



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

T E S I S

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN
MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR,
POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV, UN
FÁRMACO EMPLEADO EN EL TRATAMIENTO
DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

MIRIAM DEL CARMEN CRUZ MENDIOLA



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

T E S I S

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA CUANTIFICAR, POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV, UN
FÁRMACO EMPLEADO EN EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

MIRIAM DEL CARMEN CRUZ MENDIOLA

MÉXICO, D.F.

2010

Jurado asignado

Presidente

María Teresa Buentello Rodríguez

Vocal

Georgina Margarita Maya Ruiz

Secretario

Pedro Salvador Valadez Eslava

1er suplente

Ricardo Rodríguez Sáenz

2do suplente

Raúl Lugo Villegas

Laboratorio de Análisis de Medicamentos

Departamento de Farmacia

Facultad de Química Edificio A, Lab 1E

UNAM

Asesor del tema

Georgina Margarita Maya Ruiz

Sustentante

Miriam del Carmen Cruz Mendiola

"Homero nos hace asistir al choque violento de Europa y de Asia; Moisés nos pone delante de las maravillas de la Creación; Homero canta a Aquiles; Moisés a Yahvé.

Homero desfigura a los hombres y a los dioses, sus hombres son divinos y sus dioses son humanos; Moisés nos muestra sin velo el rostro de Dios y el rostro del hombre.

El águila homérica no subió más alto que las cumbres del Olimpo, ni voló más allá de los horizontes.

El águila del Sinaí, subió hasta el trono resplandeciente de Dios y tuvo debajo de sus alas todo el orbe de la tierra... entre la epopeya homérica y la Biblia, entre Homero y Moisés, hay la misma distancia entre Zeus y Yahvé, entre el Olimpo y el Cielo"

Dedicatoria

A ti Adonay, porque sin ti mi vida sería tan vana y sin razón. Al enseñarme el camino del verdadera Amor me has hecho vivir en plenitud. Sin tu presencia en mi vida no habría podido seguir hasta éste momento que es más tuyo que mío, sólo espero que me permitas poder ser útil a los demás.

A mis extraordinarios padres que me han dado más que cuidados , que me han enseñado a valerme por mí misma y a tener las alas del tamaño que yo quiera para alcanzar todo lo que me proponga, jamás tendré con qué pagarles todas las alegrías , angustias y desvelos que han pasado junto a mí. A ti mami por todo tu amor y comprensión que día con día ha sido mi inspiración. A ti padre por el ejemplo de fortaleza que me has transmitido siempre, por tus regaños y consejos que me han hecho crecer como ser humano. ¡MIL GRACIAS!

A la persona más excepcional que cualquiera se pudiera encontrar, mi hermano Ruben, por salir siempre a mi rescate en todas las ocasiones en las que he sido un verdadero desastre, escucharme, aguantar mis problemas y cambios constantes de estado de ánimo. Por ser un gran ejemplo para mí en todos los aspectos, tu constancia, amor y responsabilidad han sido cimientos importantes para mí. Ya sabes que te quiero hermanito. Porque sin ti no sería.

*A toda mi familia por creer en mí y apoyarme en los momentos difíciles.
En especial a Jaime, Beto, Alejandro, Daniel, Ángel, Aidé, Martha, Agustín, Jesús, Enedina y Joel por todo el amor, apoyo y cariño mostrado siempre.*

A mi segunda familia de la comunidad del Sagrado Corazón de Jesús y de Escuela de Pastoral, ya que sin sus porras, consejos y aliento no se me hubiera hecho más ligero el camino.

En especial a Paty , Cecy, Lupita, Beto, Gloria, Meche, Globy, Eva, Jasmin, Rafa y Gabby por estar siempre conmigo y alentarme con su compañía y consejos.

A todos mis amigos de la Facultad por los buenos momentos que estarán siempre en mi corazón, en especial a Chuy, Blanca, Lore y Karla por su alegría y confianza, Ana, José y Daniel por perdonarme mis ausencias, a Ociel por su sincera amistad, a Ramplix por rescatarme de mi soledad y ser un gran amigo, a Susy y Marichol por preocuparse por mí y por sus consejos. A Luz porque a pesar de ser pequeña físicamente es la más grande triunfadora del mundo, me has enseñado mucho Lucecita!

A Carlitos, Topo, Lina, Yeco, Neri, Marilyn.

A ti Alejandro porque fuiste, eres y seguirás siendo una parte importante en mi vida, gracias por todos los momentos compartidos, por tus consejos, cariño y también por estar en las buenas y en las malas. Te estaré agradecida por siempre...no te imaginas cuánto.

*A mis grandes amigos Abraham, Bety y Jan por soportarme, saben que los quiero mucho.
A Isaac, ¿Quién dice que el amor de tu vida debe permanecer contigo por siempre? Porque te respiraré eternamente... aunque vuelas miles de kilómetros lejos de mí, ya sabes en dónde estaré.*

AGRADEZCO PROFUNDAMENTE A:

*Dios por darme la vida y la oportunidad de
conocer lo maravilloso de su Creación
a través de la ciencia.*

La Universidad Nacional Autónoma de México por acogerme como a una hija más, abrirme sus puertas. Por vestir mí alma de Azul y Oro. *¡Por mi raza, hablará el espíritu!*

La Facultad de Química, por ser mí segundo hogar, por la estupenda formación recibida que dejó un sello el cual perdurará por siempre.

Dos personas muy importantes:

La Q.F.B. Georgina Margarita Maya Ruiz por el apoyo brindado en la realización de ésta tesis, sobretodo por su paciencia, consejos y amistad. Nunca olvidaré su entrega y preocupación para poder concluir con éste trabajo.

La M. en C. María del Socorro Alpizar Ramos, por compartir conmigo un poco de su basta experiencia, por su amistad, por la confianza depositada en mí y sobretodo por el apoyo brindado para que pudiera titularme.

*Gracias a las dos por creer en mí trabajo y enseñarme que no importa cuánto sepas o qué cargo tengas ya que mientras no hayas descubierto lo importante que es la calidad humana lo demás no sirve.
Gracias por los extraordinarios seres humanos que son.*

Mis profesores, principalmente a los que dejaron una huella importante en mí:

Las profesoras Rachel Mata Essayag y Honoria Fuentes Sixtos por su apoyo para la realización de la tesis, a la profesora María de los Dolores Campos Echeverría por enseñarme a descubrir el maravilloso mundo del Análisis de Medicamentos, al profesor Juan Manuel Rodríguez por su extraordinaria cátedra y ejemplo de puntualidad y entrega, al profesor Joaquín González Robledo por su amistad y comprensión, al profesor Francisco Hernández Luis por sus valiosos consejos y preocupación por sus estudiantes, al profesor Ricardo Rodríguez Sáenz por ofrecerme su apoyo y al profesor Alfonso Lira Rocha por alentarme siempre en mis momentos de depresión con un buen chiste y mostrarme que un profesor también puede ser un excelente amigo. *¡ MIL GRACIAS!*

Todos los que directa o indirectamente ayudaron a la realización de ésta tesis

A todos ustedes

GRACIAS

Índice General

	<i>Página</i>
<i>Introducción</i>	
I.- Objetivo	2
II.-Generalidades	
2.1.- Fisiología de las vías aéreas	3
2.2.- Enfermedades respiratorias	4
2.2.1.- Principales enfermedades respiratorias	6
2.2.2.- Incidencia de enfermedades respiratorias en la ciudad de México	12
2.3.- Propiedades físicas y químicas del fármaco empleado	13
2.4.- Métodos de análisis	14
2.4.1.- Espectrofotometría UV- VIS	14
2.4.2.- Componentes y funcionamiento de un espectrofotómetro UV-VIS	16
2.4.3.- Ley de Lambert – Beer	18
2.4.4.- Limitaciones a la aplicación de la Ley de Lambert - Beer	18
2.4.5.- Limitaciones propias de la Ley de Lambert – Beer	19
2.5.- Desarrollo de métodos analíticos	20
2.5.1.- El proceso de toma de muestra	20
2.5.2.- Obtención del espectro de absorción del fármaco en estudio	21
2.6.- Validación de métodos analíticos	22
2.6.1.- Definición de Validación	22
2.6.2- Importancia de validar	23
2.6.3.- ¿Cuándo deben validarse los métodos analíticos?	23

2.6.4.- Parámetros de desempeño que considera la validación para la determinación de un método analítico de ensayo	24
2.6.4.1.- Especificidad	26
2.6.4.2.- Linealidad del sistema	26
2.6.4.3.- Precisión del sistema	26
2.6.4.4.- Exactitud y repetibilidad del método	27
2.6.4.5.- Linealidad del método	27
2.6.4.6.- Precisión del método	27
2.6.4.7.- Robustez	28
III.-Desarrollo experimental	29
IV.-Resultados	45
Conclusiones	56
Bibliografía	
<i>Anexos</i>	
A.-Símbolos y abreviaturas	
B.-Índice de tablas	
C.-Índice de figuras	
D.-Tabla estadística de la distribución <i>t</i> de <i>Student</i>	
E.- Fórmulas con ejemplo del cálculo para cada uno de los parámetros de desempeño	

Introducción

El presente trabajo se desarrolla dentro de un marco multidisciplinario en el que participan diversas entidades como son el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), la Facultad de Medicina y la Facultad de Química de la UNAM. Por tal motivo se prefiere mantener el anonimato en lo que respecta al fármaco empleado y citado, denominándolo compuesto "C".

Las enfermedades respiratorias tienen una alta incidencia en la población mundial, la que más destaca es el cáncer de pulmón que en los últimos años ha cobrado la vida de un mayor número de personas. De acuerdo a información publicada por la Dirección General de Estadística del INEGI se reportó que los tumores malignos fueron la segunda causa de muerte en 1997.

Lo anterior hace notar la importancia de que en el área de la Salud se dirijan esfuerzos hacia el desarrollo de nuevos medicamentos que puedan contrarrestar y/o mejorar la calidad de vida de quienes viven con éste tipo de enfermedades.

Es por ello que el poder cuantificar un principio activo empleado en el tratamiento de enfermedades respiratorias por medio de un método analítico validado, es un paso importante para combatir éstas afecciones.

Se espera que éste trabajo sirva de motivación para descubrir nuevos fármacos, desarrollar nuevas formas farmacéuticas y métodos analíticos de cuantificación.

Objetivo

Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar un principio activo por Espectrofotometría UV-VIS, contenido en cápsulas de gelatina dura, empleado en el tratamiento de enfermedades respiratorias.

II.-Generalidades

2.1.- Fisiología de las vías aéreas²³

Las vías aéreas o tracto respiratorio¹⁹ constituyen un mecanismo de conducción del aire y de protección - calentamiento, purificación y humectación – ²⁰ del delicado tejido respiratorio representado por los alvéolos. Dichas vías comprenden las superiores – *nariz, laringe y faringe* – y las inferiores – *tráquea y bronquios* – los rasgos fisiológicos principales se exponen a continuación: ^{20, 21,22}

a) Tracto respiratorio superior

Las fosas nasales poseen una mucosa muy vascularizada que generalmente tiene la capacidad de volverse erecta al llenarse con sangre (tejido eréctil), lo que facilita el calentamiento del aire inspirado; la secreción de dicha mucosa humedece a la faringe, produciéndose así su drenaje.

La faringe es simplemente una vía de paso del aire, mientras que la laringe es el órgano de la fonación o emisión de sonidos.

b) Tracto respiratorio inferior

El *árbol traqueo - bronquial* consiste en tubos tapizados de una mucosa y sus paredes poseen fibras musculares lisas²⁰, pero a nivel de la tráquea y de los bronquios grandes y medianos, la presencia de anillos cartilagosos impide que dichos tubos se contraigan o relajen apreciablemente.

La motilidad bronquial está bajo la acción del sistema nervioso autónomo, siguiendo el vago broncoconstrictor a través de receptores muscarínicos, mientras que el simpático es broncodilatador a través de receptores β_2 adrenérgicos¹⁹, pero estos nervios normalmente no tienen tono o es muy escaso.

Los *bronquiolos* poseen una capa de fibras musculares circulares, los músculos de Reisseisen, cuya contracción o relajación es capaz de modificar la cantidad de aire a los alvéolos, los bronquiolos se dilatan durante la inspiración y se contraen en la espiración, pero se trata de fenómenos esencialmente pasivos – distensión y compresión pulmonar – normalmente.

2.2- Enfermedades respiratorias

Son enfermedades que afectan el aparato respiratorio. Pueden tener su origen en procesos infecciosos, mecánico-obstructivos y alérgicos como se describe a continuación:

a) Causas infecciosas

Se asocian a virus como el rinovirus, influenza y parainfluenza, bacterias como *M. catarrhalis* y *S. pneumoniae* o a hongos como los del género *Aspergillus*.

b) Origen mecánico-obstructivo

Debido a la exposición a contaminantes de la atmósfera como el humo del tabaco.

c) Origen alérgico

Ocasionada por una respuesta inmunológica a compuestos como el polen o polvo, por citar unos ejemplos.

La motilidad bronquial está bajo la acción del sistema nervioso autónomo, siguiendo el vago broncoconstrictor a través de receptores muscarínicos, mientras que el simpático es broncodilatador a través de receptores β_2 adrenérgicos¹⁹, pero estos nervios normalmente no tienen tono o es muy escaso.

Los *bronquiolos* poseen una capa de fibras musculares circulares, los músculos de Reisseisen, cuya contracción o relajación es capaz de modificar la cantidad de aire a los alvéolos, los bronquiolos se dilatan durante la inspiración y se contraen en la espiración, pero se trata de fenómenos esencialmente pasivos – distensión y compresión pulmonar – normalmente.

2.2- Enfermedades respiratorias

Son enfermedades que afectan el aparato respiratorio. Pueden tener su origen en procesos infecciosos, mecánico-obstructivos y alérgicos como se describe a continuación:

a) Causas infecciosas

Se asocian a virus como el rinovirus, influenza y parainfluenza, bacterias como *M. catarralis* y *S. pneumoniae* o a hongos como los del género *Aspergillus*.

b) Origen mecánico-obstructivo

Debido a la exposición a contaminantes de la atmósfera como el humo del tabaco.

c) Origen alérgico

Ocasionada por una respuesta inmunológica a compuestos como el polen o polvo, por citar unos ejemplos.

Por tanto, las enfermedades respiratorias se pueden clasificar de acuerdo al siguiente esquema:

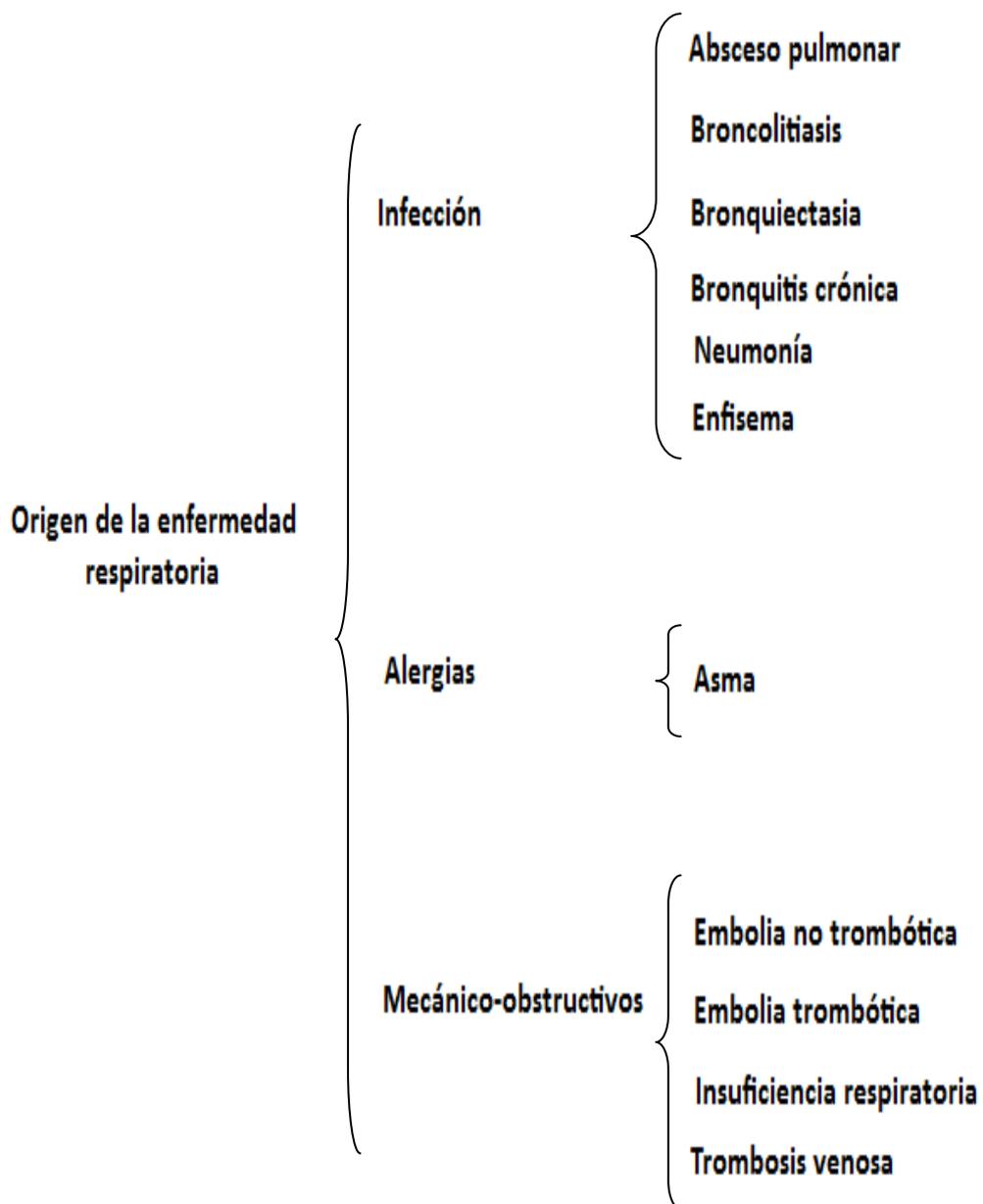


Figura 1.- Origen de algunas enfermedades respiratorias

2.2.1.- Principales enfermedades respiratorias

A continuación se mencionan de forma general cada una de las principales enfermedades respiratorias y enseguida una breve descripción de la enfermedad:

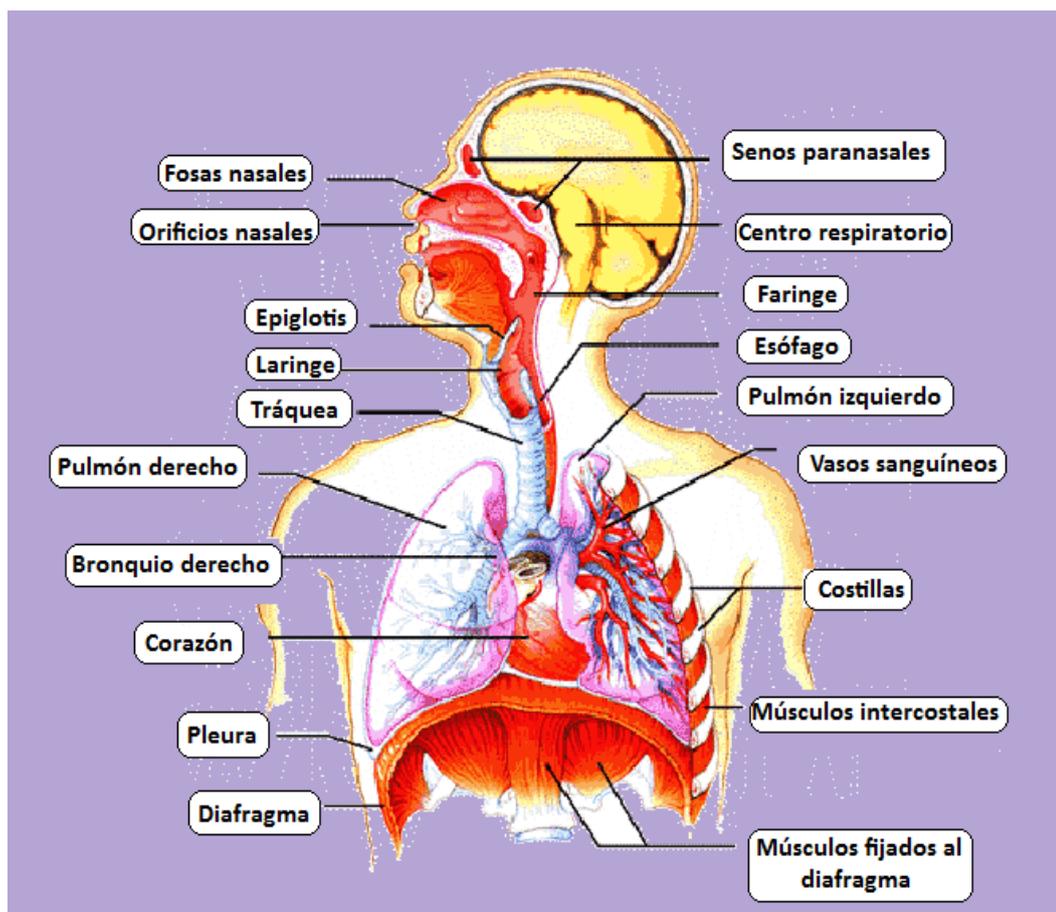


Figura 2.-Sistema respiratorio

1.- Absceso pulmonar

Es una infección que tiene como consecuencia la aparición de una cavidad llena de pus en el pulmón, rodeada de tejido inflamado ¹.

2.- Asma

Es una enfermedad pulmonar obstructiva y difusa, que se presenta con:

- a) Alta reactividad de las vías aéreas a una variedad de estímulos.
- b) Alto grado de reversibilidad del proceso obstructivo, de forma espontánea o como resultado del tratamiento.

Existen 2 tipos de asma, el asma extrínseco, de origen alérgico – que se debe a sensibilización por inhalación de alérgenos - y el asma intrínseco que no puede relacionarse con una reacción alérgica, se observa generalmente en los niños y puede deberse a infecciones bacterianas o virales sobretodo en las vías aéreas²³.

Actualmente se han descubierto fármacos que son eficientes en la terapia contra el asma ².

3.- Bronquitis crónica

La bronquitis es una inflamación de los bronquios causada generalmente por una infección. La enfermedad es por lo general leve y suele curarse por completo. Sin embargo, la bronquitis puede ser grave en personas con enfermedades crónicas que padecen afecciones cardíacas o pulmonares y también en personas de edad avanzada.

4.- Fibrosis quística

La fibrosis quística es una enfermedad hereditaria que hace que ciertas glándulas produzcan secreciones anormales, cuyo resultado es una serie de síntomas importantes que afectan al tracto digestivo y a los pulmones.

5.- Bronquiectasia

Esta enfermedad es el resultado de una lesión parcial del tracto respiratorio. En las bronquiectasias, los afectados son los bronquios (vías aéreas que se originan a partir de la tráquea). En la atelectasia, una parte del pulmón se reduce de tamaño (colapso) debido a la pérdida de aire.

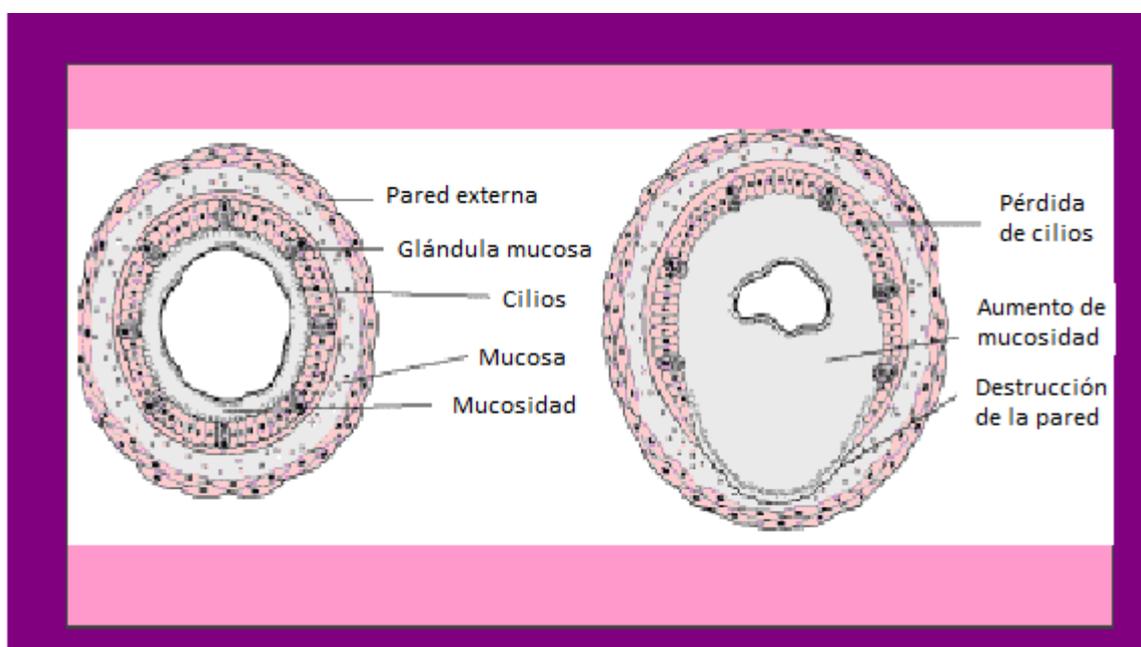


Figura 3.- En las bronquiectasias, algunas zonas de la pared bronquial están destruidas e inflamadas de modo crónico; las células ciliadas están destruidas o deterioradas y en consecuencia, la producción de mucosidad aumenta.

6.- Enfisema o enfermedad obstructiva crónica.

El enfisema es una condición crónica de los pulmones en la que los alvéolos, o sacos de aire pueden estar destruidos, estrechados, colapsados, dilatados o demasiado inflados.

La superinflación de los sacos de aire es el resultado de la desintegración en las paredes del alvéolo, y causa una disminución de la función respiratoria y por lo tanto dificultad al respirar.

El daño en los sacos de aire es irreversible, y produce como resultado "agujeros" permanentes en los tejidos de la parte baja de los pulmones.

7.- Hipertensión pulmonar primaria

La hipertensión pulmonar primaria es una enfermedad de carácter progresivo, más frecuente en mujeres jóvenes y de mediana edad. Su etiología se desconoce, aunque existe una predisposición familiar hasta en un 6% de los casos.

8.- Insuficiencia respiratoria

El síndrome de insuficiencia respiratoria aguda es un tipo de insuficiencia pulmonar provocado por diversos trastornos que causan la acumulación de líquido en los pulmones (edema pulmonar).

Este síndrome es una urgencia médica que puede producirse en personas que anteriormente tenían pulmones normales.

A pesar de llamarse a veces síndrome de distrés respiratorio del adulto, esta afección también puede manifestarse en niños.

9.- Neumonías

La neumonía es una infección de los pulmones que afecta a los alvéolos y los tejidos circundantes. La neumonía no es una enfermedad única, sino muchas enfermedades diferentes, cada una de ellas causada por un microorganismo distinto.

Por lo general, la neumonía se presenta tras la inhalación de microorganismos, pero a veces la infección es llevada por el flujo sanguíneo o pasa a los pulmones directamente desde una infección cercana, teniendo como consecuencia inflamación del tejido pulmonar ⁴.

10.- Trombosis venosa

Es la obstrucción de una o más arterias del pulmón debido a un trombo. Se corre el riesgo de no ser diagnosticada a tiempo y llegar a ser mortal⁵.

11.- Cáncer pulmonar

El cáncer de pulmón, o también conocido como carcinoma broncogénico, en 1990 era la segunda causa de muerte en México. Actualmente se ha convertido en la primera causa de muerte dentro de todos los tipos de cáncer en México y sin duda alguna ya es considerado un problema de salud pública.

Cabe destacar que el 90% de los casos es debido al consumo de tabaco. De acuerdo al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) actualmente, se registra en promedio el deceso de una persona cada 10 minutos por enfermedades relacionadas con el tabaquismo - cáncer de pulmón-.

El cáncer de pulmón es el más agresivo, aproximadamente el 90% de los pacientes mueren a causa de la enfermedad. Además es el de mayor dolor ya que reduce el tiempo de vida del paciente, afecta su calidad de vida y la de su familia.

2.2.2.- Incidencia de enfermedades respiratorias en la Ciudad de México

De acuerdo a la Secretaría de Salud, las principales 20 causas de morbilidad en el 2006 para la ciudad de México se muestra en la tabla 1.

SECRETARIA DE SALUD DEL DISTRITO FEDERAL
SERVICIOS DE SALUD PUBLICA DEL DISTRITO FEDERAL
DIRECCION DE VIGILANCIA E INTELIGENCIA EPIDEMIOLOGICA

Clave	Diagnóstico	Acumulado
16	<i>Infecciones respiratorias agudas</i>	1,900,272
8	<i>Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas</i>	394,482
110	<i>Infección de vías urinarias</i>	305,135
109	<i>Úlceras, gastritis y duodenitis</i>	118,808
128	<i>Gingivitis y enfermedad periodontal</i>	54,019
47	<i>Hipertensión arterial</i>	48,448
18	<i>Otitis media aguda</i>	43,092
49	<i>Diabetes mellitus tipo II</i>	39,942
134	<i>Conjuntivitis</i>	32,961
2	<i>Amibiasis intestinal</i>	30,558
14	<i>Otras helmintiasis</i>	27,541
54	<i>Asma y estado asmático</i>	27,293
33	<i>Varicela</i>	21,455
126	<i>Mordeduras por perro</i>	16,174
124	<i>Accidentes de transporte en vehículos con motor</i>	14,412
125	<i>Quemaduras</i>	13,006
20	<i>Candidiasis urogenital</i>	12,740
51	<i>Enfermedades isquémicas del corazón</i>	9,224
17	<i>Neumonías y bronconeumonías</i>	9,127

Tabla 1.- Principales causas de morbilidad en el 2006 en la Cd. de México. **Acumulado** es el número de personas de 1-65 años

2.3- Propiedades físicas y químicas del fármaco empleado.

Las propiedades fisicoquímicas del compuesto C se muestran a continuación.

Propiedad	
<i>Apariencia</i>	Polvo blanco cristalino
<i>Solubilidad</i>	Agua 20°C 1,7 g/L Muy soluble en etanol y poco soluble en agua
<i>Masa molecular</i>	146,14 g/mol
<i>Punto de fusión</i>	68 °C -71 °C
<i>Densidad</i>	0,935 g/mL

Tabla 2.- Propiedades fisicoquímicas del compuesto C.

2.4.- Método de análisis

2.4.1.- Espectrofotometría UV- VIS

Al conjunto de radiaciones que se mueven por todo el espacio se le llama luz. La luz visible corresponde a las radiaciones detectadas por nuestro ojo, aunque la mayoría son invisibles para nosotros.

Dichas radiaciones se pueden describir como partículas y como ondas. La descripción como onda se basa en que la luz es un campo eléctrico y magnético que oscila perpendicularmente a la dirección de traslación por el espacio, dando lugar a ondas transversales como se muestra en la figura 4.

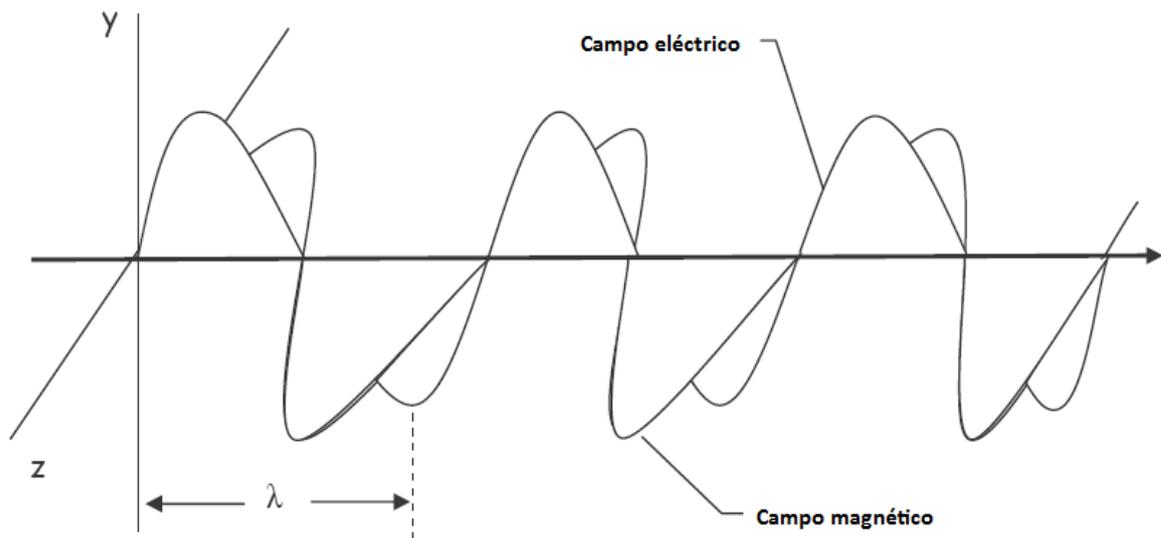


Figura 4.- Radiación electromagnética

Cualquier fenómeno oscilatorio se define mediante dos parámetros: la *longitud de onda* (λ) que es la distancia entre los picos o máximos cuando la luz recorre su camino de manera ondulatoria y la *frecuencia* (ν) y la radiación electromagnética no podía ser la excepción.

Por otra parte al conjunto de *radiaciones electromagnéticas* se le llama *espectro electromagnético* y conviene agruparlo por regiones para poder conocer sus propiedades.

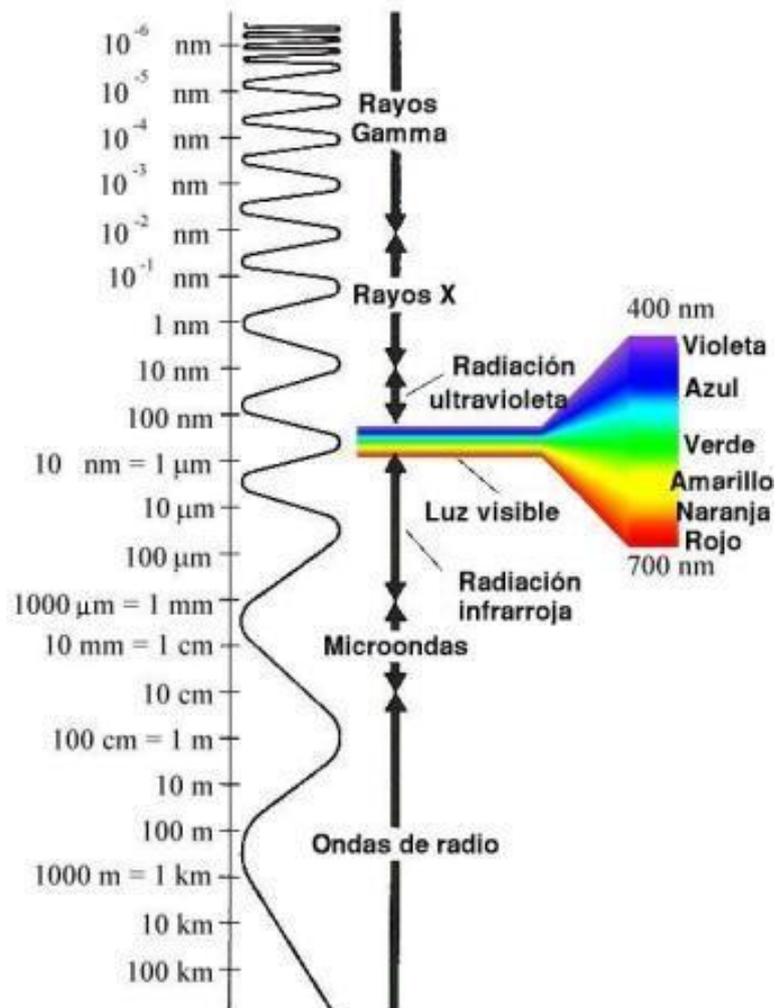


Figura 5.- Espectro electromagnético ¹⁵.

2.4.2.- Componentes y funcionamiento de un espectrofotómetro UV-VIS.

La Espectrofotometría es una de las técnicas experimentales más utilizadas para la detección específica de moléculas. Se caracteriza por su precisión, sensibilidad y su aplicabilidad a moléculas de distinta naturaleza (contaminantes, biomoléculas, etc.) y estado de agregación (sólido, líquido, gas). Un espectrofotómetro es un instrumento en el que puede medirse la cantidad de radiación visible, ultravioleta o infrarrojo que absorbe una solución a una longitud de onda dada.

Los cuatro componentes fundamentales de un espectrofotómetro son:

- *La fuente
- *El monocromador
- *La celda
- *El detector

Dichos componentes se pueden observar en la figura 6.

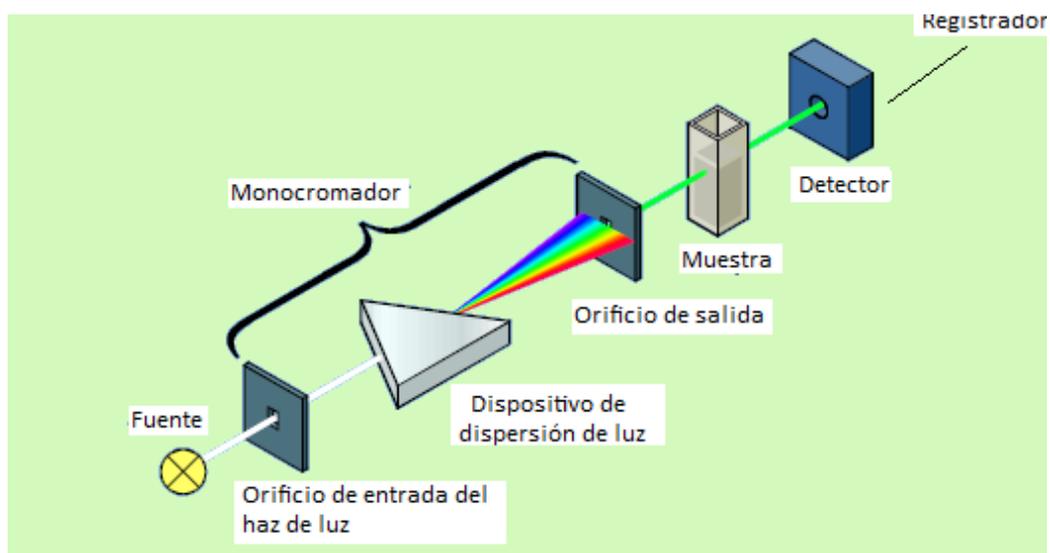


Figura 6.- Componentes fundamentales de un espectrofotómetro¹⁵

Fuente de luz: Proporciona energía radiante, es una lámpara de tungsteno (visible), deuterio o hidrógeno (UV), y yoduro de tungsteno (Visible / UV).

Monocromador: Aísla la longitud de onda mediante prismas, rejillas o filtros.

Celdas o cubetas: Vidrio (visible), cuarzo (visible / UV).

Detector o fotomultiplicador: Es un tubo electrónico sensible a la luz que amplía la señal luminosa proveniente de la celda.

Transmitancia: La transmitancia T de la solución, es la fracción de la radiación incidente transmitida por una solución.

$$T = P/P_0$$

Donde:

P₀ = Potencia inicial del haz de radiación

P = Potencia final del haz de radiación

T = Transmitancia

Por lo general la transmitancia se expresa como porcentaje.

Absorbancia: Es la cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra. La absorbancia de una solución está definida por la ecuación:

$$A = -\log T = \log P_0/P$$

Donde:

P₀ = Potencia inicial del haz de radiación

P = Potencia final del haz de radiación

T = Transmitancia

A diferencia de la transmitancia la absorbancia de una solución aumenta a medida que aumenta la atenuación del haz.

2.4.3.- Ley de Lambert – Beer

La concentración de una sustancia es directamente proporcional a la cantidad de luz absorbida e inversamente proporcional al logaritmo de la luz transmitida. Las escalas de lectura y de medición de los espectrofotómetros suelen estar calibradas para leer absorbancia y transmitancia. La sensibilidad de un espectrofotómetro depende de la magnitud de la absorbancia específica y de la absorbancia mínima que puede medirse con el grado de certidumbre requerido.

Por lo tanto cuantifica la radiación absorbida en función de la concentración de las moléculas del analito y depende de la longitud que recorre el haz de luz en el medio de absorción.

2.4.4.-Limitaciones a la aplicación de la Ley de Lambert - Beer

Se encuentran pocas excepciones a la generalización que la absorbancia está relacionada linealmente a la longitud del camino óptico. En cambio, las desviaciones de la proporcionalidad directa entre la absorbancia medida y la concentración, son más frecuentes.

Estas desviaciones son fundamentales y representan limitaciones reales de la ley. Algunas ocurren como una consecuencia de la manera en que las mediciones de absorbancia se hacen, o como un resultado de cambios químicos asociados con cambios en la concentración. Otras ocurren a veces como desviaciones instrumentales.

2.4.5.- Limitaciones propias de la Ley de Lambert - Beer

La ley de *Lambert - Beer* es exitosa en describir el comportamiento de absorción de soluciones diluidas solamente; a concentraciones altas la distancia promedio entre las especies responsables de la absorción está disminuida hasta el punto que cada una afecta la distribución de cargas de sus vecinas. Esta interacción, a su vez, puede alterar la habilidad de las especies para absorber en una longitud de onda de radiación.

Debido a que la extensión de la interacción depende de la concentración, la ocurrencia de este fenómeno provoca desviaciones de la relación lineal entre absorbancia y concentración.

Un efecto similar se encuentra a veces en soluciones que contienen altas concentraciones de otras especies, particularmente electrolitos. La proximidad de iones a la especie absorbente altera la absorptividad molar de la última por atracciones electrostáticas, este efecto se disminuye por dilución.

Desviaciones de la ley de Beer también surgen porque ϵ , que es el coeficiente de absorptividad molar característico de cada molécula, es dependiente del índice de refracción de la solución; entonces, cambios de concentración provocan alteraciones de este índice y se observan desviaciones de la ley.

2.5.- Desarrollo de métodos analíticos¹⁴

El desarrollo de un método puede tomar varias formas. Desde un extremo, el desarrollo de un método puede involucrar el adaptar un método existente realizando cambios menores de tal manera que sea adecuado a su nueva aplicación.

Para el desarrollo de un método en ocasiones se debe trabajar con diferentes ideas simultáneamente y de todas ellas escoger la mejor.

Los métodos analíticos consisten de una etapa de medición la cual puede o no ser precedida de una etapa de separación. Es necesario establecer que la señal producida en la etapa de medición o alguna otra propiedad medida, la cual se atribuye al analito, se debe únicamente al analito y no a la presencia de algo química o físicamente similar o que surja como una coincidencia. Esta es la confirmación de la identidad. La interferencia de otros compuestos en la medición del analito, dependerá de la efectividad de la etapa de separación y de la selectividad/especificidad de la etapa de medición.

La selectividad y la especificidad son medidas que garantizan la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias.

2.5.1.- El proceso de toma de muestra

El proceso toma de muestra requiere de un trabajo de gran habilidad, a pesar de lo bueno que es un método analítico y de lo bien que se haya implementado, un problema analítico puede resolverse mediante el análisis de muestras sólo si éstas han sido tomadas adecuadamente.

2.5.2.- Obtención del espectro de absorción del fármaco en estudio

El espectro de absorción del compuesto C en la región UV se muestra en la figura 7, dicha propiedad fue utilizada para poder diseñar y desarrollar el método analítico, así como la consideración de la solubilidad de la molécula en el etanol; además de revisar la especificidad en éste disolvente.

Es importante señalar que dicho compuesto por ser de naturaleza orgánica es soluble en otros disolventes orgánicos, pero la elevada toxicidad de éstos no los hace candidatos para ser utilizados.

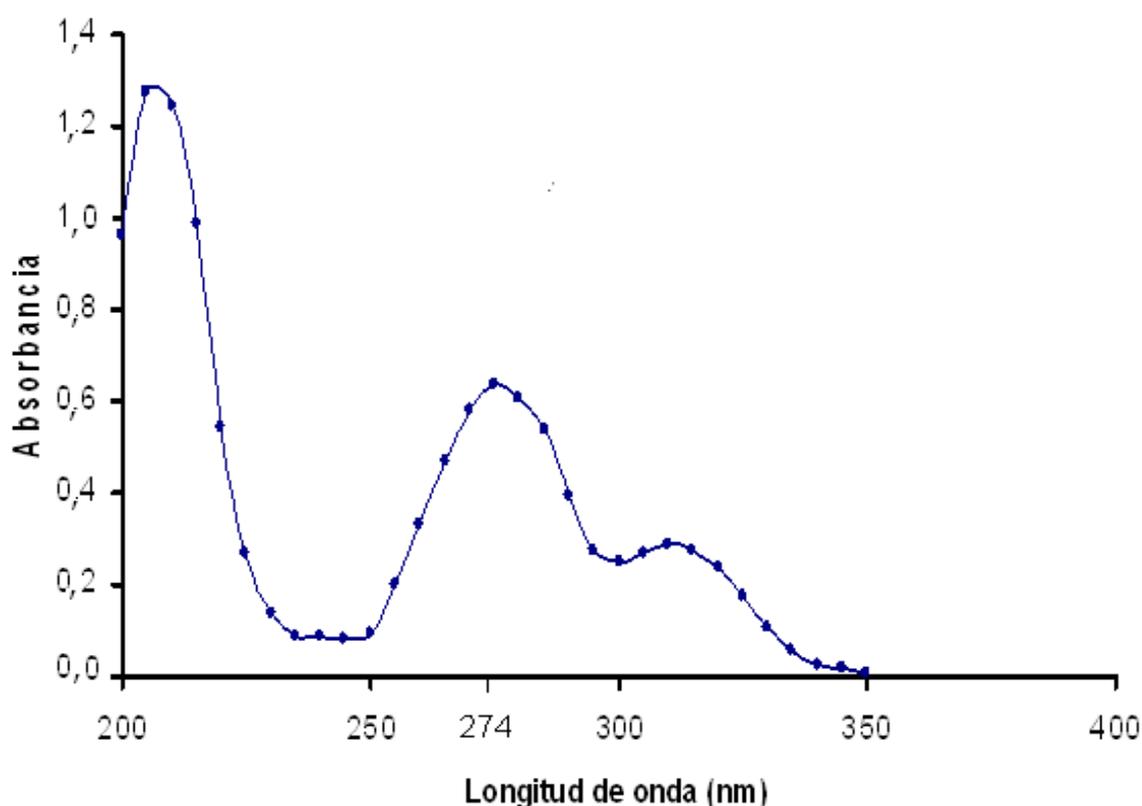


Figura 7.- Espectro de absorción del compuesto C

2.6.- Validación de métodos analíticos^{14, 18}

2.6.1.- Definición de Validación

Existen diversas definiciones de validación, algunas de ellas se citan a continuación:

1.- *“Confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.”* [ISO 8402:1994]

2.- *“El proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden modificar esas características y hasta qué punto”.*

3.- *“Evidencia documental - experimental de que un proceso es consistente para lo cual fue diseñado, dando como resultado productos que cumplen con atributos de calidad preestablecidos”.*

La definición de validación aplicada a un método analítico se puede definir como el proceso de establecer una necesidad analítica y confirmar que el método en cuestión tiene capacidades de desempeño consistentes con las que requiere la aplicación. Está implícita la necesidad de evaluar las capacidades de desempeño del método. Esto concuerda con la interpretación de la definición ISO de *Morkowski*. El criterio de la “conveniencia” del método es importante; en el pasado la validación del método tendía a concentrarse sobre el proceso de evaluación de los parámetros de desempeño.

Se considera que la validación del método está ligada estrechamente con el desarrollo del método, de hecho, no es posible determinar exactamente donde termina el desarrollo y donde empieza la validación. Por lo general, muchos de los parámetros de desempeño del método que están asociados a su validación, son evaluados.

2.6.2.- Importancia de validar

Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en éste pueda tomarse con confianza. Así, el desempeño del método debe validarse y debe estimarse la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza dado. La incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente de forma interna y fácil de interpretar. La mayor parte de la información requerida para evaluar la incertidumbre se puede obtener durante la validación del método.

2.6.3.- ¿Cuándo deben validarse los métodos analíticos?

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico. Por ejemplo:

- a) Un nuevo método desarrollado para un problema específico.
- b) Un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema.
- c) Cuando el control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo.

- d) Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación.
- e) Para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, entre un método nuevo y uno de referencia.

2.6.4.- Parámetros de desempeño que considera la validación

Para determinar los parámetros de desempeño a evaluar al validar un método analítico es importante tomar en consideración los siguientes puntos:

- a) Grado de validación que se requiere

El laboratorio tiene que decidir cuáles de los parámetros de desempeño del método necesitan caracterizarse con el fin de validar el método. La caracterización del desempeño del método es un proceso costoso pero puede restringirse inevitablemente por consideraciones de tiempo y costo. Al empezar con una especificación analítica considerada cuidadosamente, se tiene una buena base sobre la cual planear el proceso de validación, pero se sabe que en la práctica esto no siempre es posible.

- b) Aplicación analítica del método

En función de la aplicación analítica del método, la tabla 3 indica los parámetros de desempeño a estudiar.

Parámetro de desempeño	Contenido/ potencia/ valoración	Pruebas de impurezas		Identificación
		Contenido/ Valoración	Límite	
Precisión/ adecuabilidad del sistema	Sí	Sí	Sí	*
Linealidad del sistema	Sí	Sí	No	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	Sí
Exactitud y repetibilidad	Sí	Sí	No	No
Linealidad del método	Sí	Sí	No	No
Precisión del método o precisión intermedia	Sí	Sí	No	No
Estabilidad analítica de la muestra	*	*	No	No
Límite de detección	No	No	Sí	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	No
Robustez	*	*	*	No
Tolerancia	*	*	*	No

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método

Tabla 3.- Parámetros de desempeño¹⁸

2.6.4.1.- Especificidad¹⁴

Habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente éstos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, etc.

2.6.4.2.- Linealidad del sistema

Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito. Se deduce que el intervalo lineal es el intervalo de concentraciones del analito dentro del cual los resultados de prueba obtenidos por el método son proporcionales a la concentración del analito. [AOAC - PVMC]

2.6.4.3.- Precisión del sistema

Es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas. La precisión depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o valor especificado.

La medida de la precisión generalmente se expresa en términos de imprecisión y se calcula como una desviación estándar de los resultados de la prueba. “*Resultados de prueba independientes*” significa que los resultados fueron obtenidos de tal forma que no son influenciados por cualquier otro resultado previo sobre el mismo o similar objeto de prueba.

Las mediciones cuantitativas de la precisión dependen en forma crítica de las condiciones estipuladas. La repetibilidad y la reproducibilidad son series particulares de condiciones extremas. [ISO 3534-1]

Es una medida de la reproducibilidad de las mediciones dentro de una serie, es decir, la dispersión de una serie alrededor de su valor central¹⁶.

Precisión Intermedia:

La precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio en diferentes días, diferentes analistas, diferente equipo, etc.¹⁷

2.6.4.4.- Exactitud y repetibilidad del método

Es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. El término exactitud cuando se aplica a una serie de resultados de prueba, involucra una combinación de componentes aleatorios y un componente de error sistemático o sesgo. [ISO 3534-1]

La cantidad referida a las diferencias entre la media de una serie de resultados o un resultado individual y el valor el cual se acepta como valor verdadero o correcto para la cantidad medida¹⁶.

2.6.4.5.- Linealidad del método

Habilidad (dentro de un ámbito dado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra.

2.6.4.6.- Precisión del método

Expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Debe determinarse utilizando muestras originales y homogéneas. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea, puede ser determinada usando muestras preparadas o una disolución de la muestra.

2.6.4.7.- Robustez¹⁴

Una medida de la efectividad del método analítico es con qué tan buen desempeño se mantiene aún sin una implementación perfecta. En cualquier método habrá ciertas etapas las cuales, si no se llevan al cabo con suficiente cuidado, tendrán un efecto severo sobre el desempeño del método y pueden dar como resultado que definitivamente, el método no funcione. Estas etapas deben identificarse como parte del desarrollo del método y si es posible, debe evaluarse su influencia sobre el desempeño del mismo, para ello nos sirve la prueba de robustez. Esto incluye aplicar variaciones deliberadas al método y estudiar el efecto resultante en el desempeño. De esta manera es posible identificar las variables que tienen el efecto más significativo y en base a ello, controlarlas cuidadosamente cuando se aplica el método. Cuando se requiere mejorar el método, estas modificaciones se pueden realizar sobre aquellas partes que se sabe, son críticas.

III.- Desarrollo experimental

3.1.- Desarrollo del método analítico

Contenido:

Compuesto C..... 300 mg
Excipiente c.b.p..... 1 cápsula

3.1.1.- Subproceso muestreo

Pesar no menos de 20 cápsulas, determinar el contenido neto promedio y pesar la cantidad de la muestra equivalente a 300 mg del fármaco.

3.1.2.- Subproceso tratamiento de la muestra

Pesar la cantidad de la muestra equivalente a 300 mg del fármaco, pasar a un matraz volumétrico de 200 mL, agregar 150 mL de etanol y agitar mecánicamente durante 30 minutos; transcurrido este tiempo llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Filtrar esta solución descartando los primeros mililitros y transferir una alícuota de 10,0 mL a un matraz aforado de 100 mL, llevar al aforo con etanol y mezclar. Pasar una alícuota de 5,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar.

3.1.3.- Subproceso sistema de medición

El sistema de medición será espectrofotométrico:

Condiciones:

1. - Medición: ABS
2. - Rango: 400- 200 nm
3. - Rec. Rango: 0A – 1A
4. – Velocidad: Rápido
5. - No. escaneos: 1
6. - Rec. Modo: Sobrepuesto

3.2.- Recursos materiales

3.2.1- Reactivos

- Etanol R.A.

3.2.2.- Equipo

- Balanza analítica
OHAUS DF- IN017
- Espectrofotómetro UV- VIS
SCHIMADZU

3.3.- Preparación de soluciones

- *Solución de Referencia del compuesto "C"*

Pesar una cantidad de la sustancia de referencia equivalente a 15 mg del envase rotulado como principio activo C, sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con etanol, llevar al aforo con éste disolvente y mezclar. Tomar una alícuota de 5,0 mL de ésta solución y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al aforo con etanol y mezclar.

- *Solución problema*

Pesar no menos de 20 cápsulas, determinar el contenido neto promedio y pesar la cantidad de la muestra equivalente a 300 mg del fármaco, pasar a un matraz volumétrico de 200 mL, agregar 150 mL de etanol y agitar mecánicamente durante 30 minutos; Transcurrido este tiempo llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Filtrar esta solución descartando lo primeros mililitros y transferir una alícuota de 10,0 mL a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al aforo con etanol y mezclar. Pasar una alícuota de 5,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL , llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar.

- *Solución de Referencia del compuesto "C" al 100%*

Pesar una cantidad del compuesto C, sustancia de referencia, equivalente a 300 mg, transferir a un matraz volumétrico de 200 mL, disolver con etanol, llevar al aforo con éste disolvente y mezclar. Tomar una alícuota de 10,0 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al aforo con etanol y mezclar. Pasar una alícuota de 5,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar.

3.4.- Protocolo de validación

3.4.1.- Descripción del método analítico

- *Preparación de la solución de Referencia del compuesto "C"*

Ver preparación de soluciones 3.3, solución de Referencia del compuesto "C", página 30.

- *Preparación de la solución problema*

Ver preparación de soluciones 3.3, preparación de la muestra del contenido de la cápsula, página 30.

- *Preparación de la solución de Referencia del compuesto "C" al 100%*

Ver preparación de soluciones 3.3, solución de Referencia del compuesto "C" al 100%, página 31.

- Manejo de resultados

Fórmula empleada para obtener los mg recuperados del fármaco en las muestras.

$$\text{mg}_{\text{obt}} = \frac{\text{Abs}_m}{\text{Abs}_{\text{ref}}} \times \frac{X_{\text{ref}} \times 5,0 \text{ mL} \times 100}{100 \text{ mL} \times 100 \text{ mL} \times 100\%} \times \frac{200 \text{ mL} \times 100 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}}{X \text{ mg} \times 10,0 \text{ mL} \times 5,0 \text{ mL}}$$

De donde:

mg_{obt} = miligramos de fármaco recuperados

Abs_m = absorbancia obtenida de la muestra

Abs_{ref} = absorbancia obtenida de la referencia

X_{ref} = peso en mg de la referencia

$X \text{ mg}$ = miligramos pesados inicialmente

Fórmula empleada para obtener el % de recuperación del fármaco en las muestras.

$$\% \text{ Recuperado} = \frac{\text{Abs}_m}{\text{Abs}_{\text{ref}}} \times \frac{X_{\text{ref}} \times 5,0 \text{ mL} \times 100}{100 \text{ mL} \times 100 \text{ mL} \times 100\%} \times \frac{200 \text{ mL} \times 100 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}}{X \text{ mg} \times 10,0 \text{ mL} \times 5,0 \text{ mL}} \times 100$$

De donde:

mg_{obt} = miligramos de fármaco recuperados

Abs_m = absorbancia obtenida de la muestra

Abs_{ref} = absorbancia obtenida de la referencia

X_{ref} = peso en mg de la referencia

$X \text{ mg}$ = miligramos pesados inicialmente

3.4.2.- Especificidad

3.4.2.1.- Especificidad del analito

3.4.2.1.1.- Material requerido

- 1 espátula
- 1 nave de pesado
- 2 matraces aforados de 100 mL
- 1 pipeta volumétrica 5,0 mL
- 1 pipeta volumétrica 10,0 mL
- 1 matraz aforado de 200 mL

3.4.2.1.2.- Metodología

Pesar 300 mg del fármaco sustancia de referencia y llevar a cabo el procedimiento descrito en la *solución de Referencia del compuesto "C" al 100%* descrito en la página 31 a partir de "transferir a un matraz volumétrico de 200 mL..." y realizar un barrido de la solución desde longitudes de onda de 200 a 400 nm.

3.4.2.2.- Especificidad del placebo adicionado

3.4.2.2.1.- Material requerido

- 1 espátula
- 1 nave de pesado
- 2 matraces aforados de 100 mL
- 1 pipeta volumétrica 5,0 mL
- 1 pipeta volumétrica 10,0 mL
- 1 matraz aforado de 200 mL
- 1 embudo de filtración rápida
- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL
- 1 parrilla con agitación magnética
- 1 barra magnética
- Papel filtro Whatman

3.4.2.2.2.- Metodología

A la cantidad del placebo analítico del producto, que equivale al peso de una cápsula, adicionar 300 mg del fármaco sustancia de referencia y llevar a cabo el procedimiento descrito en la preparación de la muestra (7,5 µg / mL del fármaco) descrito en la página 30 a partir de “pasar a un matraz volumétrico de 200 mL...” y realizar un barrido de la solución desde longitudes de onda de 200 a 400 nm.

3.4.2.3.- Especificidad del placebo

3.4.2.3.1.- Material requerido

- 1 espátula
- 1 nave de pesado
- 2 matraces aforados de 100 mL
- 1 pipeta volumétrica 5,0 mL
- 1 pipeta volumétrica 10,0 mL
- 1 matraz aforado de 200 mL
- 1 embudo de filtración rápida
- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL
- 1 parrilla con agitación magnética
- 1 barra magnética
- Papel filtro Whatman

3.4.2.3.2.- Metodología

Pesar la cantidad del placebo analítico del producto, que equivalga al peso del contenido de una cápsula y llevar a cabo el procedimiento descrito en la preparación de la solución problema descrito en la página 30 a partir de “pasar a un matraz volumétrico de 200 mL...” y realizar una barrido de la solución, a longitudes de onda de 200 a 400 nm.

3.4.3.- Linealidad del sistema

3.4.3.1.- Material requerido

- 1 espátula
- 15 naves de pesado
- 30 matraces aforados de 100 mL
- 15 pipetas volumétricas 5,0 mL
- 15 pipetas volumétricas 10,0 mL
- 15 matraces aforados de 200 mL

3.4.3.2.- Metodología

Preparar por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración (intervalo) por pesadas independientes y someterlas al mismo tratamiento que indica la preparación de la solución de Referencia del compuesto “C” al 100% a partir de “transferir a un matraz volumétrico de 200 mL...”. La concentración central debe ser igual a la que represente el 100% en la muestra procesada para su medición.

El intervalo debe incluir la especificación. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación respuesta analítica vs concentración. Calcular el valor de b_1 , b_2 , r^2 y el IC (β_1).

El intervalo está en función del método y para éste caso se sugiere un +/- 20%. Es crítico que el intervalo no excluya valores de concentración que potencialmente puedan dar lugar al contenido del analito en la muestra.

El intervalo de concentraciones para esta prueba es el siguiente:

<i>Tabla 4. Intervalo de concentraciones para Linealidad del método</i>		
% de concentración	Fármaco S_{ref} (mg)	Concentración final (µg/mL)
60	180	4,5
80	240	6,0
100	300	7,5
120	360	9,0
140	420	10,5

3.4.3.3.- Criterio de aceptación

$$r^2 \geq 0.98$$

IC (β_1), no debe incluir el cero.

Cualquier otro criterio de aceptación debe ser justificado.

Es conveniente trazar la gráfica de la respuesta analítica (y) vs concentración (x), e incluir en ella la ecuación, la línea de ajuste y el coeficiente de determinación.

3.4.4.- Precisión del sistema

3.4.4.1.- Material de vidrio

- 1 espátula
- 6 naves de pesado
- 12 matraces aforados de 100 mL
- 6 pipetas volumétricas 5,0 mL
- 6 pipetas volumétricas 10,0 mL
- 6 matraces aforados de 200 mL

3.4.4.2.- Metodología

Preparar un sextuplicado de la solución de Referencia del compuesto "C" al 100% por pesadas independientes y leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 274 nm.

Calcular el promedio, S y CV de la respuesta de las 6 preparaciones, para la señal del fármaco.

3.4.4.3.- Criterio de aceptación

El CV de la respuesta del compuesto de interés debe ser \leq al 1,5%.

3.4.5.- Exactitud y repetibilidad del método

3.4.5.1.- Material requerido

- 1 espátula
- 6 naves de pesado
- 12 matraces aforados de 100 mL
- 6 pipetas volumétricas 5,0 mL
- 6 pipetas volumétricas 10,0 mL
- 6 matraces aforados de 200 mL
- 6 embudos de filtración rápida
- 6 matraces Erlenmeyer de 250 mL
- 6 parrillas con agitación magnética
- 6 barras magnéticas
- Papel filtro Whatman

3.4.5.2.- Metodología

A la cantidad del placebo analítico del producto, que equivale al peso de una cápsula, por sextuplicado, adicionar 300,0 mg del fármaco sustancia de referencia y llevar a cabo el procedimiento descrito en la preparación de la solución problema descrito en la página 30 a partir de “pasar a un matraz volumétrico de 200 mL...” y determinar la absorbancia a 274nm. Llevar a cabo la evaluación preparando una solución de Referencia del compuesto “C”.

Evaluar el % de recobro para cada placebo analítico, el promedio, S y CV.

3.4.5.3.- Criterios de aceptación

El promedio del % de recobro obtenido se debe encontrar entre 97 – 103% y el CV del recobro no debe ser mayor al 3%.

3.4.6.- Linealidad del método

3.4.6.1.- Material requerido

- 1 espátula
- 9 naves de pesado
- 18 matraces aforados de 100 mL
- 9 pipetas volumétricas 5,0 mL
- 9 pipetas volumétricas 10,0 mL
- 9 matraces aforados de 200 mL
- 9 embudos de filtración rápida
- 9 matraces Erlenmeyer de 250 mL
- 9 parrillas con agitación magnética
- 9 barras magnéticas
- Papel filtro Whatman

3.4.6.2.-Metodología

Debido a que se conocen los componentes del sistema y es posible preparar el placebo analítico se realiza lo siguiente:

Preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por triplicado, adicionarle la cantidad del analito correspondiente al 100% de éste en la muestra. Seleccionar al menos 2 niveles superior e inferior de la cantidad del analito (intervalo) y preparar el placebo adicionado al menos por triplicado a cada nivel, llevar a cabo el procedimiento descrito en la preparación de la solución problema descrito en la página 30 a partir de “pasar a un matraz volumétrico de 200 mL...” y determinar la absorbancia a 274nm. Evaluar preparando una solución de Referencia del compuesto “C”.

Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia la sustancia empleada en la adición al placebo analítico. Determinar la cantidad recuperada del analito.

De acuerdo al propósito del método analítico se recomienda un $L_i-10\%$ a $L_s+10\%$. Reportar la relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada. Utilizando el método de estimación por mínimos cuadrados, calcular $b_1, b_0, r^2, IC(\beta_1), IC(\beta_0)$ y el $CV_{y/x}$.

Calcular el porcentaje de recobro de cada placebo adicionado, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje. Calcular el promedio aritmético, S, CV y el IC (μ) del porcentaje de recobro.

La forma de preparar el placebo analítico se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 5. Preparación del placebo analítico

Nivel	% del fármaco	Cantidad del fármaco (mg)	Cantidad de placebo (mg)
Inferior	80	240	177
Intermedio	100	300	117
Superior	120	360	57

3.4.6.3.-Criterios de aceptación

a) Cantidad adicionada vs cantidad recuperada

$$r^2 \geq 0,98$$

IC (β_1) debe incluir la unidad

IC (β_0) debe incluir el cero

El $CV_{y/x}$ del porcentaje del recobro no debe ser mayor al 3% debido a que es un método espectrofotométrico.

b) Porcentaje del recobro

El IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo.

El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor al 3%.

3.4.7.- Precisión del método (precisión intermedia o tolerancia interdía/analista)

3.4.7.1 Material requerido

- 2 espátulas
- 6 naves de pesado
- 12 matraces aforados de 100 mL
- 6 pipetas volumétricas de 5,0 mL
- 6 pipetas volumétricas de 10,0 mL
- 6 matraces aforados de 200 mL
- 6 embudos de filtración rápida
- 6 matraces Erlenmeyer de 250 mL
- 6 parrillas con agitación magnética
- 6 barras magnéticas
- Papel filtro Whatman

3.4.7.2.- Metodología

Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100% en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Utilizar de preferencia la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y/o equipos. Reportar el contenido del analito de todas las muestras. Calcular el promedio, S, CV de todos los resultados obtenidos.

3.4.7.3.- Criterios de aceptación

$CV \leq 3\%$, no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Valores superiores deben ser justificados.

3.4.8.- Robustez

Para ésta prueba los factores no instrumentales que se modificarán de forma individual son:

- Tiempo de agitación (15 min)
- Diluciones realizadas

3.4.8.1-Material requerido para modificar el factor tiempo de agitación (15 min)

- 1 espátula
- 7 naves de pesado
- 14 matraces aforados de 100 mL
- 7 pipetas volumétricas de 5,0 mL
- 6 pipetas volumétricas de 10,0 mL
- 6 matraces aforados de 200 mL
- 6 embudos de filtración rápida
- 6 matraces Erlenmeyer de 250 mL
- 6 parrillas con agitación magnética
- 6 barras magnéticas
- Papel filtro Whatman

3.4.8.2-Material requerido para modificar el factor de diluciones realizadas

- 1 espátula
- 3 naves de pesado
- 6 matraces aforados de 50 mL
- 3 pipetas volumétricas 5,0 mL
- 3 pipetas volumétricas 3,0 mL
- 5 matraces aforados de 100 mL
- 1 pipeta volumétrica de 4,0 mL
- 3 embudos de filtración rápida
- 3 matraces Erlenmeyer de 250 mL
- 3 parrillas con agitación magnética
- 3 barras magnéticas
- Papel filtro Whatman

3.4.8.2.- Metodología

En cada condición de operación distinta; así como en la condición normal, analizar la misma muestra por lo menos por triplicado. Reportar la cuantificación del compuesto "C" para las muestras en condición normal de operación y para las muestras de las otras condiciones de operación, expresadas como %.

Calcular la media aritmética de la condición normal de operación (\bar{y}_o) y de cada condición de operación diferente a la condición normal (\bar{y}). Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal ($|d_i|$).

3.4.8.2.1.- Metodología para el cambio de diluciones

Pesar la cantidad de la muestra equivalente a 100 mg del fármaco, pasar a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 50 mL de etanol y agitar mecánicamente durante 30 minutos; Transcurrido este tiempo llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Filtrar esta solución descartando los primeros mililitros y transferir una alícuota de 5,0 mL a un matraz aforado de 50 mL, llevar al aforo con etanol y mezclar. Pasar una alícuota de 3,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50 mL llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar.

3.4.8.3.- Criterio de aceptación

$|d_i|$ debe ser menor o igual al 3%, no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

IV.- Resultados y discusión

3.1.- Desarrollo del método analítico

3.1.1.- Subproceso muestreo

El resultado para el cálculo del contenido neto promedio se muestra en la siguiente tabla:

Cápsula	Contenido neto (mg)
1	425,1
2	425,9
3	404,0
4	430,1
5	425,8
6	427,4
7	426,3
8	428,2
9	434,5
10	406,7
11	419,6
12	404,5
13	424,3
14	395,3
15	424,6
16	425,7
17	430,1
18	412,0
19	436,6
20	405,8
Contenido neto promedio	420,6

Tabla 6. Cálculo del contenido neto promedio para el lote 111207 fabricado en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química, UNAM.

4.1.2.- Subproceso tratamiento de la muestra

Los resultados del tratamiento de la muestra por medio del método propuesto para cuantificar al compuesto C, en cápsulas de gelatina dura , se muestran en la siguiente tabla:

Lote 111207				
Determinación				
	1	2	3	promedio
mg/ cápsula	308,3	331,9	317,4	319,2
%	102,8	110,6	105,8	106,4

Tabla 7. Resultados para el subproceso tratamiento de la muestra, para el lote 111207 fabricado en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química, UNAM

4.2.- Validación del método analítico

4.2.1.- Especificidad

Especificidad del analito, analito adicionado y placebo

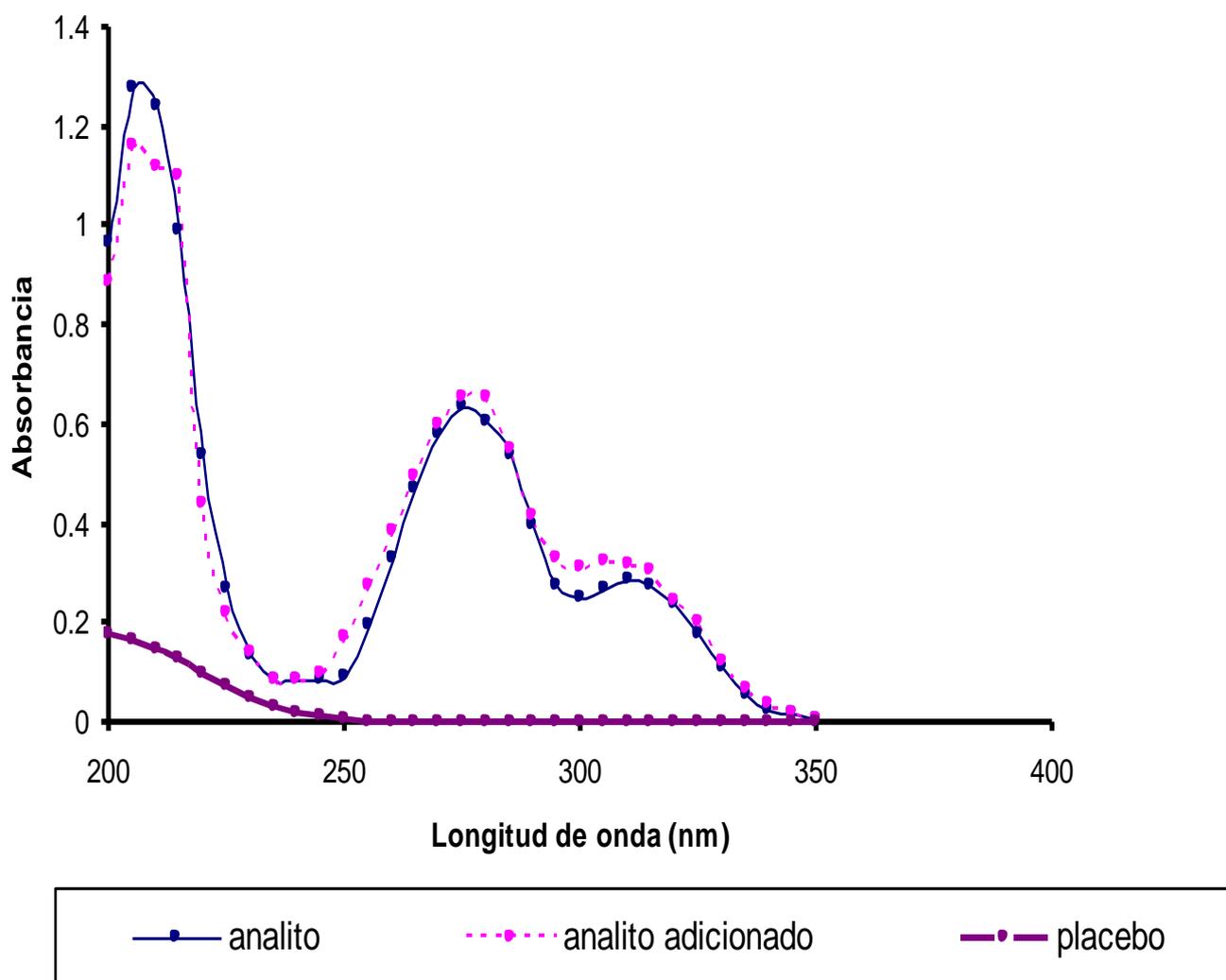


Figura 8. Especificidad del método analítico desarrollado

El método cumple con el parámetro de especificidad ya que el gráfico muestra que la respuesta analítica medida es debida sólo al analito.

4.2.2.- Linealidad del sistema

Los resultados de ésta prueba se presentan a continuación en la tabla 8.

<i>Tabla 8. Linealidad del sistema</i>				
% de concentración	Preparación	Concentración (µg / mL)	Absorbancia	mg obtenidos del fármaco
60	1a	4,5	0,333	184,0
60	1b	4,5	0,333	184,0
60	1c	4,5	0,331	182,9
80	2a	6,0	0,442	244,2
80	2b	6,0	0,441	243,6
80	2c	6,0	0,439	242,5
100	3a	7,5	0,556	307,2
100	3b	7,5	0,551	304,4
100	3c	7,5	0,546	301,7
120	4a	9,0	0,655	361,9
120	4b	9,0	0,658	363,5
120	4c	9,0	0,666	368,0
140	5a	10,5	0,772	426,5
140	5b	10,5	0,772	426,5
140	5c	10,5	0,752	415,5

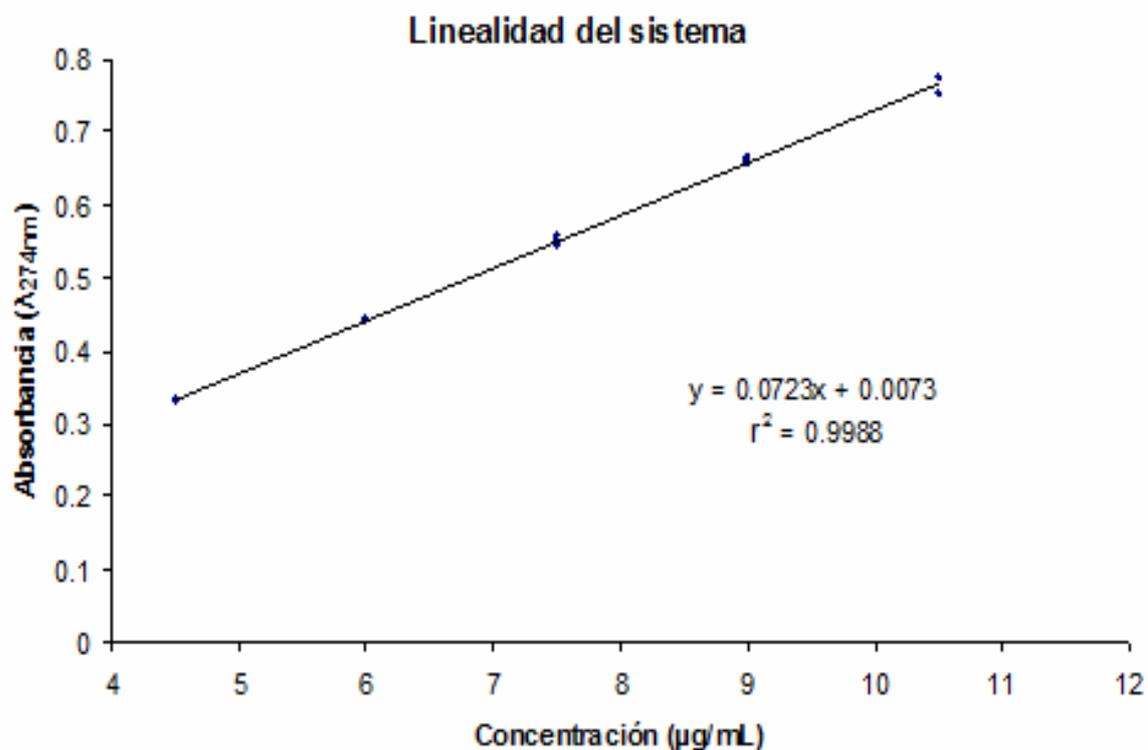


Figura 9.- Linealidad del sistema

$$b_1 = 0,0723$$

$$b_2 = 0,0073$$

$$r^2 = 0,9988$$

$$IC(\beta_1) = 0,069, 0,076$$

El intervalo de confianza no incluye el cero. Por lo tanto el método cumple con la prueba de linealidad del sistema.

4.2.3.- Precisión del sistema

Los resultados de ésta prueba se presentan a continuación en la tabla 9.

Preparación	Concentración (μg / mL)	Absorbancia	mg obtenidos del fármaco
1	7,5	0,537	290,4
2	7,5	0,538	291,3
3	7,5	0,532	287,9
4	7,5	0,540	292,2
5	7,5	0,536	290,1
6	7,5	0,533	288,4
		\bar{y}	290,0
		σ	1,6
		CV	0,6%

De acuerdo a los resultados de la tabla, se puede decir que el sistema es preciso ya que el coeficiente de variación resultó ser \leq al 1,5%.

4.2.4.- Exactitud y repetibilidad del método

En la tabla 10 se muestran los resultados de las 6 preparaciones para ésta determinación.

Preparación	mg del compuesto "C" adicionado	Absorbancia	mg obtenidos del compuesto "C"	% de recobro
1	300,3	0,552	307,9	102,5
2	299,9	0,554	309,0	103,0
3	299,9	0,542	302,3	100,8
4	300,0	0,548	305,7	101,9
5	299,8	0,550	306,8	102,3
6	300,0	0,554	309,0	103,0
			Promedio	102,3
			D. estándar	0,8
			CV	0,8%

Debido a que el promedio del % de recobro se encuentra entre 97-103% y el CV es menor al 3% se puede decir que el método cumple con la prueba de exactitud y repetibilidad del método.

4.2.5.- Linealidad del método

Los resultados de la prueba se muestran a continuación:

<i>Tabla 11. Linealidad del método</i>					
% de concentración	Preparación	mg del fármaco	Absorbancia	mg obtenidos del fármaco	% de Recobro
80	1a	240,0	0,445	242,9	101,2
80	1b	240,2	0,443	241,8	100,1
80	1c	240,1	0,443	241,8	100,7
100	2a	300,2	0,554	302,4	100,7
100	2b	300,2	0,552	301,3	100,4
100	2c	300,0	0,557	304,0	101,3
120	3a	360,1	0,659	359,7	99,9
120	3b	360,2	0,656	358,0	99,4
120	3c	360,2	0,655	357,5	99,3

a) Cantidad adicionada vs cantidad recuperada

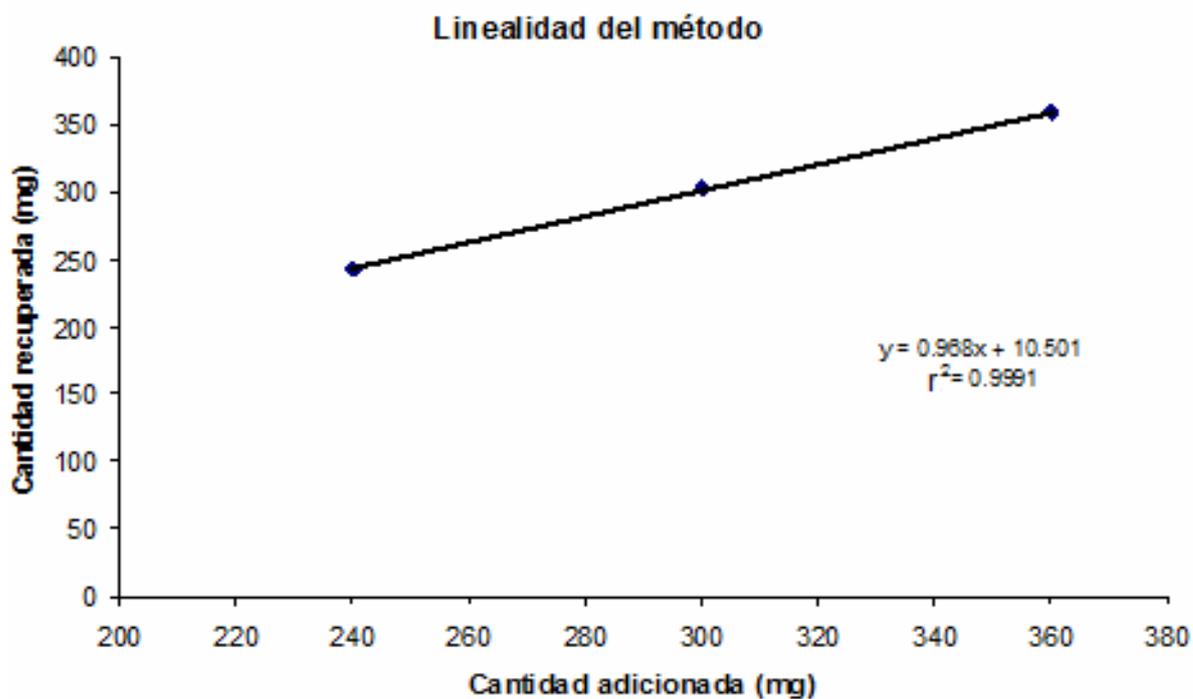


Figura 10.- Linealidad del método

$$r^2 \geq 0,98$$

IC (β_1) = 0,9215 , 1,0145 Incluye la unidad

IC (β_0) = -3,6475 , 24,6475 Incluye el cero

$CV_{y/x} = 1\%$ No excede el 3%

b) Porcentaje del recobro

El IC (μ) incluye el 100%, de igual forma el promedio aritmético del % de recobro.

El CV del porcentaje de recobro es del 1% que es menor al 3%.

Conforme a los resultados obtenidos para la prueba de linealidad del método es posible decir que cumple con dicha prueba.

4.2.6.- Precisión del método (precisión intermedia o tolerancia interdía/analista)

Los resultados para ésta prueba se muestran a continuación:

<i>Tabla 12. Resultados obtenidos para la Precisión del método</i>		
Analista		
	1	2
Día	Absorbancia	Absorbancia
1	0,596	0,578
	0,608	0,563
	0,600	0,567
2	0,604	0,580
	0,610	0,566
	0,607	0,581

<i>Tabla 13. Contenido del analito en % para la Precisión del método</i>		
Analista		
	1	2
Día	mg del fármaco	mg del fármaco
1	108,6	105,2
	110,8	102,5
	109,4	103,2
2	110,1	105,6
	109,9	103,0
	110,6	105,8
	\bar{y}	107,1
	σ	9,5
	CV	3%

Debido a que el CV es igual a 3%, el método cumple con la prueba de Precisión del método (precisión intermedia o tolerancia interdía/analista).

4.2.7.- Robustez

Cuantificación (%) del analito			
<i>Robustez cambiando factores no instrumentales del método</i>			
Condición			
<i>Muestra</i>	Tiempo de agitación (15min)	Condición normal	Cambio en las diluciones
1	103,2	110,1	103,8
2	105,1	106,4	107,3
3	104,6	108,3	106,1

Tabla 14.- Resultados para la prueba de robustez

$$\bar{y}_0 = 108,3$$

$$\bar{y}_1 = 104,3$$

$$\bar{y}_2 = 105,7$$

$$|d_1| = 4$$

Excede el 3%

$$|d_2| = 3$$

No excede el 3%

Por lo tanto el método es robusto al cambiar las diluciones, pero no lo es para un tiempo de agitación de 15 min.

Conclusión

Se desarrolló un método analítico para cuantificar un fármaco, empleado en el tratamiento de enfermedades respiratorias, aprovechando sus propiedades fisicoquímicas. Se validó dicho método encontrándose que el método no es robusto para tiempos de agitación menores a 15 minutos como condición del proceso para el tratamiento de la muestra.

Bibliografía

1. - Selimović A, Saracević E, Dizdarević A, Cengić S, *Pulmonary abscess*, Med Arh. 2005; 59(4):261-2.
- 2.- Colice GL, *New drugs for asthma*, Respir Care. 2008 Jun; 53(6):688-98
- 3.- Sáenz C., Sánchez V., Velázquez T., *Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en tromboembolismo e hipertensión pulmonar*, Rev Esp Cardiol 2001; 54: 194-210.
- 4.- Principles of Critical Care, tercera edición, Capítulo 51. Pneumonia
- 6.- GOODMAN & Gilman, LAS BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPEÚTICA, Volumen 1, novena edición, Ed. Mc GRAW-Hill, 1996.
- 7.- Taylor, John K. Validation of Analytical Methods. Analytical Chemistry, Vol. 55, No. 6 (05,1993).
- 8.- Handbook of Enviromental data on organic chemicals.
- 9.- D.A. Skoog, Fundamentos de Química Analítica, cuarta edición, Ed. Reverté, 1996.
- 10.- D. Gary , Química Analítica, segunda edición, Ed. Limusa, 1981.
- 11.- Harris Daniel, Análisis Químico Cuantitativo, segunda edición, Ed. Reverté , 2001.
- 12.- Química Analítica Cuantitativa, Day and Underwood.
- 13.- FDA. US Departament of health and human services. Guidance for industry bioanalytical
- 14.- EURACHEM, The fitness for purpose of analytical methods, First English Edition 1998.
- 15.- Hewlett Packard, Fundamentals of modern UV- Visible Spectroscopy
- 16.- IUPAC Compendium de Chemical Technology, 1985

17.- ICH Q2A, CPMP/ICH/381/95

18.- Guía de Validación de métodos analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, Edición 2002.

19.- BOWMAN, W.C.,and RAND, M.J. Textbook of Pharmacology, segunda edición, Blackwell Scientific Publications, London, 1980.

20.- CROFTON , J. and DOUGLAS A., Respiratory Diseases, tercera edición , Blackwell Scientific Publications, London , 1981.

21.- COLE, R.B., Drug treatment of Respiratory Disease , Churchill Livingstone, London, 1981.

22.- WIDDICOMBE, J.G.,Expectoration, In LANE, D.J., Respiratory Disease, Appleton-Century- Crofts, New York, 1976,112.

23.- LITTER, Manuel, Farmacología Experimental y Clínica, séptima edición, Ed. El Ateneo, Buenos Aires, 1988.

24.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, novena edición, 2008.

Referencias electrónicas:

5.- Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). www.iner.salud.gob.mx

Anexo A

Símbolos y abreviaturas

mg_{obt}	Miligramos de fármaco recuperados
Abs_m	Absorbancia obtenida de la muestra
Abs_{ref}	Absorbancia obtenida de la referencia
X_{ref}	Peso en mg de la referencia
b_1	Pendiente
b_0	Ordenada al origen
r^2	Coefficiente de determinación
IC (β_0)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC (β_1)	Intervalo de confianza para la pendiente
S_{ref}	Sustancia de referencia
S	Desviación estándar
CV	Coefficiente de variación
L_i	Límite inferior
L_s	Límite superior
$CV_{y/x}$	Coefficiente de variación de regresión
IC (μ)	Intervalo de confianza para la media poblacional
\bar{y}	Promedio aritmético
\bar{y}_o	Media aritmética en condición normal de operación
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
mg	Miligramos
gl	Grados de libertad
NOM	Norma oficial mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
SSA	Secretaría de Salud
μg	Microgramos
σ	Desviación estándar

Anexo B
Índice de tablas

Tabla	página
Tabla 1.- Principales causas de morbilidad en el 2006	12
Tabla 2.- Propiedades fisicoquímicas del compuesto C	13
Tabla 3.- Parámetros de desempeño	25
Tabla 4.- Intervalo de concentraciones para la linealidad del método	36
Tabla 5.- Preparación del placebo analítico	40
Tabla 6.- Subproceso muestreo	45
Tabla 7.- Resultados para el subproceso tratamiento de la muestra	46
Tabla 8.- Linealidad del sistema	48
Tabla 9.- Precisión del sistema	50
Tabla 10.- Exactitud y repetibilidad del método	50
Tabla 11.- Linealidad del método	51
Tabla 12.- Resultados para la precisión del método	54
Tabla 13.- Contenido del analito en mg para la precisión del método	54
Tabla 14.- Resultados para la prueba de robustez	55

Anexo C

Índice de figuras

Figuras	página
Figura 1.- Origen de algunas enfermedades respiratorias	5
Figura 2.- Sistema Respiratorio	6
Figura 3.- Bronquiectasia	8
Figura 4.- Radiación electromagnética	14
Figura 5.- Espectro electromagnético	15
Figura 6.- Componentes fundamentales de un espectrofotómetro	16
Figura 7.- Espectro de absorción del compuesto C	21
Figura 8.- Especificidad del método analítico desarrollado	47
Figura 9.- Linealidad del sistema	49
Figura 10.- Linealidad del método	52

Anexo D
Tabla estadística de la distribución *t* de student

Grados de libertad	<i>t</i> _{0.975}	Grados de libertad	<i>t</i> _{0.975}	Grados de libertad	<i>t</i> _{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	2.04	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	59	2.001
10	2.228	35	2.03	60	2
11	2.201	36	2.028	61	2
12	2.179	37	2.026	62	1.999
13	2.16	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	2.12	41	2.02	66	1.997
17	2.11	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	2.08	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	2.01	74	1.993
25	2.06	50	2.009	75	1.992

Los grados de libertad se fijan con base a la fórmula indicada en el subíndice del símbolo de la *t* de student

Anexo E

Fórmulas con ejemplo de cálculo para los parámetros de desempeño

Linealidad del sistema

a) Fórmulas

1.- Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n= número de mediciones (concentración- respuesta analítica)

2.- Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{n \sum y - b_1 \sum x}{n}$$

3.- Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

4.- Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975,n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}$$

$t_{0,975,n-2}$ = Referirse al anexo D, para determinar el valor de la t de student.

b) Procedimientos de cálculo

1.- Tabular los resultados

2.- Calcular $\sum x$, $\sum y$, $\sum x^2$, $\sum y^2$, $\sum xy$ y determinar n

$$\sum x = 4,5 + 4,5 + \dots + 10,5 = 112,50$$

$$\sum y = 0,333 + 0,333 + \dots + 0,752 = 8,25$$

$$\sum x^2 = 4,5^2 + 4,5^2 + \dots + 10,5^2 = 911,25$$

$$\sum y^2 = 0,333^2 + 0,333^2 + \dots + 0,752^2 = 4,89$$

$$\sum xy = 4,5 * 0,333 + 4,5 * 0,333 \dots + 10,5 * 0,752 = 66,73$$

$$n = 15$$

3.- Calcular b_1 , b_0 y r^2

$$b_1 = ((15 * 66,73) - (112,50 * 8,25)) / ((15 * 911,25) - (112,50)^2) = 0,0723$$

$$b_0 = ((8,25) - (0,0723 * 112,50)) / 15 = 0,00755$$

$$r^2 = ((15 * 66,73) - (112,50)(8,25))^2 / ((15 * 911,25) - (112,50)^2)((15 * 4,89) - (8,25)^2) = 0,9988$$

4.- Calcular $S_{y/x}$ y S_{b1}

$$S_{y/x} = \sqrt{((4,89) - (0,0723 * 66,73) - (0,00755 * 8,25)) / 13} = 0,015525413$$

$$S_{b1} = 0,015525413 \sqrt{1 / (911,25 - (112,50)^2 / 15)} = 0,001889693092$$

4.- Determinar en el anexo D $t_{0,975,n-2}$ y determinar IC (β_1)

$$IC(\beta_1) = 0,0723 + 2,16 * 0,001889693092 = 0,076381737$$

$$IC(\beta_1) = 0,0723 - 2,16 * 0,001889693092 = 0,068218262$$

El intervalo no incluye el cero.

Precisión del sistema

a) Fórmulas

1.- Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

2.- Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

3.- Coeficiente de variación

$$CV = (S / \bar{y}) 100$$

n= número de mediciones

b) Procedimiento de cálculo

1.- Tabular los resultados (tabla 9 página 50)

2.- Calcular $\sum y$, $\sum y^2$ y determinar n

$$\sum y = 0,537 + 0,538 + \dots + 0,533 = 3,21$$

$$\sum y^2 = 0,537^2 + 0,538^2 + \dots + 0,533^2 = 1,72$$

$$n = 6$$

3.- Calcular \bar{y} y S

$$\bar{y} = (3,216) / 6 = 0,536$$

$$S = \sqrt{(6(1,72) - (3,21)^2) / 30} = 0,0230217$$

4.- Calcular el CV

$$CV = (0,0230217 / 0,536) 100 = 0,6\%$$

El CV no excede el 1,5%

Exactitud y repetibilidad del método

c) Fórmulas

1.- Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

2.- Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

3.- Coeficiente de variación

$$CV = (S / \bar{y}) 100$$

n= número de mediciones

4.- Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0,975,n-1} (S / \sqrt{n})$$

$t_{0,975,n-1}$ referirse al anexo D, para determinar el valor t de student

n= número de recobros

d) Procedimiento de cálculo

1.- Tabular los resultados (tabla 10 página 50), en donde y es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada.

2.- Calcular $\sum y$, $\sum y^2$ y determinar n

$$\sum y = 102,5 + 103,0 + 103,0 = 613,5$$

$$\sum y^2 = 102,5^2 + 103,0^2 + \dots + 103,0^2 = 62733,79$$

$$n = 6$$

3.- Calcular \bar{y} y S

$$\bar{y} = (613,5) / 6 = 102,25$$

$$S = \sqrt{(6,0(62733,79) - (613,5)^2) / 30} = 0,826438$$

4.- Calcular el CV

$$CV = (0,826438 / 102,25) 100 = 0,8\%$$

El CV no excede el 1,5%

5.- Determinar en el anexo D $t_{0,975,n-1}$ y determinar IC (μ)

$$IC (\mu) = 102,25 + 2,571 (0,826438/ \sqrt{6}) = 103,12$$

$$IC (\mu) = 102,25 - 2,571 (0,826438/ \sqrt{6}) = 101,38$$

El intervalo no incluye el valor del 100%

Precisión del método

e) Fórmulas

1.- Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

2.- Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

3.- Coefficiente de variación

$$CV = (S / \bar{y}) 100$$

n= número de mediciones

f) Procedimiento de cálculo

1.- Tabular los resultados (tabla 12 página 54)

2.- Calcular $\sum y$, $\sum y^2$ y determinar n

$$\sum y = 325,9 + 332,4 + \dots + 317,3 = 3854,4$$

$$\sum y^2 = 325,9^2 + 332,4^2 + \dots + 317,3^2 = 1239029,14$$

n= 6

3.- Calcular \bar{y} y S

$$\bar{y} = (3854,4) / 6 = 321,2$$

$$S = \sqrt{(6(1239029,14) - (3854,4)^2) / 30} = 9,514868$$

4.- Calcular el CV

$$CV = (9,514868 / 321,2) 100 = 3\%$$

El CV es igual al 3%

Robustez

a) Fórmulas

1.- Media aritmética de la condición normal de operación

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

n_0 = número de muestras de la condición normal de operación

2.- Media aritmética del análisis de cada condición de operación diferente a la condición normal

$$\bar{y}_1 = \frac{\sum y_1}{n_1}$$

n_1 = número de muestras de la i-ésima condición de operación

3.- Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la media aritmética de la condición normal.

$$d_1 = \bar{y}_1 - \bar{y}_0$$

b) Procedimiento de cálculo

1.- Tabular los resultados (tabla 14 de la página 55)

2.- Calcular $\sum y_0$, $\sum y_1$ y $\sum y_2$ y determinar n_0 , n_1 y n_2

$$\sum \bar{y}_0 = 110,1 + 106,4 + 108,3 = 324,8$$

$$\sum \bar{y}_1 = 103,2 + 105,1 + 104,6 = 312,9$$

$$\sum \bar{y}_2 = 103,8 + 107,3 + 106,1 = 317,2$$

$$n_0 = 3$$

$$n_1 = 3$$

$$n_2 = 3$$

3.- Calcular \bar{y}_0 , \bar{y}_1 y \bar{y}_2

$$\bar{y}_0 = (324,8)/3 = 108,266$$

$$\bar{y}_1 = (312,9)/3 = 104,3$$

$$\bar{y}_2 = (317,2)/3 = 105,7333$$

4.- Calcular $|d_1|$

$$|d_1| = 104,3 - 108,266 = 4\%$$

Excede el 3%

5.- Calcular $|d_2|$

$$|d_2| = 105,7333 - 108,266 = 2,5\%$$

No excede el 3%

Linealidad del método

a) Fórmulas

1.- Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n= número de mediciones (concentración- respuesta analítica)

2.- Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{n \sum y - b_1 \sum x}{n}$$

3.- Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

4.- Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975,n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}$$

$t_{0,975,n-2}$ = Referirse al anexo D, para determinar el valor de la t de student.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0,975, n-2} S_{b0}$$

$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Coefficiente de variación de regresión

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

b) Procedimientos de cálculo

1.- Tabular los resultados (Ver tabla 11, página 51)

2.- Calcular $\sum x$, $\sum y$, $\sum x^2$, $\sum y^2$, $\sum xy$ y determinar n

$$\sum x = 240,0 + 240,2 + \dots + 360,2 = 2701,20$$

$$\sum y = 242,9 + 241,8 + \dots + 357,5 = 2709,40$$

$$\sum x^2 = 4,5^2 + 4,5^2 + \dots + 10,5^2 = 832344,22$$

$$\sum y^2 = 0,333^2 + 0,333^2 + \dots + 0,752^2 = 835932,68$$

$$\sum xy = 240,0 \cdot 242,9 + 240,2 \cdot 241,8 \dots + 360,2 \cdot 357,5 = 834114,35$$

$$n = 9$$

3.- Calcular b_1 , b_0 y r^2

$$b_1 = (9(834114,35) - (2701,2 \cdot 2709,4)) / (9(832344,22) - (2701,2)^2) = 0,9680$$

$$b_0 = ((2709,4) - (0,9680 \cdot 2701,2)) / 9 = 10,5154$$

$$r^2 = (9(834114,35) - (2701,2)(2709,4))^2 / ((9 \cdot 832344,22) - (2701,2)^2)((9 \cdot 835932,68) - (2709,40)^2) = 0,9991$$

4.- Calcular $S_{y/x}$ y S_{b1}

$$S_{y/x} = \sqrt{((835932,68) - (0,9680 * 834114,35) - (10,5154 * 2709,4)) / 7} = 2,8660$$

$$S_{b1} = 2,8660 \sqrt{1 / (832344,22) - (2701,2)^2 / 9} = 0,01949$$

5.- Determinar en el anexo D $t_{0,975,n-2}$ y determinar IC (β_1)

$$IC(\beta_1) = 0,9680 + 2,365 * 0,01949 = 1,0145$$

$$IC(\beta_1) = 0,9680 - 2,365 * 0,01949 = 0,9215$$

El intervalo incluye la unidad

6.- Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$\bar{x} = 2701,2 / 9 = 300,13$$

$$S_{b0} = 2,8660 \sqrt{(1/9) + ((300,13)^2 / (832344,22) - (2701,2)^2 / 9)} = 5,9270$$

$$IC(\beta_0) = 10,5014 + 2,365 * 5,9270 = 24,6475$$

$$IC(\beta_0) = 10,5014 - 2,365 * 5,9270 = -3,6475$$

El intervalo incluye el cero

7.- Coeficiente de variación debido a la regresión

$$CV_{y/x} = 2,8660 / 301,04 * 100 = 0,96\%$$

$$\bar{y} = 2709,4 / 9 = 301,04$$

5.- Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

6.- Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

7.- Coeficiente de variación

$$CV = (S / \bar{y}) * 100$$

8.- Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = \pm t_{0,975,n-1} (S/\sqrt{n})$$

$t_{0,975,n-1}$ referirse al anexo D, para determinar el valor t de student

n= número de mediciones

8.- Media aritmética

$$\bar{y} = 903 / 9 = 100,33$$

9.- Desviación estándar

$$S = \sqrt{((9 \cdot 90605,14) - (903)^2) / 9 \cdot 8} = 0,7194$$

10.- Coeficiente de variación

$$CV = 0,7194 / 100,33 \cdot 100 = 0,72\%$$

11.- Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = 100,33 + 2,365 (0,7194 / \sqrt{9}) = 100,90$$

$$IC(\mu) = 100,33 - 2,365 (0,7194 / \sqrt{9}) = 99,76$$

El intervalo incluye el valor del 100 %