

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA**



TEMA: VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VISIBLE PARA LA CUANTIFICACIÓN Y DISOLUCIÓN DE TINIDAZOL TABLETA DE 500 MG, EN EL LABORATORIO NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS, ABRIL-NOVIEMBRE 2015.

AUTORES

Br. Yeltsin Ramón Ruiz Blandón

Br. Moisés David Paizano Hernández

TUTORA

PhD. Carla Martínez Algaba

Managua, febrero 2016

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
OPINIÓN DEL TUTOR	
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	
RESUMEN	
CAPÍTULO I ASPECTOS GENERALES	
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 OBJETIVOS	2
1.2.1 OBJETIVO GENERAL	2
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.4 JUSTIFICACIÓN	4
1.5 ANTECEDENTES	5
1.5.1 INTERNACIONALES	5
1.5.2 NACIONALES	6
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	
2.1 GENERALIDADES DE VALIDACIÓN	7
2.1.1 DEFINICIÓN DE VALIDACIÓN	7
2.1.2 RAZONES QUE JUSTIFICAN LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	7
2.1.3 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS PARA VALIDACIÓN DE MÉTODOS	7
2.1.3.1 Especificidad	8
2.1.3.1.1 Ámbito de aplicación, especificidad	8
2.1.3.1.2 Linealidad e intervalo	8
2.1.3.2.1 Ámbito de aplicación, linealidad	9
2.1.3.2.2 Análisis de varianza en UV-Visible	9
2.1.3.3 Precisión	9
2.1.3.3.1 Determinación de repetibilidad	10
2.1.3.3.1.2 Criterios de aceptación de repetibilidad	10
2.1.3.3.2 Precisión intermedia	10
2.1.3.3.2.1 Determinación de precisión intermedia	10
2.1.3.3.2.2 Criterios de aceptación de precisión intermedia	10
2.1.3.4 Exactitud	10

2.1.3.4.1 Determinación de exactitud.....	11
2.1.3.4.2 Procedimiento de la determinación de exactitud.....	11
2.1.3.4.3 Comparación de los resultados obtenidos de un estándar o material de referencia certificado	12
2.1.3.4.4 Criterio de aceptación de exactitud	12
2.1.3.5 Límite de detección (LOD).....	12
2.1.3.6 Límite de cuantificación (LOQ).....	13
2.1.3.7. Robustez.....	13
2.1.3.7.1. Ámbito de aplicación, robustez.....	13
2.2 DISOLUCIÓN	14
2.2.1 FUNDAMENTO	14
2.2.2 ASPECTOS TEÓRICOS DE LA PRUEBA DE DISOLUCIÓN	14
2.2.2.1 Aplicación de la prueba de disolución.....	14
2.2.2.2 Aparato 2 (Aparato con Paleta).....	14
2.3 CLASES DE ENSAYOS ANALÍTICOS	16
2.3.1. DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN	16
2.4 FUNDAMENTO DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA (UV-VISIBLE).....	17
2.4.1 DEFINICIÓN DE ESPECTROFOTOMETRÍA (UV-VISIBLE).....	17
2.4.2 ESPECTROFOTÓMETRO	18
2.4.3 COMPONENTES DEL ESPECTROFOTÓMETRO	18
2.4.3.1 Fuente de luz.....	18
2.4.3.2 Rendija de entrada	18
2.4.3.3 Monocromadores.....	18
2.4.3.4 Rendija de salida	19
2.4.3.5 Cubeta	19
2.4.3.6 Detector	19
2.4.3.7 Medidor.....	20
2.5 GENERALIDADES FARMACOLÓGICAS DE LA MOLÉCULA TINIDAZOL	21
2.5.1 PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DEL TINIDAZOL (Moffat, 2005).....	21
2.5.2 MECANISMO DE ACCIÓN.....	22
2.5.3 FARMACOCINÉTICA.....	22
2.5.4 INDICACIONES TERAPÉUTICAS	23
2.5.5 REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS	23
2.5.6 INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS Y DE OTRO GÉNERO.....	23

CAPÍTULO III HIPÓTESIS

3.1 HIPÓTESIS	24
CAPÍTULO IV DISEÑO METODOLÓGICO	
4.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO	25
4.2 TIPO DE ESTUDIO.....	25
4.2.1 TIPO DE DISEÑO	25
4.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	25
4.3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	25
4.3.2 MUESTRA.....	25
4.3.2.1 Criterio de inclusión	25
4.3.2.2 Criterio de exclusión.....	25
4.4 VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	26
4.4.1 VARIABLE INDEPENDIENTE.....	26
4.4.2 VARIABLES DEPENDIENTES	26
4.5 MATERIAL Y MÉTODO	29
4.5.1 MATERIALES PARA RECOLECTAR LA INFORMACIÓN	29
4.5.2 MATERIALES PARA PROCESAR LA INFORMACIÓN	29
4.5.2.1 Tipos de fuentes de información primaria.....	29
4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL (METODOLOGÍA ANALÍTICA GENERAL).....	30
4.6.1 MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE	30
4.6.1.1 Condiciones del espectrofotómetro	30
4.6.1.2 Condiciones del ensayo de disolución (disolutor).....	30
4.6.2. PROGRAMACIÓN DEL EQUIPO DE DISOLUCIÓN	30
4.7 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.....	31
4.7.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES REACTIVAS.....	31
4.7.1.1 Ácido clorhídrico (HCL 0.1 N)	31
4.7.1.2 Preparación del estándar de tinidazol para la curva de calibrado.....	31
4.7.1.3 Preparación de las muestras de tinidazol tabletas de 500 mg	33
4.7.1.3.1 Preparación de solución madre de tinidazol tabletas de 500 mg.....	33
4.8 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE DISOLUCIÓN Y MUESTRAS PARA EL TEST DE DISOLUCIÓN	34
4.8.1 ÁCIDO CLORHÍDRICO (HCl 0.1 N).....	34
4.8.2 Preparación de la solución muestra tinidazol para el ensayo de disolución	34
4.9 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO	35
4.9.1 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL SISTEMA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO TINIDAZOL	35
4.9.1.1 Linealidad del sistema	35

4.9.1.1.1 Criterio de aceptación de linealidad del sistema	35
4.9.1.2 Precisión del sistema	36
4.9.1.2.1 Repetibilidad del sistema	36
4.9.1.2.1.1 Criterio de aceptación	36
4.9.1.3 Limite de detección y límite de cuantificación	36
4.9.1.4 Exactitud	36
4.9.1.4.1 Criterio de aceptación de exactitud	36
4.10 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ACTIVO TINIDAZOL 500 MG	37
4.10.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO	37
4.10.2 PRECISIÓN DEL MÉTODO	37
4.10.2.1 Repetibilidad del método	37
4.10.2.1.1 Criterios de aceptación de repetibilidad	38
4.10.2.2 Precisión intermedia	38
4.10.2.2.1 Criterios de aceptación de la precisión intermedia	38
4.10.3 ROBUSTEZ	38
4.10.3.1 Criterios de aceptación	39
4.11 TEST DE DISOLUCIÓN	39
4.11.1 CRITERIO DE ACEPTACIÓN	39
4.12 REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIALES	39
CAPÍTULO V ORGANIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	
5.1 TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA UV-VISIBLE CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODO (DAD) Y CELDA DE CUARZO DE 1 CM	42
5.1.1 PARÁMETROS DEL SISTEMA	42
5.1.1.1 Adecuación del sistema	42
5.1.1.2 Linealidad del sistema	43
5.1.1.2.2 Ecuación de la recta de la linealidad en espectrofotometría UV-visible	45
5.1.1.2.3 Test de linealidad: test de student para la pendiente (b) en UV-visible	49
5.1.1.2.4 Test de proporcionalidad: test de Student para el intercepto (a) en UV-visible	51
5.1.1.2.5 Test G de Cochran varianza de los factores de respuesta	53
5.1.1.2.5.1 Prueba de homogeneidad de las varianzas	54
5.1.1.2.6 Coeficientes de variación de los factores de respuestas	55
5.1.1.2.7 Análisis de varianza	56
5.1.1.3 Precisión del sistema en espectrofotometría UV-VIS	60
5.1.1.3.1 Repetibilidad del sistema en espectrofotometría UV-VIS	60

5.1.1.3.1.1.1 Evaluación estadística para la repetibilidad del sistema en espectrofotometría UV-visible.....	61
5.1.1.3.2 Límite de detección (LOD).....	62
5.1.1.3.3 Límite de cuantificación (LOQ).....	62
5.1.1.4 Exactitud del sistema por espectrofotometría UV-visible	63
5.1.1.4.1.1 Evaluación estadística de exactitud del sistema en UV-Vis	64
5.1.1.5 Exactitud del método de tinidazol en Espectrofotometría	65
5.1.2 PARÁMETROS DEL MÉTODO	68
5.1.2.1 Linealidad del Método Tinidazol tableta 500 mg.....	68
5.1.2.2 Ecuación de la recta de la linealidad del método espectrofotométrico UV-visible.....	71
5.1.2.3 Test de linealidad: test de student para la pendiente (b) en UV-Vis	74
5.1.2.4 Test de proporcionalidad: test de student para el intercepto (a) en UV-VIS.....	75
5.1.2.5 Test G de Cochran varianza de los factores de respuesta	77
5.1.2.6. Coeficiente de variación de los factores de respuesta	79
5.1.2.8 Precisión del método en espectrofotometría UV-visible.....	83
5.1.2.8.1. Repetibilidad del Método en espectrofotometría UV-visible.....	83
5.1.2.8.1.1.1 Evaluación estadística de la repetibilidad del método espectrofotométrico UV-vis....	84
5.1.2.8.2 Precisión intermedia del método en espectrofotometría UV-visible	85
5.1.2.9 Robustez.....	89
5.1.2.10 Test de disolución.....	91
CAPÍTULO VI CONCLUSIONES	
6.1 CONCLUSIONES	93
CAPÍTULO VII RECOMENDACIONES	
7.1 RECOMENDACIONES	94
BIBLIOGRAFÍA.....	95
GLOSARIO.....	97
ABREVIATURAS.....	101
ANEXOS	

DEDICATORIA

A DIOS Por darme la vida, por reconfortarme en los momentos de tribulación, por estar presente durante los años de mi formación profesional y permitirme llegar hasta acá.

A mi madre Edda Hernández por todo su amor, por su entero sacrificio que hoy se ve premiado en mí, por ser el motor que me inspiraba cada día en seguir adelante y ser mejor cada día, gracias mamá.

A mi abuelita Teresa Cruz (q.e.p.d) aunque no estás conmigo, sé que estarías orgullosa de mi al ver este sueño hecho realidad; gracias por tus consejos, por instarme a superarme y por ser mi segunda mamá.

A mi hermanita Adriana Garay por estar conmigo cuando me sentí triste y desanimado, por decirme “todo estará bien”, cuando no sabía qué hacer, y sobre todo por estar en mis alegrías, enojos y tristezas.

A todas esas personas que de manera desinteresada me apoyaron durante toda mi carrera universitaria en especial a Francisco, Ignacio, Bertha, Petrona, Noé que hicieron que este reto fuera aún más fácil de superar, gracias.

Moisés David Paizano Hernández

DEDICATORIA

A DIOS por darme vida, por ser mi ayuda en todo momento, por cuidarme de todo peligro y darme las fuerzas para salir adelante y superarme; y si he llegado hasta esta etapa de mi formación ha sido nada más que por su gran voluntad.

A mi abuela Ángela Bejarano quien siempre ha estado a mi lado cuidándome, ayudándome, preocupándose por mí y lo ha hecho incondicionalmente nunca dejare de estar agradecido por todo lo que ha hecho por mí.

A mi madre Marta Blandón que me ha dado la herencia que no se puede perder, que no se puede acabar y no me pueden robar, pues con mucho sacrificio me ha apoyado para que yo pudiera culminar mis estudios universitarios.

A mi tía Milagro Blandón, aunque la distancia nos ha separado por estos años, siempre como a tu propio hijo me has cuidado, ayudado y apoyado y sé que estas orgullosa de mi.

A todas las personas que de manera directa o indirecta me han apoyado porque todo lo que he logrado ha sido resultado de su ayuda en especial a mi mamá Mirna Cabrera, La Familia Pavón Centeno, Los Tercero Abaunza, Manuel, Claudia, Jessling, Moisés, a todos ustedes gracias.

Yeltsin Ramón Ruiz Blandón.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos la vida, por ser nuestra fuerza, nuestro guía, y sobre todo por acompañarnos durante estos años de formación profesional. A nuestros padres por ser nuestros principales apoyos, por sus enteros esfuerzos para que nuestros sueños de ser profesionales sean hoy realidad.

A nuestra tutora PhD. Carla Martínez Algaba por haber asumido con tanto empeño y dedicación la conducción de este trabajo y por su valiosa orientación para culminar este estudio. Nuestro respeto y admiración.

Al Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos (MINSA) en especial a la Lic. Nubia Blanco, Directora General, al Lic. Francisco Álvarez, Jefe del área Físico-Química, a los analistas, Lic. Julio Mercado, Lic. Rogelio Machado por abrirnos las puertas para que nosotros pudiéramos realizar nuestro estudio, por brindar sus conocimientos, su apoyo y colaboración en la realización de esta monografía. A ustedes gracias.

Finalmente a todas aquellas personas que durante nuestros largos cinco años de formación nos brindaron su apoyo de manera desinteresada para que hoy lográramos culminar una de nuestras mayores metas que hemos tenido en la vida.

De todo corazón gracias.

OPINIÓN DEL TUTOR

El trabajo monográfico presentado por los bachilleres Yeltsin Ramón Ruiz Blandón y Moisés David Paizano Hernández, cuyo tema es: “**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO ULTRAVIOLETA VISIBLE PARA LA CUANTIFICACIÓN Y DISOLUCIÓN DE TINIDAZOL TABLETA DE 500 MG, EN EL LABORATORIO NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS**”, presenta los siguientes aportes en el campo científico técnico:

- Es un tema cuya implementación se está iniciando en la industria farmacéutica, en el contexto del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 11.03.39:06).
- Su ejecución se ha llevado a cabo insertándose dentro del flujo real de procesos del laboratorio nacional de control de calidad de medicamentos, lo cual permitió la evaluación de la variabilidad del sistema en tiempo real.
- Fue utilizado un espectrofotómetro ultravioleta visible Agilent 8453 series con un detector de arreglo de diodo lo cual permitió garantizar la cuantificación del analito.
- Se utilizaron herramientas estadísticas para el procesamiento de los datos, siguiendo el flujograma de la marcha analítica.
- Los resultados responden a la hipótesis planteada inicialmente, obteniéndose un método debidamente validado que se está utilizando actualmente para la realización de control de calidad de los medicamentos en el laboratorio nacional de control de medicamentos del Ministerio de Salud.

Atentamente,

PhD. Carla Martínez Algaba
Doctora en Farmacia
Tutora

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-MANAGUA

RECINTO UNIVERSITARIO “RUBÉN DARÍO”

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Nosotros, *Yeltsin Ramón Ruíz Blandón*, mayor de edad, soltero, identificado con cédula número 401-051093-0008d, y número de carnet universitario 10043461, de domicilio Masaya y *Moisés David Paizano Hernández*, mayor de edad, soltero, identificado con cédula número 570-090693-0002T, y número de carnet universitario 10043428 y del domicilio de Altagracia, Isla de Ometepe, ambos egresados de la Carrera de Química Farmacéutica, plan 1999, ofertada por la Facultad de Ciencias e Ingenierías de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-Managua) a través del Departamento de Química, damos fe y veracidad de la autoría y originalidad de la presente Monografía que lleva por título “*Validación del método espectrofotométrico UV-Visible para la cuantificación y disolución de tinidazol tableta de 500 mg, en el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos, Abril-Noviembre 2015*”, en la cual se presentan datos experimentales reales única y exclusivamente obtenidos por los suscritos, durante el período de realización de esta investigación.

Dado en la ciudad de Managua a los quince días del mes de Febrero del año dos mil dieciséis,

Yeltsin Ramón Ruíz Blandón, Br.

Moisés David Paizano Hernández, Br.

Aspirantes al título de Licenciados en Química Farmacéutica UNAN-Managua.

RESUMEN

Palabras clave: Tinidazol, Espectrofotometría UV-Visible, Validación, Disolución.

Tinidazol, nombre químico 1-[2-(Etilsulfonil)etil]-2-metil-5-nitro-1H-imidazol, indicado en amebiasis, giardiasis y Tricomoniasis intestinales, genitourinarias del hombre y la mujer, así como en la profilaxis de infecciones post operatorias en cirugía gastrointestinal, ginecológicas y de colon. Es uno de los antiparasitarios demandados por el Ministerio de Salud de Nicaragua.

El trabajo que a continuación se muestra se realizó en el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos del Ministerio de Salud (LNCCM), con el propósito de validar el método Analítico por Espectrofotometría UV-Visible, para la cuantificación de tinidazol, en la forma farmacéutica tableta 500 mg, según metodología interna del laboratorio.

Se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible Agilent, modelo 8453 series, con detector de arreglo de diodo a una longitud de onda analítica de 276 nm, trabajando en un rango de concentración de 32 µg/mL a 48 µg/mL, usando como disolvente HCl 0.1 N.

Se evaluaron parámetros de desempeño analíticos que incluyen Linealidad, Precisión, Exactitud, Robustez y Disolución con el objetivo de cumplir los requisitos del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 11.03.39:06); Productos Farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos.

La curva de calibración demostró ser lineal $r^2 = 0.9994$, obteniéndose un porcentaje de recuperación de 100.27%. En los estudios de repetibilidad y precisión intermedia los coeficientes de variación fueron menores al 2%. El método resultó ser lineal, preciso y exacto por lo tanto puede usarse como método de rutina para el control de calidad de productos farmacéuticos.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Nº	Especificaciones	Página
Gráfico N° 5.1.1.2.1.1	Gráfico de curva de calibración en Absorbancias de tinidazol en UV-Visible	44
Gráfico N° 5.1.1.2.2.1.1	Gráfico de análisis de los residuales de la linealidad del sistema	47
Gráfico N° 5.1.1.2.2.1.2	Gráfico de linealidad del sistema de tinidazol en espectrofotometría UV-Visible	49
Gráfico N° 5.1.2.1.1	Gráfico de linealidad del método de tinidazol tableta 500 mg	70
Gráfico N° 5.1.2.2.1.1	Gráfico de análisis de los residuales de la linealidad del método de tinidazol	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Especificaciones	Página
Figura 2.2.2.2.1	Esquema del aparato 2 de disolución	15
Figura 2.4.3.8	Esquema de espectrofotometría UV-Visible	20
Figura 4.7.1.2.1	Mecanismo de acción de tinidazol	22
Figura 4.7.1.2.1	Presentación esquemática de la preparación de la curva de calibrado de estándar de tinidazol	32
Figura 4.7.1.3.2	Presentación esquemática de la preparación de la curva de calibrado de tinidazol tabletas de 500 mg	34

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	Especificaciones	Página
Tabla Nº 2.3.1	Parámetros requeridos para la validación	17
Tabla Nº 4.4.3	Operacionalización de variables	26
Tabla Nº 4.9.1.1.1	Criterios de aceptación de la linealidad del sistema	35
Tabla Nº 4.10.1.1	Criterios de aceptación de la linealidad del método	37
Tabla Nº 4.12.1	Reactivos	39
Tabla Nº 4.12.2	Materiales	40
Tabla Nº 4.12.3	Equipos	41
Tabla Nº 5.1.1.1.1	Tratamiento estadístico de la aptitud del sistema	42
Tabla Nº 5.1.1.2.1	Evaluación de la curva de calibración del sistema de tinidazol	43
Tabla Nº 5.1.1.2.2.1	Análisis de los mínimos cuadrados en los datos de la linealidad del sistema de tinidazol	46
Tabla Nº 5.1.1.2.5.1	Test de G de Cochran Varianza de los factores de respuesta del sistema de tinidazol	54
Tabla Nº 5.1.1.2.7.1	Análisis de la varianza de los factores de respuesta del sistema de tinidazol en espectrofotometría UV-Visible.	57
Tabla Nº 5.1.1.3.1.1	Evaluación estadística de repetibilidad del sistema de tinidazol	60
Tabla Nº 5.1.1.4.1	Evaluación de la Exactitud del sistema de tinidazol	63
Tabla Nº 5.1.1.5.1	Porcentaje de recuperación de tinidazol tableta 500 mg	66
Tabla Nº 5.1.1.5.1.1	Test G de Cochran para el porcentaje de recuperación de tinidazol tableta 500 mg	67

Nº	Especificaciones	Página
Tabla Nº 5.1.2.1.1	Evaluación de la linealidad del método de Tinidazol tab 500 mg	69
Tabla Nº 5.1.2.2.1	Análisis de mínimos cuadrados en los datos de linealidad del método	71
Tabla Nº 5.1.2.5.1	Test G de Cochran varianza de los factores de respuestas del método de tinidazol tableta 500 mg	78
Tabla Nº 5.1.2.7	Análisis de varianza de los factores de respuesta del método de tinidazol tab 500 mg	80
Tabla Nº 5.1.2.8.1.1	Evaluación de repetibilidad del método de tinidazol tableta 500 mg	83
Tabla Nº 5.1.2.8.2.1	Evaluación de la precisión intermedia interdía e interanalista	86
Tabla Nº 5.1.2.8.2.1.1	Evaluación estadística para la precisión intermedia en espectrofotometría UV-Visible de tinidazol tableta 500 mg	87
Tabla Nº 5.1.2.8.2.1.2	Precisión intermedia analista A	88
Tabla Nº 5.1.2.8.2.1.3	Precisión intermedia analista B	88
Tabla Nº 5.1.2.8.2.1.4	Precisión intermedia analista A vs B Día 1	88
Tabla Nº 5.1.2.8.2.1.5	Precisión intermedia analista A vs B Día 2	89
Tabla Nº 5.1.2.8.2.2	Precisión intermedia interdía e interanalista <i>t</i> estadígrafo Student	89
Tabla Nº 5.1.2.9.1	Evaluación de la robustez de tinidazol tableta 500 mg	90
Tabla Nº 5.1.2.10.1	Evaluación del Test de Disolución de tinidazol tableta 500 mg	91
Tabla Nº 5.2	Resumen de resultados de validación de tinidazol tableta 500 mg en espectrofotometría UV-visible	92

ÍNDICE DE ANEXOS
ÍNDICE DE ECUACIONES

Nº	Ecuación	Página
Ecuación 1	$LOD = \frac{3.3 \sigma}{m}$	12
Ecuación 2	$LOQ = \frac{10 \sigma}{m}$	13
Ecuación 3	$r = \frac{\sum_i^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$	44
Ecuación 4	r^2	44
Ecuación 5	$\hat{y} = b * x + a$	47
Ecuación 6	$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$	47
Ecuación 7	$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$	48
Ecuación 8	$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$	48
Ecuación 9	$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$	48
Ecuación 10	$a = \bar{y} - b\bar{x}$	48
Ecuación 11	$t_{exp(b)} = \frac{ b }{S_b}$	50
Ecuación 12	$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}}$	50

Ecuación 13 $S_b = \sqrt{Sr^2/S_{xx}}$ **50**

Ecuación 14 $IC_b = b \pm t * S_b$ **51**

Ecuación 15 $t_{exp(a)} = \frac{|a|}{S_a}$ **52**

Ecuación 16 $S_a = S_r * \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}}$ **52**

Ecuación 17 $IC_a = a \pm t * S_a$ **53**

Ecuación 18 $G_{exp} = \frac{S^2 \text{máxima}}{\sum S_i^2}$ **53**

Ecuación 19 $CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$ **55**

Ecuación 20 $V_{RES} = S_{y,x}^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-2}$ **58**

Ecuación 21 $SC_T = SC_{RES} + SC_{REG}$ **58**

Ecuación 22 $S_{y,x}^2 = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n-2}$ **58**

Ecuación 23 $F = \frac{V_{REG}}{V_{RES}}$ **59**

Ecuación 24 $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$ **61**

Ecuación 25 $s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n-1)}$ **61**

Nº	Especificaciones	Páginas
Anexo 1	Carta declaratoria del Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos	1
Anexo 2	Idoneidad del método espectrofotométrico UV-Visible	2
Anexo 3	Calibrado del sistema en espectrofotometría UV-Visible	3
Anexo 4	Cálculos para las concentraciones	4
Anexo 5	Espectros de la linealidad del sistema y del método	5
Anexo 6	Espectros de la precisión en condiciones de repetibilidad del sistema y del método	6
Anexo 7	Espectros de la precisión intermedia del método de muestras de tinidazol tableta 500 mg Interanalista-Día 1	7
Anexo 8	Espectros de la precisión intermedia del método de muestras de tinidazol tableta 500 mg Interanalista-Día 2	8
Anexo 9	Espectros de la exactitud del Sistema y del Método	9
Anexo 10	Partes del Disolutor HANSON RESORD	10
Anexo 11	Partes del Espectrofotómetro AGILENT 8453 SERIES	11
Anexo 12	Partes de la Balanza Analítica OHAUS EXPLORER	12
Anexo 13	Monografía individual de Tinidazol, materia prima USP-37	13
Anexo 14	Reglamento Técnico Centroamericano 11.03.39:06	14
Anexo 15	Capítulo general de Espectrofotometría y Dispersión de la luz USP-37	15
Anexo 16	Capítulo general de Disolución USP-37	16

Anexo 17	Capítulo general de Validación de procedimientos farmacopéicos USP-37	17
Anexo 18	Tablas Estadísticas	18

CAPÍTULO I

ASPECTOS GENERALES



1.1 INTRODUCCIÓN

En Nicaragua es muy bien conocido el problema de las infecciones parasitarias; a medida que la mayoría de la población las padece, el uso de los antiparasitarios es esencial para el tratamiento de dichas infecciones, siendo el Tinidazol uno de los fármacos utilizados en este tipo de afecciones.

La industria farmacéutica nacional en la actualidad fabrica el tinidazol en tableta, por razones económicas no todos cuentan con el equipo necesario que algunos métodos modernos exigen para el análisis del producto terminado. Es por ello que los laboratorios nacionales tienen que disponer de métodos de análisis alternativos, que sean rápidos, seguros, confiables y económicos.

El Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06 “Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos”, indica las directrices que deben aplicarse a todos los métodos analíticos no oficiales y oficiales utilizados para el control de calidad de medicamentos.

La Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 36), no contemplan ninguna monografía de producto terminado de tinidazol, por lo que este trabajo pretende validar el método espectrofotométrico UV-visible para la cuantificación de Tinidazol tabletas 500 mg, mediante la evaluación de los parámetros de desempeño, exactitud, precisión, linealidad e intervalo, con la única finalidad de garantizar la calidad y la seguridad del medicamento.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

- Validar el método espectrofotométrico para la cuantificación y disolución de tinidazol tableta de 500 mg realizado en el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos (LNCCM) Abril-Noviembre 2015.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprobar la idoneidad del método analítico, para la cuantificación de tinidazol tabletas de 500 mg, por espectrofotometría UV-visible.
- Evidenciar los parámetros del desempeño para la validación del sistema: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, robustez, para la cuantificación de tinidazol tableta 500 mg por espectrofotometría UV-visible.
- Aplicar el ensayo de disolución para la cuantificación de tinidazol tabletas 500 mg, por espectrofotometría UV-visible.

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La validación de los métodos de cuantificación, es una de las exigencias de las Buenas Prácticas de Manufactura y las Buenas Prácticas de Laboratorio, que deben cumplirse en la Industria Farmacéutica, para garantizar que la evaluación de la calidad de los productos se realiza dentro de un sistema de calidad confiable.

El Ministerio de Salud de Nicaragua, como garante de la calidad de los medicamentos en uso de sus facultades orienta que todos los laboratorios deben tener validado sus métodos analíticos, tomando como referencia las monografías oficiales de la farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) y el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06, en la cuales se orienta la validación de los nuevos métodos de análisis, para verificar la calidad de los medicamentos para uso humano.

Los métodos presentados para algunas moléculas (cromatografía líquida de alta presión y cromatografía de gases) resultan costosos, especialmente para los laboratorios nacionales y gubernamentales que se dedican a la fabricación de estos productos y que no cuentan con estos equipos.

Con el presente trabajo se pretende validar este método analítico no oficial, para la cuantificación y disolución de tinidazol, requisito necesario orientado por el ente regulador para cumplir con los controles de registro sanitario del producto terminado.

Por tal razón surge la pregunta:

¿Es el método de espectrofotometría UV-visible idónea para la cuantificación y disolución de tinidazol tableta de 500 mg?

1.4 JUSTIFICACIÓN

La industria farmacéutica nacional, en vías de ampliar sus fronteras comerciales, ha estado en constantes cambios tomando como eje el cumplimiento de las normativas de calidad internacionales como son el Reglamento Técnico Centroamericano y farmacopea de los Estados Unidos de América, donde la validación de los métodos analíticos de los productos farmacéuticos es fundamental para garantizar la calidad de los productos, estas usualmente resultan ser costosas por los recursos tecnológicos modernos a utilizar, por lo que comúnmente es preciso adaptar métodos de análisis alternativos que garanticen la calidad de los medicamentos y el cumplimiento de todas y cada una de las normas establecidas.

La importancia de la realización de este trabajo de investigación se debe al aporte que suministra el método empleado, al reunir condiciones idóneas para la obtención de resultados precisos, exactos, confiables, con menos tiempo y costo en su aplicación, proporcionando vías alternativas ante metodologías analíticas que usualmente son costosas para el laboratorio. De la misma manera ser útil para el fortalecimiento del conocimiento farmacéutico relacionado con la validación de métodos analíticos

La molécula de tinidazol fue seleccionada por el interés del Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos del Ministerio de Salud, por lo que es utilizada frecuentemente en enfermedades parasitarias, así mismo al no contemplarse la metodología analítica en la farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 36), y no estar validado este método utilizado por el ente regulador, se procede a validar el método a través de espectrofotometría UV-Visible, para convertirse en un método oficial para la industria nacional.

1.5 ANTECEDENTES

Al realizar investigaciones documentales sobre estudios relacionados a validaciones de métodos espectrofotométricos para tinidazol, internacionalmente encontramos trabajos reportados en diferentes revistas sobre validaciones de métodos espectrofotométricos en diversos preparados farmacéuticos y en algunos de ellos en tinidazol.

En Nicaragua no se encontró estudio alguno que demuestre el uso de la técnica de Espectrofotometría UV-visible, para la cuantificación de tinidazol y la evaluación de los parámetros de desempeño analíticos.

1.5.1 INTERNACIONALES

2012 “Application of UV spectrophotometric methods for simultaneous estimation of norfloxacin and tinidazole in bulk and tablet dosage forms”. Pant Mayank, Dadare Khemchand and Khatri, N.C. Der Pharma Chemica, 2012, 4 (3):1041-1046.

2011 “Method for Determination of Tinidazole using Direct UV Visible Spectrophotometric and Differential Spectrophotometric in pure and Tablet Dosage Forms. Singh L. and Nanda S. East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences 2011, Vol. 14: 75-80.

2011 “A Validated UV-Spectrophotometric Method for the Estimation of Tinidazole in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. Umadevi Kothapalli, et al. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives 2011; 2(4):1152-1156.

2008 “Determinação de Tinidazol por Cromatografia em Camada Delgada e Espectrofotometria”. Lissandra Gluszczak, Denia Mendes de Sousa Valladão, Ricardo López Tortorela. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

1999 “Validación de Método Espectrofotométrico para Cuantificación de Metronidazol, Mebendazol, Albendazol y Tinidazol (Tabletas y Suspensión)”, Valenzuela Mejía, Ana C.

1.5.2 NACIONALES

2012 “Validación de metodología analítica para la cuantificación de Levofloxacin 500 mg capleta recubierta por espectrofotometría ultravioleta visible durante el periodo de Septiembre 2012 en UNAN-León”. Brs. Vázquez Hernández W. A. y Villegas Marcias T.

2012 “Validación de Famotidina de 40 mg por espectrofotometría ultravioleta visible UNAN-León”. Br. Sevilla Bonilla A. J.

2008 “Validación de un método espectrofotométrico UV-visible para la determinación de Ciprofloxacina en formulaciones sólidas producidas por laboratorios Bengochea de Managua, UNAN-Managua”. Brs. García Tálenos G. M y Gutiérrez Obando B. A.

2003 “Validación de un método analítico por espectrofotometría ultravioleta visible para el ensayo de disolución de tabletas de Metocarbamol (Turel-AX), Elaborado por laboratorios PANZYMA, UNAN-LEON”. Brs. Rugama Narvárez E. R. y Silva C. A.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO



2.1 GENERALIDADES DE VALIDACIÓN

2.1.1 DEFINICIÓN DE VALIDACIÓN

La validación de un procedimiento analítico, es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorios, que las características de desempeño del procedimiento cumplan los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado. (USP 36 <1225>, 2013)

Mediante la validación del método se establece si los parámetros de calidad satisfacen los requisitos de una aplicación analítica concreta. Para ello, se requiere experimentación y comparación con valores de referencia bien conocidos.

2.1.2 RAZONES QUE JUSTIFICAN LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas.
- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimiza el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costos.
- Trabajar con métodos validados permite no solo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de las Buenas Prácticas de Laboratorio, con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto. (Aguirre, 2001)

2.1.3 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS PARA VALIDACIÓN DE MÉTODOS

Para que un método de análisis pueda ser validado, es necesaria la determinación y evaluación de una serie de parámetros que definen la calidad del método que describen la Farmacopea USP 36 NF-31, a continuación se mencionan: (USP 36 <1225>, 2013)

- Especificidad
- Linealidad del sistema
- Precisión expresada en sus 2 formas: repetitividad y precisión intermedia.
- Exactitud
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Robustez

2.1.3.1 Especificidad

Capacidad de un método analítico para medir o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra. (Aguirre, 2001)

2.1.3.1.1 Ámbito de aplicación, especificidad

En el análisis farmacéutico la tendencia mayoritaria es la utilización de métodos lo más selectivos posibles, en los que la presencia de otros compuestos tienen escasa influencia en los resultados.

Para efectuar estudios de selectividad se precisa la máxima información de impurezas y productos de degradación potencialmente presentes en la muestra, así como posibles interferencias debido a excipientes u otros componentes. (Aguirre, 2001)

2.1.3.2 Linealidad e intervalo

Capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. (COMIECO, 2006)

Intervalo: es la amplitud entre la concentración inferior y superior del analito (incluyendo esos niveles), en la cual se puede determinar el analito con un nivel

adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el método según se describe. (COMIECO, 2006)

2.1.3.2.1 Ámbito de aplicación, linealidad

Según la guía ICH Q2A se recomienda estudiar la linealidad en todos los métodos de tipo cuantitativo.

Valoración del contenido de principio activo.

Velocidad de disolución.

Cuantificación de impurezas.

2.1.3.2.2 Análisis de varianza en UV-Visible

El análisis de la varianza de la regresión (ANOVA) es un método que se emplea para comparar resultados obtenidos por distintos métodos, laboratorios, analistas etc., cuando el número de medias obtenidas es superior a dos. También permite separar las contribuciones de uno más factores a la varianza global de sistema. (Aguirre, 2001)

2.1.3.3 Precisión

Expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea original o bien a partir de varias muestras obtenidas por dilución de la muestra bajo condiciones establecidas.

Existen tres formas diferentes de evaluar la precisión: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. (COMIECO, 2006)

2.1.3.3.1 Repetibilidad

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.). En un mismo laboratorio y en un período de tiempo corto. (Aguirre, 2001)

2.1.3.3.1.1 Determinación de repetibilidad

La Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH), recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones, que cubran el intervalo especificado para el procedimiento, se trabaja con el punto medio de la calibración, con sus nueve determinaciones repetidas de esta concentración. (ICH, 2002)

2.1.3.3.1.2 Criterios de aceptación de repetibilidad

Existen diferentes criterios de aceptación, sin embargo se puede generalizar que en el caso de la repetibilidad y la precisión intermedia; la desviación estándar relativa para evaluar la precisión del sistema o del método debe ser menor o igual al 3 %, la reproducibilidad, puede ser 2 ó 3 veces la repetibilidad. (Aduanera, 2004)

2.1.3.3.2 Precisión intermedia

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra homogénea, pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, días y aparatos, etc.) en un mismo laboratorio. (Aguirre, 2001)

2.1.3.3.2.1 Determinación de precisión intermedia

Se determina preparando una muestra a la concentración considerada como el 100% ó a la concentración de análisis rutinario, haciendo análisis por triplicado. El ensayo se realiza por dos analistas, en días diferentes. (USP 36 <1225>, 2013)

2.1.3.3.2.2 Criterios de aceptación de precisión intermedia

La estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del Coeficiente de Variación global. (Aduanera, 2004)

2.1.3.4 Exactitud

Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero. (COMIECO, 2006)

2.1.3.4.1 Determinación de exactitud

Existen diferentes maneras de determinar la exactitud, los siguientes son los más frecuentes y pueden ser utilizados en todos los tipos de análisis:

- Prueba de un Estándar de Referencia.
- Mezcla con excipientes (placebo con una cantidad agregada conocida).
- Agregado de estándar (muestra con cantidad agregada conocida).
- Se deduce a partir de los datos de especificidad y linealidad.
- Comparación con un método reconocido como exacto. (ICH, 2002)

2.1.3.4.2 Procedimiento de la determinación de exactitud

Se recomienda que la exactitud se evalúe un mínimo de nueve determinaciones, sobre un mínimo de tres niveles de concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración, que podrían ser la concentración central y las concentraciones de los extremos del rango. En función del tipo de método a validar y de cada caso concreto se deberá tener en cuenta el rango de concentraciones de trabajo:

- Riquezas de un principio activo de materia prima o en producto acabado (80-120%).
- Ensayo de disolución: si se trata de un producto de liberación inmediata sería de que $Q - 20\%$ a $Q + 20\%$, si se trata de un producto de liberación controlada sobre cada límite de disolución en cada período de tiempo se aplicaría ($\pm 20\%$). (Aguirre, 2001)

La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadido sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza.

2.1.3.4.3 Comparación de los resultados obtenidos de un estándar o material de referencia certificado

Verificación

El material de referencia puede ser obtenido en el mercado por algún suplidor o puede ser preparado internamente en el laboratorio.

Se analiza por replicado el material, por el método a validar y se compara el resultado obtenido con el valor verdadero declarado, este método se encuentra limitado por la disponibilidad y la estabilidad del material de referencia, así como por el grado de incertidumbre que se tenga del valor verdadero de la concentración del material de referencia. (OMS, 2006)

2.1.3.4.4 Criterio de aceptación de exactitud

En la exactitud el criterio de aceptación es 90% - 110% de recuperación o 2% de error relativo. (USP 36 <1225>, 2013)

2.1.3.5 Límite de detección (LOD)

Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse por una única medición, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas, expresadas habitualmente en forma de concentración de analito (porcentajes, partes por billón) en la muestra. (USP 36 <1225>, 2013)

Se determina mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo que puede detectarse confiablemente. El límite de detección se calcula mediante la fórmula:

$$LOD = \frac{3.3 \sigma}{m} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde:

σ = es la desviación estándar de la respuesta de la muestra.

m = es la pendiente de la curva de calibración para la linealidad.

2.1.3.6 Límite de cuantificación (LOQ)

Mínima cantidad del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para la determinación de, impurezas y productos de degradación. (COMIECO, 2006)

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Dónde:

σ = Es la desviación estándar de la respuesta de la muestra.

m = Es la pendiente de la curva de calibración para la linealidad.

2.1.3.7. Robustez

La guía ICH, Q2A define la robustez de un método analítico como la media de su capacidad para permanecer inalterado, ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo en rutina. Es por la tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar datos validos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método susceptible de producirse durante su utilización. (Aguirre, 2001)

2.1.3.7.1. Ámbito de aplicación, robustez

La guía ICH recomienda incluir la robustez en un método, en una fase apropiada del desarrollo de este, no se comprueba con anterioridad a iniciar la validación, puede suceder que se intente validar un método poco robusto, con los consiguientes malos resultados y pérdida de tiempo y dinero. (Aguirre, 2001)

2.2 DISOLUCIÓN

2.2.1 FUNDAMENTO

La disolución se emplea para determinar el comportamiento de la disolución de los principios activos contenidos en una forma farmacéutica sólida de uso oral, estableciendo un criterio de evaluación de las propiedades físicas y biofarmacéuticas del producto. Los métodos descritos se aplican en las monografías que establecen un límite de principio activo disuelto bajo el título Disolución. La disolución de tabletas es una prueba que se utiliza para la determinación del principio activo, que se encuentra en la solución, después de cierto tiempo de agitación. (USP 36 <711>, 2013)

El procedimiento de disolución requiere de un aparato, un medio de disolución y condiciones de prueba que provean un método discriminatorio lo suficientemente resistente y reproducible para las operaciones diarias y capaz de ser transferido entre laboratorios.

Los criterios de aceptación deben ser representativos de varios lotes con la misma composición nominal y el mismo proceso de fabricación, que usualmente incluyen los lotes de mayor relevancia usados en estudios claves, y deben también ser representativos del desempeño en estudios de estabilidad. (USP 36 <711>, 2013)

2.2.2 ASPECTOS TEÓRICOS DE LA PRUEBA DE DISOLUCIÓN

2.2.2.1 Aplicación de la prueba de disolución

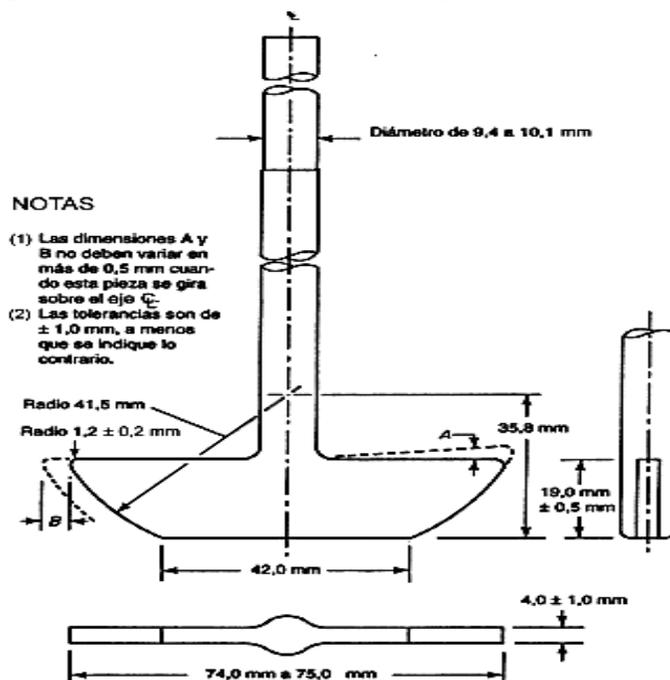
La disolución es una prueba físico química que determina la cantidad de fármaco que se disuelve por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas de la interfase líquida/sólida, la temperatura y la composición del solvente. (USP 36 <711>, 2013)

2.2.2.2 Aparato 2 (Aparato con Paleta)

Emplear el Aparato 2 usando como elemento de agitación una paleta compuesta por un aspa y un eje. Colocar el eje propulsor de forma tal que su eje central guarde una distancia máxima de 2 mm con respecto a cualquier punto del eje vertical del vaso y rote suavemente sin fluctuaciones que pudieran afectar los resultados. La línea

central vertical del aspa está alineada con el eje propulsor de forma tal que el extremo inferior del aspa esta nivelado con el extremo inferior del eje propulsor. La paleta cumple con las especificaciones que se indican en la siguiente figura:

Figura 2.2.2.2.1 Esquema del aparato 2 de Disolución



Fuente: (USP 36 <711>, 2013)

La distancia entre el fondo interno del vaso y el aspa se mantiene en 25 ± 2 mm durante la prueba. El aspa metálica o de otro material inerte adecuado y el eje forman una unidad. En algunos casos, se puede usar un dispositivo desmontable de dos partes, siempre y cuando las partes permanezcan firmemente ajustadas durante la prueba.

El eje y el aspa de la paleta pueden estar recubiertos con un material inerte adecuado. Dejar que la unidad de dosificación se hunda hasta el fondo del vaso antes de empezar a rotar el aspa. A las unidades de dosificación se les puede agregar una pieza pequeña, suelta, de algún material no reactivo, como por ejemplo un par de vueltas de alambre, para evitar que floten. (USP 36 <711>, 2013)

2.3 CLASES DE ENSAYOS ANALÍTICOS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica, en cuatro clases principales con sus respectivas especificaciones para la validación de métodos analíticos, que se nombran en: (OMS, 2006)

Clase A: Para establecer identidad.

Clase B: Para detectar y cuantificar impurezas.

Clase C: Para determinar cuantitativamente la concentración.

Clase D: Para evaluar las características, disolución, uniformidad de contenido.

2.3.1. DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN

Los requisitos de las pruebas farmacopéicos varían dependiendo de la naturaleza de la prueba específica, considerando esta amplia variedad es lógico que diferentes procedimientos requieran diferentes esquemas de validación, que a continuación se detallan: (USP 36 <1225>, 2013)

Categoría I: procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: para la determinación de impurezas en fármacos a granel o producto de degradación en productos farmacéuticos.

Categoría III: para la determinación de las características de desempeño (ej. disolución, liberación de fármacos).

Categoría IV: pruebas de identificación.

Tabla N° 2.3.1 Parámetros requeridos para la validación

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Prueba de Límite Cuantitativa	Prueba de Límite Cualitativa		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

Fuente: (USP 36 <1225>, 2013) Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

2.4 FUNDAMENTO DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA (UV-VISIBLE)

2.4.1 DEFINICIÓN DE ESPECTROFOTOMETRÍA (UV-VISIBLE)

La espectrofotometría ultravioleta visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa la medición de una interacción entre una radiación electromagnética y las moléculas o átomos de una sustancia química. Las técnicas que se emplean frecuentemente en el análisis farmacéutico incluyen la espectroscopia de absorción atómica, en el espectro UV, en el visible y en el IR. (USP 36 <851>, 2013)

Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma.

2.4.2 ESPECTROFOTÓMETRO

La palabra espectrofotómetro se deriva de la palabra latina *spectrum*, que significa imagen, y de la palabra griega *phos* o *photos*, que significa luz. Utiliza las propiedades y su interacción con otras sustancias, para determinar la naturaleza de las mismas. En general, la luz de la lámpara de características especiales es guiada a través de un dispositivo que selecciona y separa la luz de una determinada longitud de onda y la hace pasar por una muestra. La intensidad de la luz que sale de la muestra es captada y comparada con la intensidad de la luz que incidió en la muestra y a partir de esto se calcula la transmitancia de la muestra, que depende de factores como la concentración de la sustancia. (López I, 1999)

2.4.3 COMPONENTES DEL ESPECTROFOTÓMETRO

2.4.3.1 Fuente de luz

Dependiendo del tipo de espectrofotometría la fuente luminosa, puede ser una lámpara con filamentos de tungsteno para luz visible, o una lámpara de arco de deuterio para luz ultravioleta. (López I, 1999)

2.4.3.2 Rendija de entrada

Tiene como función reducir al máximo la luz difusa y evitar que la luz dispersa entre en el sistema de selección de longitud de ondas.

2.4.3.3 Monocromadores

Está compuesto por un conjunto de elementos. En general, dispone de una rendija o ranura de entrada que limita la radiación lumínica producida por la fuente y la confina en un área determinada, un conjunto de espejos para pasar la luz a través del sistema óptico, un elemento para separar las longitudes de ondas de la radiación lumínica. Pueden ser: Prismas o Redes de difracción (López I, 1999)

- **Prismas:** son fragmentos con forma de cuña de un material que permite el paso de la luz, como por ejemplo: vidrio para trabajar en el espectro visible o cuarzo para trabajar en el ultravioleta lejano.
- **Redes de difracción:** son un gran número de líneas paralelas situadas a distancias iguales entre sí y son hendiduras sobre un vidrio o una superficie metálica. Cada una de estas hendiduras se comporta como un pequeño prisma.

2.4.3.4 Rendija de salida

Tiene como función impedir que la luz difusa atraviese la cubeta de la muestra, que provocaría desviaciones a la Ley de Beer.

2.4.3.5 Cubeta

Está fabricado con un material que permite el paso de la radiación en la región del espectro de interés. Suelen ser de vidrio, plástico o cuarzo. El espesor de la cubeta más habitual es de 1 cm. (Hernández, 2002)

2.4.3.6 Detector

El diseño depende de los rangos de longitud de onda, de la sensibilidad y de la velocidad de respuesta requerida. Recibe la energía lumínica proveniente de la muestra y la convierte en una señal eléctrica proporcional a la energía recibida y puede ser de dos tipos:

- **Fotocélulas o células fotovoltaica**

Es una lámina de Cobre sobre la que se extiende una capa de Selenio o de Óxido de Cobre. La luz incide sobre el Selenio y éste desprende electrones, que pasan a la placa de Cobre originando una diferencia de potencial por existir carga negativa sobre el Cobre y positiva sobre el Selenio. El conjunto se conecta a un amperímetro que señala el paso de corriente.

- **Fototubos multiplicadores**

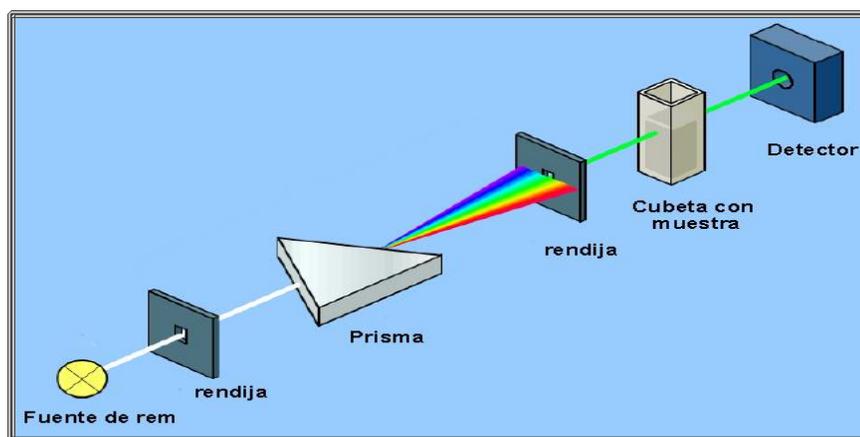
Un fototubo multiplicador es un tubo que contiene un cátodo que emite electrones de forma proporcional a la energía que incide sobre él. Tiene un ánodo que recoge los electrones y la corriente se multiplica varias veces al chocar los electrones sobre sucesivos ánodos que van teniendo un voltaje superior al precedente. La señal se amplifica en cientos o miles de veces. (Hernández, 2002)

2.4.3.7 Medidor

La señal que sale del detector recibe diversas transformaciones. Se amplifica y se transforma para que su intensidad resulte proporcional al porcentaje de Transmitancia/Absorbancias. Existen sistemas de lectura de tipo análogo (muestra la magnitud leída sobre una escala de lectura) o digital.

Los indicadores de tipo análogo reciben tradicional el nombre de metros. Su exactitud depende, entre otros factores, de la longitud de la escala y del número de divisiones que tenga (mientras más divisiones, más exacto). Los indicadores digitales, usualmente presentan los resultados en una pantalla, en forma de caracteres alfanuméricos luminosos. Esto lo hace menos propensos a que se cometan errores de lectura. (Hernández, 2002)

Figura 2.4.3.8 Esquema de la espectrofotetría UV-Visible



Fuente: (López I, 1999)

2.5 GENERALIDADES FARMACOLÓGICAS DE LA MOLÉCULA TINIDAZOL

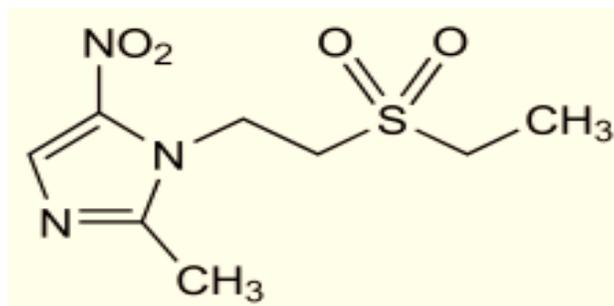
El tinidazol es un antimicrobiano, derivado imidazólico (similar al metronidazol) con actividad bactericida frente a anaerobios y antiprotozoarios. Es activo frente a *Entamoeba histolítica*, *Trichomona vaginalis*, *Giardia lamblia* y las bacterias gram-negativas son las más sensibles.

2.5.1 PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DEL TINIDAZOL (Moffat, 2005)

Nombre propio: Tinidazol

Nombre químico: 1-[2-(Etilsulfonil)etil]-2-metil-5-nitro-1H-imidazol

Fórmula estructural:



Fórmula molecular: C₈H₁₃N₃O₄S

Peso molecular: 247.3 g/mol

Descripción: Polvo cristalino, blanco o amarillo claro.

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua, soluble en acetona y en cloruro de metileno, ligeramente soluble en metanol.

Pka: 3.1

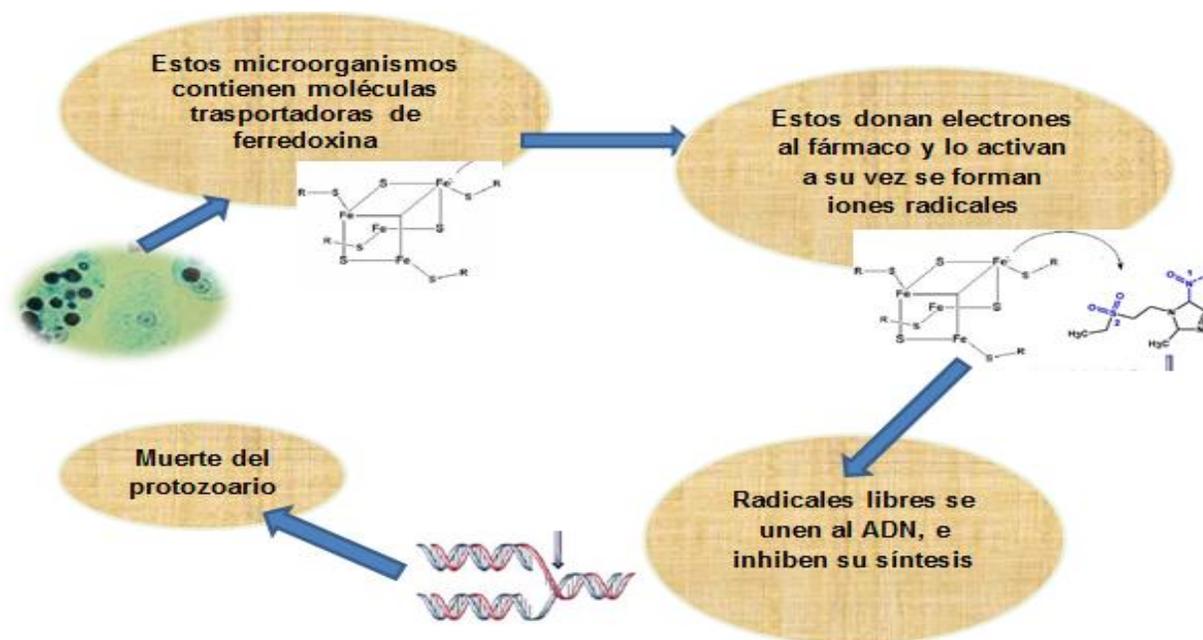
pH: 5

Punto de fusión: 125^o-128

2.5.2 MECANISMO DE ACCIÓN

Actúa al ser reducido su grupo nitro por los extractos de células de tricomonas, el radical libre nitro generado como resultado de esta reducción puede ser responsable de la actividad antiprotozoaria. El tinidazol químicamente reducido es capaz de liberar nitritos que alteran el ADN bacteriano, si bien también ocasionan la ruptura del ADN en las especies de Giardia y Entamoeba. (Chéry, 2010)

Figura 2.5.2.1 Mecanismo de acción de tinidazol



Fuente: (Chéry, 2010)

2.5.3 FARMACOCINÉTICA

La biodisponibilidad del Tinidazol es del 100%, a las 2 horas alcanza la concentración plasmática máxima. En forma amplia se distribuye por tejidos y líquidos corporales. Se difunde fácilmente incluso a través de la barrera hematoencefálica y placentaria. Se liga en un 16% a las proteínas plasmáticas. Se metaboliza parcialmente en el hígado y se elimina parcialmente por la orina en buena proporción en forma activa, también se elimina a través de la leche materna; la vida media es de aproximadamente 13 horas. (Chéry, 2010)

2.5.4 INDICACIONES TERAPÉUTICAS

Tinidazol está indicado en:

- El absceso hepático amebiano; infestaciones duales de *Candida albicans* y *tricomonas*.
- Amebiasis intestinal, vaginitis inespecífica, gingivitis ulcerosa, Tricomoniasis genitourinarias de la mujer y el hombre, giardiasis intestinal
- Infecciones por anaerobios (infecciones ginecológicas, óseas, infecciones respiratorias: neumonía, sinusitis, septicemia bacteriana, infecciones de la piel y tejidos blandos).
- Profilaxis de infecciones postoperatorias por bacterias anaerobias en cirugía gastrointestinal, ginecológica y del colon. (Chéry, 2010)

2.5.5 REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS

El tinidazol produce reacciones indeseables leves y transitorias. Entre las más frecuentemente reportadas tenemos: alteraciones digestivas, náuseas, vómito, alteración del gusto, anorexia, sequedad de la boca, diarrea, dispepsias, dolor abdominal, estreñimiento.

Ocasionalmente se han reportado alteraciones dermatológicas: urticaria, prurito, y otros como fiebre, cefalea, parestesias y mareos. Raramente alteraciones sanguíneas: leucopenia, trombocitopenia y confusión, depresión e insomnio. (González, 1995)

2.5.6 INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS Y DE OTRO GÉNERO

Se puede producir una reacción tipo desulfuran cuando se ingiere alcohol durante el tratamiento con Tinidazol y hasta 72 horas después de haber ingerido Tinidazol y otras drogas de estructura similar.

Terapia anticoagulante oral, tipo warfarina, puede potenciar los efectos de los fármacos anticoagulantes. (González, 1995)

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS



3.1 HIPÓTESIS

El método propuesto por espectrofotometría UV-visible para la cuantificación y disolución de tinidazol tabletas de 500 mg, proporciona resultados que cumplen con los parámetros de desempeño analítico de exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo requeridos para la validación de un método analítico, según RTCA 11.03.39:06.

CAPÍTULO IV

DISEÑO METODOLÓGICO



4.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el Laboratorio Nacional Control de Calidad de Medicamentos del Ministerio de Salud de Nicaragua (MINSa), Gasolinera UNO Xolotlán 2 Cuadras y media abajo, antigua calle 15 de Septiembre.

4.2 TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo, univariado y corte transversal. Es descriptivo porque se realizó un análisis estadístico, es univariado porque describe y estima parámetros en la población de estudio a partir de una muestra. Es transversal ya que implican la recolección de datos en un sólo corte en el tiempo.

4.2.1 TIPO DE DISEÑO

Experimental debido a que se desea comprobar la idoneidad del método espectrofotométrico UV-visible para la cuantificación de tinidazol tableta 500 mg.

4.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

4.3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio proporcionada por el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos (LNCCM) fue de 480 tabletas de tinidazol 500 mg.

4.3.2 MUESTRA

Se tomó una muestra usando un muestreo aleatorio simple, de acuerdo a los criterios de inclusión seleccionando 120 tabletas de 500 mg correspondiendo al 25% de la población de estudio

4.3.2.1 Criterio de inclusión

Para el estudio solamente se tomaron, tabletas de tinidazol de 500 mg

4.3.2.2 Criterio de exclusión

Se tomaron como criterios de exclusión las tabletas de tinidazol de 1g, suspensión de 335mg / 5mL y 1g / 5mL.

4.4 VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

4.4.1 VARIABLE INDEPENDIENTE

Concentración (variable no sujeta a errores indeterminados).

4.4.2 VARIABLES DEPENDIENTES

Absorbancias (sujeta a errores indeterminados). Linealidad, precisión en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, para tinidazol mediante los métodos validados por UV-visible.

Tabla N° 4.4.3 Operacionalización de variables

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
Linealidad	Es su capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados de análisis que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de un analito en la muestra.	<ul style="list-style-type: none"> • Coeficiente de variación (CV) • Coeficiente de correlación (r) • Coeficiente de determinación (r^2) • Test de regresión • Test de linealidad de la pendiente t_{pend} • Test del intercepto t_{int} 	CV de la pendiente $\leq 2\%$ $r \geq 0,9950$ $r^2 > 0,9980$ $t_{reg} > t_{tab}$ $t_{pend} > t_{tab}$ $t_{int} < t_{tab}$	Categórica

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
Precisión	Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación a través de un corto intervalo de tiempo. También significa una precisión entre ensayos.	<ul style="list-style-type: none"> El coeficiente de variación (CV) de los resultados, tanto para los datos correspondientes a la repetibilidad como para la precisión intermedia no debe ser mayor de 2%. 	CV ≤ 2% para ambos analistas	Categórica
Exactitud	Es la proximidad entre los resultados de las prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero	<ul style="list-style-type: none"> Test de Cochran Ensayo de hipótesis de t de Student: Recuperación de muestra por concentración en el procedimiento analítico. 	$G_{exp} < G_{tab}$ $t_{exp} < t_{tab}$ % Recuperación 90.0% a 110.0%	Categórica

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
Robustez	Según USP 36 La robustez se puede analizar durante la selección y optimización de los medios y fuerzas de dispersión. El cambio de la energía dispersante se puede monitorear por el cambio en la distribución del tamaño de las partículas.	<ul style="list-style-type: none"> • Cambio de lámpara el coeficiente de variación (CV) de los resultados no debe ser mayor de 2%. 	CV ≤ 2%	Categórica

Aclaración, tanto el RTCA 11:03.39.06 y USP 36 no exigen la realización de la robustez, pero se realizó cambiando la lámpara para demostrar que no existen cambio en las absorbancias.

4.5 MATERIAL Y MÉTODO

4.5.1 MATERIALES PARA RECOLECTAR LA INFORMACIÓN

Consulta de USP 36 NF-31 *Farmacopea de Estados Unidos Americano*, Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11:03.39.06 Productos Farmacéuticos: *Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la calidad de los Medicamento*, ICH 2002, *Validación de Métodos Analíticos*, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI 2001) *Validación de Métodos Analíticos*, FDA (2010) *Guía para la industria: Pruebas de Disolución de Formas de Dosificación oral Solidas de liberación Inmediata*, Unión Aduanera 2004: *Guía de Validación de Métodos Analíticos*, Hach Company 1999: *Spectrophotometer, Instrument Manual*, *Farmacología: Manual de Farmacología Básica y Clínica*; y sitios web de internet

4.5.2 MATERIALES PARA PROCESAR LA INFORMACIÓN

El análisis se realizó haciendo uso de hojas de cálculo en Excel 2010 diseñadas específicamente para tal fin, presentando la información obtenida a través de cuadros y gráficos.

4.5.2.1 Tipos de fuentes de información primaria

Generada por el programa ChemStation versión B.04.02 Espectrofotómetro Agilent 8453.

4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL (METODOLOGÍA ANALÍTICA GENERAL)

4.6.1 MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

4.6.1.1 Condiciones del espectrofotómetro

- Equipo : Espectrofotómetro
- Marca : Agilent
- Modelo : 8453
- Detector : Detector de Arreglo de Diodo (DAD)
- Celda : Cuarzo 1 cm.
- Longitud de onda analítica : 276 nm
- Rango de espectro : 200-400 nm

4.6.1.2 Condiciones del ensayo de disolución (disolutor)

- Marca : Hanson Resord
- Medio de Disolución : HCl 0.1 N
- Volumen de Disolución : 900 mL
- Aparato USP : 2 Paletas
- Revoluciones por minuto : 75 RPM
- Temperatura : 37.5° C
- Tiempo de Prueba : 45 min
- Volumen tomado : 10 mL

4.6.2. PROGRAMACIÓN DEL EQUIPO DE DISOLUCIÓN

Para la disolución de tinidazol tableta de 500 mg se utilizó un disolutor Hanson Resord, de 8 estaciones de las cuales se usaron solamente 6, con vasos de 1000 mL de capacidad, se programaron las condiciones en el disolutor según el método de estudio y una vez estabilizada la temperatura en cada una de las estaciones del disolutor se inicia con el proceso.

4.7 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

Nota: El Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos del Ministerio de Salud, aseguro que el método empleado por ellos para el control de calidad de la molécula de Tinidazol bajo la presentación de tabletas es muy selectivo, por lo que las muestras no fueron sometidas a condiciones drásticas como: hidrólisis ácida HCl 3 N, hidrólisis básica NaOH 3 N, oxidación H₂O₂, de igual manera no se realizó el estudio de estabilidad, por falta de reactivos, factores económicos y tiempo programado para realizar dicha investigación.

4.7.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES REACTIVAS

4.7.1.1 Ácido clorhídrico (HCL 0.1 N)

Con ayuda de una probeta de 1000 mL se midieron, 1000 mL de agua destilada que fueron transferidas a un matraz aforado de 2000 mL limpio y seco, al cual se le adicionaron 17 mL de ácido clorhídrico concentrado medidos con una probeta de 20 mL; se agitó por 5 minutos hasta homogenizar la solución posteriormente se aforó con agua destilada hasta los 2000 mL.

4.7.1.2 Preparación del estándar de tinidazol para la curva de calibrado

En la preparación de la solución madre; se utilizó un estándar secundario (ES) tinidazol base procedente de laboratorio Pfizer, con un grado de pureza de 99.9% según certificado de análisis mostrado por el LNCCM.

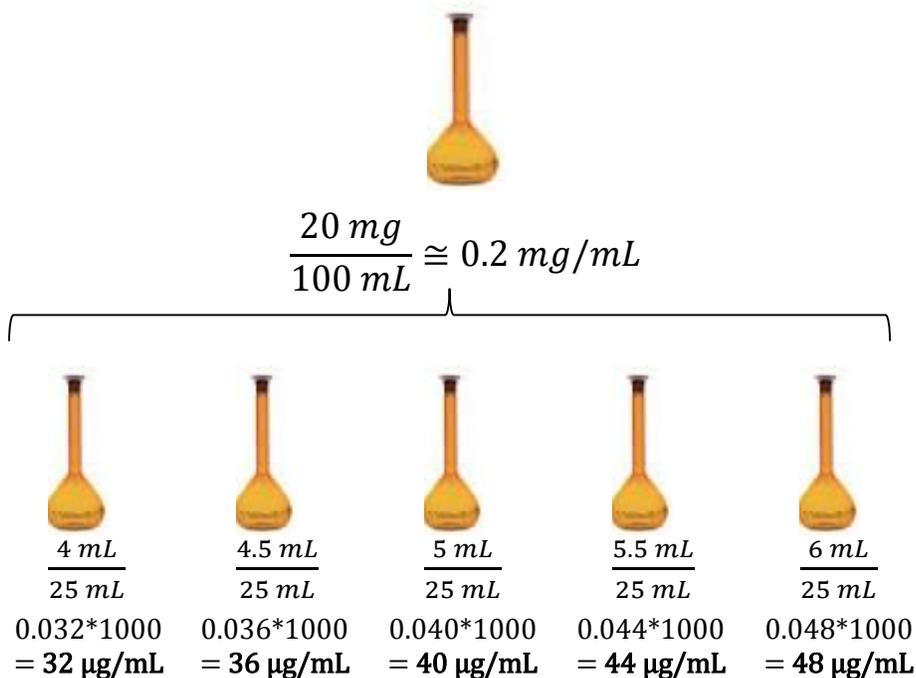
Se pesó con exactitud 20.05 mg, multiplicándose por el valor de la pureza declarada en la etiqueta del estándar para obtener el valor verdadero de tinidazol base 20.03 mg que se transfirió inmediatamente a un matraz volumétrico de 100 mL de color ámbar, y se disolvió con HCl 0.1 N, hasta la marca de aforo y se sonificó por 5 minutos.

$$\frac{20.05 \text{ mg}}{X} \cdot \frac{100\%}{99.9\%} = X = \frac{20.05 \text{ mg} \times 99.9\%}{100.0\%} = 22.03 \text{ mg de principio activo.}$$

$$\frac{22.03 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} = 0.2203 \text{ mg/mL Concentración madre}$$

Luego se prepararon a partir de la solución madre las cinco concentraciones para la curva de calibrado, siendo de 32, 36, 40, 44, 48, µg/mL respectivamente. Las cuáles fueron aforadas en matraces de 25 mL, con el mismo disolvente (HCl 0.1 N) y se agitaron de forma manual por 5 minutos. Posteriormente fueron leídos uno a uno en sentido creciente de concentración en el equipo y por triplicado a una longitud de onda de 276 nm.

Figura 4.7.1.2.1. Presentación esquemática de la preparación de la curva de calibrado de estándar de Tinidazol



4.7.1.3 Preparación de las muestras de tinidazol tabletas de 500 mg

4.7.1.3.1 Preparación de solución madre de tinidazol tabletas de 500 mg

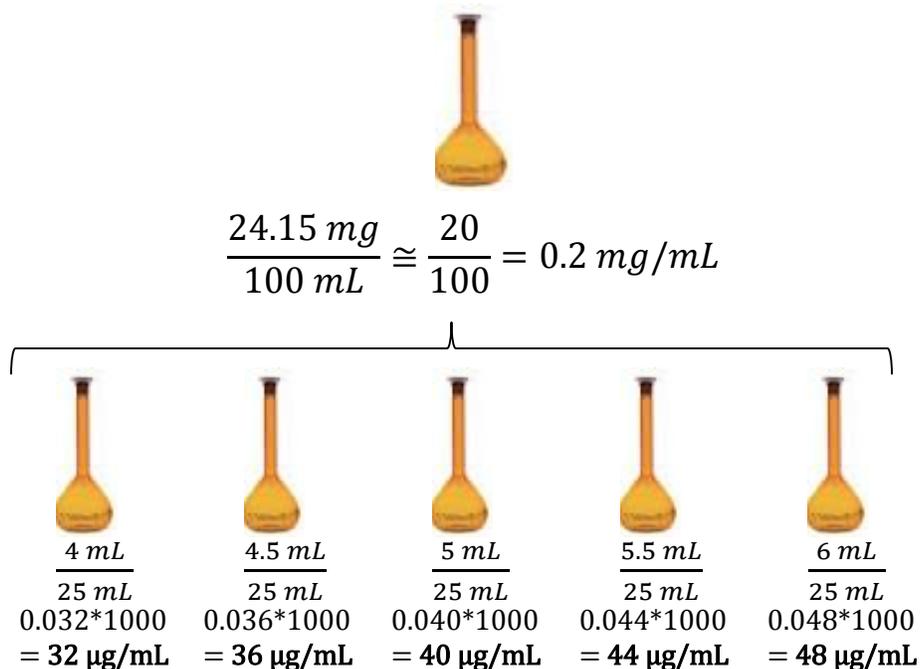
La cantidad declarada de Tinidazol por cada tableta es de 500 mg, la muestra se preparó considerando la curva de calibrado, tomando el punto medio de la misma para obtener una concentración del 100% del principio activo. Para obtener una muestra representativa se seleccionaron aleatoriamente 10 tabletas de 500 mg, siendo pesada individualmente cada tableta para obtener su peso promedio, posteriormente se pulverizó hasta obtener un polvo fino y homogéneo, que facilitó su disolución. De la muestra pulverizada se pesó en papel parafinado exactamente la cantidad de 24.15 mg equivalente a 20 mg de principio activo, luego se transfirió a un matraz aforado de 100 mL, seguidamente se disolvió con HCl 0.1 N hasta la marca de aforo, posterior a esto se sonificó por 5 minutos, luego se procedió a filtrar en papel filtro Whatman # 40 desechando los primeros 5 mL del filtrado.

$$\text{Cantidad de contenido a pesar} = \frac{603.75 \text{ mg (contenido)} \times 20 \text{ mg (principio activo)}}{500 \text{ mg (concentracion declarada)}} = 24.15 \text{ mg}$$

Se prepararon a partir de la solución madre 5 soluciones de muestra a las siguientes concentraciones 32, 36, 40, 44, 48 µg/ mL (80%, 90%, 100%, 110%, 120%), en matraces aforado de 25 mL, se le agregaron 10 mL de HCl 0.1 N seguidamente se sonificó por 5 minutos, se dejó enfriar y se terminó de aforar. Posteriormente se analizó por triplicado cada solución en sentido creciente de concentraciones a una longitud de onda de 276 nm

En la especialidad farmacéutica los límites de especificaciones suelen establecerse entre 95% - 105% a liberación, 90% - 110% a caducidad, respecto al valor nominal, en materia prima los límites son de 98% - 102% o 99% - 101%. Debido a esto se suele evaluar la linealidad de los métodos en un rango más amplio, las ICH recomiendan del 80% - 120% (Aguirre, 2001)

Figura 4.7.1.3.2 Presentación esquemática de la preparación de la curva de calibrado de tinidazol tableta de 500 mg



4.8 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE DISOLUCIÓN Y MUESTRAS PARA EL TEST DE DISOLUCIÓN

4.8.1 ÁCIDO CLORHÍDRICO (HCl 0.1 N)

Con ayuda de una probeta de 1000 mL se midieron, 3000 mL de agua destilada que fueron transferidas a un bidón plástico de 20 L limpio y seco, al cual se le adicionaron 66 mL de ácido clorhídrico concentrado, con una probeta de 50 mL; se agitó vigorosamente por 5 minutos hasta homogenizar la solución posteriormente se adicionó agua destilada hasta alcanzar un volumen de aforo de 8 L.

4.8.2 Preparación de la solución muestra tinidazol para el ensayo de disolución

Se pesó individualmente 6 tabletas de tinidazol 500 mg en la balanza analítica para obtener su peso promedio. Cuando el disolutor alcanzó la temperatura deseada se procedió a colocar cada una de las tabletas en una estación del disolutor con un minuto de diferencia entre cada una. Al terminar el tiempo de prueba se tomaron de cada estación 10 mL de muestra filtrada, colocándolas en tubos de ensayo y que fueron leídas por triplicado a una longitud de onda de 276 nm

4.9 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

Según la USP 36 el presente trabajo corresponde con la categoría I en el cual se evaluarán las características de desempeño analítico: especificidad, linealidad, precisión, exactitud, se incluirán límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y robustez. También corresponde a la categoría III, debido que se procede a aplicar la prueba de disolución. (USP 36 <1225>, 2013)

4.9.1 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL SISTEMA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO TINIDAZOL

4.9.1.1 Linealidad del sistema

Para la determinación de la linealidad del sistema, se preparó una curva de calibrado a partir de 5 soluciones estándar con niveles de concentración diferentes de 32, 36, 40, 44, 48 µg/mL (80%, 90%, 100%, 110%, 120%), cada una se analizó por triplicado en sentido creciente a la concentración a una longitud de onda de 276 nm.

4.9.1.1.1 Criterio de aceptación de linealidad del sistema

Los parámetros que nos permitieron valorar la linealidad del sistema fueron los siguientes:

Tabla Nº 4.9.1.1.1 Criterio de aceptación de linealidad del sistema

Parámetro	Criterio de aceptación
Coeficiente de correlación lineal (r)	$r \geq 0.9900$
• Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.9980$
• Pendiente b	$t_{\text{pendiente}} > t_{\text{tab}}$
• Intercepto a	$t_{\text{intercepto}} < t_{\text{tab}}$
• Intervalo de confianza para la pendiente	El intervalo debe incluir el cero
• Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo no debe incluir al cero
• Coeficiente de variación	$CV \leq 2\%$
• Test de Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$
• Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe de reflejar ninguna tendencia

4.9.1.2 Precisión del sistema

La evaluación de la precisión del sistema se realizó en condiciones de repetibilidad.

4.9.1.2.1 Repetibilidad del sistema

En el caso de la repetibilidad se prepararon 10 diluciones determinando 10 lecturas de la concentración del punto medio del calibrado del estándar siendo de 40 µg/mL.

4.9.1.2.1.1 Criterio de aceptación

- Media.
- Desviación estándar.
- Coeficiente de variación $\leq 2\%$.

4.9.1.3 Limite de detección y límite de cuantificación

Ambos límites se determinaron matemáticamente según las ecuaciones 1 y 2.

4.9.1.4 Exactitud

La Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH), recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado en el procedimiento.

Para ello se prepararon tres soluciones individuales de estándar, con concentraciones finales de 32, 40 y 44 µg/mL correspondiente a los dos puntos extremos y punto medio de la curva de calibrado, las cuales fueron leídas de manera intercalada por triplicado cada uno de ellos a una longitud de onda de 276 nm.

4.9.1.4.1 Criterio de aceptación de exactitud

- Porcentaje de recuperación: tableta 90.0% - 110.0%
- Homogeneidad de variancias (Test Cochran): $G_{exp} < G_{tab}$
- Test de t Student: $t_{exp} < t_{tab}$

4.10 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ACTIVO TINIDAZOL 500 MG

4.10.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Al igual que en la linealidad del sistema se preparó una curva de calibrado con 5 disoluciones a partir de las muestras de tinidazol previamente homogenizadas como en el inciso 4.7.1.3.1 para obtener las concentraciones finales de 32, 36, 40, 44, 48 µg/mL (80, 90, 100, 110, 120 %) . Cada una se analizó por triplicado a una longitud de onda 276 nm.

Tabla N° 4.10.1.1 Criterio de aceptación de linealidad del método

Parámetro	Criterio de aceptación
• Coeficiente de correlación lineal (r)	$r \geq 0.9900$
• Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.9980$
• Pendiente b	$t_{\text{pendiente}} > t_{\text{tab}}$
• Intercepto a	$t_{\text{intercepto}} < t_{\text{tab}}$
• Intervalo de confianza para la pendiente	El intervalo debe incluir el cero
• Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo no debe incluir al cero
• Coeficiente de variación	$CV \leq 2\%$
• Test de Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$
• Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe de reflejar ninguna tendencia

4.10.2 PRECISIÓN DEL MÉTODO

4.10.2.1 Repetibilidad del método

Esta prueba se realizó analizando la muestra en un mismo laboratorio, bajo la mismas condiciones de operación por el mismo analista, en un período corto tiempo con los mismos aparatos y reactivos. Se prepararon 10 soluciones de muestra al 100 %, según como se indica en el inciso 4.7.1.3.1 y se analizaron uno a uno a una longitud de onda de 276 nm.

4.10.2.1.1 Criterios de aceptación de repetibilidad

- Media
- Desviación estándar
- Coeficiente de variación $\leq 2\%$

4.10.2.2 Precisión intermedia

La precisión intermedia se realizó por dos analistas en dos días diferentes. Por cada analista se prepararon 6 soluciones de muestras independientes al 100 % como se indica en el inciso 4.7.1.3.1.

4.10.2.2.1 Criterios de aceptación de la precisión intermedia

- Coeficiente de variación $\leq 2\%$
- Coeficiente de variación global $\leq 2\%$.
- Análisis de la varianza con el test de Fischer $F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$

4.10.3 ROBUSTEZ

La evaluación de la robustez se realizó con una sola modificación a las condiciones normales de trabajo, como fue el cambio de la lámpara espectrofotométrica, por una nueva. No se realizaron modificaciones de longitud de onda, medio de disolución, temperatura y concentración, debido que este método fue desarrollado por el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos (LNCCM) del Ministerio de Salud, el cual durante el desarrollo del método se realizaron todas las posibles modificaciones, concluyendo que las condiciones evaluadas en nuestro trabajo son adecuadas para el análisis.

Dentro de las disposiciones del LNCCM, decidieron cambiar la lámpara por una nueva para verificar que el método sigue siendo robusto y comprobar que no existen variaciones en los resultados.

Para este parámetro se preparó una solución muestra al 100 % siguiendo el procedimiento escrito en 4.7.1.3.1. Se determinó el porcentaje promedio recuperado, el coeficiente de variación y la diferencia absoluta para cada longitud de onda.

4.10.3.1 Criterios de aceptación

- Coeficiente de variación global $\leq 2\%$

4.11 TEST DE DISOLUCIÓN

Para la prueba de disolución se prepararán las condiciones del método como se indica en el inciso 4.8.2 posteriormente se procedió a preparar el medio de disolución como se indica en el inciso 4.8.1.

4.11.1 CRITERIO DE ACEPTACIÓN

- Valor de Q para 45 minutos; Q no debe ser menor del 75 % en 45 min
- Coeficiente de variación $\leq 2\%$

4.12 REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIALES

Tabla N° 4.12.1 Reactivos

Reactivos							
Nº	Nombres	Fórmula Química	Marca	Grado	Lote	Procedencia	Fecha de vencimiento
1	Agua Bidestilada	H ₂ O	-	Analítica	-	LNCCM	-
2	Ácido Clorhídrico	HCl	Merck	Reactivo	121494	SINTER	Agosto-2017
3	Estándar Tinidazol Base Pureza 99.9%	C ₈ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	Pfizer	Estándar Secundario	003120 -Qes- 17	Laboratorios Pfizer	Junio -2016

Tabla N° 4.12.2 Materiales

Cantidad	Materiales	Capacidad	Marca	Clase/ Tolerancia
1	Recipiente graduado plástico	20 L	Nalgine	-
3	Matraz aforado	2000 mL	Pyrex	A/ ± 0.4 mL
6	Matraz ámbar aforado	100 mL	Pyrex	A/ ± 0.1 mL
6	Matraz ámbar aforado	50 mL	Pyrex	A/ ± 0.1 mL
20	Matraz ámbar aforado	25 mL	Pyrex	A/ ± 0.04mL
6	Beaker	100 mL	Pyrex	A
6	Beaker	50 mL		A
2	Mortero y pilón	-	-	-
2	Espátula de acero inoxidable	-	-	-
6	Filtro para disolutor	10 micron	Hanson Resord	P/N 27/101-091
1	Pipeta volumétrica	10 mL		A/±0.01mL
2	Probeta	10 mL	Pyrex	A
2	Probeta	25 mL	Pyrex	A
2	Probeta	50 mL	Pyrex	A
2	Probeta	100 mL	Pyrex	A
1	Probeta	1000 mL	Pyrex	A

Tabla No 4.12.3 Equipos

Equipos					
Nº	Nombres	Marca	Modelo	Nº Serie	Muestra de verificación de calibración
1	Balanza Analítica	Ohaus Explorer	EX 224	B441115826	3 FEB 2015
2	Ultrasonificador	Aquasonic	P250T	0802-10-10	.
3	Espectrofotómetro UV-Visible Detector de arreglo de Diodo DAD	Agilent	8453	CN02501472	08 DIC 2014
4	Disolutor	Hanson Resord	SR8Plus	0802-10-10Z	-

Nota: Los equipos instrumentales están verificados y calibrados por la empresa **ORGOMA** garantizando el cumplimiento de la norma **NTN-04-001-05 “Requisito Generales para la Competencia de Laboratorios de Ensayo y de Calibración”**, Se anexa en este trabajo la carta extendida por el **LNCCM. Anexo N° 1.**

CAPÍTULO V

ORGANIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS



5.1 TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA UV-VISIBLE CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODO (DAD) Y CELDA DE CUARZO DE 1 CM

Todos los parámetros se evaluaron con un nivel de confianza de 95%.

5.1.1 PARÁMETROS DEL SISTEMA

5.1.1.1 Adecuación del sistema

Se verificó la adecuación del sistema analítico observando su capacidad para detectar el analito de forma inequívoca sin interferencias de otro compuesto y/o sustancias que puedan estar presentes en una misma muestra. Para comprobar la adecuación del sistema, se preparon diez soluciones estándar al 100 % y se realizaron 10 lecturas a una longitud de onda de 276 nm.

Tabla N° 5.1.1.1.1 Tratamiento estadístico de la aptitud del sistema

Aptitud del Sistema		
Nº de muestra	Concentración 40 µg/mL (100%)	Absorbancias
1	100	0.95894
2	100	0.95855
3	100	0.95801
4	100	0.95862
5	100	0.95956
6	100	0.96432
7	100	0.95885
8	100	0.95965
9	100	0.95986
10	100	0.95694
Promedio		0.95933
Desviación estándar		0.00195
CV %		0.00203

Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Programa Microsoft Excel 2010

El ensayo de adecuación del sistema cumple con las especificaciones establecidas, debido a que las absorbancias de las muestras registraron un coeficiente de variación menor al 2%.

5.1.1.2 Linealidad del sistema

Para la determinación de la linealidad se prepararon 5 soluciones estándar a concentraciones de 32, 36, 40, 44, 48 µg/mL (80%, 90%, 100%, 110%, 120%), como se indica en el inciso 4.7.1.2, se realizaron análisis por triplicado de cada solución a una longitud de onda de 276 nm obteniendo los siguientes resultados:

Tabla N° 5.1.1.2.1 Evaluación de la curva de calibración del sistema de tinidazol

Linealidad del Sistema de Tinidazol Base					
X (Concentración)	Y (Abs.)	F = Y/X Factor de Respuesta	Promedio	Desviación Estándar	Varianza
32 µg/mL (80%)	0.7743	0.0097	0.00972	0.00005	2.5 x 10 ⁻⁰⁹
	0.7821	0.0098			
	0.7769	0.0097			
36 µg/mL (90%)	0.8673	0.0096	0.00965	0.00005	2.8 x 10 ⁻⁰⁹
	0.8740	0.0097			
	0.8647	0.0096			
40 µg/mL (100%)	0.9614	0.0096	0.00965	0.00003	8.8 x 10 ⁻¹⁰
	0.9650	0.0096			
	0.9673	0.0097			
44 µg/mL (110%)	1.0616	0.0097	0.00966	0.00002	4.3 x 10 ⁻¹⁰
	1.0611	0.0096			
	1.0653	0.0097			
48 µg/mL (120%)	1.1578	0.0096	0.00965	0.00002	4.2 x 10 ⁻¹⁰
	1.1555	0.0096			
	1.1604	0.0097			
Coefficiente Correlación		0.9997			
Coefficiente Determinación		0.9994			
Intercepto		0.0121			
Pendiente		0.0095			

Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Programa Microsoft Excel 2010

En la tabla 5.1.1.2.1 se reflejan los datos proporcionados por el software Chemstation Agilent 8453 series, para la verificación de estos datos se procedieron a calcular estadísticamente la pendiente (b), el intercepto (a), el coeficiente de determinación (r) y el coeficiente de correlación (r²).

Coefficiente de correlación

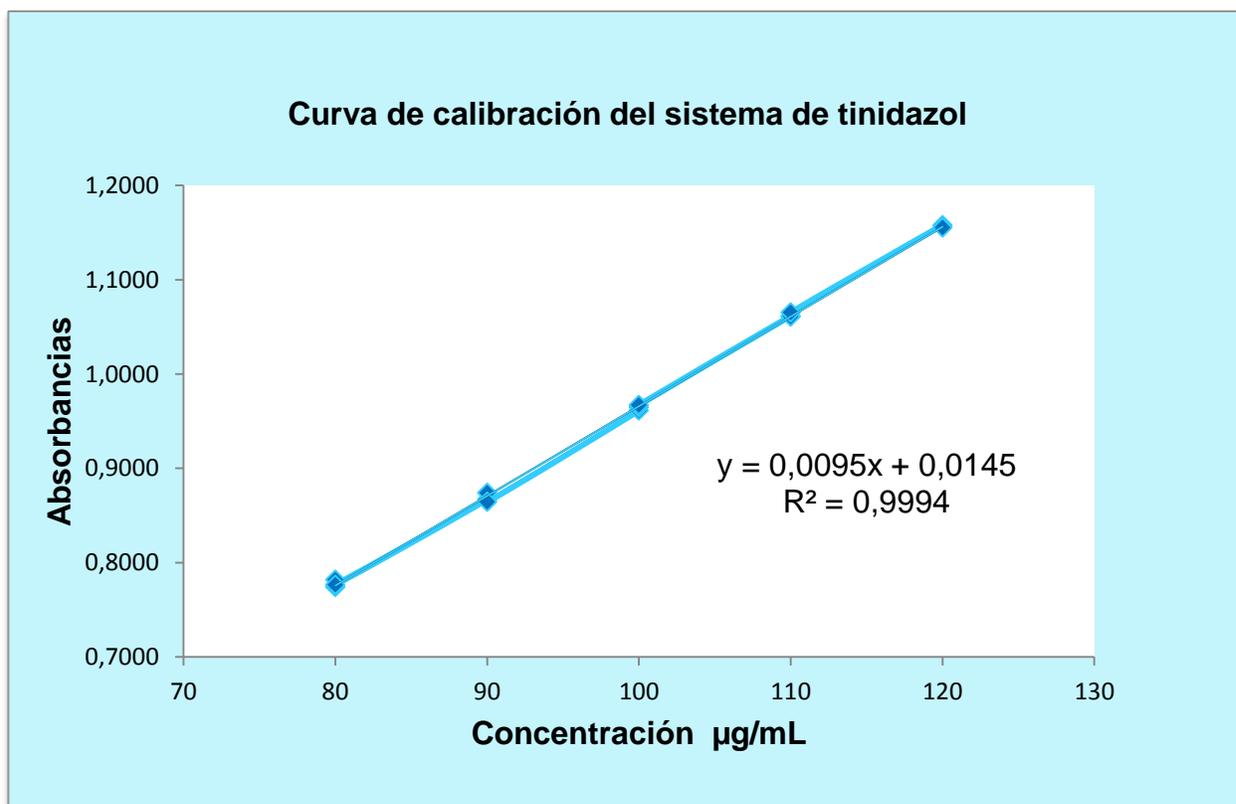
$$r = \frac{\sum_i^n [(x_i - \bar{X})(y_i - \bar{Y})]}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{X})^2 \sum_i (y_i - \bar{Y})^2}} = 0.9997 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Coefficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = 0.9997^2 = 0.9994 \quad (\text{Ecuación 4})$$

A continuación se presenta el calibrado y la ecuación de la recta, en ella se observa una proporcionalidad entre concentración y las absorbancias.

Gráfico N° 5.1.1.2.1.1 Curva de calibración en absorbancias de Tinidazol en UV-visible



Fuente: Espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453

5.1.1.2.2 Ecuación de la recta de la linealidad en espectrofotometría UV-visible

Por lo tanto la ecuación de la recta de la curva de calibración, se expresa de la siguiente manera $y = 0.0095x + 0.0121$ con $r = 0.99970$ y $r^2 = 0.9994$.

La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y = b x + a$.

Dónde:

b: es la pendiente

x: es la concentración del analito

a: es la ordenada en el origen, obtenida por un método de ajuste. (Aguirre, 2001)

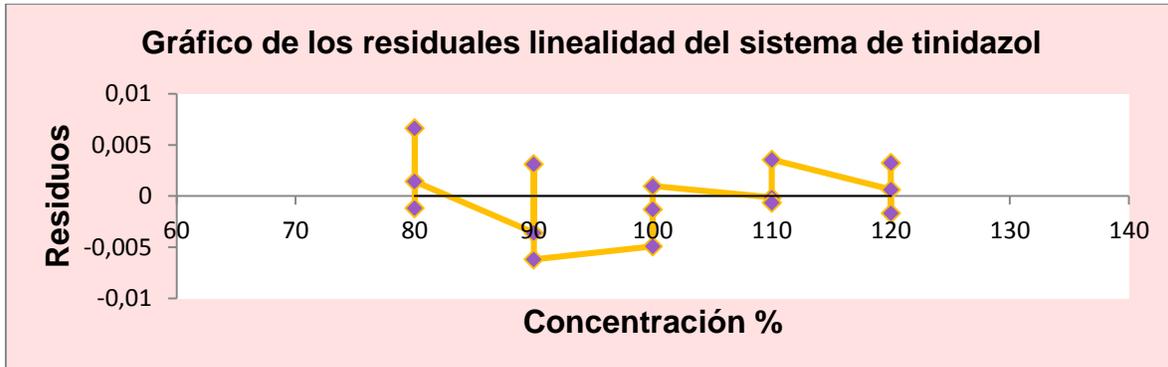
Se utilizó el método de los mínimos cuadrados, que consiste en ajustar estos parámetros para minimizar la suma de los cuadrados de los residuales y obtener funciones lineales. (Skoog, 2003)

Tabla N° 5.1.1.2.2.1 Análisis de los mínimos cuadrados en los datos de la linealidad del sistema de tinidazol.

X Conc. (µg/mL)	Y Abs.	$(x_i - \bar{X})$	$(x_i - \bar{X})^2$	$(y_i - \bar{Y})$	$(y_i - \bar{Y})^2$	$(x_i - \bar{X})(y_i - \bar{Y})$	$\sum x_i^2$	$\hat{Y} = b \cdot x + a$	ei = ($\hat{y} - y$) residuales
32	0.7743	-20.0000	400.0000	-0.1920	0.0369	3.8403	6400	0.7755	0.0012
32	0.7821	-20.0000	400.0000	-0.1842	0.0339	3.6843	6400	0.7755	
32	0.7769	-20.0000	400.0000	-0.1894	0.0359	3.7883	6400	0.7755	
36	0.8673	-10.0000	100.0000	-0.0990	0.0098	0.9901	8100	0.8709	0.0036
36	0.8740	-10.0000	100.0000	-0.0923	0.0085	0.9231	8100	0.8709	
36	0.8647	-10.0000	100.0000	-0.1016	0.0103	1.0161	8100	0.8709	
40	0.9614	0.0000	0.0000	-0.0049	0.0000	0.0000	10000	0.9663	0.0049
40	0.9650	0.0000	0.0000	-0.0013	0.0000	0.0000	10000	0.9663	
40	0.9673	0.0000	0.0000	0.0010	0.0000	0.0000	10000	0.9663	
44	1.0616	10.0000	100.0000	0.0953	0.0091	0.9529	12100	1.0617	0.0001
44	1.0611	10.0000	100.0000	0.0948	0.0090	0.9479	12100	1.0617	
44	1.0653	10.0000	100.0000	0.0990	0.0098	0.9899	12100	1.0617	
48	1.1578	20.0000	400.0000	0.1915	0.0367	3.8297	14400	1.1572	-0.0006
48	1.1555	20.0000	400.0000	0.1892	0.0358	3.7837	14400	1.1572	
48	1.1604	20.0000	400.0000	0.1941	0.0377	3.8817	14400	1.1572	
$\Sigma=1500.0$	14.4947	0.0000	$\Sigma=3000.00$	0.0000	$\Sigma=0.2733$	28.6280	$\Sigma=153000$		
$\bar{X}=100.0$	0.9663	0.0000	200.00	0.0000	0.0182	1.9085			

Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Programa Microsoft Excel 2010

Gráfico N° 5.1.1.2.2.1.1 Análisis de residuales de la linealidad del sistema



Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Programa Microsoft Excel 2010

La distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ningún patrón demostrando que son independientes o no correlacionados, como podemos observar en el gráfico de residuales se aprecia que para el método analítico por espectrofotometría UV-visible se ajusta bien a los datos, por lo tanto, el sistema es válido.

La ecuación utilizada para \hat{y} fue la siguiente

$$\hat{y} = b * x + a \quad (\text{Ecuación 5})$$

Conviene definir los valores de las variables S_{xx} , S_{yy} y S_{xy} para encontrar la pendiente y el intercepto:

1. S_{xx} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x.

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Dónde:

x_i = pares de datos individuales de x

\bar{x} = valor medio o promedio de las variables (x)

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = 3000.0000$$

2. S_{yy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de y.

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Dónde:

y_i = pares de datos individuales de y

\bar{y} = valores medio o promedios de las variables (y)

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = 14.2798 - \frac{210.0963}{15} = \mathbf{0.2733}$$

3. S_{xy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x e y.

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \quad (\text{Ecuación 8})$$

$$S_{xy} = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$$

$$S_{xy} = 1478.09 - \frac{21742.05}{15} = \mathbf{28.6280}$$

Para encontrar la ecuación de la recta es necesario encontrar la pendiente y el intercepto a partir de los datos calculados de la suma de los cuadrados.

Ecuación de la pendiente (b):

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (\text{Ecuación 9})$$

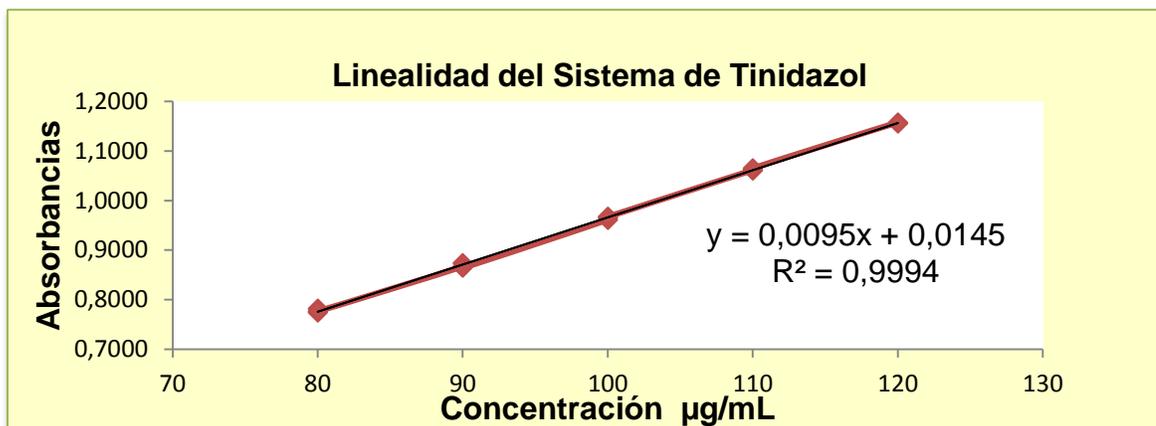
$$b = \frac{28.6276}{3000} = \mathbf{0.0095}$$

Ecuación del intercepto (a):

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$a = 0.9663 - (0.009543 * 100.0000) = \mathbf{0.0121}$$

Gráfico N° 5.1.1.2.2.1.2 Linealidad del sistema de Tinidazol en espectrofotometría UV-visible



Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series

Según el valor de la pendiente, la sensibilidad del método es de 0.0095 y el sesgo del método es de 0.0121 indicado por el valor del intercepto con $r = 0.9997$ y $r^2 = 0.9994$ (Boris Duffau et al., 2010)

5.1.1.2.3 Test de linealidad: test de student para la pendiente (b) en UV-visible

Para demostrar que existe una pendiente significativamente distinta de cero se aplicó la prueba de t Student, para $n-2$ grados de libertad = 13 en un nivel de confianza del 95% y con un grado de significación $\alpha = 0.05$ ($\alpha/2 = t_{0.975, 13}$), el valor crítico en la tabla de la distribución T-Student es 2.160.

Para esta prueba debe de cumplirse que $t_{exp} > t_{tab}$.

Hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = 0$$

$$H_1: \mu_1 \neq 0$$

Dónde:

$\mu_1 =$ corresponde a la pendiente

Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{s_b} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Dónde:

|b|: Valor absoluto de la pendiente

S_b: Desviación estándar de la pendiente

Para calcular el **t_{exp}** es necesario calcular primero la desviación estándar de la regresión (**S_r**) para poder obtener la desviación estándar de la pendiente **S_b**.

Desviación estándar de la regresión (S_r)

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad (\text{Ecuación 12})$$

$$S_r = \sqrt{\frac{0.2733 - ((0.0095425)^2 * 3000)}{15 - 2}}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{0.2733 - 0.273178}{13}}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{0.000122}{13}} = \sqrt{9.3846 \times 10^{-06}} = 0.0030634 \cong 3.0634 \times 10^{-03}$$

Desviación estándar de la pendiente (S_b)

Hipótesis:

$$H_0: t_{exp} < t_{tab}$$

$$H_1: t_{exp} > t_{tab}$$

Para esta prueba debe de cumplirse que $t_{exp} > t_{tab}$

$$S_b = \sqrt{S_r^2 / S_{xx}} = \quad (\text{Ecuación 13})$$

$$S_b = \sqrt{(0.0030634)^2 / 3000.000} = \sqrt{3.12 \times 10^{-09}} = 5.5929 \times 10^{-05}$$

Se obtiene:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} = \frac{0.0095425}{5.5929 \times 10^{-05}} = \mathbf{170.6181}$$

Se comprueba estadísticamente que existe una pendiente diferente de cero, obteniendo el t_{exp} mayor que al t_{tab} , siendo el t_{exp} de **170.6181** > t_{tab} **2.160**, lo que demuestra que existen diferencias significativas.

El intervalo de confianza confirma lo demostrado por el test de Student la pendiente no incluye el cero. El intervalo de confianza (IC) para la pendiente se calcula:

$$\begin{aligned} \mathbf{IC_b = b \pm t * S_b =} & \qquad \qquad \qquad \mathbf{(Ecuación 14)} \\ & 0.0095425 \pm 2.160 * 5.5929 \times 10^{-05} \\ & 0.0095425 \pm 1.2081 \times 10^{-04} \\ & \mathbf{9.4217 \times 10^{-03} \text{ a } 9.6333 \times 10^{-03}} \end{aligned}$$

5.1.1.2.4 Test de proporcionalidad: test de Student para el intercepto (a) en UV-visible

Mediante este test se evaluó que la recta pasa por el origen de coordenadas, determinando que la variable independiente (x) es significativamente distinta de cero. Cabe mencionar, que el valor crítico en la tabla de la distribución T-Student es 2.160, para n-2 grados de libertad y un grado de significancia de $\alpha=0.05$

Para esta prueba debe de cumplirse que $t_{exp(a)} < t_{tab}$

Hipótesis:

$$H_0: t_{exp(a)} > t_{tab}$$

$$H_1: t_{exp(a)} < t_{tab}$$

Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_a = \frac{|a|}{S_a} \qquad \qquad \qquad \mathbf{(Ecuación 15)}$$

$|a|$ = valor absoluto del intercepto

S_a =Desviación estándar del intercepto

Se calculó primero la desviación estándar del intercepto:

$$S_a = S_r * \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}} \quad (\text{Ecuación 16})$$

$$S_a = 0.0030634 * \sqrt{\frac{1}{15 - (2250000/153000)}}$$

$$S_a = 0.0030634 * \sqrt{\frac{1}{15 - 14.70588235}}$$

$$S_a = 0.0030634 * \sqrt{\frac{1}{0.294118}}$$

$$S_a = 0.0030634 * \sqrt{3.399996}$$

$$S_a = 0.0030634 * 1.843908$$

$$S_a = \mathbf{0.0056486} \cong \mathbf{5.6486 \times 10^{-03}}$$

$$t_{\text{exp}(a)} = \frac{a}{S_a} = \frac{0.0121}{0.0056486} = \mathbf{2.142124}$$

Se cumplió que $t_{\text{exp}(a)} < t_{\text{tab}}$. Para calcular el t_{tab} de dos cola, para $n-2$ grados de libertad = 13 en un nivel de confianza del 95% y con un grado de significación $\alpha = 0.05$ ($\alpha/2 = t_{0.95, 13}$), el valor crítico en la tabla de la distribución T-Student es 2.160, siendo $t_{\text{exp}(a)} 2.142124 < t_{\text{tab}} 2.160$; se comprueba que la variable x es diferente de cero y que la recta pasa por el origen de coordenadas.

El intervalo de confianza confirma lo demostrado por el test de Student donde el intercepto incluye el cero. El intervalo de confianza (IC) para el intercepto se calcula:

$$IC_a = a \pm t * S_a$$

(Ecuación 17)

$$0.0121 \pm 2.160 * 0.0056486$$

$$0.0121 \pm 0.01220$$

$$-0.0001 \text{ a } 0.0243$$

5.1.1.2.5 Test G de Cochran varianza de los factores de respuesta

La prueba de Cochran se realizó para determinar si el factor de concentración tiene influencia en la variabilidad de las respuestas

$$G_{exp} = \frac{S^2_{m\acute{a}xima}}{\sum S_i^2} \quad \text{(Ecuación 18)}$$

Dónde:

$S^2_{m\acute{a}xima}$: Varianza máxima de los grupos

$\sum S_i^2$: Sumatoria de la varianza de cada grupo

El valor crítico de Cochran se determina $C = (K, \nu, \alpha)$

Dónde:

K; es el número de grupo de datos o números de réplicas

ν ; es el número de grados de libertad definido como $n_{max} - 1$, donde n_{max} es el mayor de los tamaños de la muestra

α ; el nivel de significancia es usualmente 0.05

El criterio de aceptación: si el $G_{exp} < G_{tab}$ significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor de concentración no influye estadísticamente en la variabilidad de los resultados.

5.1.1.2.5.1 Prueba de homogeneidad de las varianzas

Tabla N° 5.1.1.2.5.1 Test G de Cochran Varianza de los factores de respuesta del sistema de Tinidazol

Concentración (µg/ml) Variable x	Absorbancia (276 nm) Variable y	Factor respuesta f(y/x)	Promedio de f(y/x)	Desviación estándar (S) de f(y/x)	Varianza (S ²) de f(y/x)
32µg/mL (80%)	0.7743	0.0097	0.00972	0.00005	2.46 x 10 ⁻⁰⁹
	0.7821	0.0098			
	0.7769	0.0097			
36µg/mL (90%)	0.8673	0.0096	0.00965	0.00005	2.84 x 10 ⁻⁰⁹
	0.8740	0.0097			
	0.8647	0.0096			
40µg/mL (100%)	0.9614	0.0096	0.00965	0.00003	8.84 x 10 ⁻¹⁰
	0.9650	0.0096			
	0.9673	0.0097			
44µg/mL (110%)	1.0616	0.0097	0.00966	0.00002	4.35 x 10 ⁻¹⁰
	1.0611	0.0096			
	1.0653	0.0097			
48µg/mL (120%)	1.1578	0.0096	0.00965	0.00002	4.17 x 10 ⁻¹⁰
	1.1555	0.0096			
	1.1604	0.0097			
Promedio		0.00967	$\Sigma Si^2 = 7.0360 \times 10^{-09}$		
Desviación Estándar (S)		0.00004			
CV (%)		0.4136%			

Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Programa Microsoft Excel 2010

Homogeneidad de las varianzas

La homogeneidad de varianza se comprobó aplicando el test de Cochran.

La hipótesis es:

$$H_0 = G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$$

$$H_1 = G_{\text{exp}} > G_{\text{tab}}$$

El valor de G_{tab} de la distribución de Cochran para un grado de significación (α)= 0.05 a 5 niveles de concentración y 3 grados el valor es de 0.683.

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ máxima}}{\sum S_i^2}$$

$$G_{exp} \frac{S^2 \text{ máxima}}{\sum S_i^2} = \frac{2.84 \times 10^{-09}}{7.0360 \times 10^{-09}} = 0.4036$$

Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple la hipótesis donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x) $0.4036 < 0.683$.

5.1.1.2.6 Coeficientes de variación de los factores de respuestas

Esta prueba permitió relacionar las lecturas o respuestas en área y la concentración. Se recomienda obtener valores menores al 2% para ello se aplicó la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad (\text{Ecuación 19})$$

Dónde:

S = Desviación estándar

\bar{X} = media de los resultados

Así se tiene que, la desviación estándar de los factores de respuesta es de 0.00004 y la media global es de 0.00967 por tanto:

$$CV = \frac{0.00004}{0.00967} * 100 = 0.4136\%$$

Al aplicar la prueba de linealidad mediante los coeficientes de variación de los factores de respuesta CV se obtuvo como resultado un coeficiente de variación $CV < 2.0\%$, demostrándose la adecuada linealidad del sistema, de acuerdo con los límites establecidos.

5.1.1.2.7 Análisis de varianza

El análisis de la varianza de la regresión (ANOVA) es un método que se emplea para comparar resultados obtenidos por distintos métodos, laboratorios, analistas, etc., cuando el número de medias obtenidas es superior a dos. También permite separar las contribuciones de uno o más factores a la varianza global del sistema (Aguirre, 2001)

Tabla N° 5.1.1.2.7.1 Análisis de la varianza de los factores de respuesta del sistema de tinidazol en espectrofotometría UV-Visible

Análisis de Varianza		Análisis de Residual			Análisis de la Regresión	
Concentración (µg/mL)	Absorbancias	\hat{y} $\hat{y} = b * x + a$	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$
32 µg/mL (80%)	0.7743	0.7755	-0.0012	1.35 x 10 ⁻⁰⁶	-0.19	3.64 x 10 ⁻⁰²
	0.7821	0.7755	0.0066	4.41 x 10 ⁻⁰⁵	-0.19	3.64 x 10 ⁻⁰²
	0.7769	0.7755	0.0014	2.07 x 10 ⁻⁰⁶	-0.19	3.64 x 10 ⁻⁰²
36 µg/mL (90%)	0.8673	0.8709	-0.0036	1.29 x 10 ⁻⁰⁵	-0.10	9.11 x 10 ⁻⁰³
	0.8740	0.8709	0.0031	9.69 x 10 ⁻⁰⁶	-0.10	9.11 x 10 ⁻⁰³
	0.8647	0.8709	-0.0062	3.83 x 10 ⁻⁰⁵	-0.10	9.11 x 10 ⁻⁰³
40 µg/mL (100%)	0.9614	0.9663	-0.0049	2.41 x 10 ⁻⁰⁵	0.00	0.00
	0.9650	0.9663	-0.0013	1.72 x 10 ⁻⁰⁶	0.00	0.00
	0.9673	0.9663	0.0010	9.74 x 10 ⁻⁰⁷	0.00	0.00
44 µg/mL (110%)	1.0616	1.0617	-0.0001	1.96 x 10 ⁻⁰⁸	0.10	9.11 x 10 ⁻⁰³
	1.0611	1.0617	-0.0006	4.10 x 10 ⁻⁰⁷	0.10	9.11 x 10 ⁻⁰³
	1.0653	1.0617	0.0036	1.27 x 10 ⁻⁰⁵	0.10	9.11 x 10 ⁻⁰³
48 µg/mL (120%)	1.1578	1.1572	0.0006	4.01 x 10 ⁻⁰⁷	0.19	3.64 x 10 ⁻⁰²
	1.1555	1.1572	-0.0017	2.78 x 10 ⁻⁰⁶	0.19	3.64 x 10 ⁻⁰²
	1.1604	1.1452	0.0152	2.30 x 10 ⁻⁰⁴	0.18	3.20 x 10 ⁻⁰²
X = 100.0	0.97	0.95	SC_{RES} = 3.8144 x 10⁻⁰⁴		SC_{REG} = 2.6878 x 10⁻⁰¹	
	Σ=14.4947		V _{RES} = 2.9342 x 10 ⁻⁰⁵			

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

La ecuación utilizada para calcular \hat{y} , fue la siguiente

$$\hat{y} = b * x + a$$

Según (Aguirre, 2001), el análisis de la varianza se fundamentó en la suma de cuadrados totales la cual está conformada por dos componentes la suma de cuadrados de los residuales y la regresión $SCT = SC_{RES} + SC_{REG}$

Se calculó la Varianza residual ($S^2_{y,x}$) a partir de los datos de los mínimos cuadrados, con la siguiente ecuación:

Varianza Residual

$$V_{RES} = S^2_{y,x} = \frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n-2} \quad (\text{Ecuación 20})$$

$$V_{RES} = S^2_{y,x} = \frac{0.00038144}{15-2}$$

$$V_{RES} = S^2_{x,y} = 2.9338 \times 10^{-05}$$

$$SCT = SC_{RES} + SC_{REG} \quad (\text{Ecuación 21})$$

$$SCT = 3.8144 \times 10^{-04} + 2.6878 \times 10^{-01}$$

$$SCT = \mathbf{0.2692}$$

Varianza de la Regresión

$$V_{REG} = S^2_{y^*} = \frac{\sum(Y_i - \bar{y})^2}{N} \quad (\text{Ecuación 22})$$

$$V_{REG} = S^2_{y^*} = \frac{2.6878 \times 10^{-01}}{15} = \mathbf{0.01792}$$

Una vez realizada la homogeneidad de varianzas y cálculo residuales se realizó el cálculo de Fisher (F), donde debe de cumplirse que $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$.

La Hipótesis es:

$$H_0 = F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$$

$$H_1 = F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$$

$$F = \frac{V_{\text{REG}}}{V_{\text{RES}}} \quad (\text{Ecuación 23})$$

$$F = \frac{0.01792}{2.9338 \times 10^{-04}} = \mathbf{610.8119}$$

Por lo tanto Fisher será: $610.8119 > F_{\text{tab}}(0.05, 1, n-2) = 4.67$ cumpliendo el criterio de aceptación, demostrando la existencia de una pendiente diferente de cero.

Se validó la linealidad de la metodología del sistema, para lo cual se partió de una solución concentrada de estándar de tinidazol, preparando una curva de calibrado con cinco niveles de concentración del analito en el rango de trabajo de 80%-120%.

Con respecto a la evaluación de los coeficientes de determinación r^2 y de correlación r en el sistema demostraron correlación entre la concentración (%) y la señal obtenida (Absorbancias).

Se aplicaron diferentes test estadísticos para demostrar la linealidad del sistema, incluyendo el ajuste de la curva de calibración por el análisis de los mínimos cuadrados, pudiéndose obtener los valores de la pendiente y el intercepto, aplicando el t de Student para demostrar que existe diferencia significativa.

Con la aplicación del test de Cochran se demostró la homogeneidad de varianza. Se realizó el análisis de la varianza de la regresión ANOVA, se evaluaron los residuos y se determinó que estos son independientes y tienen distribución normal, presentando homocedasticidad y que la relación entre concentración y absorbancias es lineal.

De igual manera se aplicó el test estadístico F de Fisher para verificar la linealidad, bajo la evidencia muestral y con un nivel de confianza de 95%, no se encontró diferencias significativas entre las concentraciones de los niveles estudiados, obteniendo un valor de F de Fisher experimental mayor que el valor de F tabulado, indicando regresión.

5.1.1.3 Precisión del sistema en espectrofotometría UV-VIS

Para la evaluación del parámetro de la precisión se trabajó con muestras de estándar de Tinidazol con un grado de pureza de 99.9%; mediante la valoración de condiciones de repetibilidad y precisión intermedia del sistema

5.1.1.3.1 Repetibilidad del sistema en espectrofotometría UV-VIS

La repetibilidad se realizó mediante la evaluación de 10 determinaciones, se trabajó con la concentración media de trabajo de 40 µg/mL (100%), para ello se determinaron valores de la media, desviación estándar, y los coeficientes de variación en función del factor de respuesta

Tabla N° 5.1.1.3.1.1 Evaluación estadística de repetibilidad del sistema de tinidazol

N° de lecturas	Concentración 40µg/mL (100%)	Absorbancias (276 nm)	Factor de Respuestas f=y/x	Datos del factor de respuesta f(y/x)	
				Media	(S)
1	100	0.9714	0.0097	0.0097	1.2 x 10 ⁻⁰⁵
2	100	0.9708	0.0097		
3	100	0.9734	0.0097		
4	100	0.9737	0.0097		
5	100	0.9742	0.0097		
6	100	0.9739	0.0097		
7	100	0.9745	0.0097		
8	100	0.9731	0.0097		
9	100	0.9724	0.0097		
10	100	0.9724	0.0097		
CV%				0.1237%	

Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Programa Microsoft Excel 2010

5.1.1.3.1.1.1 Evaluación estadística para la repetibilidad del sistema en espectrofotometría UV-visible

Los datos obtenidos se evaluaron con un tratamiento estadísticos con las siguientes especificaciones, según valores de la tabla 5.1.1.3.1.1

➤ **Media**

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} \quad (\text{Ecuación 24})$$

$$\bar{X} = \frac{0.0973}{10}$$

$$\bar{X} = 0.0097$$

➤ **Desviación estándar (S)**

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (\text{Ecuación 25})$$

$$S = \sqrt{\frac{1.3362 \times 10^{-09}}{9}}$$

$$S = \sqrt{1.4846 \times 10^{-10}}$$

$$S = 0.000012$$

En la precisión en condiciones de Repetibilidad en función del factor de respuesta se obtuvo una desviación estándar pequeña con un valor de 0.000012 indicando la buena precisión del sistema.

➤ **Coefficiente de variación (CV)**

El coeficiente de variación (CV) nos indica la relación existente entre la desviación de una muestra y su media. Al dividir la desviación típica por la media se convierte en un valor de unidad de medida. (Skoog, 2003)

El coeficiente de variación entre los datos se calcula utilizando la siguiente ecuación

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

$$CV = \frac{0.000012}{0.0097} * 100 = 0.1237\%$$

Se aprecia, que el CV% está por debajo de 2 % obteniendo un valor de 0.1237%, indicando que la técnica cumple con los parámetros establecidos, siendo el ensayo repetitivo y a la vez aceptable.

5.1.1.3.2 Límite de detección (LOD)

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{m} \quad (\text{Ecuación 1})$$

σ = es la desviación estándar de la respuesta de la muestra

m = es la pendiente de la curva de calibración para la linealidad

$$LOD = \frac{3.3 \times 0.000012}{0.0095425}$$

$$LOD = \frac{3.96 \times 10^{-05}}{0.0095425}$$

$$LOD = 0.0041 \mu\text{g/mL}$$

5.1.1.3.3 Límite de cuantificación (LOQ)

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Dónde:

σ = Es la desviación estándar de la respuesta de la muestra.

m = Es la pendiente de la curva de calibración para la linealidad

$$LOQ = \frac{10 \times 0.000012}{0.0095425}$$

$$LOQ = \frac{1.2 \times 10^{-04}}{0.0095425}$$

$$LOQ = 0.0125 \mu\text{g/mL}$$

5.1.1.4 Exactitud del sistema por espectrofotometría UV-visible

El parámetro de la exactitud, se evaluó a 3 concentraciones de trabajo de 32, 40 y 48 (µg/mL), con soluciones de estándar primario de tinidazol, las cuales corresponden a los dos puntos extremos y el medio de la curva de calibración, realizándose por triplicado cada punto de análisis obteniendo los siguientes resultados.

Tabla N° 5.1.1.4.1 Evaluación de la Exactitud del sistema de tinidazol

Nº de lectura	Concentración (%)	Absorbancias 276 nm	Factor de repuesta F=Y/X	Promedio de F(Y/X)	Desviación estándar (S) de F(Y/X)	Varianza (S ²) de F(Y/X)
1	32 µg/mL (80%)	0.7746	0.00968	0.00966	2.26 x 10 ⁻⁰⁵	5.0917 x 10 ⁻¹⁰
2		0.7710	0.00964			
3		0.7728	0.00966			
4	40 µg/mL (100%)	0.9740	0.00974	0.00972	1.86 x 10 ⁻⁰⁴	3.4641 x 10 ⁻¹⁰
5		0.9714	0.00971			
6		0.9704	0.00970			
7	48 µg/mL (120%)	1.1537	0.00961	0.00962	5.29238 x10 ⁻⁰⁶	2.8009 x 10 ⁻¹¹
8		1.1548	0.00962			
9		1.1537	0.00961			
Promedio \bar{x}			0.00967	$\Sigma Si^2 = 8.8359 \times 10^{-10}$		
Desviación Estándar (S)			4.667 x 10 ⁻⁰⁵			
CV%			0.4828%			

Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Programa Microsoft Excel 2010

5.1.1.4.1.1 Evaluación estadística de exactitud del sistema en UV-Vis

A continuación se presenta los resultados de la tabla 5.1.1.4.1 donde se reflejan los valores obtenidos con respecto a la media y desviación estándar

➤ **Media**

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} = \frac{0.0870}{9} = 0.00967$$

➤ **Desviación estándar (S)**

$$S = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$$

$$S = \sqrt{\frac{1.74221 \times 10^{-8}}{8}}$$

$$S = 4.667 \times 10^{-5}$$

Test de proporcionalidad: G de Cochran

Dónde: $G_{exp} < G_{tab}$

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ máxima}}{\sum S_i^2}$$

Dónde:

S^2 : varianza máxima de los grupos

$\sum S_i^2$: Sumatoria de la varianza de cada grupo

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ máxima}}{\sum S_i^2} = \frac{5.0917 \times 10^{-10}}{8.8359 \times 10^{-10}} = 0.5762$$

El valor de G_{tab} de la distribución de G de Cochran para un grado de significación $\alpha = 0.05$ a 3 niveles de concentración ($k=3$) y 2 grados de libertad, el valor crítico es de 0.966.

Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple la hipótesis donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x) $0.5762 < 0.966$.

5.1.1.5 Exactitud del método de tinidazol en Espectrofotometría

Cálculos para determinar el porcentaje de recuperación de Tinidazol 500 mg, tableta

Cantidad de principio activo (p.a) que declara cada tableta	500 mg
Peso promedio de las tabletas (mg)	594.4 mg
Cantidad pesada en polvo	23.776 mg
Cantidad de principio activo (p.a) en la muestra pesada (mg)	20 mg

Para la realización de esta tabla se realizaron los siguientes cálculos.

$$\text{Cantidad de p. a. en la muestra} = \frac{\text{cantidad pesada} \cdot \text{peso promedio de la tableta}}{\text{declaración de p.a en la tableta}}$$

$$\text{Cantidad de p. a. en la muestra} = \frac{20 \cdot 594.4 \text{ mg}}{500 \text{ mg}} = \mathbf{23.776 \text{ mg}}$$

$$\text{Concentración } \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = \frac{\text{cantidad de principio activo en la muestra}}{\text{volumen}} * 1000$$

$$\text{Concentración } \mu\text{g/mL} = \frac{20 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} * \frac{5 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} * 1000 = \mathbf{40 \mu\text{g/mL}}$$

$$\text{Concentración } \mu\text{g/mL} = \mathbf{40 \mu\text{g/mL}}$$

$$\mu\text{g/mL encontrado de p. a} = \frac{\text{Absorbancias de la muestra}}{\text{Absorbancias del estándar}} * \text{Concentración del estándar}$$

$$\text{Concentración } \mu\text{g/mL} = \frac{0.9566}{0.9618} * 40 = \mathbf{39.7837 \mu\text{g/mL}}$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{\mu\text{g/mL encontrado}}{\mu\text{g/mL que se inyectaron}} * 100$$

$$\text{Recuperación \%} = \frac{39.7837 \mu\text{g/mL}}{40.000 \mu\text{g/mL}} * 100 = \mathbf{99.46\%}$$

El procedimiento de cuantificación nos permitió calcular la cantidad de principio activo en la muestra sometida a análisis, y el promedio del porcentaje de recuperación obtenido fue de 99.46 % lo que indica que dicho valor está dentro de los rangos establecidos para el formulado farmacéutico 90.0% - 110.0%.

Tabla N° 5.1.1.5.1 Porcentaje de recuperación de Tinidazol Tableta 500 mg

Porcentaje de recuperación de Tinidazol Tableta 500 mg							
Declara principio activo en Tab/mg	Cantidad pesada mg de polvo (p.a + Excipientes) (mg)	Cantidad pesada principio activo (mg)	Concentración µg/mL	Absorbancias del Estándar	Absorbancias de la muestra	mg encontrados	% Recuperación
500	23.776	20	40.000	0.9618	0.9655	40.1539	100.3847
500	23.776	20	40.000	0.9618	0.9553	39.7297	99.3242
500	23.776	20	40.000	0.9618	0.9557	39.7463	99.3658
500	23.776	20	40.000	0.9618	0.9543	39.6881	99.2202
500	23.776	20	40.000	0.9618	0.9515	39.5716	98.9291
500	23.776	20	40.000	0.9618	0.9577	39.8295	99.5737
500	23.776	20	40.000	0.9618	0.9569	39.7962	99.4905
500	23.776	20	40.000	0.9618	0.9531	39.6382	99.0954
500	23.776	20	40.000	0.9618	0.9599	39.9210	99.8025
$\bar{x} = 500$	23.776	20	40.000	0.9618	0.9566	39.7860	99.4651

Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Programa Microsoft Excel 2010

Tabla N° 5.1.1.5.1.1 Test G de Cochran para el porcentaje de recuperación de tinidazol tableta 500 mg

N°	Concentración (µg/mL)	Recuperación	Promedio de % Recuperación	Desv. Estándar	Varianza
1	40 (100%)	100.3847	99.6916	0.6006	0.3608
2		99.3242			
3		99.3658			
4	40 (100%)	99.2202	99.2410	0.3228	0.1042
5		98.9291			
6		99.5737			
7	40 (100%)	99.4905	99.4628	0.3543	0.1255
8		99.0954			
9		99.8025			
Promedio		99.466	$\sum Si^2 = 0.5905$		
Desviación estándar (S)		0.432			
CV%		0.434%			

Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Programa Microsoft Excel 2010

Test de proporcionalidad

Test de Cochran

Dónde: $G_{exp} < G_{tab}$

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ máxima}}{\sum S_i^2}$$

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ máxima}}{\sum S_i^2} = \frac{0.3608}{0.5905} = \mathbf{0.6110}$$

Al comparar el valor experimental con el valor crítico, se obtuvo un G_{exp} menor que el G_{tab} , por tanto se cumple la hipótesis donde se comprueba que X o factor de repuesta no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de f (y/x) $G_{exp} 0.6110 < 0.966$.

Test de Student

Para esta prueba se utilizó el criterio que $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$ en la tabla de t de Student n-1 grados de libertad y 0.05 grados de significación el de $t_{\text{tab}} = 4.303$

Para ello se utilizó la siguiente ecuación

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - \bar{x}| * \sqrt{n}}{CV}$$

Dónde:

\bar{x} = Media del porcentaje de recuperación

CV = Coeficiente de variación del porcentaje de recuperación

n = Número de muestras 3

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100.00 - 99.466| * \sqrt{3}}{0.434}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{0.534 * 1.732}{0.434} = \frac{0.924}{0.434}$$

$$t_{\text{exp}} = 2.131$$

$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}} = 2.131 < 2.306$, se cumple con el criterio.

El ensayo del t de Student para comparar el valor promedio de las concentraciones obtenidas con el valor esperado demostró que no hay diferencias significativas entre la concentración introducida y la recuperada, ya que el t_{exp} es menor al t_{tab} a un nivel de confianza de 95% y n-2 grados de libertad con $t_{\text{tab}} = 2.306$.

5.1.2 PARÁMETROS DEL MÉTODO

5.1.2.1 Linealidad del Método Tinidazol tableta 500 mg

Para la determinación de la linealidad se prepararon 5 soluciones muestras a concentraciones de 32 µg/mL, 36 µg/mL, 40 µg/mL, 44 µg/mL, 48 µg/mL (80%, 90%, 100%, 110% y 120%). Se realizaron análisis por triplicado de cada solución a una longitud de onda de 276 nm y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla N° 5.1.2.1.1 Evaluación de la linealidad del método de Tinidazol tableta 500 mg

X Conc.	Y Abs.	F = Y/X Factor de Respuesta	Promedio	Desv. Estándar	Varianza
32 µg/mL (80 %)	0.7643	0.0096	0.00955	5.25 x10 ⁻⁰⁵	2.76 x 10 ⁻⁰⁹
	0.7592	0.0095			
	0.7676	0.0096			
36 µg/mL (90 %)	0.8659	0.0096	0.00959	5.64 x 10 ⁻⁰⁵	3.18 x 10 ⁻⁰⁹
	0.8575	0.0095			
	0.8666	0.0096			
40 µg/mL (100 %)	0.9622	0.0096	0.00966	3.32 x 10 ⁻⁰⁵	1.10 x 10 ⁻⁰⁹
	0.9689	0.0097			
	0.9656	0.0097			
44 µg/mL (110 %)	1.0683	0.0097	0.00968	3.85 x 10 ⁻⁰⁵	1.48 x 10 ⁻⁰⁹
	1.0602	0.0096			
	1.0664	0.0097			
48 µg/mL (120 %)	1.1622	0.0097	0.00967	2.24 x 10 ⁻⁰⁵	5.03 x 10 ⁻¹⁰
	1.1570	0.0096			
	1.1608	0.0097			
C. Correlación		0.9996			
C. Determinación		0.9993			
Intercepto		-0.031			
Pendiente		0.0099			

Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Programa Microsoft Excel 2010

En la tabla anterior se refleja los resultados obtenidos de la linealidad del método para la verificación de estos datos se procedieron a calcular estadísticamente la pendiente, el intercepto, el coeficiente de determinación (r) y de correlación (r²).

Coefficiente de correlación (r)

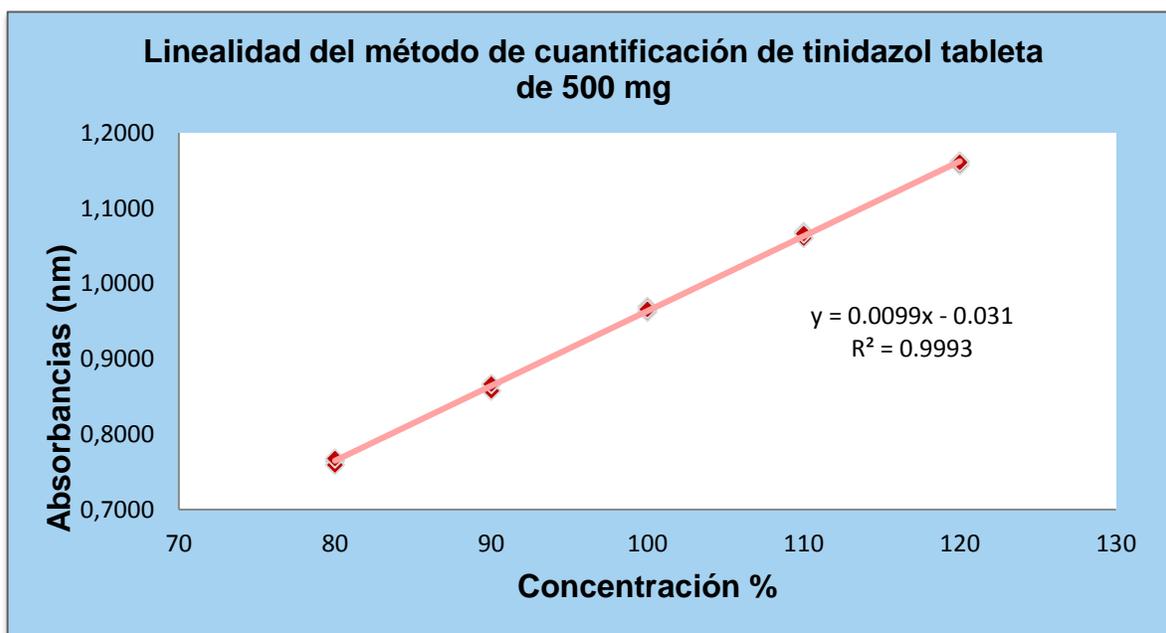
$$r = \frac{\sum_i^n [(x_i - \bar{X})(y_i - \bar{Y})]}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{X})^2 \sum_i (y_i - \bar{Y})^2}} = 0.9996 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Coefficiente de determinación (r²)

$$r^2 = 0.9996^2 = 0.9993 \quad (\text{Ecuación 4})$$

A continuación se presenta el calibrado y la ecuación de la recta en ella se observa una proporcionalidad entre concentración y respuesta espectrofotométrica

Gráfico N° 5.1.2.1.1 Linealidad del método de Tinidazol Tableta de 500 mg



Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Microsoft Excel 2010

La ecuación de la recta de la curva de calibración, se expresa: $y = 0.0099x - 0.031$ con $r = 0.9996$ y $r^2 = 0.9993$

5.1.2.2 Ecuación de la recta de la linealidad del método espectrofotométrico UV-visible

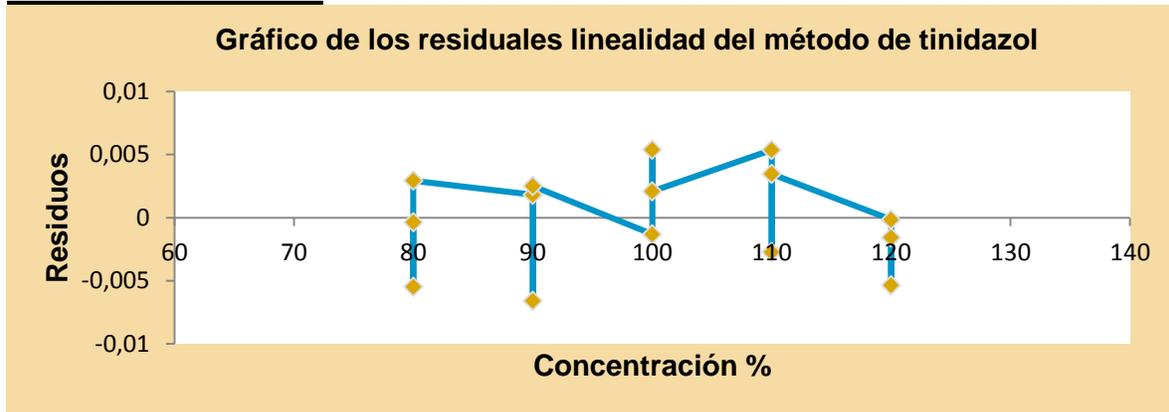
Se utilizó el método de los mínimos cuadrados, que consiste en ajustar estos parámetros para minimizar la suma de los cuadrados de los residuales y obtener funciones lineales.

Tabla N° 5.1.2.2.1 Análisis de mínimos cuadrados en los datos de linealidad del método

X Conc.	Y Abs.	$(x_i - \bar{X})$	$(x_i - \bar{X})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{X})(y_i - \bar{y})$	$\sum x_i^2$	$\hat{Y} = b^* x + a$	$e_i = (\hat{y} - y)$ residuales
80.000	0.7643	-20.0000	400.0000	-0.1992	0.0397	3.9843	6400	0.7647	3.67 x 10 ⁻⁰⁴
80.000	0.7592	-20.0000	400.0000	-0.2043	0.0417	4.0863	6400	0.7647	
80.000	0.7676	-20.0000	400.0000	-0.1959	0.0384	3.9183	6400	0.7647	
90.000	0.8659	-10.0000	100.0000	-0.0976	0.0095	0.9761	8100	0.8641	-1.81 x 10 ⁻⁰³
90.000	0.8575	-10.0000	100.0000	-0.1060	0.0112	1.0601	8100	0.8641	
90.000	0.8666	-10.0000	100.0000	-0.0969	0.0094	0.9691	8100	0.8641	
100.000	0.9622	0.0000	0.0000	-0.0013	0.0000	0.0000	10000	0.9635	1.31 x 10 ⁻⁰³
100.000	0.9689	0.0000	0.0000	0.0054	0.0000	0.0000	10000	0.9635	
100.000	0.9656	0.0000	0.0000	0.0021	0.0000	0.0000	10000	0.9635	
110.000	1.0683	10.0000	100.0000	0.1048	0.0110	1.0479	12100	1.0629	-5.36 x 10 ⁻⁰³
110.000	1.0602	10.0000	100.0000	0.0967	0.0093	0.9669	12100	1.0629	
110.000	1.0664	10.0000	100.0000	0.1029	0.0106	1.0289	12100	1.0629	
120.000	1.1622	20.0000	400.0000	0.1987	0.0395	3.9737	14400	1.1624	1.60 x 10 ⁻⁰⁴
120.000	1.1570	20.0000	400.0000	0.1935	0.0374	3.8697	14400	1.1624	
120.000	1.1608	20.0000	400.0000	0.1973	0.0389	3.9457	14400	1.1624	
1500.0000	14.4528	0.0000	3000	0.0000	0.2967	29.8270	153000		
100.0000	0.9635	0.0000	200	0.0000	0.0198	1.9885			

Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Programa Microsoft Excel 2010

Gráfico N° 5.1.2.2.1.1 Análisis de los residuales de la linealidad del método



Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Microsoft Excel 2010

La distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ninguna tendencia demostrándose la ausencia de error sistemático, observando el gráfico se aprecia que la distribución de los residuos es aleatoria, por lo tanto, el sistema es válido.

La ecuación utilizada para \hat{y} fue la siguiente

$$\hat{y} = b * x + a \quad . \quad (\text{Ecuación 5})$$

Conviene definir los valores de S_{xx} , S_{yy} y S_{xy} para encontrar la pendiente y el intercepto:

1. S_{xx} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x.

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Dónde:

x_i = pares de datos individuales de x

\bar{x} = valor medio o promedio de las variables (x)

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = 3000.0000$$

2. S_{yy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de y.

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Dónde:

y_i = pares de datos individuales de y

\bar{y} = valores medio o promedios de las variables (y)

$$S_{yy} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} = 14.2221 - \frac{14.4527^2}{15} = \mathbf{0.2967}$$

3. S_{xy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x e y.

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} \quad (\text{Ecuación 8})$$

$$S_{xy} = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N} = 1475.0970 - \frac{1500 \times 14.4527}{15} = \mathbf{29.8270}$$

Para encontrar la ecuación de la recta es necesario encontrar la pendiente y el intercepto a partir de los datos calculados de la suma de los cuadrados.

Ecuación de la pendiente (b):

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (\text{Ecuación 9})$$

$$b = \frac{29.8270}{3000.0000} = \mathbf{0.0099}$$

Dónde:

S_{xy} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x e y.

S_{xx} = suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x.

Ecuación del intercepto (a):

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$a = 0.9635 - (0.0099 * 100.0000) = -0.0031$$

Según el valor de la pendiente, la sensibilidad del método es de 0.0097 y el sesgo del método es de - 0.0031 indicado por el valor del intercepto con $r = 0.9997$ y $r^2 = 0.9994$

5.1.2.3 Test de linealidad: test de student para la pendiente (b) en UV-Vis

Para demostrar que existe una pendiente significativamente distinta de cero se aplicó la prueba de t Student, para un grado de significación (α) de 0.05%, y n-2 grados de libertad, siendo el valor crítico de 2.160.

Para esta prueba debe de cumplirse que $t_{exp} > t_{tab}$.

Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Para calcular el t_{exp} es necesario calcular primero la desviación estándar de la regresión (S_r) para poder obtener la desviación estándar de la pendiente S_b .

Desviación estándar de la regresión (S_r)

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N - 2}} \quad (\text{Ecuación 12})$$

$$S_r = \sqrt{\frac{0.2967 - ((0.0099)^2 * 3000.000)}{15 - 2}}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{0.2967 - 0.29403}{13}}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{0.0026}{13}} = \sqrt{2.0538 \times 10^{-04}} = 0.01433$$

Desviación estándar de la pendiente (S_b)

Para esta prueba debe de cumplirse que $t_{exp} > t_{tab}$

Hipótesis:

$$H_0: t_{exp} < t_{tab}$$

$$H_1: t_{exp} > t_{tab}$$

$$S_b = \sqrt{Sr^2/S_{xx}} = \quad \quad \quad \text{(Ecuación 13)}$$

$$S_b = \sqrt{(0.01433)^2/3000.000} = \sqrt{6.8449 \times 10^{-08}} = 2.616288 \times 10^{-04}$$

Se obtiene:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} = \frac{0.0099}{2.616288 \times 10^{-04}} = 37.8399$$

Se comprueba estadísticamente que existe una pendiente diferente de cero, obteniendo el t_{exp} mayor que al t_{tab} , siendo el t_{exp} de 37.8399 > t_{tab} 2.160, lo que demuestra que existen diferencias significativas.

El intervalo de confianza confirma lo demostrado por el test de Student la pendiente no incluye el cero.

Intervalo de confianza (IC) para la pendiente se calcula:

$$IC = b \pm t * S_b = \quad \quad \quad \text{(Ecuación 14)}$$

$$0.0099 \pm 2.160 * 2.616288 \times 10^{-04}$$

$$0.0099 \pm 5.651182 \times 10^{-04}$$

$$0.0093 \text{ a } 0.0105$$

5.1.2.4 Test de proporcionalidad: test de student para el intercepto (a) en UV-VIS

Para llevar a cabo este test se recurrió a la prueba de significación de t de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación (α) 0.05. El valor de t Student de tabla es de 2.160, siendo esta mayor que al experimental lo que demuestra que el sesgo no es estadísticamente significativo.

Hipótesis:

$$H_0: t_{exp} > t_{tab}$$

$$H_1: t_{exp} < t_{tab}$$

Debe de cumplirse que el test experimental del intercepto debe ser menor al test crítico.

$t_{\text{exp}(a)} < t_{\text{tab}}$. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_a = \frac{|a|}{S_a} \quad (\text{Ecuación 15})$$

$|a|$ = valor absoluto del intercepto

S_a = Desviación estándar del intercepto

Se calculó primero la desviación estándar del intercepto:

$$S_a = S_r * \sqrt{\frac{1}{N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}} \quad (\text{Ecuación 16})$$

$$S_a = 0.01433 * \sqrt{\frac{1}{15 - (2250000/153000)}}$$

$$S_a = 0.01433 * \sqrt{\frac{1}{15 - (14.7059)}}$$

$$S_a = 0.01433 * \sqrt{\frac{1}{0.2941}}$$

$$S_a = 0.01433 * \sqrt{3.4002}$$

$$S_a = 0.01433 * 1.84396$$

$$S_a = 0.0264$$

$$t_{\text{exp}(a)} = \frac{|a|}{S_a} = \frac{|-0.031|}{0.0264} = -1.1742$$

Siendo $t_{\text{exp}(a)} < t_{\text{tab}}$ se comprueba que la variable X es diferente de cero y que la recta pasa por el origen de coordenadas para 2 grados de libertad = 13 en un nivel de confianza de 95% y con un grado de significación $\alpha = 0.05$. El t_{tab} para las condiciones planteadas anteriormente es de 2.160 siendo $t_{\text{exp}(a)} = -1.1742 < t_{\text{tab}} = 2.160$

El intervalo de confianza (IC) para el intercepto se calculó:

$$IC_a = a \pm t * S_a = \quad \quad \quad \text{(Ecuación 17)}$$
$$-0.031 \pm 2.160 * 0.02656$$
$$-0.031 \pm 0.05737$$
$$\mathbf{-0.884 \text{ a } 0.0264}$$

5.1.2.5 Test G de Cochran varianza de los factores de respuesta

La prueba de Cochran se realizó para determinar si el factor de concentración tiene influencia en la variabilidad de las respuestas

$$G_{exp} = \frac{S^2 \text{ máxima}}{\sum S_i^2} \quad \quad \quad \text{(Ecuación 18)}$$

Dónde:

$S^2 \text{ máxima}$: Varianza máxima de los grupos

$\sum S_i^2$: Sumatoria de la varianza de cada grupo

Dónde:

K; es el número de grupo de datos o números de réplicas

v; es el número de grados de libertad definido como $n_{\max} - 1$, donde n_{\max} es el mayor de los tamaños de la muestra

α ; el nivel de significancia es usualmente 0.05.

El criterio de aceptación: si el $G_{exp} < G_{tab}$ significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor de concentración no influyen estadísticamente en la variabilidad de los resultados.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Tabla N° 5.1.2.5.1 Test de G de Cochran varianza de los factores de respuestas de tinidazol tableta 500 mg

X Conc.	Y Absorbancias	F = Y/X Factores de respuesta	Promedio	Desv. Estándar	Varianza
32µg/mL (80%)	0.7643	0.0096	0.00955	5.25 x 10 ⁻⁰⁵	2.76 x 10 ⁻⁰⁹
	0.7592	0.0095			
	0.7676	0.0096			
36 µg/mL (90%)	0.8659	0.0096	0.00959	5.64 x 10 ⁻⁰⁵	3.18 x 10 ⁻⁰⁹
	0.8575	0.0095			
	0.8666	0.0096			
40 µg/mL (100%)	0.9622	0.0096	0.00966	3.32 x 10 ⁻⁰⁵	1.10 x 10 ⁻⁰⁹
	0.9689	0.0097			
	0.9656	0.0097			
44 µg/mL (110%)	1.0683	0.0097	0.00968	3.85 x 10 ⁻⁰⁵	1.48 x 10 ⁻⁰⁹
	1.0602	0.0096			
	1.0664	0.0097			
48 µg/mL (120%)	1.1622	0.0097	0.00967	2.24 x 10 ⁻⁰⁵	5.03 x 10 ⁻¹⁰
	1.1570	0.0096			
	1.1608	0.0097			
Promedio (x)		0.00963	$\sum S_i^2 = 9.03 \times 10^{-09}$		
Desviación estándar (S)		1.3981 x 10 ⁻⁰⁵			

Fuentes: Chemstation Software Agilent 8453 series y Programa Microsoft Excel 2010

La hipótesis es:

$$H_0 = G_{exp} < G_{tab}$$

$$H_1 = G_{exp} > G_{tab}$$

$$G_{exp} = \frac{3.18 \times 10^{-09}}{9.03 \times 10^{-09}} = 3.52 \times 10^{-01}$$

Al comparar el valor experimental con el valor crítico se obtuvo un G_{exp} menor que el G de la tabla, por tanto se cumple que $f(y/x)$ no tiene influencia en la variabilidad de los resultados de $f(y/x)$ $G_{exp} 3.52 \times 10^{-01} < G_{tab} (\alpha = 0.05, k = 5, n = 3) 0.683$

5.1.2.6. Coeficiente de variación de los factores de respuesta

Al aplicar la prueba de la linealidad mediante los coeficientes de variación de los factores de respuesta se obtuvo como resultado un coeficiente de variación de 0.145 % < 2% demostrándose la adecuada linealidad del método.

$$cv = \frac{s}{\bar{x}} \quad (\text{Ecuación 19})$$

Dónde:

S = desviación estándar

\bar{x} = media de los resultados

La desviación estándar global de los factores de respuesta es de $1,3981 \times 10^{-05}$ y el promedio global es de 0,00963 por tanto

$$cv = \frac{1.3981 \times 10^{-05}}{0.00963} * 100 = 0.145\%$$

Al aplicar la prueba de la linealidad mediante los coeficientes de variación de los factores de respuesta se obtuvo como resultado un coeficiente de variación de 0.145% siendo menor al 2% demostrándose la adecuada linealidad del método.

Tabla N° 5.1.2.7 Análisis de varianza de los factores de respuesta del método de tinidazol tableta de 500 mg

Análisis de la varianza		Análisis de Residual			Análisis de la Regresión	
X Conc	Y Abs	\hat{y} $\hat{y} = b * x + a$	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \hat{y})^2$	$\hat{y} - \bar{y}$	$(\hat{y} - \bar{y})^2$
80	0.7643	0.7647	-0.0004	1.34 x 10 ⁻⁰⁷	-0.1988	0.0395
80	0.7592	0.7647	-0.0055	2.99 x 10 ⁻⁰⁵	-0.1988	0.0395
80	0.7676	0.7647	0.0029	8.60 x 10 ⁻⁰⁶	-0.1988	0.0395
90	0.8659	0.8641	0.0018	3.28 x 10 ⁻⁰⁶	-0.0994	0.0099
90	0.8575	0.8641	-0.0066	4.34 x 10 ⁻⁰⁵	-0.0994	0.0099
90	0.8666	0.8641	0.0025	6.30 x 10 ⁻⁰⁶	-0.0994	0.0099
100	0.9622	0.9635	-0.0013	1.72 x 10 ⁻⁰⁶	0.0000	0.0000
100	0.9689	0.9635	0.0054	2.90 x 10 ⁻⁰⁵	0.0000	0.0000
100	0.9656	0.9635	0.0021	4.35 x 10 ⁻⁰⁶	0.0000	0.0000
110	1.0683	1.0629	0.0054	2.88 x 10 ⁻⁰⁵	0.0994	0.0099
110	1.0602	1.0629	-0.0027	7.49 x 10 ⁻⁰⁶	0.0994	0.0099
110	1.0664	1.0629	0.0035	1.20 x 10 ⁻⁰⁵	0.0994	0.0099
120	1.1622	1.1624	-0.0002	2.56.x.10 ⁻⁰⁸	0.1988	0.0395
120	1.1570	1.1624	-0.0054	2.87 x 10 ⁻⁰⁵	0.1988	0.0395
120	1.1608	1.1624	-0.0016	2.43 x 10 ⁻⁰⁶	0.1988	0.0395
$\bar{X} = 100$	$\bar{X} = 0.97$ $\Sigma=14.4767$	$\bar{X} = 0.99$	$SC_{RES} = 2.0616 \times 10^{-04}$	$SC_{REG} = 0.2965$		

Fuentes: Programa Microsoft Excel 2010

La ecuación utilizada para calcular \hat{y} , fue la siguiente

$$\hat{y} = b * x + a \quad (\text{Ecuación 5})$$

Según (Aguirre, 2001), el análisis de la varianza se fundamentó en la suma de cuadrados totales la cual está conformada por dos componentes la suma de cuadrados de los residuales y la regresión $SCT = SC_{RES} + SC_{REG}$

Se calculó la Varianza residual ($S^2_{y,x}$) a partir de los datos de los mínimos cuadrados, con la siguiente ecuación:

Varianza Residual

$$V_{RES} = S^2_{y,x} = \frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n-2} \quad (\text{Ecuación 20})$$

$$V_{RES} = S^2_{y,x} = \frac{2.0616 \times 10^{-04}}{15-2}$$

$$V_{RES} = S^2_{x,y} = 1.5859 \times 10^{-05}$$

$$SC_T = SC_{RES} + SC_{REG} \quad (\text{Ecuación 21})$$

$$SC_T = 2.0616 \times 10^{-04} + 0.2965$$

$$SC_T = 0.2967$$

Varianza de la Regresión

$$V_{REG} = S^2_{y^*} = \frac{\sum(Y_i - \bar{y})^2}{N} \quad (\text{Ecuación 22})$$

$$V_{REG} = S^2_{y^*} = \frac{0.2968}{15} = 0.0198$$

Una vez realizada la homogeneidad de varianzas y calculó residuales se realizó el cálculo de Fisher (F), donde debe de cumplirse que $F_{exp} > F_{tab}$.

$$F = \frac{V_{\text{REG}}}{V_{\text{RES}}} \quad (\text{Ecuación})$$

La hipótesis es:

$$H_0 = F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$$

$$H_1 = F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$$

$$F = \frac{0.01978}{1.58^{-05}} = 1251.8987$$

Dónde:

SC_{REG}: suma de cuadrados de la regresión.

$$V_{\text{RES}}: 1.58 \times 10^{-05}$$

$$V_{\text{REG}}: 0.01978$$

Por lo tanto Fisher será: $1251.8987 F_{\text{tab}} (0.05, 1, n-2) = 4.667$ cumpliendo el criterio de aceptación, demostrando la existencia de una pendiente diferente de cero.

Se validó la linealidad de la metodología del método, para lo cual se partió de una solución concentrada de tinidazol, preparando una curva de calibrado con cinco niveles de concentración del analito en el rango de trabajo de 80% - 120%.

Con respecto a la evaluación de los coeficientes de determinación r^2 y de correlación r en el método demostraron correlación entre la concentración (%) y la señal obtenida (Absorbancias).

Se aplicaron diferentes test estadísticos para demostrar la linealidad del método, incluyendo el ajuste de la curva de calibración por el análisis de los mínimos cuadrados, pudiéndose obtener los valores de la pendiente y el intercepto, aplicando el t de Student para demostrar que existe diferencia significativa.

Con la aplicación del test de Cochran se demostró la homogeneidad de varianza. Se realizó el análisis de la varianza de la regresión ANOVA, se evaluaron los residuos y se determinó que estos son independientes y tienen distribución normal, presentando homocedasticidad y que la relación entre concentración y absorbancias es lineal.

5.1.2.8 Precisión del método en espectrofotometría UV-visible

Para evaluar la precisión se trabajó con muestras de estándar secundario de Tinidazol con un grado de pureza de 99.9%. El estudio de la precisión se realizó mediante la evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia del sistema.

5.1.2.8.1. Repetibilidad del Método en espectrofotometría UV-visible

La repetibilidad se analizó mediante la evaluación de 10 determinaciones a una concentración del 100% se determinaron los valores medios, desviaciones estándar y los coeficientes de variación en función de los factores de respuesta.

Tabla N° 5.1.2.8.1.1 Evaluación de repetibilidad del método de tinidazol tableta 500 mg

N° de lecturas	Concentración (%) X	Absorbancias Y	f(y/x) Factores de respuestas
1	100.000	0.9655	0.0097
2	100.000	0.9550	0.0096
3	100.000	0.9557	0.0096
4	100.000	0.9543	0.0095
5	100.000	0.9515	0.0095
6	100.000	0.9577	0.0096
7	100.000	0.9569	0.0096
8	100.000	0.9531	0.0095
9	100.000	0.9636	0.0096
10	100.000	0.9617	0.0096
Promedio de f (Y/X)			0.0095
Desviación Estándar f (Y/X)			0.000046
CV% de f (Y/X)			0.485%

Fuentes: Programa Microsoft Excel 2010

5.1.2.8.1.1 Evaluación estadística para la repetibilidad del método en espectrofotometría UV-visible

Para la evaluación de la precisión del método en términos de repetibilidad se evaluaron los siguientes parámetros, en donde se muestran valores obtenidos según tabla 5.1.2.8.1.1.

➤ **Media**

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (\text{Ecuación 24})$$

$$\bar{X} = \frac{0.0958}{10}$$

$$\bar{X} = 0.0095$$

➤ **Desviación estándar (S)**

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Ecuación 25})$$

$$S = \sqrt{\frac{1.9434 \times 10^{-08}}{9}}$$

$$S = \sqrt{\frac{1.9434 \times 10^{-08}}{9}}$$

$$S = 0.000046$$

En la precisión en condiciones de Repetibilidad en función del factor de respuesta se obtuvo una desviación estándar pequeña con un valor de 0.00005 indicando la buena precisión del sistema donde demuestra que no se observó una diferencia significativa.

➤ **Coefficiente de variación (CV)**

El coeficiente de variación (CV) nos indica la relación existente entre la desviación de una muestra y su media. Al dividir la desviación típica por la media se convierte en un valor de unidad de medida.

El coeficiente de variación entre los datos se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

$$CV = \frac{0.000046}{0.0095} * 100 = 0.484\%$$

Se aprecia, que el CV% está por debajo de 2% obteniendo un valor de 0.487%, indicando que la técnica cumple con los parámetros establecidos, siendo el ensayo repetitivo y a la misma vez aceptable.

5.1.2.8.2 Precisión intermedia del método en espectrofotometría UV-visible

La precisión intermedia se realizó para evaluar las fuentes de variación en el análisis inter analista e inter día, se trabajó con concentraciones al 100% (40 µg/mL) para ambos días.

Se aplicó el estadístico de *t* student y la prueba de Fisher para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados analíticos obtenidos por ambos analistas.

Los datos obtenidos están representados en función al factor de respuesta para determinar si influye en la variabilidad de los resultados.

Tabla N° 5.1.2.8.2.1 Evaluación de la precisión intermedia interdía e interanalista

Día	Analista	Concentración (%)	Abs de la muestra	Factor de respuesta f(Y/X)	Promedio	Desviación Estándar	CV (%)	CV global
1	1	100	0.9578	0.00958	0.0095	3.2×10^{-11}	0.2671	0.2852
		100	0.9589	0.00959				
		100	0.9608	0.00961				
		100	0.9617	0.00962				
		100	0.9627	0.00963				
		100	0.9559	0.00956				
	2	100	0.9618	0.00962	0.0095	1.68×10^{-12}	0.3781	
		100	0.9541	0.00954				
		100	0.9612	0.00961				
		100	0.9554	0.00955				
		100	0.9566	0.00957				
		100	0.9533	0.00953				
2	1	100	0.9578	0.00958	0.0095	3.78×10^{-10}	0.1539	
		100	0.9590	0.00959				
		100	0.9587	0.00959				
		100	0.9615	0.00962				
		100	0.9588	0.00959				
		100	0.9572	0.00957				
	2	100	0.9589	0.00959	0.0095	1.56×10^{-10}	0.3418	
		100	0.9538	0.00954				
		100	0.9597	0.00980				
		100	0.9608	0.00961				
		100	0.9535	0.00954				
		100	0.9546	0.00955				

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

En la tabla anterior se aprecia que los coeficientes de variación experimentales en los dos analistas y en diferentes días están por debajo del 2%, cumpliendo con el criterio de aceptación ($CV \leq 2\%$).

Tabla N° 5.1.2.8.2.1.1 Evaluación estadística para la precisión intermedia en espectrofotometría UV-visible

Análisis de Varianza 100 %						
Resumen						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Analista 1	2	0.01918	0.00959	3.2 x 10 ⁻¹¹		
Analista 2	2	0.01913	0.00956	1.6 x 10 ⁻¹²		
Día 1	2	0.01918	0.00959	3.2 x 10 ⁻¹¹		
Día 2	2	0.01913	0.00956	1.6 x 10 ⁻¹²		
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	5.1001 x 10 ⁻¹⁰	1	5.1 x 10 ⁻¹⁰	21.0976	0.13647	161.44763
Columnas	9.5069 x 10 ⁻¹²	1	9.5 x 10 ⁻¹²	0.3932	0.64341	161.44763
Error	2.4174 x 10 ⁻¹¹	1	2.4 x 10 ⁻¹¹			
Total	5.4369 x 10 ⁻¹⁰	3				

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

Se realizó un análisis de la varianza de los datos aplicándose el test de Fisher. Los valores obtenidos demostraron que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para una probabilidad de 0.05 ya que el valor de F_{exp} es menor que F_{tab} (inter analista F_{exp} 21.0976 < F_{tab} 161.4476; inter día F_{exp} 0.3932 < F_{tab} 161.4476).

Tabla N° 5.1.2.8.2.1.2 Precisión intermedia analista A

Día 1	Día 2	Día1-Día 2	Valor absoluto	Analista A $t_{exp} = \frac{ \bar{x} }{(s\sqrt{n})}$ $t_{exp} = \frac{1.27 \times 10^{-05}}{(1.5319 \times 10^{-05}\sqrt{6})}$ $= 0.3384$
9.580 x 10 ⁻³	9.580 x 10 ⁻³	0	0	
9.589 x 10 ⁻³	9.590 x 10 ⁻³	-1.0 x 10 ⁻⁰⁶	1.0 x 10 ⁻⁰⁶	
9.608 x 10 ⁻³	9.587 x 10 ⁻³	2.1 x 10 ⁻⁰⁵	2.1 x 10 ⁻⁰⁵	
9.617 x 10 ⁻³	9.615 x 10 ⁻³	2.0 x 10 ⁻⁰⁶	2.0 x 10 ⁻⁰⁶	
9.627 x 10 ⁻³	9.588 x 10 ⁻³	3.9 x 10 ⁻⁰⁵	3.9 x 10 ⁻⁰⁵	
9.559 x 10 ⁻³	9.570 x 10 ⁻³	-1.3 x 10 ⁻⁰⁵	1.3 x 10 ⁻⁰⁵	
Promedio			1.27 x 10 ⁻⁰⁵	
S			1.5319 x 10 ⁻⁰⁵	
√6			2.44948974	

Tabla N° 5.1.2.8.2.1.3 Precisión intermedia analista B

Día 1	Día 2	Día1-Día 2	Valor absoluto	Analista B $t_{exp} = \frac{\bar{x}}{(s\sqrt{n})}$ $t_{exp} = \frac{1.67 \times 10^{-03}}{(3.894 \times 10^{-03}\sqrt{6})}$ $= 0.1750$
9.618 x 10 ⁻³	9.589 x 10 ⁻³	9.6 x 10 ⁻⁰³	9.6 x 10 ⁻⁰³	
9.541 x 10 ⁻³	9.538 x 10 ⁻³	-4.8 x 10 ⁻⁰⁵	4.8 x 10 ⁻⁰⁵	
9.612 x 10 ⁻³	9.797 x 10 ⁻³	7.4 x 10 ⁻⁰⁵	7.4 x 10 ⁻⁰⁵	
9.554 x 10 ⁻³	9.608 x 10 ⁻³	-2.4 x 10 ⁻⁰⁴	2.4 x 10 ⁻⁰⁴	
9.566 x 10 ⁻³	9.535 x 10 ⁻³	-4.2 x 10 ⁻⁰⁵	4.2 x 10 ⁻⁰⁵	
9.533 x 10 ⁻³	9.546 x 10 ⁻³	-2.0 x 10 ⁻⁰⁶	2.0 x 10 ⁻⁰⁶	
Promedio			1.67 x 10 ⁻⁰³	
S			3.894 x 10 ⁻⁰³	
√6			2.44948974	

Tabla N° 5.1.2.8.2.1.4 Precisión intermedia analista A vs B Día 1

Analista A	Analista B	Analista A-B	Valor absoluto	Analista A vs B (Día 1) $t_{exp} = \frac{\bar{x}}{(s\sqrt{n})}$ $t_{exp} = \frac{1.09 \times 10^{-03}}{(2.55 \times 10^{-03}\sqrt{6})}$ $= 0.1745$
9.578 x 10 ⁻³	9.618 x 10 ⁻³	-4.00 x 10 ⁻⁰⁵	4.00 x 10 ⁻⁰⁵	
9.589 x 10 ⁻³	9.541 x 10 ⁻³	4.80 x 10 ⁻⁰⁵	4.80 x 10 ⁻⁰⁵	
9.608 x 10 ⁻³	9.612 x 10 ⁻³	-4.00 x 10 ⁻⁰⁶	4.00 x 10 ⁻⁰⁶	
9.617 x 10 ⁻³	9.554 x 10 ⁻³	6.30 x 10 ⁻⁰⁵	6.30 x 10 ⁻⁰⁵	
9.627 x 10 ⁻³	9.566 x 10 ⁻³	6.10 x 10 ⁻⁰⁵	6.10 x 10 ⁻⁰⁵	
9.559 x 10 ⁻³	9.533 x 10 ⁻³	2.60 x 10 ⁻⁰⁵	2.60 x 10 ⁻⁰⁵	
Promedio			1.09 x 10 ⁻⁰³	
S			2.55 x 10 ⁻⁰³	
√6			2.44948974	

Tabla N° 5.1.2.8.2.1.5 Precisión intermedia analista A vs B Día 2

Analista A	Analista B	Analista A-B	Valor absoluto	Analista A vs B (Día 2) $t_{exp} = \frac{\bar{x}}{(s\sqrt{n})}$ $t_{exp} = \frac{5.98 \times 10^{-05}}{(7.6129 \times 10^{-05}\sqrt{6})}$ $= 0.3206$
9.578 x 10 ⁻³	9.589 x 10 ⁻³	-1.1 x 10 ⁻⁰⁵	1.1 x 10 ⁻⁰⁵	
9.590 x 10 ⁻³	9.538 x 10 ⁻³	5.2 x 10 ⁻⁰⁵	5.2 x 10 ⁻⁰⁵	
9.587 x 10 ⁻³	9.797 x 10 ⁻³	-2.1 x 10 ⁻⁰⁴	2.1 x 10 ⁻⁰⁴	
9.615 x 10 ⁻³	9.608 x 10 ⁻³	7.0 x 10 ⁻⁰⁶	7.0 x 10 ⁻⁰⁶	
9.588 x 10 ⁻³	9.535 x 10 ⁻³	5.3 x 10 ⁻⁰⁵	5.3 x 10 ⁻⁰⁵	
9.572 x 10 ⁻³	9.546 x 10 ⁻³	2.6 x 10 ⁻⁰⁵	2.6 x 10 ⁻⁰⁵	
Promedio			5.98 x 10 ⁻⁰⁵	
S			7.6129 x 10 ⁻⁰⁵	
√6			2.449489743	

Tabla N° 5.1.2.8.2.2 Precisión intermedia, interdía e interanalista

t estadístico de Student

Analista: A		Analista: B	Analista: A vs. B		Fórmula
			1er día	2do día	
t _{exp}	0.3384	0.1750	0.1745	0.3206	$t_{exp} = \frac{ \bar{x} }{(s\sqrt{n})}$
t _{tab}	2.570	2.570	2.570	2.570	
T _{exp} < t _{tab} . No existe diferencias significativas					

Fuente: Programa de Microsoft Excel 2010

En la tabla 5.1.2.8.2.2 se observa que al realizar la prueba de Student para ambos analistas, el valor experimental resultó ser menor que el tabulado **2.570**, lo cual demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas con un nivel de significación de un **5%**.

5.1.2.9 Robustez

Se realizó el parámetro de robustez como se indica en el inciso 4.10.3. y se leyeron en el espectrofotómetro que se utilizó para el resto de los estudios (lámpara A) luego, se cambió la lámpara por una nueva (lámpara B) y se volvieron a leer las mismas muestras obteniendo los resultados que se presentan en la tabla 5.1.2.9.1.

Tabla N° 5.1.2.9.1 Evaluación de la robustez de tinidazol tableta 500 mg

Cambio	Muestra	Concentración (%)	Absorbancias de la muestra	Absorbancias del estándar	Promedio	Desviación estándar	CV %	% Recuperación
Lámpara A	1	100	0.95554	0.9646	0.9550	0.0020	0.0020	99.0638
	2	100	0.95504	0.9646				99.0120
	3	100	0.95568	0.9646				99.0783
	4	100	0.95429	0.9646				98.9342
	5	100	0.95152	0.9646				98.6471
	6	100	0.95774	0.9646				99.2919
	7	100	0.95689	0.9646				99.2038
	8	100	0.95310	0.9646				98.8109
Promedio								99.0053
Lámpara B	1	100	0.96792	0.9646	0.9663	0.0011	0.0011	100.3473
	2	100	0.96814	0.9646				100.3701
	3	100	0.96556	0.9646				100.1026
	4	100	0.96626	0.9646				100.1752
	5	100	0.96531	0.9646				100.0767
	6	100	0.96608	0.9646				100.1565
	7	100	0.96523	0.9646				100.0684
	8	100	0.96574	0.9646				100.1213
Promedio								100.1773
C.V global							0.0022	

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

El método es robusto para el cambio de lámpara, ya que el porcentaje promedio recuperado está entre el 90.0% y el 110.0%, el coeficiente de variación global es menor al 2.00%.

5.1.2.10 Test de disolución

Se realizó el test de disolución para comprobar la cantidad de fármaco que se libera por unidad de tiempo y evaluar la calidad del producto. Una vez concluido el tiempo programado para tomar las muestras de las seis estaciones, se realizaron lecturas por triplicado, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla N° 5.1.2.10.1 Evaluación del Test de Disolución de Tinidazol tableta de 500 mg

Estaciones	Concentración %	Absorbancias de la muestras	Absorbancias del estándar	% Recuperado
vaso 1	100	0.9728	0.9646	100.86
	100	0.9740	0.9646	100.98
	100	0.9753	0.9646	101.11
vaso 2	100	0.9702	0.9646	100.59
	100	0.9690	0.9646	100.46
	100	0.9678	0.9646	100.34
vaso 3	100	0.9492	0.9646	98.42
	100	0.9505	0.9646	98.54
	100	0.9517	0.9646	98.67
vaso 4	100	0.9757	0.9646	101.15
	100	0.9769	0.9646	101.28
	100	0.9781	0.9646	101.41
vaso 5	100	0.9729	0.9646	100.87
	100	0.9574	0.9646	99.26
	100	0.9754	0.9646	101.13
vaso 6	100	0.9623	0.9646	99.77
	100	0.9636	0.9646	99.90
	100	0.9648	0.9646	100.03
Promedio				100.27
Desv. Estándar				0.9806
C.V (%)				0.9780

Fuente: Programa Microsoft Excel 2010

El test de Disolución cumple con el criterio de aceptación, siendo el valor obtenido de Q = 100.27% (Q > 80%) y un coeficiente de variación de 0.9780 (CV ≤ 5%).

Tabla N° 5.2 Resumen de resultados de validación de tinidazol tableta 500 mg en espectrofotometría UV-visible

Principio Activo: Tinidazol	Tipo de Validación		Resultados	
	Ensayos	Prospectiva	Validación	
		Especificaciones	Sistema	Método
1. Aptitud del sistema				
- Interferencia de excipientes	No debe presentar interferencia de excipientes	Cumple	Cumple	
- Coeficiente de variación C V	$CV \leq 2\%$			
2. Linealidad				
- Coeficiente de variación C V	$CV \leq 2\%$	Cumple	Cumple	
- Coeficiente de correlación r	≥ 0.9950			
- Coeficiente de determinación r^2	≥ 0.9980			
- Intercepto (a)				
- Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el cero			
- Test de t para evaluar la significación estadística de desviación estándar del intercepto	$t_{exp} < t_{tab} (t_{tab}=2.16)$			
- Pendiente (b)	Aproximadamente a 1			
- Intervalo de confianza de la pendiente	El intervalo no debe incluir el cero			
- Test de t para evaluar la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente	$t_{exp} > t_{tab} (t_{tab} = 2.16)$			
- Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tab} (G_{tab} = 0.683)$			
- Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia.			
3. Precisión				
- Repetibilidad	$CV \leq 2\%$	Cumple	Cumple	
- Precisión intermedia	$CV_{global} \leq 2\%$			
4. Exactitud				
- % Recuperado promedio	90.0 % - 110.0 %	Cumple	Cumple	
- Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tab} (G_{tab}= 0.966)$			
- Test de Student	$t_{exp} < t_{tab} (t_{tab} = 4.303)$			
5. Robustez				
- Robustez del método	$CV \leq 2\%$ Cambio de lámpara	Cumple	Cumple	

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES



6.1 CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos de la fase experimental se ha demostrado la Validez de la metodología para la cuantificación y disolución de Tinidazol tableta de 500 mg, verificándose los parámetros de aceptación planteados por la USP-36 y el RTCA 11:03:39.06.

- Se comprobó la idoneidad del método analítico, para la cuantificación de tinidazol tabletas de 500 mg, por espectrofotometría UV-visible cumpliendo con los criterios de aceptación teniendo como resultado un CV $\leq 2\%$.
- La técnica analítica por espectrofotometría UV-visible para la cuantificación de Tinidazol tableta 500 mg demostró: ser lineal, precisa, exacta, y robusta en el rango de aceptaciones estudiadas, cumpliendo con la hipótesis planteada, por lo cual puede ser utilizado para el control de calidad.
- El test de disolución cumple con los criterios establecidos, se obtuvo un porcentaje de recuperación de 100.27%, con un coeficiente de variación de 0.9780 % proporcionando resultados que comprueban que el producto es confiable para el consumo humano.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES



7.1 RECOMENDACIONES

Se recomienda la realización del estudio de estabilidad y del parámetro de selectividad ya que por diferentes razones; como el tiempo que se programó para el estudio, el uso de reactivos y materiales de laboratorio, recursos económicos entre otros no se realizó y los cuales son parámetros nexos en una validación analítica.

Que la universidad gestione los equipos necesarios con los organismos que tienen convenio para que los estudiantes lleven la teoría a la práctica para así desarrollar sus conocimientos y de esta manera adquirir las habilidades necesarias para el desarrollo en el campo laboral en la industria farmacéutica.

Enviar una copia de la monografía a la jefatura del Laboratorio Nacional de Control de Calidad del Ministerio de Salud y a la jefatura del departamento de la dirección General de servicio de salud, para brindar información accesible de consultas sobre el tema.

BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFÍA

- (2013). USP 36 <1225>. En *Validación de Procedimientos Farmacéuticos* (págs. 1093-1098). ESTADOS UNIDOS: Rockville MD.
- (2013). USP 36 <711>. En *Disolución* (págs. 332-338). ESTADOS UNIDOS: Rockville MD.
- (2013). USP 36 <851>. En *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (págs. 458-464). ESTADOS UNIDOS: Rocville MD.
- Administration, S. N. (2007). *Estudio de Validación de Métodos Analíticos (Una guía práctica para laboratorios químicos)*. New York.
- Aduanera, U. (2004). *Guia de Validación Métodos Analíticos*. Guatemala.
- Aguirre, L. et al. (2001). *Validación de Métodos Analíticos, Asociación Española de Farmacéuticos de Industria*. Barcelona, España.
- Boris Duffau et al. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de los métodos". *Instituto de Salud Pública de Chile*, 50-55.
- Chery, P. M. (2010). Farmacología Básica y Clínica. En *Capítulo V Farmacología Gastrointestinal* (págs. 175-185). 2010: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S A de C. V.
- COMIECO. (2006). *RTCA 11:03.39.06*. Guatemala.
- González, M. et al. (1995). Manual de Terapéutica, Fundamentos de Medicina. En *Capítulo 10-Gastroenterología* (págs. 251-268). Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Gutiérrez, G. et al. (2008). Tesis para optar al título de Química Farmacéutica. *Validación de un método Espectrofotométrico UV-Visible para la determinación de Ciprofloxacina en formulaciones sólidas producidas por Laboratorios Bengochea*. Managua Nicaragua.
- Hernández, I. (2002). Introducción al Análisis Instrumental. En *Capítulo III, Espectrofotometría* (págs. 238-366). Chile: editorial Ariel ciencia.
- ICH. (2002). *Validación de Métodos Analíticos, Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico*.

- Kothapalli, U. (2011). A Validate UV-Spectrophometric Method for the Estimation of Tinidazole in Bulk and Farmaceutical Dosage Form. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* , 1152-1156.
- López I. (1999). Spectrophotometer, Instrument Manual. *Hach Company*, 32-41.
- Moffat. (2005). *Clark´s Analysis of Drugs and Poisons*.
- OMS, I. 32. (2006). *ANEXO 5 Validación de Procedimientos Analíticos empleados en el exámen de los materiales farmacéuticos* .
- Rugama, N. (2003). Tesis para obter al título de Química Farmacéutica. *Validación de un método analítico por espectrofotometría ultravioleta visible para el ensayo de disolución de tabletas de Metocarbamol (Turel-AX) elaborado en laboratorios PANZYMA UNAN-León*. El Crucero, Managua, Nicaragua.
- Sevilla, A. (2012). Tesis para obter al titulo de Química Farmaceutica. *Validacion de Famotidina de 40 mg por espectrofotometria Ultravioleta-Visible UNAN-Leon*. Leon, Nicaragua.
- Singh, L. (2011). Method for Determination of Tinidazole Using Direct UV-Visible Spectrophometric and Differential Spectrophometric in Pure and Tablet Dosage Forms. *East and Central Africa Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.14, 75-80.
- Skoog, D. A. (2003). El método de los mínimos cuadrados para obtener curvas de calibrado. En *Fundamentos de Química Analítica* (pág. 56). Barcelona: Reverté. S. A.
- Valenzuela, A. (Julio de 1999). Tesis para obter al titulo de Química Farmacéutica. *Validacion de Método Espectrofotométrico para cuantificacion de Metronidazol, Mebendazol, Albendazol y Tinidazol (Tabletas y Suspensión)*. Guatemala.
- Valladao, D. et al. (2008). Determinacao de Tinidazol por Cromatografia em Camada Delgada e Espectrofotometria . *Sociedade Brasileira de Quimica*, 34.
- Vásquez, W. (2012). Tesis para obter al título de Química Farmacéutica. *Validación de metodología analítica para la cuantificación de Levofloxaciono 500 mg cápsula recubierta por espectrofotometría ultravioleta visible durante el período de Septiembre 2012 en UNAN-León* . León, Nicaragua: Editorial Universitaria.

GLOSARIO

- **Amebiasis:** Enfermedad intestinal causada por un parásito microscópico llamado *Entamoeba histolytica* y en la que a veces puede extenderse a otros órganos.
- **Analito:** Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.
- **Autoridad reguladora:** Ente responsable de Registro Sanitario y/o vigilancia Sanitaria de cada Estado.
- **Especificaciones:** Descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.
- **Especificidad o selectividad:** Capacidad de evaluar, medir e identificar simultáneamente o separadamente, los análisis de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes y otras sustancias presentes en la matriz de la muestra.
- **Espectrofotetría:** Método de análisis óptico que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.
- **Espectrofotómetro:** Instrumento usado en el análisis químico que sirve para medir en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativa a 2 haces de radiaciones y la concentración o reacciones químicas que se miran en una muestra.
- **Exactitud o veracidad:** Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero.

- **Homocedasticidad:** Multivariable estadística que considera la varianza de la variable error constante. La Homocedasticidad es que la varianza de los residuos es constante y no varía en los diferentes niveles del factor.
- **Impurezas:** Sustancias ajenas a la fórmula cualicuantitativa que pueden provenir de los procesos de fabricación y de almacenamiento, incluyendo la degradación de las materias primas (principios activos y productos farmacéuticos auxiliares) y formas de dosificación.
- **Intervalo:** Amplitud entre las concentraciones inferior y superior de analito (incluyendo esos niveles), en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.
- **Límite de cuantificación:** Mínima cantidad del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptable.
- **Límite de detección:** Mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.
- **Linealidad:** Capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.
- **Matriz:** Está conformado por el principio activo y los excipientes que dependerá del preparado farmacéutico.
- **Método Analítico:** Adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado, en la cual se identifican los recursos materiales y el procedimiento.

- **Muestra:** Porción del material a evaluar.
- **Parámetros de desempeño analítico, parámetros de mérito o elementos requeridos para el ensayo de validación:** Características de validación que necesitan ser evaluadas y que típicamente corresponden a la siguiente lista: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo de linealidad.
- **Precisión Intermedia:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.
- **Precisión:** Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.
- **Procedimiento analítico:** Descripción detallada de los pasos necesarios para aplicar un método analítico.
- **Profilaxis:** Conjunto de medidas que se toman para la prevención de una enfermedad.
- **Repetibilidad:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.
- **Validación de un procedimiento analítico:** Procedimientos para establecer pruebas documentadas que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuados para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar

de un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

- **Validación del método analítico:** Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.
- **Validación:** Establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.

ABREVIATURAS

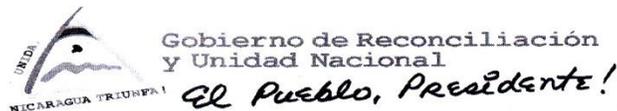
- **%**: Porcentaje
- \bar{x} : Media aritmética de x
- \bar{y} : Media aritmética de y
- \hat{y} : y ponderada
- **a**: Intercepto
- **Abs**: Absorbancias
- **b**: Pendiente
- **BPM**: Buenas Prácticas de Manufactura
- **COMEICO**: Consejo de Ministros de Integración Económica de Centroamérica
- **Conc.:** Concentración
- **CV**: Coeficiente de variación o desviación estándar relativa
- **CV_{y/x}**: Coeficiente de variación de regresión
- **FDA**: Agencia de Alimentos y Medicamentos (Food and Drugs Administration)
- **IC**: Intervalos de confianza
- **ICH**: Conferencia Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano.
- **IR**: Infrarrojo
- **LNCCM**: Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos
- **LOD**: Limite de detección
- **LOQ**: Limite de cuantificación
- **mg**: Miligramos
- **MINSA**: Ministerio de Salud
- **mL**: Mililitro
- **Mta**: Muestra
- **nm**: Nanómetros
- **OMS**: Organización Mundial de la Salud
- **p.a**: Principio activo
- **r**: Coeficiente de correlación
- **r²**: Coeficiente de determinación

- **RTCA:** Reglamento Técnico Centroamericano
- **S:** Desviación estándar
- **S²:** Varianza
- **SCT:** Suma de cuadrados total
- **SCE:** Suma de cuadrados residual
- **SC_{REG}:** Suma de cuadrados de la regresión
- **UNAN:** Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
- **USP:** Farmacopea de los Estados Unidos de América
- **UV:** Ultra violeta
- **Vis:** Visible
- **µg/mL:** Microgramo por mililitro
- **µg:** Microgramo

ANEXOS



1. CARTA DECLARATORIA DEL LABORATORIO NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS



2015
Varios Adelante!

Managua, 26 de febrero 2016

CONSTANCIA

A quien corresponda:

La suscrita directora del Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos, del Ministerio de Salud hace constar que durante los equipos utilizados en este laboratorio cumplen con la Norma NTN 04-001-05 "Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Ensayo y de Calibración"

En este sentido los equipos son calibrados y cualificados anualmente entre ellos:

- Espectrofotómetro Ultravioleta- Visible marca Age4lin 8453, serie TN02501472
- Disolutor Hansson, serie 080210102
- Balanza analítica Ohaus Explore modelo EX 224, serie B441115826

Se extiende la presente para fines de completar requisitos en la defensa de monografía, en la ciudad de Managua, a los veintiséis días del mes de febrero del año dos mil dieciséis


Nubia Argentina Blanco Sampson
Directora
Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Med.



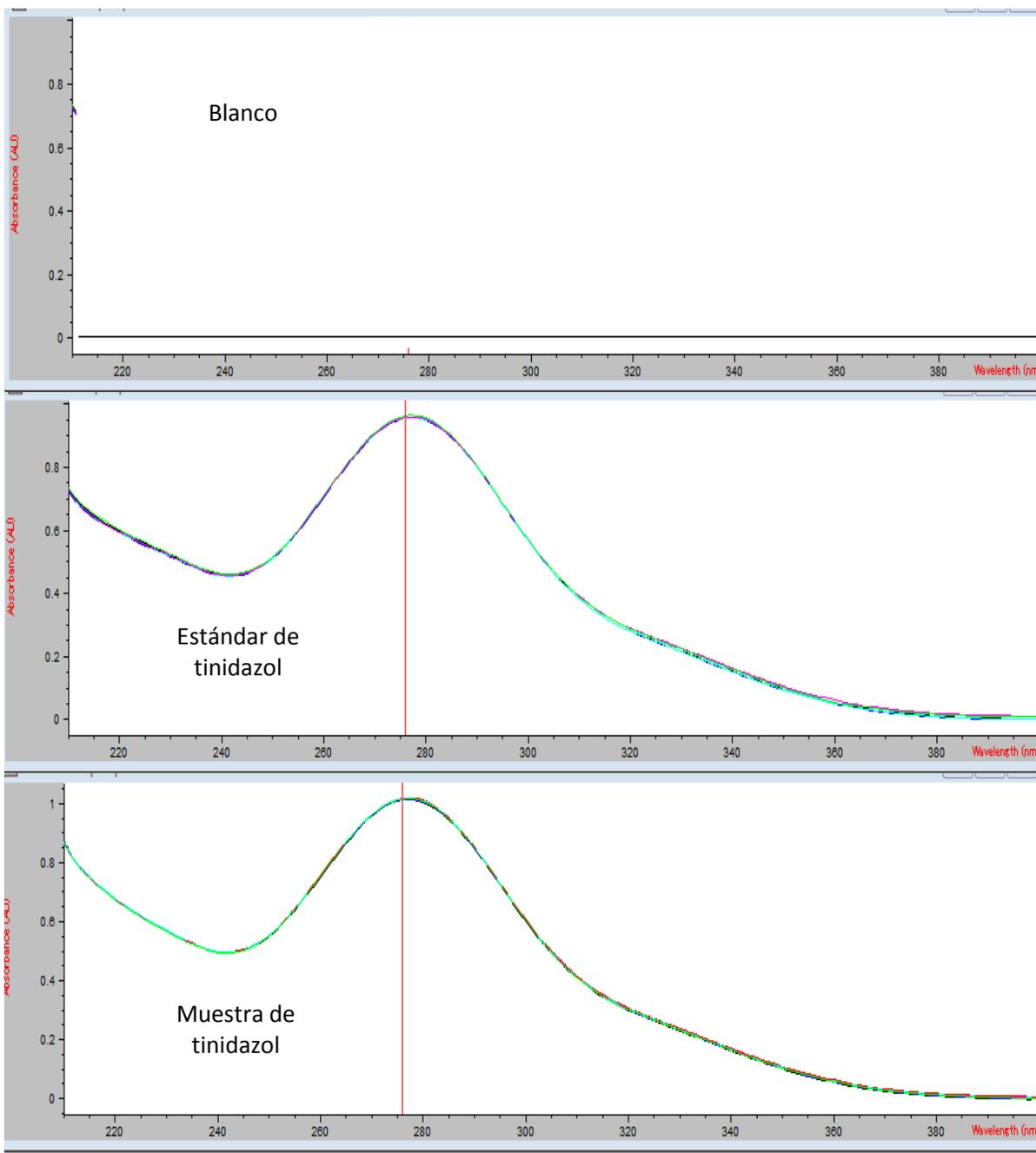


FE,
FAMILIA
Y COMUNIDAD!
EN VICTORIAS!

MINISTERIO DE SALUD
DIRECCIÓN GENERAL DE REGULACIÓN SANITARIA
LABORATORIO NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS
Calle 15 de Septiembre de la gasolinera UNO Xolotlan 2 ½ cuadra al Oeste, Managua,
Nicaragua Telefax: (505) 22441925, www.minsa.gob.ni E:mail lnccm@minsa.gob.ni

2 IDONEIDAD DEL MÉTODO EN ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

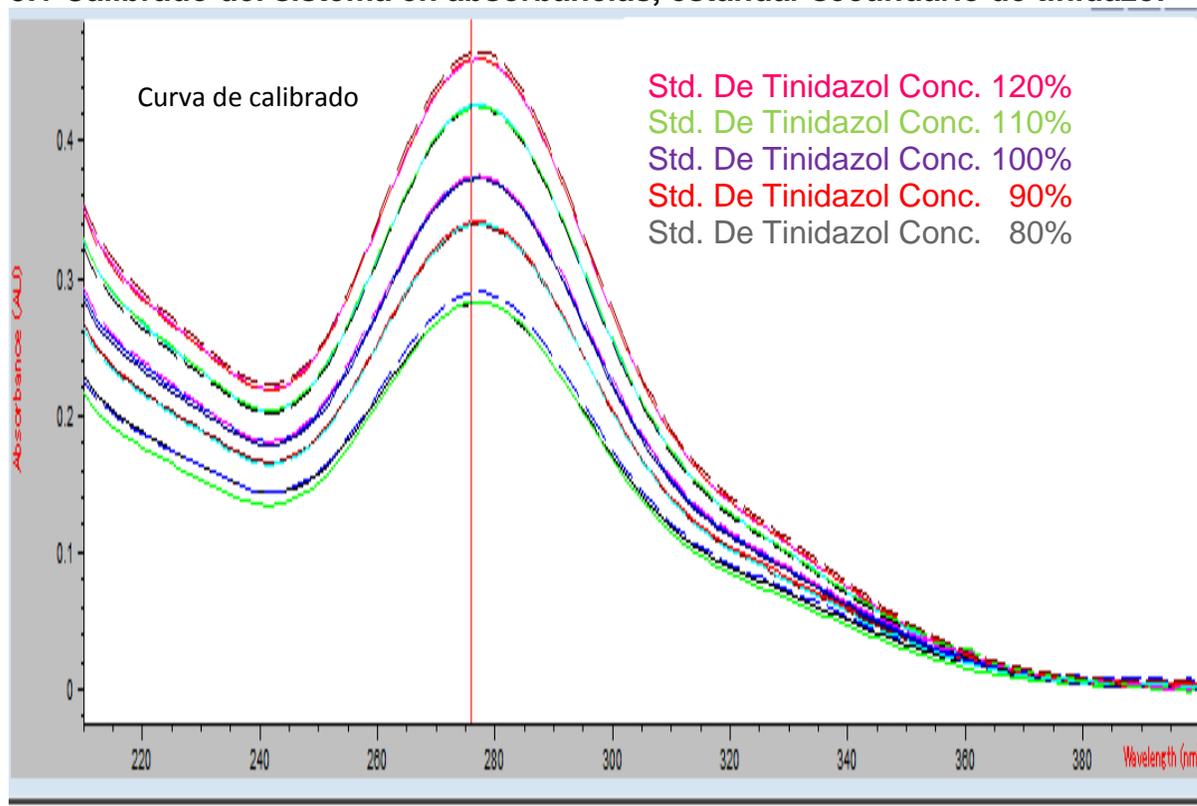
2.1 Idoneidad del método para la cuantificación de tinidazol tableta de 500 mg.



Fuente: Chemstation Software Agilent 8453 series

3 CALIBRADO DEL SISTEMA EN ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE

3.1 Calibrado del sistema en absorbancias, estándar secundario de tinidazol



Fuente: Chemstation Software Agilent 8453 series

3.2 Cálculos para las concentraciones

$$40 \mu\text{g}/\text{mL} \longrightarrow 100 \%$$

500 mg declara la tableta, para obtener una concentración que se ajuste bien a la curva de calibración se parte de una concentración 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se toma una alícuota de 5 mL para obtener esta concentración con el siguiente calculo.

24.15 mg tinidazol = 20 mg transferidos en un matraz aforado de 100 mL multiplicado por el volumen tomado 5 mL entre el volumen del material volumétrico 25 mL por 1000.

$$\frac{20 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} * \frac{5 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} * 1000 = 40 \mu\text{g}/\text{mL}$$

Para obtener las concentraciones de la curva de calibración partimos de la concentración al 100 % utilizando una regla de tres.

$$\begin{array}{r} 100 \% \qquad \qquad 40 \mu\text{g}/\text{mL} \\ 80 \% \qquad \qquad \qquad X \\ X = 80 * 400 / 100 = 32 \mu\text{g}/\text{mL} \end{array}$$

Para obtener el volumen tomado para llegar a las concentraciones deseadas de igual manera se parte del volumen del 100 % utilizando una regla de tres.

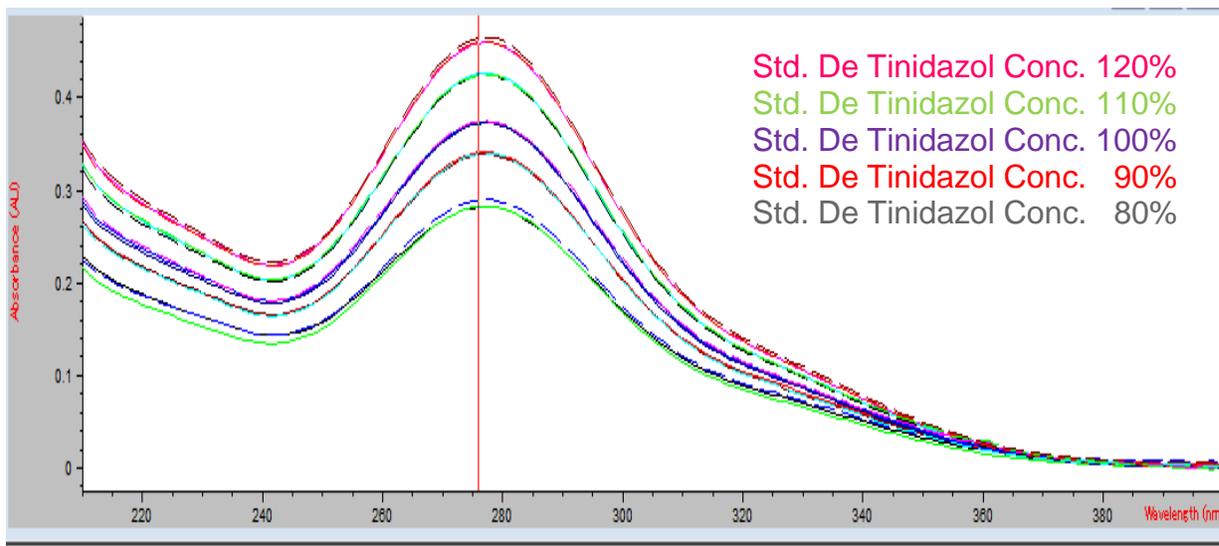
$$\begin{array}{r} 40 \mu\text{g}/\text{mL} \qquad \qquad 5 \text{ mL} \\ 32 \mu\text{g}/\text{mL} \qquad \qquad \qquad X \\ X = 32 * 5 / 40 = 4 \text{ mL} \end{array}$$

Así respectivamente se realizaron los cálculos para cada concentración para realizar la curva de calibrado, la linealidad del sistema, linealidad del método y para las tres concentraciones de la exactitud.

4. ESPECTROS DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO

4.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

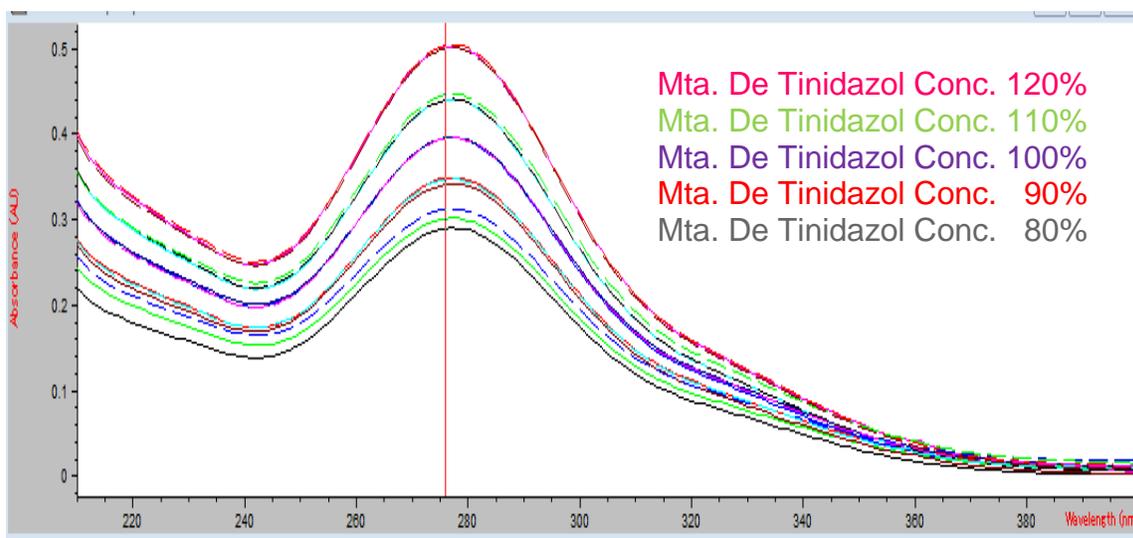
Linealidad del sistema en absorbancia, estándar de Tinidazol.



Fuente: Chemstation Software Agilent 8453 series

4.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Linealidad del método en absorbancia, muestra de tinidazol tableta 500 mg.

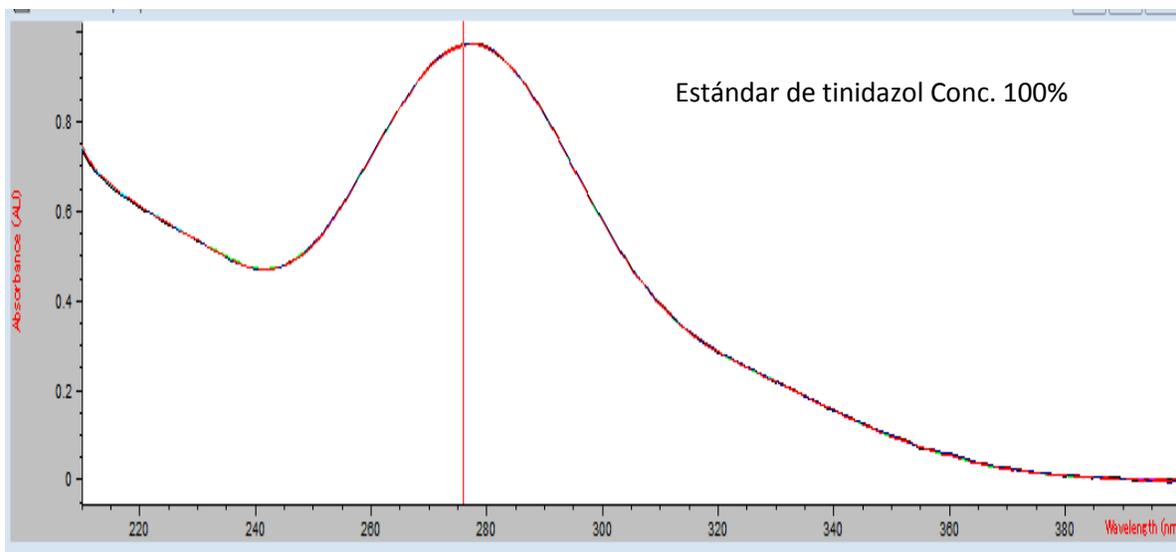


Fuente: Chemstation Software Agilent 8453 series

5. ESPECTRO DE LA PRECISIÓN EN CONDICIONES DE REPETIBILIDAD DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO

5.1 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

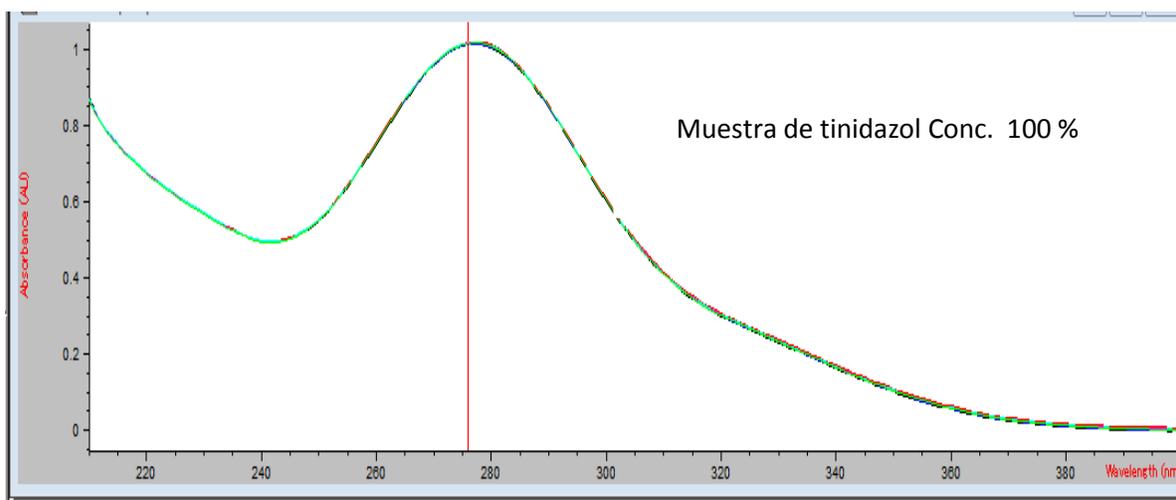
Repetibilidad del sistema en absorbancia, estándar de tinidazol.



Fuente: Chemstation Software Agilent 8453 series

5.2 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

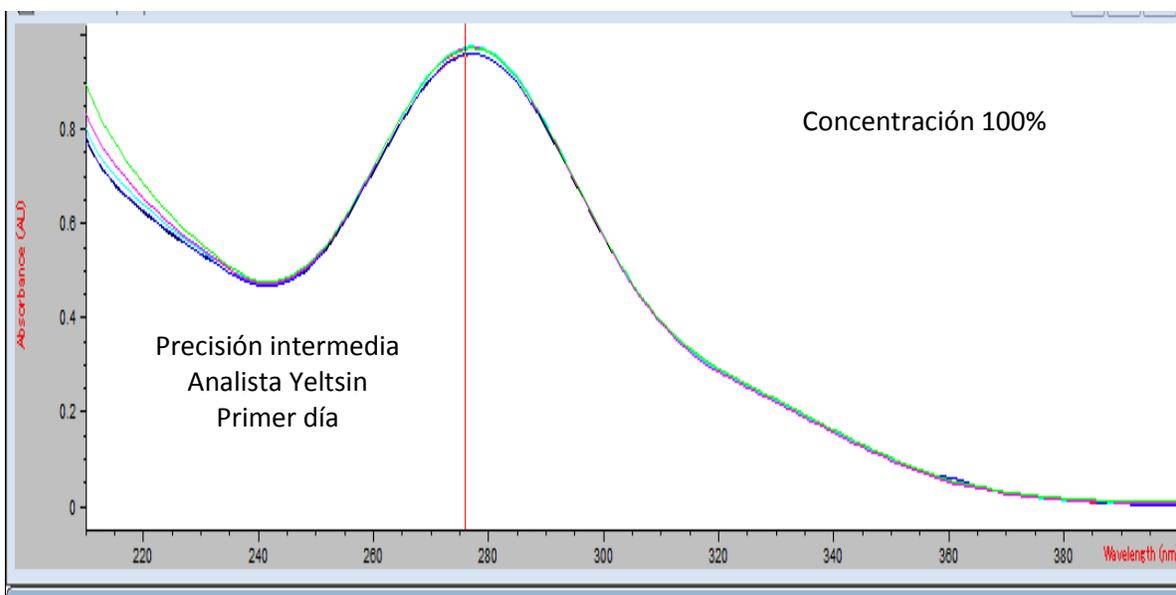
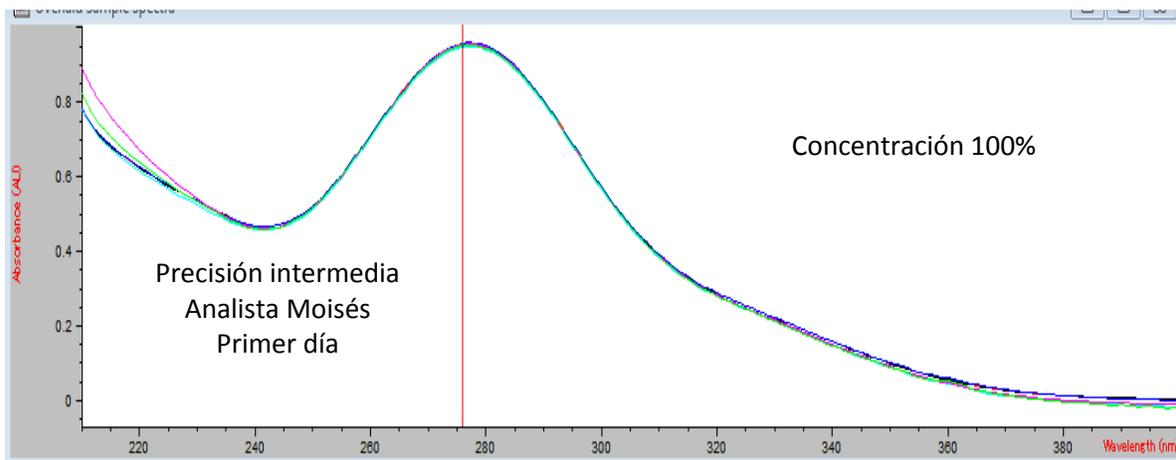
Repetibilidad del método en absorbancia, muestra de tinidazol tableta 500 mg.



Fuente: Chemstation Software Agilent 8453 series

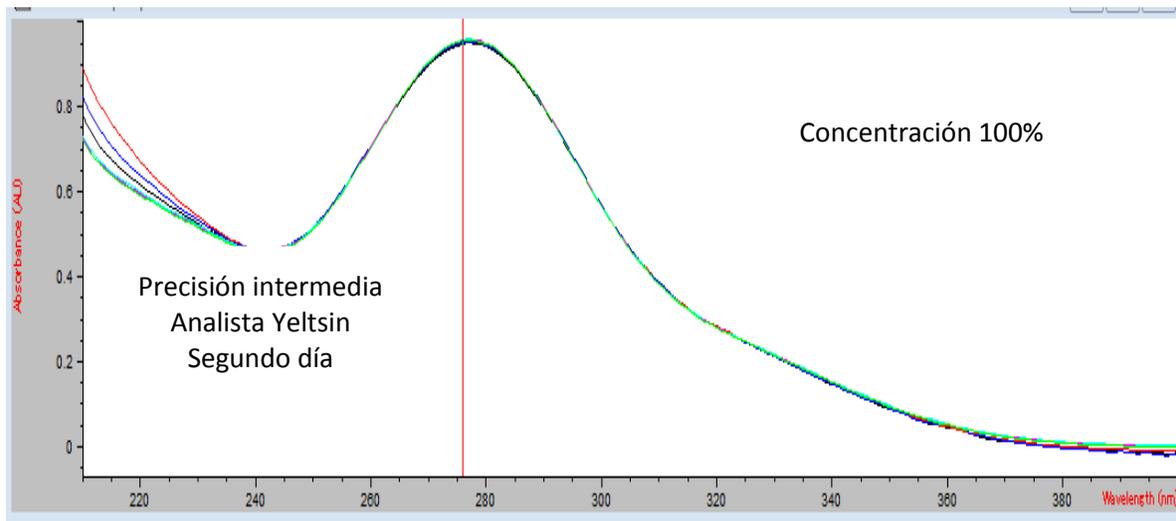
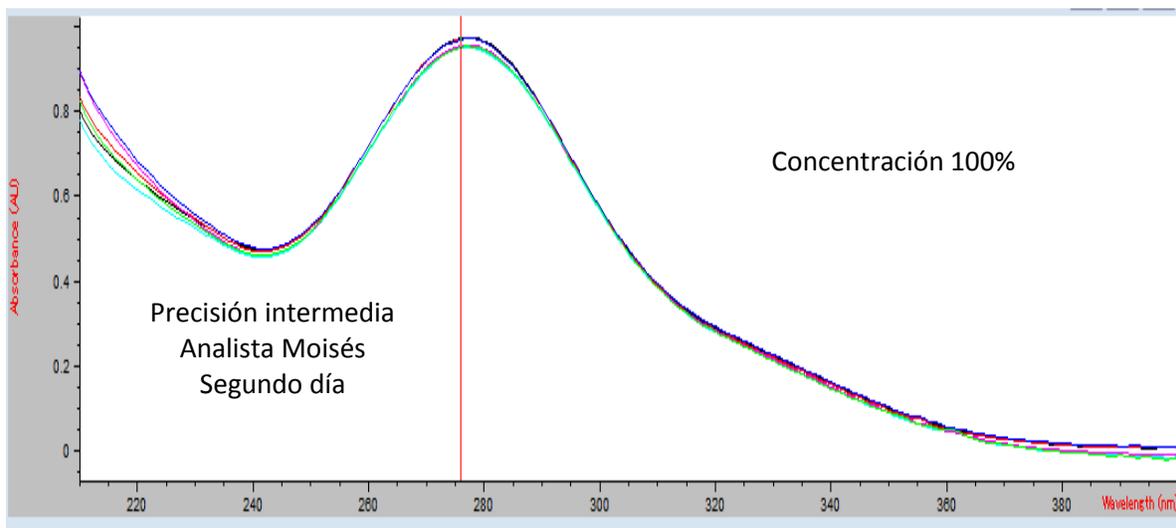
5.3 PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE MUESTRA DE TINIDAZOL TABLETA 500 MG INTERANALISTA-DÍA 1

Precisión intermedia INTER-ANALISTA DIA 1



Fuente: Chemstation Software Agilent 8453 series

5.4 PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE MUESTRA DE TINIDAZOL TABLETA 500 MG INTERANALISTA-DÍA 2

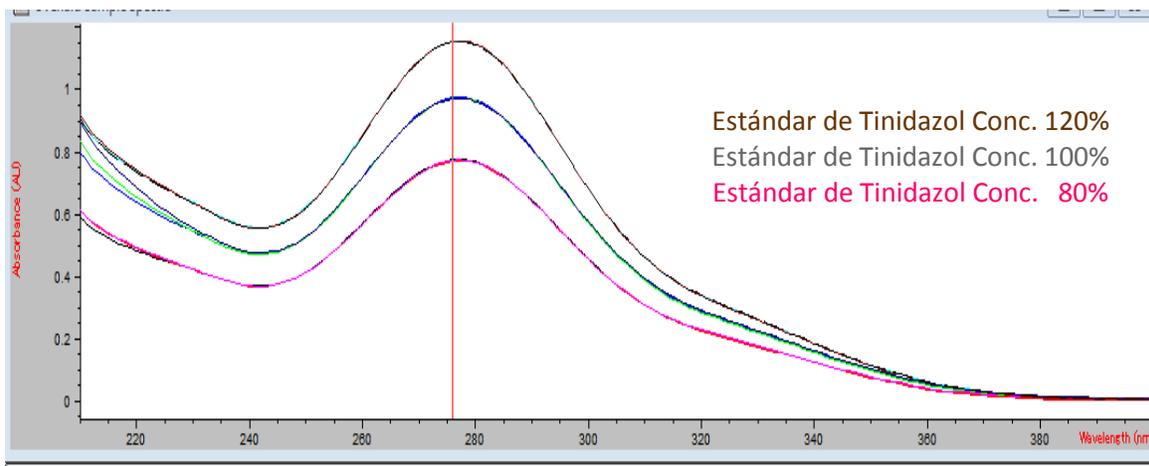


Fuente: Chemstation Software Agilent 8453 series

6. ESPECTRO DE LA EXACTITUD DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO

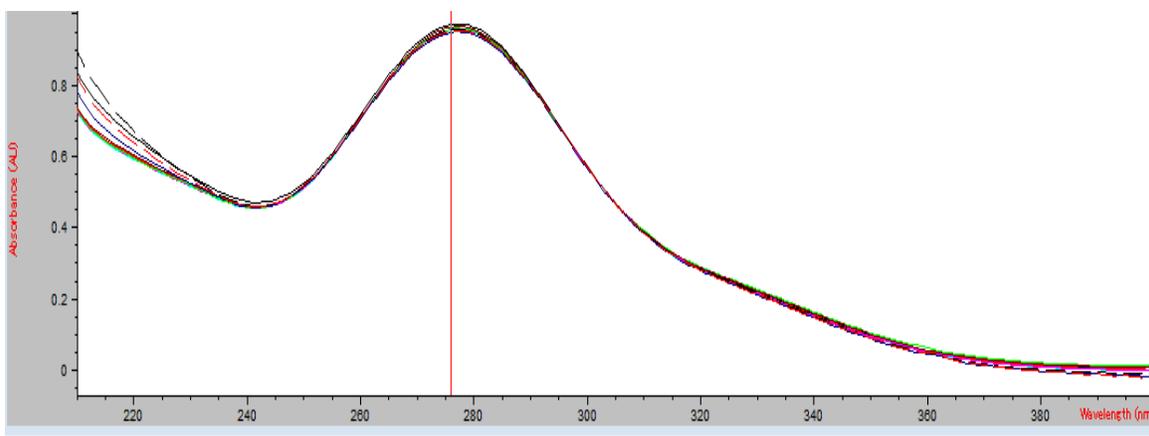
6.1 EXACTITUD DEL SISTEMA

Exactitud del sistema en absorbancia



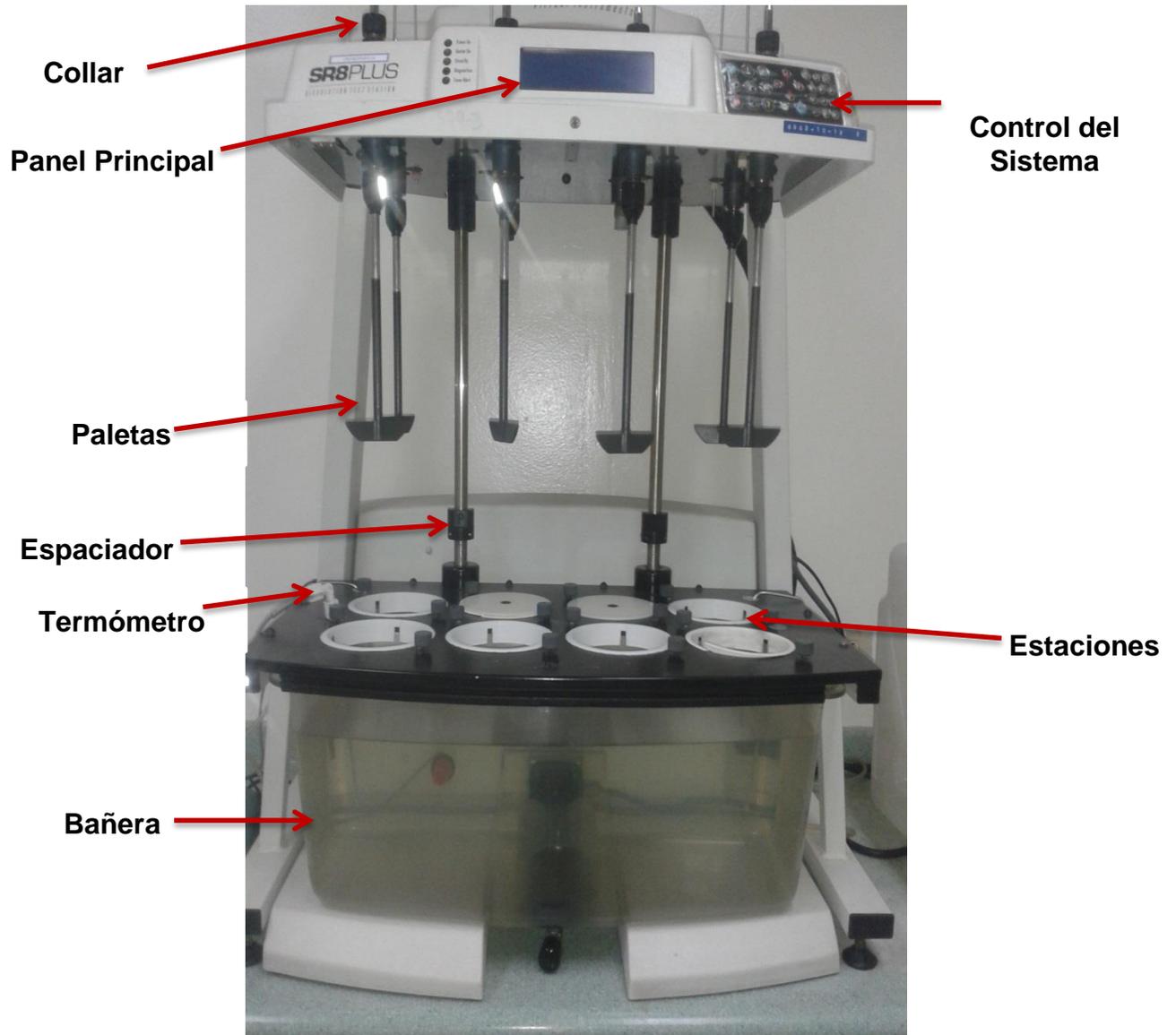
Fuente: Chemstation Software Agilent 8453 series

6.2 EXACTITUD DEL MÉTODO



Fuente: Chemstation Software Agilent 8453 series

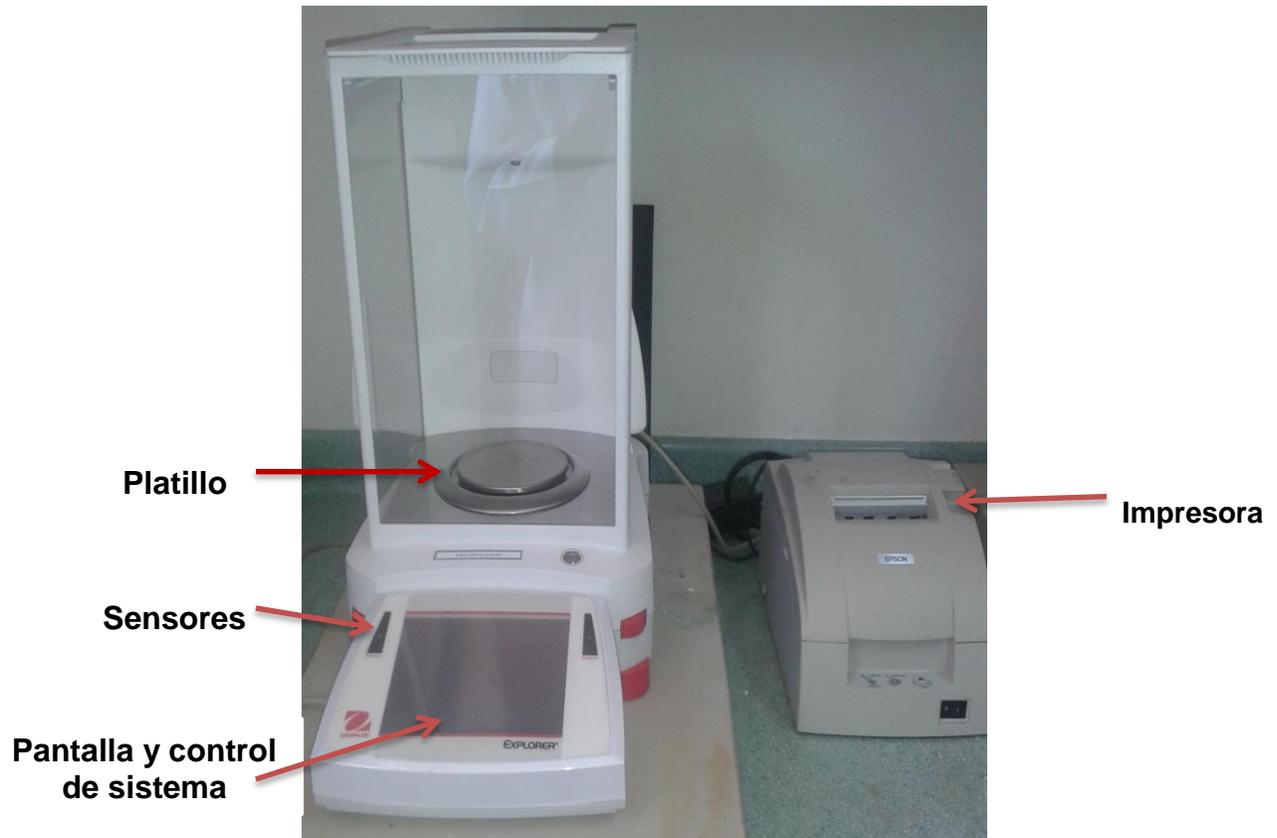
PARTES DEL DISOLUTOR HANSON RESORD



PARTES DEL ESPECTROFOTÓMETRO AGILENT 8453 SERIES



PARTES DE LA BALANZA ANALÍTICA OHAUS EXPLORER



Anexo N° 13
MONOGRAFÍA INDIVIDUAL DE TINIDAZOL MATERIA PRIMA
USP 36

Anexo N° 14
REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO 11.03.39:06

Anexo N° 15
CAPÍTULO GENERAL DE ESPECTROFOTOMETRÍA Y DISPERSIÓN DE LA LUZ
USP 36

Anexo N° 16
CAPÍTULO GENERAL DE DISOLUCIÓN
USP 36

Anexo N° 17
CAPÍTULO GENERAL DE VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS
FARMACOPEICOS USP 36

Anexo N° 18
TABLAS ESTADÍSTICAS