de variación para la prueba de exactitud y repetibilidad al 100% solamente, por lo que en este trabajo se añadió la prueba de χ^2 para evaluar la repetibilidad y una prueba de hipótesis para las medias experimentales del porcentaje de recobro con respecto a una media de 100% para la evaluación de la exactitud. Los resultados de estas pruebas permitieron una evaluación más amplia de la exactitud y repetibilidad del método en cuestión, permitiéndose así una aceptación basada en un criterio más amplio.

I. REPRODUCIBILIDAD PARA COBRE.

ANALISTA

I II

1	101.36	99.45
	101.42	99.45
	103.22	100.62
2	98.44	99.84
	101.26	99.84
	103.00	100.13

TABLA XXIV. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE REPRODUCIBILIDAD PARA COBRE.

Fuente de variación	g.l	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F Cal.	F Tablas
Analista	1	7.3164	7.3164	4.2692	5.32
Día	1	0.7550	0.7550	0.4378	5.32
Día-Analista	1	1.0740	1.0740	0.6229	5.32
Error exp.	8	13.7943	1.7243		

TABLA XXV. TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA PARA LA PRUEBA DE REPRODUCIBILIDAD.

PRUEBAS DE HIPOTESIS.

Ho: No hay interacción entre los parámetros evaluados

Ha: Hay interacción entre los parámetros evaluados

Criterio de Aceptación: Si $F_{cal} \leq F_{tab}$ Ho se acepta

a) Analistas

4.2692 < 5.32 ♣ Ho se acepta

b) Días

0.4378 < 5.32 ♣ Ho se acepta

c) Día-Analista

0.6229 < 5.32 ♣ Ho se acepta

No hay efecto significativo por interacción entre analistas, entre días ni entre días y analistas.

J.REPRODUCIBILIDAD PARA ZINC.

ANALISTA

I II

DIA	1	97.06	97.02
		97.38	97.02
		99.57	97.02
	2	97.96	97.54
		98.53	97.54
		100.64	98.17

TABLA XXVI.RESULTADOS DE LA PRUEBA DE REPRODUCIBILIDAD PARA ZINC.

Fuente de variación	g.l	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F Cal.	F Tablas
Analista	1	3.8873	3.8873	3.8951	5.32
Día	1	2.3496	2.3496	2.3543	5.32
Día-Analista	1	0.0722	0.0722	0.0723	5.32
Error exp.	8	7.9839	0.9980		

TABLA XXVII.TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA PARA LA PRUEBA DE REPRODUCIBILIDAD.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

PRUEBAS DE HIPOTESIS.

Ho: No hay interacción entre los parámetros evaluados

Ha: Hay interacción entre los parámetros evaluados

Criterio de Aceptación: Si $F_{cal} \leq F_{tab}$ Ho se acepta

a) Analistas

$3.8951 < 5.32$ \clubsuit Ho se acepta

b) Días

$2.3543 < 5.32$ \clubsuit Ho se acepta

c) Día-Analista

$0.0723 < 5.32$ \clubsuit Ho se acepta

No hay efecto significativo por interacción entre analistas, entre días ni entre días y analistas.

En ésta prueba se observó cierta diferencia entre los resultados obtenidos por los dos analistas aun cuando esta no es significativa estadísticamente, tampoco se encontró interacción entre los días o día -analista que afectara de forma significativa estadísticamente los resultados de los análisis, por lo que se tiene que el método propuesto es reproducible.

K.ESPECIFICIDAD PARA COBRE.

Sustancia relacionada	Respuesta
Sulfato de Cobre	Detectable 99.65%
Sulfato de Zinc	No Detectable
Placebo adicionado	Detectable 99.26%
Placebo	No detectable

TABLA XXVIII.RESULTADOS PARA LA PRUEBA DE ESPECIFICIDAD. LAS LECTURAS SE REALIZARON A UNA LONGITUD DE ONDA DE 324.8 nm.

L.ESPECIFICIDAD PARA ZINC.

Sustancia relacionada	Respuesta
Sulfato de Zinc	Detectable 100.40%
Sulfato de Cobre	No Detectable
Placebo adicionado	Detectable 99.26%
Placebo	No detectable

TABLA XXIX. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ESPECIFICIDAD. LAS LECTURAS SE REALIZARON A UNA LONGITUD DE ONDA DE 213.8 nm.

De los resultados anteriores puede determinarse que el método es específico tanto para cobre como para zinc, lo que concuerda con lo obtenido durante el desarrollo del método donde no se encontró una diferencia significativa entre los resultados obtenidos con soluciones de cada metal por separado y una mezcla de ellos, en esta evaluación se encontró que no se tiene una respuesta por parte de los otros componentes de la solución de análisis que pueda afectar el resultado de los análisis.

M.ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA PARA COBRE.

Inicial	24hr	48hr	72hr
100.31	100.44	100.73	100.63
99.87	100.00	102.33	100.06
101.14	101.27	99.30	99.44

TABLA XXX.RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ESTABILIDAD EXPRESADOS EN PORCIENTOS DE RECOBRO.

Tiempo	Intervalo de confianza	Factor I
24 hr.	-1.0997 a 1.3597	100.13%
48 hr.	-1.7438 a 2.5301	100.40%
72 hr.	-1.6943 a 0.8077	99.56%

TABLA XXXI.PARAMETROS EVALUADOS EN LA PRUEBA DE ESTABILIDAD.

Criterio de Aceptación: Si en el intervalo de confianza se encuentra el valor de cero la muestra es estable.

Si el efecto no es mayor de un + 3% la muestra es estable.

NESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA PARA ZINC.

Inicial	24hr	48hr	72hr
97.88	97.65	97.46	97.97
101.87	101.35	100.85	101.68
101.64	100.57	100.63	101.73

TABLA XXXII. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ESTABILIDAD
EXPRESADOS EN PORCIENTO DE RECOBRO.

Tiempo	Intervalo de confianza	Factor I
24 hr.	-4.6111 a 3.3979	99.40%
48 hr.	-4.7742 a 3.1410	99.19%
72 hr.	-4.1956 a 4.1890	99.99%

TABLA XXXIII. PARAMETROS EVALUADOS EN LA PRUEBA DE ESTABILIDAD

Criterio de Aceptación: Si en el intervalo de confianza se encuentra el valor de cero la muestra es estable.

Si el efecto no es mayor de un $\pm 3\%$ la muestra es estable.

De acuerdo a lo anterior la muestra es estable bajo condiciones de experimentación durante 72 horas ya que no se tuvo un efecto mayor del +3% por lo que permite la obtención de resultados confiables aun cuando la muestra sea almacenada, sin rebasar el tiempo especificado.

8.CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos puede decirse que el método propuesto para cuantificar cobre y zinc en un polvo antiséptico por absorción atómica es apropiado y además es válido según los criterios estipulados en las Guías Generales de Validación de Métodos Analíticos.

Mediante la validación se encontró que tanto el método como el sistema son lineales dentro de un rango de concentraciones de 0.45 a 1.25 $\mu\text{g/ml}$ de Cobre y de 1.25 a 3.7 $\mu\text{g/ml}$ de Zinc, así mismo pudo observarse que las lecturas para cobre aun cuando se encuentra en menor concentración son menos variables que para el zinc, esto debido a que la línea del cobre es más energética que la del zinc y menos ruidosa.

En cuanto a la interferencia de las especies (cobre y zinc) entre sí también pudo comprobarse que no existe, y debido a esta especificidad se logra el objetivo de cuantificar los principios activos en una misma muestra preparada.

Se establece que la muestra preparada presenta una estabilidad de hasta 72 horas a temperatura ambiente y bajo condiciones de experimentación.

9.APENDICES

I. Parámetros a validar dependiendo del uso del método.(12)

Parámetro	Control de Calidad	Indicadores de Estabilidad	Biodisponibilidad
Linealidad y			
precisión	X	X	X
Reproducibilidad	X	X	X
Precisión y			
exactitud al 100%	X	X	X
Límite de			
detección			X
Especificidad	X	X	X
Tolerancia del			
sistema		X	
Estabilidad de			
la muestra	X	X	X

II.1 Tabla de análisis de varianza de la regresión lineal para la prueba de linealidad del sistema para Cobre.

Fuente	g.l.	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F _{cal}	F _{tab.}
Regresión	1	5.08E-3	5.08E-3	4267	6.30
Error	14	1.66E-5	1.19E-6		
Total	15	5.09E-3			

Ho: Y no depende de X Ha: Y depende de X

Criterio: Si $F_{cal} \leq F_{tab}$ Ho se acepta

$4267 > 6.30$ ♣ Ho se rechaza, Y depende de X

II.2 Tabla de análisis de varianza de la regresión lineal para la prueba de linealidad del sistema para zinc.

Fuente	g.l.	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F _{cal}	F _{tab.}
Regresión	1	0.39501	0.39501	11064	6.30
Error	14	5E-4	3.57E-5		
Total	15	0.39551			

Ho: Y no depende de X Ha: Y depende de X

Criterio: Si $F_{cal} \leq F_{tab}$ Ho se acepta

$11064 > 6.30$ ♣ Ho se rechaza, Y depende de X

III.1 Tabla de análisis de varianza de la regresión lineal para la prueba de linealidad del método para cobre.

Fuente	g.l.	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F _{cal}	F _{tab.}
Regresión	1	2.1074	2.1099	12619	6.30
Error	14	1.5E-3	1.67E-4		
Total	15	2.1099			

Ho: Y no depende de X Ha: Y depende de X

Criterio: Si $F_{cal} \leq F_{tab}$ Ho se acepta

12619 > 6.30 ♣ Ho se rechaza, Y depende de X

III.2 Tabla de análisis de varianza de la regresión lineal para la prueba de linealidad del método para zinc.

Fuente	g.l.	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F _{cal}	F _{tab.}
Regresión	1	15.8884	15.8884	8606	6.30
Error	14	0.0277	1.84E-3		
Total	15	15.9161			

Ho: Y no depende de X Ha: Y depende de X

Criterio: Si $F_{cal} \leq F_{tab}$ Ho se acepta

8606 > 6.30 ♣ Ho se rechaza, Y depende de X

10.BIBLIOGRAFIA

1. Attiyat, A.; Study of the relative effects of classes of solvents on the atomic absorption spectrometry determination of copper and zinc; *Microchem. J.*; 36(2)228-234, 1987.
2. Cha, T.; Determination of gold, silver, copper, lead and zinc in a single sample solution; *Huaxue Fence*; 23(1)35, 1987.
3. Christian, D.; "Instrumental Analysis"; 2^a; Allyn and Bacon Inc.; USA; 1986; 280-380.
4. Ewing, G.; "Instrumental methods of chemical analysis"; 3^a; McGraw Hill; USA; 1969; 178-188.
5. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; 5^a; Secretaría de Salud; México; 504, 1101; 1988.
6. Goodman, L., Gilman, A.; "The pharmacological basis of therapeutics"; Macmillan Publishing Co.; USA; 1975; 1000-1001.
7. Higuchi, T.; "Pharmaceutical Analysis"; Interscience publishers; USA; 1961; 758-759.
8. Levine, R.; "Pharmacology: Drug actions and reactions"; 2^a; Little, Brown and Company; USA; 1978; 447-448.
9. Li, Y., Zhou, J.; Simultaneous determination of copper, zinc, iron, calcium and magnesium in erythrocytes by flame atomic absorption spectrometry; *Guangpu Fenxi*; 7(4)60-63, 1987.

10. Litter, M.; "Farmacología"; 7ª; El Ateneo; Argentina; 1988; 1380-1383.
11. Márques, M.; "Probabilidad y estadística para ciencias Químico - Biológicas"; Preedición; McGraw Hill; México; 1991; 450-456.
12. Norma Técnica: Guías Generales de Validación, Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaría de Salud, México, 1988.
13. Oikawa, N., Taguchi, K.; Rapid determination of trace metals in cows milk by graphite furnace atomic absorption spectrometry; *Eiseiga Ku Zaushi*; 28(3)180-189, 1987.
14. Parra, O.; Copper Determination in haemodialysis solutions by graphite furnace atomic absorption spectrometry; *At. Spectrosc.*, 8(4)105-108, 1987.
15. Pelies, L., Martynenko, K.; Studies of analytical signal stabilization by automatic control of graphite-tube furnace temperature; *Zh. Anal. Khim*; 42(6)1020-1032, 1987.
16. Sandell, E.; "Colorimetric determination of traces of metals"; Interscience; USA; 1944; 261.
17. Shine, I.; "Handbook of spectrophotometric data of drugs"; CRC Press; 1969; 349-382.
18. Skoog, D., West, D.; "Análisis instrumental"; 2ª; McGraw-Hill; México; 1990; 316-342.

19. Strobel, H.; "Chemical instrumentation: A systematic approach"; 3^a; Wiley-Interscience; USA; 1989; 479-500.

20. The United States Pharmacopeia; XIX; USA; 66, 545; 1975.

21. Ybañez, N., Mantur, R.; Determinación de cadmio, cobre, plomo y zinc en agua potable a concentraciones de $\mu\text{g/ml}$ mediante absorción atómica de flama; *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*; 27(2)270-278, 1987.